



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Génie des Procédés et de l'Environnement*

Présentée et soutenue par *Céline CHRISTOPHE*
Le jeudi 14 Octobre 2010

Titre :

*Intégration de microcapteurs électrochimiques en technologies
"Silicium et Polymères" pour l'étude du stress oxydant.
Application à la biochimie cutanée*

JURY

*Maurice COMTAT, Professeur Emérite - LGC Toulouse,
Corinne DEJOURS, Professeur d'Université - IMS Bordeaux
Rosaria FERRIGNO, Professeur d'Université - INL Lyon
Pierre GROS, Professeur d'Université - LGC Toulouse
Jérôme LAUNAY, Maître de Conférences - LAAS-CNRS Toulouse
Pascal MAILLEY, Maître de Conférences - CEA/INAC Grenoble, Rapporteur
Hubert PERROT, Directeur de Recherche - LISE-CNRS Paris, Rapporteur
Emmanuel QUESTEL - Responsable Unité Photobiologie - CERP - PFDC Toulouse*

Ecole doctorale : *Mécanique, Energétique, Génie Civil et Procédés (MEGeP)*
Unité de recherche : *Laboratoire de Génie Chimique – UMR 5503 Toulouse*
Directeurs de Thèse : *Pierre GROS et Jérôme LAUNAY*

Remerciements

Avant propos : la thèse est un cheminement, des rencontres, des rêves.... Un cheminement ... oui car si j'y réfléchis ce sont les enseignements, les professeurs qui transmettent leurs passions, l'initiation à la physique chimie qui au fil des années devient la chimie physique.... Des rencontres, qui vous font prendre des directions que vous n'auriez pas imaginées ou que vous songiez quasi-inaccessibles..... Des rêves Oui.... Penser recherche, développement, innovations, pour une application à visée médicale et travailler avec des personnes qui sont passionnées.

Les Laboratoires Pierre Fabre m'ont permis de réaliser cette thèse. Et à ce titre, je souhaiterais remercier très vivement le docteur Anne Marie Schmitt pour m'avoir ouvert les portes de son Centre de Recherche sur la Peau. Je tiens à remercier Emmanuel Questel pour avoir accueilli ce projet dans son unité de Photobiologie.

Ces travaux de recherche ont été également effectués au sein de deux laboratoires, le Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes du CNRS et le Laboratoire de Génie Chimique. Je remercie leurs directeurs, respectivement, Raja Chatila et Joël Bertrand, ainsi que le directeur adjoint du LCG Pierre Aimar.

Ce travail de thèse est un travail d'équipe et je voudrais en ce sens remercier mes deux... mes trois encadrants de thèse, Pierre Gros, Jérôme Launay et Pierre Temple-Boyer. Malgré l'éloignement du laboratoire (la traversée d'un canal peut être toujours un obstacle) mais surtout son titre de professeur qui ne lui laissait guère de temps, Pierre Gros a toujours su trouver des disponibilités pour suivre ce travail et conseiller mes orientations. Dans le monde des présentations et des équations, Pierre Temple Boyer est le roi de la préparation des planches et des intégrales !!! Mais il m'a toujours laissé la porte ouverte pour entrecouper ses réflexions des miennes ! Je voudrais remercier particulièrement Jérôme Launay. Outre le fait qu'il ait eu à me supporter dans le bureau, il m'a surtout initiée aux joies de la salle blanche, confrontée à différents points de vue et toujours apporté et appris son savoir technologique. Je n'oublierai pas non plus son sens de l'humour lié à mes indénombrables fous rires mais également ses mots lors de ma soutenance.

Je voudrais remercier très chaleureusement Maurice COMTAT (l'initiateur), professeur émérite, qui m'a fait la joie d'être le président de mon jury de thèse. Son initiation à l'électrochimie fut, pour moi, un virage dans mes études. Il a su transmettre sa passion, je me souviens encore de sa démonstration, de sa représentation de la diffusion... pour moi ce fut la visualisation de l'extrêmement petit à l'échelle humaine... Je le remercie pour ses enseignements, ses conseils, sa force motrice qui m'a poussée à « conquérir » de nouveaux horizons. Il m'aura aussi beaucoup apporté pendant la thèse, ces idées, ces discussions auront toujours été enrichissantes et m'auront appris énormément.

Je tiens à remercier Pascal Mailley et Hubert Perrot pour avoir accepté de rapporter mon travail ainsi que les autres membres du jury, Rosaria Ferrigno et Corinne Dejous, pour leur participation à ma

soutenance. Je les remercie pour leurs conseils et leurs commentaires qui m'ont permis d'améliorer le manuscrit et de moduler mon regard sur ma thèse.

Même si mes visites étaient ponctuelles, je remercie le personnel du Centre de Recherche sur la Peau Pierre Fabre, et plus particulièrement les équipes de photobiologie et de biologie cellulaire, Valérie, Anne-Lise, Christiane, Cécile, Pascale, Sandrine, Ophélie, Sabine... Vous m'avez initiée à un monde inconnu qu'est la peau et plus largement le monde du vivant et votre accueil a toujours été chaleureux.

Ce travail doit également beaucoup à l'équipe TEAM, l'âme, le cœur, la sagesse, l'encyclopédie technologique. Imaginez... Vous rentrez dans le sas pour enfiler votre combinaison à votre nom, tout y est parfaitement rangé... Merci Monique pour ta rigueur ! ... Et puis vous pénétrez dans ce que j'appelle l'aire de jeux, celle où votre imagination peut vous amener loin tellement les possibilités sont quasi-infinies... En face de vous l'équipe métallisation ! Quelle équipe ! Un infini MERCI à Ludo et Seb (sans oublier le petit dernier Mathieu) pour tous, tous, tous ces dépôts !!! ... à votre gauche, Boubou, pour mes oxydes ! À droite, et on rentre dans le vif du sujet, la photolithographie ! Que de remerciements je leur dois pour toutes les réponses qu'ils m'ont apportées. Véro ou l'inépuisable source de culture au sujet des résines (citons notre amie en commun la SU-8) ! Laurent et Fabien, les rois des équipements, merci à Laurent pour ses formations et à Fabien pour toute la chimie qu'il sait si bien transmettre. Plus loin, la zone électrochimie ! Merci à David pour tous mes dépôts de SU-8 éliminés ! Au fond, la zone caractérisation où l'infiniment petit est observable ! Merci à Christina pour son apprentissage. Et puis, la zone assemblage, merci à David C., Samuel et Thierry pour leurs formations et leur aide ! En plus de l'enseignement scientifique et technique, toutes ces personnes ont rendu mon séjour au LAAS et plus largement ces trois années (avec ces moments « récréatifs ») inoubliables. Leurs compétences et leur bonne humeur sont un moteur sans frein pour rentrer tous les matins dans cette merveilleuse centrale technologique. Je n'oublie pas non plus Eric, Jean Christophe, Christine, Monique D., Norbert, Franck (quelle formation MEB !), Pierre-François, Djaffar, Stéphane, Bernard, Jean-Baptiste... et Hugues le responsable de cette belle équipe. Je vous remercie tous pour votre gentillesse et toutes les réponses que vous avez pu fournir ! Dans le même contexte, je remercie également Sandrine (21). Je profite de ce paragraphe pour les remercier aussi pour avoir accepté de tester mes dispositifs et être mes cobayes de choix ! *Grâce eux, j'ai commencé à visualiser des résultats positifs et très encourageants ! Merci car ce fut inestimable pour moi !*

Mes journées au LAAS ont également été égayées par toutes les personnes qui y ont séjourné, notamment en salle blanche, qui m'ont fait part de leur expérience et dont les conseils ont été précieux: Pierre Y. (une autre vision du monde), Hélène, Marine, Hamida, Gustavo, Yannick, Rémy, Aline... Fadhila, Arnaud, Jonathan, Maeva, Marie-Laure.....

Je remercie mes amis d'enfance, d'étude, de cœur.... qui malgré nos chemins différents ont été d'un grand soutien et votre présence, pour ceux qui l'ont pu à ma soutenance (Merci à Marjorie) m'a beaucoup touchée.

Chose promise, chose due, un grand merci à mes chouchous Jet d'Ail et Caro. Un grand grand grand merci à toi Caro, quelques soient les kilomètres qui nous séparent, ton soutien, tes messages culturels quotidiens et les très beaux moments que tu m'as fait partager sont et resteront inoubliables !!!!

Pour finir, je remercie mon soutien sans faille, ma famille : mon oncle et sa tribu, ma grand-mère, ma sœur et sa petite famille Seb, Ella et mon Lulu qui m'a beaucoup aidée pour la rédaction, Moussy.

Je termine par remercier ceux sans qui je ne serais jamais arrivée jusqu'à ces quelques lignes, je leur dois tant : Merci Maman, Merci Papa. Je vous dédie ce travail !

Je dédie ce titre à mon grand-père. J'aurais tant aimé partager ce moment avec toi !

Sommaire

Introduction générale	1
------------------------------	----------

Chapitre I : État de l'art des microcapteurs électrochimiques

I. Quelques éléments théoriques d'électrochimie	7
A. Quelques définitions	7
1. Notion de potentiel	7
2. Polarisation et surtension	8
3. Chaîne électrochimique	9
4. Processus faradiques et non faradiques	10
5. Capacité de la double couche électrochimique	10
B. Chaînes électrochimiques traversées par un courant	11
1. Description des phénomènes	11
2. Différents régimes cinétiques	11
C. Méthodes expérimentales électrochimiques	19
1. Choix et positionnement des électrodes	20
2. La voltammétrie cyclique	21
3. Allure et informations des voltammogrammes	21
D. Les microélectrodes	24
1. Transport de matière et voltammétrie	24
2. Réduction du courant capacitif	24
3. Diminution de la chute ohmique	25
4. Avantage de leur taille	25
5. Réseaux d'ultramicroélectrodes	25
II. De la pile aux biocapteurs électrochimiques	29
A. Naissance et histoire de l'électrochimie	29
B. Capteurs électrochimiques pour l'analyse biomédicale	31
C. Fabrication et enjeux économiques	32
1. Fabrication des microélectrodes	32
2. Applications et enjeux économiques	34
III. Développement de microélectrodes appliquées à l'analyse de la peau	35
A. La peau et le stress oxydant	35
1. La peau : une structure particulière, siège de fonctions essentielles à la vie	35
2. Le stress oxydant : un déséquilibre aux origines et conséquences multiples	37
B. Méthodes d'exploration du stress oxydant	39

1. Mesure directe des radicaux libres	40
2. Evaluation des métabolites issus des réactions radicalaires	40
3. Analyse des antioxydants	42
4. Evaluation de la capacité antioxydante totale	43
5. Limitations	43
C. Nouvelle méthode exploratoire aux avantages prometteurs	44
Conclusion	47

Chapitre II : Intégration des microdispositifs électrochimiques

I. La technologie pour les microélectrodes	55
A. Les matériaux d'électrodes et leurs techniques de dépôts	56
B. Les procédés d'intégration – La définition des motifs	58
1. La photolithographie	58
2. Les procédés soustractifs	59
3. Les procédés additifs	61
4. Le lift-off	61
5. Le « screen printing »	62
6. L'imprinting et le microcontact printing	62
C. Les matériaux d'isolation électrique	63
1. Les matériaux inorganiques	63
2. Les matériaux organiques	63
II. Cahier des charges et choix associés	64
A. Configuration du dispositif électrochimique miniaturisé	64
1. Structures proposées dans la bibliographie	64
2. Choix des géométries et des tailles	68
B. Procédé d'intégration	70
C. Procédé d'isolation	71
D. Electrode de référence	72
III. Description du procédé de fabrication des dispositifs électrochimiques	74
A. Procédé de fabrication	76
B. Mise au point et optimisation du procédé de fabrication	79
1. Lift-off	80
2. Validation du processus de fabrication	83
3. Solution SU-8	91
4. Electrode de référence Ag/AgCl	100

Chapitre III : Application du dispositif électrochimique pour une analyse de l'état rédox en surface de la peau

I. Détection des antioxydants en solutions modèles	111
A. Matériels et méthodes	111
1. Le montage électrochimique	L 111
2. Les microélectrodes	L 112
3. Les caractérisations	C 112
B. Détection électrochimique de l'acide ascorbique	112
1. Le mécanisme d'oxydation	M 113
2. L'oxydation électrochimique sur une microélectrode d'or	O 114
C. Détection électrochimique de l'acide urique	115
1. Le mécanisme d'oxydation	M 115
2. L'oxydation électrochimique sur une microélectrode d'or	O 115
D. Détection électrochimique d'un mélange équimolaire d'acide ascorbique et d'acide urique	116
1. La détection des deux acides	D 117
2. Sur une électrode d'or	S 117
II. Détection électrochimique pour l'analyse du milieu cutané	118
A. Avantages du microdispositif électrochimique	118
B. Performances des dispositifs réalisés	120
1. Microdispositif avec une couche d'isolant de 3 μm	120
2. Microdispositif avec une couche d'isolant de 1,6 μm	121
3. Microdispositif avec une couche d'isolant de 0,9 μm	125
III. Etude de l'activité électrochimique parasite	132
A. Comportement électrochimique du titane	132
B. Electroactivité du polymère époxy SU-8	134
C. Influence des paramètres de réticulation	138
1. Etude FTIR	138
2. Etude électrochimique	139

Conclusion	141
Conclusion générale	147
Principaux symboles	149
Abréviations	151

Introduction générale

L'électrochimie, discipline d'association des processus chimiques et de l'électricité, offre depuis plus d'un siècle un grand nombre de procédés dans des champs d'applications diversifiés : analyse, énergie, traitement de surface, synthèse... L'électrochimie analytique est particulièrement sollicitée par notre société actuelle, avide de proposer des outils de contrôle de la qualité des produits chimiques ou agroalimentaires, de suivi de l'environnement et d'aide au diagnostic des problèmes de santé inhérents au vieillissement de la population et à son mode de vie. Cette discipline est née avec la polarographie dans les années 1920 et s'est fortement développée à partir des années 1990 comme en témoigne la Figure A, montrant l'évolution du nombre annuel de publications scientifiques selon la base données ISI Web of Knowledge. Cette date coïncide avec le développement des microélectrodes qui apportent une nouvelle dimension à cette méthode d'analyse.

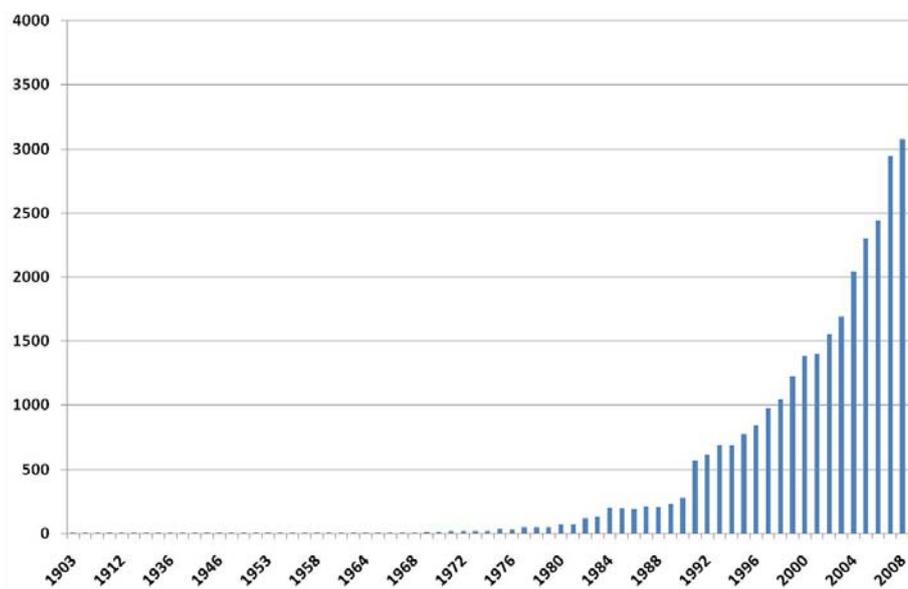


Figure A : Nombre de publications scientifiques comprenant les termes « analyse électrochimique » selon la base de données ISI Web of Knowledge

En 2010, les communications scientifiques dédiées à l'analyse électrochimique mettent en avant un certain nombre de thèmes de recherche parmi lesquels l'étude du stress oxydant. En effet, le stress oxydant est un syndrome résultant d'un dérèglement de l'état d'oxydoréduction des tissus et est associé à un grand nombre de maladies. Les facteurs déclenchant ainsi que les mécanismes de développement ne sont pas toujours bien clarifiés et expliqués et, l'efficacité des traitements n'est pas toujours bien évaluée.

Le stress oxydant se caractérise par une production excessive de molécules oxydantes très réactives, comme les radicaux libres. Ces dernières provoquent des dommages sur les protéines, les membranes, etc. L'organisme dispose cependant de différents mécanismes de défense. L'un d'eux

implique des molécules antioxydantes de faible poids moléculaire (acide urique, acide ascorbique, glutathion...) qui réagissent avec les radicaux libres au cours de réactions d'oxydoréduction thermodynamiquement spontanées.

La peau est une cible particulière du stress oxydant puisqu'elle constitue le tissu le plus largement exposé aux agressions extérieures quotidiennes comme les irradiations ultra-violettes et les polluants chimiques. Un vieillissement prématuré du tissu cutané est généralement la conséquence de ce déséquilibre qui peut être également impliqué dans différentes pathologies dermatologiques. Le Centre de Recherche sur la Peau des Laboratoires Pierre Fabre dédie ses recherches à l'exploration de notre enveloppe corporelle et à l'évaluation de la tolérance et de l'efficacité des produits dermo-cosmétiques ou de tout autre dispositif à orientation dermatologique développé au sein du Groupe.

Les méthodes exploratoires du stress oxydant sur l'organisme sont diverses. Elles sont généralement réalisées par chimiluminescence, par chromatographies liquide ou gazeuse... en fonction des espèces analysées (radicaux libres, produits d'oxydation, espèces antioxydantes). Cependant, ces techniques sont pour la plupart complexes, onéreuses et nécessitent souvent une biopsie du tissu étudié. Or la compréhension des processus liés au stress oxydant et de leur évolution nécessite des outils analytiques fiables et simples d'utilisation. Ces derniers participent également à l'établissement d'un diagnostic et d'une thérapeutique adaptée.

L'électrochimie constitue une approche alternative pour l'étude et l'analyse des propriétés antioxydantes d'un milieu complexe. Les appareillages nécessaires sont beaucoup moins coûteux et les protocoles expérimentaux bien plus simples. Les avantages certains que peut apporter cette discipline à l'exploration du milieu cutané sont le moteur de la collaboration qui unit depuis 2001 l'Institut de Recherche Pierre Fabre et l'équipe « Capteurs Electrochimiques et Procédés » du Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse. Les premières années ont permis de démontrer les potentialités des techniques électrochimiques utilisant les microélectrodes pour l'analyse de l'état rédox de milieux biologiques réels. Ces dernières sont capables d'informer en temps réel sur le pouvoir antioxydant global et de détecter la présence de plusieurs antioxydants hydrophiles. Si la pertinence de la démarche a été confirmée, les travaux réalisés au cours d'une première thèse soutenue en 2005 ont également mis en lumière un certain nombre de difficultés. En effet, le protocole de fabrication et d'utilisation des microélectrodes n'est pas en adéquation avec l'emploi en routine de la méthode. Pour remédier à ce problème et pérenniser cette méthode d'exploration, le mode de fabrication manuelle doit être repensé par un procédé issu des microtechnologies « Silicium & Polymères ». Cette approche a donné lieu à une nouvelle collaboration en 2007, dans le cadre d'un projet industriel soutenu par la région Midi-Pyrénées, impliquant le groupe Pierre Fabre, le Laboratoire de Génie Chimique et l'équipe Microcapteurs et Microdispositifs de Détection du LAAS-CNRS (Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes).

L'objectif de ce projet est de remplacer le protocole de fabrication des électrodes à l'unité par un procédé de fabrication collective de microélectrodes utilisant les technologies de la microélectronique pour disposer d'un outil d'analyse miniaturisé, disponible en grande quantité avec des propriétés identiques. Ce dernier devrait permettre, lui aussi, de donner in fine des informations en direct sur l'état d'oxydation du milieu cutané et de suivre la dynamique des processus métaboliques, notamment à la suite de diverses agressions. Le cœur du travail qui fait l'objet de ce mémoire est donc d'étudier et d'optimiser les procédés d'intégration des couches métalliques

propres aux réactions électrochimiques étudiées : or, platine, argent. Cette phase doit permettre de concevoir et de réaliser à l'aide de ces technologies des microélectrodes adaptées à l'analyse de la peau.

Ce manuscrit est composé de trois chapitres.

Le premier propose de montrer à travers quelques bases théoriques de l'électrochimie et quelques éléments mécanistiques du stress oxydant, l'intérêt d'un dispositif électrochimique pour l'analyse du milieu cutané. Pour mieux comprendre l'enjeu socio-économique du projet, une brève présentation des techniques existantes d'évaluation du stress oxydant est faite dans ce chapitre et le développement des biocapteurs électrochimiques y est rapidement dépeint.

En deuxième partie sont exposés les différents procédés possibles de fabrication des microélectrodes à l'aide des microtechnologies « Silicium & Polymères ». Les choix technologiques ainsi que le développement du protocole de réalisation des microdispositifs sont présentés. Afin de valider la fabrication, les propriétés électrochimiques des différents matériaux d'électrodes sont analysées et comparées à celles des matériaux massifs.

Les performances analytiques des microcapteurs sont étudiées dans le troisième chapitre. Le comportement électrochimique de deux principaux antioxydants, l'acide ascorbique et l'acide urique, sur des microélectrodes intégrées de fabrication collective, est comparé à celui observé sur les microélectrodes de fabrication manuelle. Ces performances sont également évaluées à l'aide de mesures réalisées directement à la surface de l'épiderme. L'électroactivité de la structure de la microélectrode et plus précisément des matériaux qui la composent est abordée, avec une attention particulière portée sur le polymère utilisé pour délimiter les microélectrodes.

Chapitre I

État de l'art des microcapteurs électrochimiques

Chapitre I : État de l'art des microcapteurs électrochimiques

Née il y a plus de 200 ans, l'électrochimie a de nombreuses applications dans divers domaines : métallurgie (élaboration et traitement des matériaux), stockage et conversion de l'énergie (piles et accumulateurs), analyse (capteurs pH, à oxygène, à glucose)... Pour mieux comprendre l'essor des capteurs électrochimiques comme dispositifs d'analyse et leurs avantages dans de nombreux axes de recherche (agroalimentaire, environnement, santé...), les principes sur lesquels reposent l'électrochimie doivent être définis et présentés dans leur contexte d'utilisation. Nous verrons ensuite comment cette discipline s'est développée depuis sa naissance jusqu'à l'arrivée des biocapteurs électrochimiques. Dans une dernière partie, le lien entre l'étude des propriétés physico-chimiques de la peau et l'électrochimie sera établi, expliquant la genèse du projet et les enjeux de la thèse.

I. Quelques éléments théoriques d'électrochimie

L'électrochimie est la discipline qui a en charge l'étude des interfaces entre un conducteur électronique et un conducteur ionique. Le conducteur électronique peut être un métal, du carbone, un semi-conducteur, un polymère conducteur, etc., capable d'assurer le transport de charge par le déplacement d'électrons. Des conducteurs tels que les électrolytes ou les sels fondus peuvent constituer le conducteur ionique. Ce dernier permet le transport de charge par le mouvement des ions. L'interface, surface entre les deux conducteurs, est appelée électrode.

Cette partie a pour objectif de donner aux non-spécialistes les éléments nécessaires à la compréhension des concepts et des théories électrochimiques. Ce chapitre ne prétend nullement à l'exhaustivité. Pour plus de détails sur les notions abordées, le lecteur pourra consulter différents ouvrages de référence (Fleischmann *et al.*, 1987 ; Montenegro *et al.*, 1991 ; Trémillon, 1993 ; Bard et Faulkner, 2001 ; Girault, 2007).

A. Quelques définitions

1. Notion de potentiel

Lorsqu'un conducteur électronique est plongé dans un électrolyte, la répartition des charges à l'interface est différente de la répartition au sein de chaque phase. Cette distribution de charges constitue la double couche électrochimique, modélisée en première approximation par un condensateur plan. Il apparaît alors une différence de potentiel entre les deux phases, appelée potentiel absolu d'électrode ϕ . C'est une grandeur non mesurable mais il est possible de repérer le potentiel relatif d'électrode E , par rapport à celui d'une autre interface électrochimique, pris comme référence. Si aucun courant ne circule dans la cellule, ce potentiel d'électrode est dit à courant nul E_{0} .

Code de champ modifié

Code de champ modifié

L'électrode de référence, dont la composition reste constante, a un potentiel fixe. L'électrode de référence dont le potentiel est fixé conventionnellement à 0 V est l'électrode standard à hydrogène, notée ESH : Pt, H₂ (1 bar)/H⁺ (1M). Cependant, les potentiels sont souvent mesurés par rapport à d'autres électrodes de référence, plus simples à mettre en place expérimentalement. Les plus usuelles sont :

- l'électrode au calomel saturée, noté ECS : Hg/Hg₂Cl₂/KCl_(saturé dans l'eau), avec un potentiel de 0,24 V/ESH
- l'électrode argent – chlorure d'argent : Ag/AgCl/KCl_(saturé dans l'eau), avec un potentiel de 0,22 V/ESH.

Un oxydant, noté Ox, est un corps capable d'accepter des électrons. Un réducteur, noté Red, est un corps capable de céder des électrons. Un couple rédox est un couple composé d'un réducteur et d'un oxydant.

Code de champ modifié

Code de champ modifié



Le potentiel d'équilibre correspond au cas où un système électrochimique, i. e. un couple rédox dont les constituants sont présents à l'électrode, est dans un état d'équilibre thermodynamique. Il est calculé en fonction de la composition du système, par application de la loi de Nernst :

$$E_{eq} = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(a_{Ox})^{v_{Ox}}}{(a_{Red})^{v_{Red}}}$$

Équation I-1

où E[°] est le potentiel standard du couple rédox (en V), F la constante de Faraday (en C.mol⁻¹), n le nombre d'électrons échangés lors de la réaction et a_i l'activité du constituant i, produit de son coefficient d'activité γ_i (cm³.mol⁻¹) et de sa concentration C_i (en mol.cm⁻³). Pour des solutions diluées, l'activité de l'espèce tend vers la même valeur numérique que la concentration.

Code de champ modifié

Dans le cas général de l'analyse chimique, il est courant de définir un potentiel standard apparent E^{°f} qui a l'avantage de présenter l'équation de Nernst sous une forme directement reliée aux concentrations :

$$E^{\circ f} = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{\gamma_{Ox}^{v_{Ox}}}{\gamma_{Red}^{v_{Red}}} \right)$$

Équation I-2

$$E_{eq} = E^{\circ f} + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{C_{Ox}^{v_{Ox}}}{C_{Red}^{v_{Red}}} \right)$$

Équation I-3

Généralement, le potentiel standard apparent contient d'autres facteurs qui peuvent traduire des phénomènes de complexation, comme des constantes d'équilibres...

2. Polarisation et surtension

Si l'intensité I qui traverse le circuit est non nulle, l'électrode est dite polarisée.

La différence entre le potentiel de l'interface hors équilibre E et le potentiel à courant nul $E_{(i=0)}$ est appelée surtension η .

$$\eta = E - E_{(i=0)}$$

Equation I-4

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

3. Chaîne électrochimique

Une chaîne électrochimique est constituée de deux électrodes séparées par une ou plusieurs solutions électrolytiques. Si ces solutions contiennent des espèces capables de réagir aux interfaces, la chaîne peut avoir deux types de fonctionnement :

- en mode pile, la réaction globale est spontanée et les réactions aux électrodes engendrent le courant qui circule dans la cellule,
- en mode électrolyse, un générateur fournit la tension nécessaire pour que les réactions se produisent aux électrodes.

A chaque électrode se produit une réaction :

- soit une réaction d'oxydation correspondant au transfert électronique des espèces réduites de l'électrolyte vers l'électrode : l'électrode est alors appelée anode,
- soit une réaction de réduction, réaction inverse de l'oxydation : l'électrode est appelée cathode.

La force électromotrice de la chaîne, notée \mathcal{E} , est la différence entre le potentiel de l'anode ($E_{A(i=0)}$) et le potentiel de la cathode ($E_{C(i=0)}$) mesurés à l'équilibre ($I=0$).

Code de champ modifié

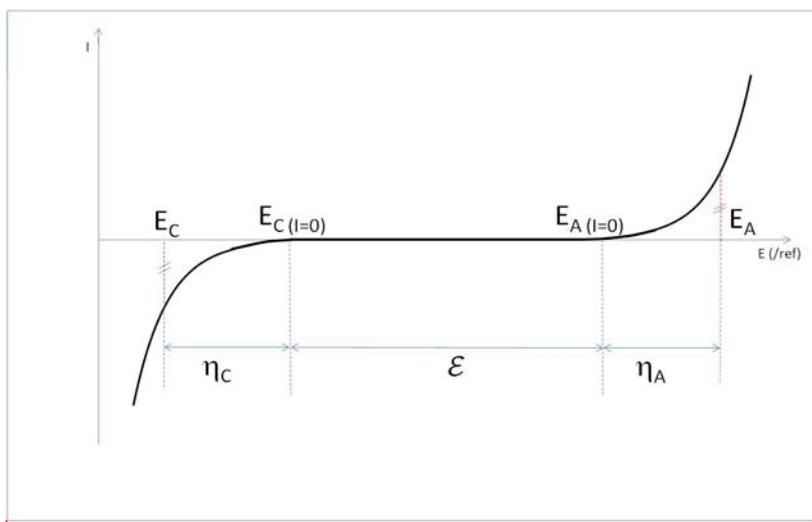
Code de champ modifié

Code de champ modifié

Lorsqu'un courant circule dans le circuit, il est possible de mesurer (Figure I-1) :

- son intensité I ,
- les densités de courant anodique $i_A = I/S_A$ (comptée positivement) et cathodique $i_C = I/S_C$ (comptée négativement), avec S_A et S_C la surface de l'anode et de la cathode
- le potentiel de l'anode E_A , supérieur à $E_{A(i=0)}$ et le potentiel de la cathode E_C , inférieur à $E_{C(i=0)}$.
- la surtension anodique η_A et cathodique η_C .

Code de champ modifié



Mis en forme : Ne pas vérifier l'orthographe ou la grammaire

Figure I-1 : Courbe intensité – potentiel caractéristique d'une cellule d'électrolyse.

Les caractéristiques électrochimiques de chaque électrode peuvent être représentées graphiquement par le tracé de l'intensité en fonction du potentiel de l'électrode, appelé aussi courbe intensité - potentiel. Cette représentation pour une cellule d'électrolyse est donnée Figure I-1.

Code de champ modifié

Pour une cellule d'électrolyse, la tension aux bornes du circuit est exprimé par :

$$U = \varepsilon + \eta_A + \eta_C + R_s I$$

Équation I-5

où le terme $R_s I$ est la chute ohmique, R_s étant la résistance interne de la cellule entre les deux électrodes. Cette chute de tension dépend de la solution d'étude et de la géométrie de la cellule. En effet, cette résistance interne est liée à la résistance de la solution électrolytique. Cette dernière est inversement proportionnelle à sa conductivité électrique σ et dépend des dimensions de la cellule. Elle est proportionnelle à l , distance entre les électrodes.

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

4. Processus faradiques et non faradiques

Deux types de processus peuvent se produire à l'électrode. Le premier décrit les réactions au cours desquelles les électrons sont transférés à travers l'interface métal-solution. Ce transfert résulte de l'oxydation ou de la réduction. Ces réactions suivent la loi de Faraday (Équation I-6) : la quantité d'espèces chimiquement transformées est proportionnelle à la quantité d'électricité qui traverse la cellule. Ce sont des processus faradiques.

Code de champ modifié

$$Q = It = nFN$$

Équation I-6

Q est la quantité de charge électrique (en C) et N le nombre de moles de produit formé ou de réactif consommé à l'électrode (mol).

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Cependant d'autres phénomènes, appelés non faradiques, tels que l'adsorption et la désorption peuvent se produire et la structure de l'interface électrode/solution peut être modifiée lors des balayages de potentiels par exemple.

5. Capacité de la double couche électrochimique

Lorsqu'une électrode plonge dans une solution électrolytique, la capacité de la double couche électrochimique, C_d apparaît, entraînant par exemple lorsqu'un échelon de potentiel E est appliqué, un courant de charge qui décroît exponentiellement avec le temps :

$$I_{\text{capacitif}} = \frac{E}{R_s} \exp\left(-\frac{t}{R_s C_d}\right)$$

Équation I-7

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Lors d'une réaction électrochimique, le courant mesuré est la somme du courant faradique et du courant capacitif.

B. Chaînes électrochimiques traversées par un courant

1. Description des phénomènes

Considérons la réaction d'électrode $Ox + ne^- = Red$ qui peut être décomposée en une série d'étapes élémentaires consécutives. Dans ce cas, la vitesse de réaction est contrôlée par la vitesse de l'étape la plus lente qui peut être le transport de matière, le transfert électronique hétérogène (qui se produit entre l'oxydant présent à l'électrode et l'électrode dans le cas d'une réduction), les réactions chimiques précédant ou suivant le transfert électronique et d'autres phénomènes de surface (tels que l'adsorption, la désorption).

Code de champ modifié

La réaction la plus simple implique seulement trois phénomènes : le transport de matière de l'espèce électroactive de la solution vers l'électrode, puis le transfert d'électrons (sans adsorption des espèces) et le transport de matière du produit de la réaction vers la solution (Figure I-2).

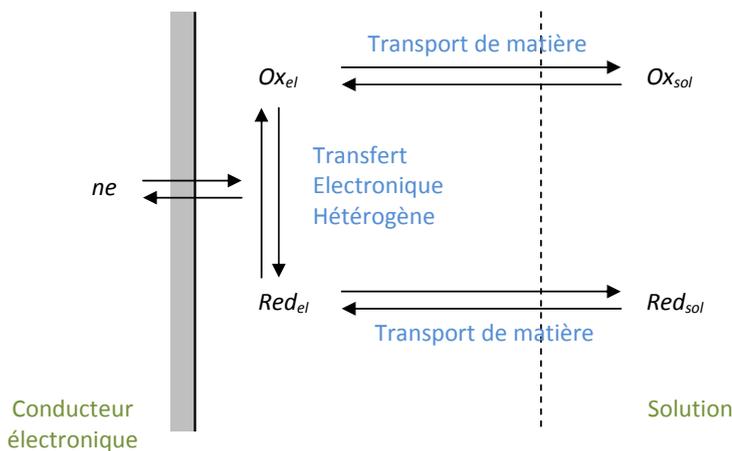


Figure I-2 : Différentes étapes impliquées dans une réaction électrochimique simple

Il existe trois modes de transport des espèces en solution :

- la migration, ou déplacement des espèces chargées sous l'effet d'un gradient de potentiel électrique
- la diffusion, ou déplacement des espèces sous l'effet d'un gradient de concentration
- la convection, ou déplacement des espèces en solution sous l'effet d'un gradient de vitesse de fluide.

2. Différents régimes cinétiques

Trois régimes cinétiques peuvent être définis :

* régime d'activation pur : la vitesse de transport de masse est infiniment rapide devant la vitesse de transfert électronique hétérogène. La vitesse globale de la réaction est déterminée par la vitesse de transfert interfacial d'électrons. Le corollaire de ce régime est une absence de gradient de concentration au voisinage de l'électrode. Ce régime prévaut particulièrement lors de l'oxydation du matériau d'électrode ou pour l'oxydation et la réduction du solvant.

* régime mixte d'activation-diffusion : la vitesse de transport de matière est du même ordre de grandeur que la vitesse de transfert électronique hétérogène.

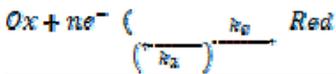
* régime de diffusion pur : la vitesse de transport de masse est très faible devant la vitesse de transfert électronique.

a) Le régime d'activation pur :

En régime d'activation pur, la vitesse de la réaction globale est égale à la vitesse du transfert électronique hétérogène v_{trh} .

Code de champ modifié

Soit une réaction d'oxydo-réduction élémentaire :



L'intensité qui circule dans le circuit est proportionnelle à la vitesse de réaction :

$$v_{trh} = \frac{I}{nFS} = k_a C_{Red}^{el} - k_c C_{Ox}^{el} \quad \text{Équation I-8}$$

avec S la surface de l'électrode (en cm²), I (en A), k_a et k_c les constantes de vitesse de transfert électronique hétérogène respectivement d'oxydation et de réduction (en cm.s⁻¹), C_{Ox}^{el} et C_{Red}^{el} les concentrations respectives de l'oxydant et du réducteur à la surface de l'électrode (en mol.cm⁻³). En régime d'activation pur, ces concentrations sont égales aux concentrations en solution.

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Les constantes de vitesse de transfert de charge k_a et k_c , à température constante

Code de champ modifié

Code de champ modifié

$$k_a = k_a^0 \exp\left(\frac{\alpha n F}{RT} E\right)$$

Équation I-9

$$k_c = k_c^0 \exp\left(-\frac{\beta n F}{RT} E\right)$$

Équation I-10

dépendent des coefficients de transfert de charge anodique α et cathodique β , tous deux compris entre 0 et 1, k_a^0 et k_c^0 sont les constantes intrinsèques de vitesse de transfert électronique hétérogène anodique et cathodique.

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Le courant total s'écrit alors :

$$I = nFS \left[k_a^0 C_{Red}^{ei} \exp\left(\frac{\alpha n F}{RT} E\right) - k_c^0 C_{Ox}^{ei} \exp\left(-\frac{\beta n F}{RT} E\right) \right]$$

Équation I-11

A l'équilibre, le courant est nul et est égal à la somme du courant anodique et du courant cathodique, égaux en valeur absolue. Cette valeur, notée I_0 , est appelée intensité du courant d'échange :

$$I_0 = nFS k_a^0 C_{Red}^{ei} \exp\left(\frac{\alpha n F}{RT} E_{(I=0)}\right) = nFS k_c^0 C_{Ox}^{ei} \exp\left(-\frac{\beta n F}{RT} E_{(I=0)}\right)$$

Équation I-12

Code de champ modifié

L'intensité globale peut-être alors exprimée en fonction du courant d'échange I_0 et de la surtension η .

$$I = I_0 \left[\exp\left(\frac{\alpha n F}{RT} \eta\right) - \exp\left(-\frac{\beta n F}{RT} \eta\right) \right]$$

Équation I-13

Code de champ modifié

Code de champ modifié

L'Équation I-13 est l'équation de Butler-Volmer. De plus, il est possible de démontrer que $\alpha + \beta = 1$, soit :

$$I = I_0 \left[\exp\left(\frac{\alpha n F}{RT} \eta\right) - \exp\left(-\frac{(1 - \alpha) n F}{RT} \eta\right) \right]$$

Équation I-14

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Les valeurs de la constante intrinsèque de transfert et du coefficient de transfert électronique hétérogène conditionnent l'allure des courbes courant-surtension (Figure I-3 et Figure I-4). La constante intrinsèque de vitesse est donnée pour un couple rédox et un matériau d'électrode.

Code de champ modifié

Code de champ modifié

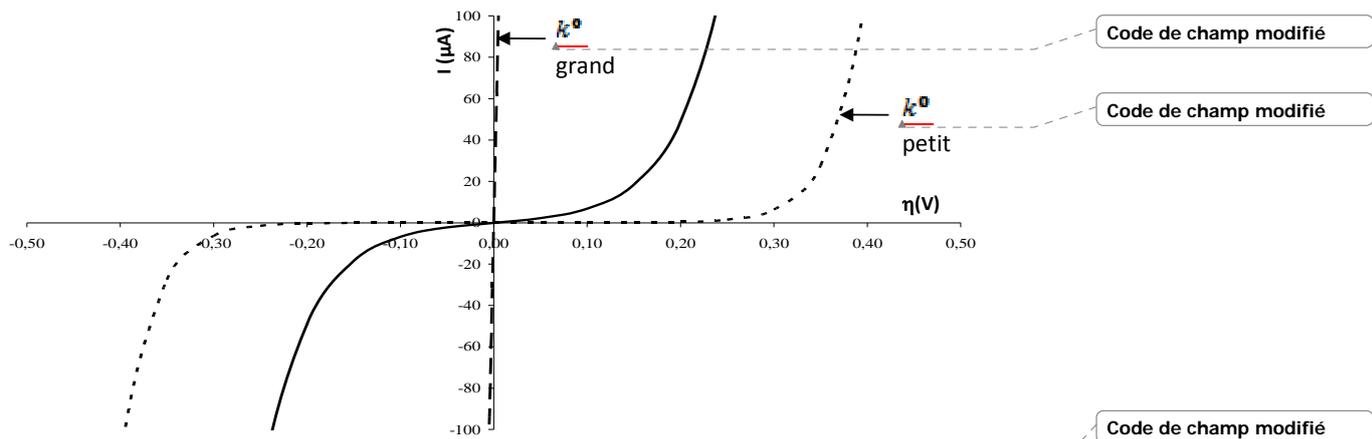


Figure I-3 : Courbes intensité-surtension : influence de la constante intrinsèque de vitesse (k^\ominus , $n=1$, $T=298K$)

Un système est dit électroinactif lorsqu'il ne peut pas échanger d'électrons à l'interface. Dans ces conditions, aucune réaction d'oxydo-réduction autre que celle liée au matériau ou au solvant n'a lieu. Un système est dit lent lorsqu'il faut imposer une surtension importante au système pour provoquer la réaction électrochimique et que la constante de transfert électronique hétérogène est faible. Ces systèmes sont caractérisés par des valeurs de constantes de vitesse k^\ominus inférieures à $10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$. Si la constante de vitesse est comprise entre 10^{-2} et 10^2 cm.s^{-1} , les systèmes sont qualifiés de rapides, une légère surtension entraîne le transfert électronique hétérogène.

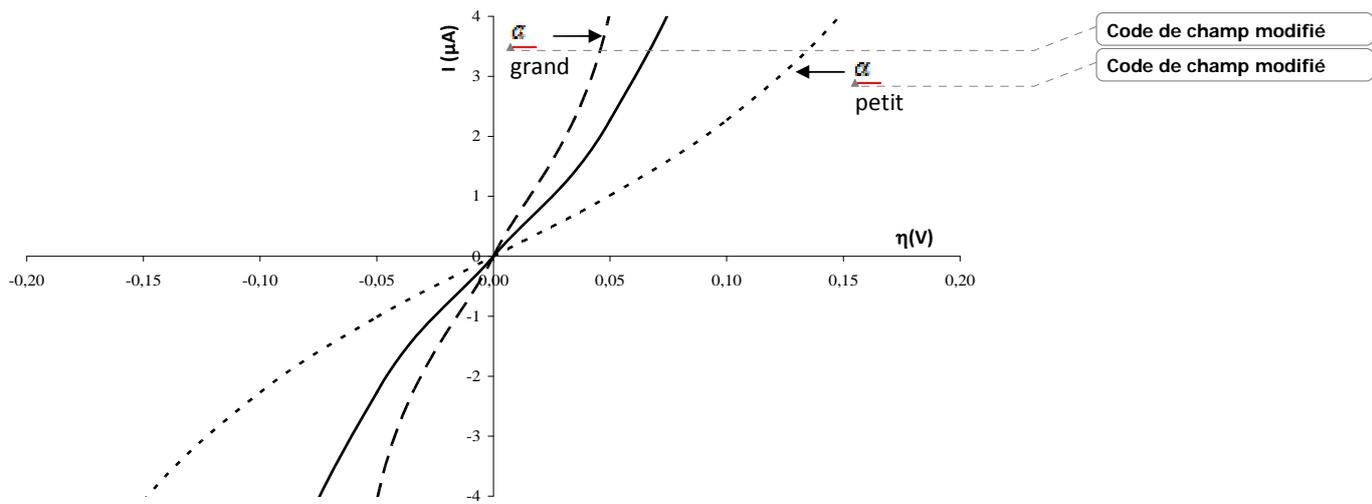


Figure I-4 : Courbes intensité-surtension : influence du coefficient de transfert électronique hétérogène α ($i_0=1\mu A$, $n=1$, $T=298K$)

L'équation de Butler-Volmer est souvent exploitée sous forme de graphe, appelé graphe de Tafel, donnant la variation de $\log|I|$ en fonction de la surtension η . Par exemple, pour une surtension

anodique importante (réaction d'oxydation), le second terme de l'Équation I-14 (composante cathodique du courant) devient négligeable :

$$I = I_0 \exp\left(\frac{\alpha n F}{RT} \eta\right) \Rightarrow \ln I = \ln I_0 + \frac{\alpha n F}{RT} \eta \quad \text{Équation I-15}$$

Ces représentations permettent d'atteindre graphiquement les paramètres cinétiques de la réaction rédox : le courant d'échange, par extrapolation des deux droites à $\eta = 0V$, et les coefficients de transfert de charge anodique et cathodique déduits des valeurs des pentes de ces deux droites.

b) Le régime de diffusion pur

Lorsque la vitesse de transfert électronique hétérogène est grande, l'espèce électroactive est consommée dès qu'elle est à l'interface. Pour que la réaction électrochimique puisse se poursuivre, il faut que la vitesse de consommation de l'espèce à l'électrode soit compensée par la vitesse de transport. Celle-ci devient alors l'étape limitante.

La présence d'un électrolyte support dont les ions ne participent pas au transfert électronique hétérogène, en très grande concentration devant les espèces électroactives considérées, permet de minimiser le phénomène de migration de ces espèces électroactives et d'augmenter la conductivité de la solution. De plus, la vitesse d'écoulement à proximité de toute paroi solide tend vers zéro, le flux de convection est alors négligeable. Cette zone adjacente à la surface du matériau d'électrode, au sein de laquelle seul le transport de matière par diffusion est considéré, est appelée couche de diffusion.

Le transport de matière diffusif de l'espèce électroactive considérée i , est régi par la première loi de Fick (Équation I-16). La densité de flux diffusif est proportionnelle au gradient de concentration de l'espèce i à l'interface et à son coefficient de diffusion D_i , x étant la distance à l'électrode.

$$J_i(x, t) = -D_i \frac{\partial C_i(x, t)}{\partial x} \quad \text{Équation I-16}$$

En régime permanent, l'épaisseur de la couche de diffusion a une valeur δ . Cette condition peut être obtenue soit hydrodynamiquement par agitation contrôlée constante (cas de l'électrode tournante), soit par la géométrie même des électrodes (par exemple avec des ultramicroélectrodes).

En émettant l'hypothèse que le profil de concentration est linéaire au voisinage de l'interface (cas des électrodes planes), l'intensité liée à l'oxydation ou la réduction de l'espèce i , s'exprime par :

$$I = nFSj_i = nFSD_i \left(\frac{\Delta C_i}{\Delta x}\right)_{x=0} = nFSD_i \frac{(C_i^{sol} - C_i^{el})}{\delta} \quad \text{Équation I-17}$$

avec C_i^{sol} et C_i^{el} les concentrations de l'espèce électroactive i au sein de la solution et à la surface de l'électrode respectivement.

Si la surtension imposée est suffisamment importante, la concentration interfaciale C_i^{sol} tend vers zéro. L'intensité atteint alors une valeur limite :

Code de champ modifié

$$I_{lim} = nFSD_i \frac{C_i^{sol}}{\delta}$$

Équation I-18

En régime non permanent, l'épaisseur de la couche de diffusion δ augmente au cours du temps et les profils de concentration à l'électrode évoluent également en fonction du temps, $C(x,t)$. Cette dépendance au temps est exprimée par la seconde loi de Fick :

Code de champ modifié

$$\frac{\partial C_i(x,t)}{\partial t} = D_i \frac{\partial^2 C_i(x,t)}{\partial x^2}$$

Équation I-19

L'Équation I-19 est applicable pour des réactions qui ont lieu à une électrode plane (Figure I-5 a).

Code de champ modifié

Dans le cas d'une électrode sphérique de rayon r_0 (Figure I-5 b), la diffusion des espèces électroactives est décrite par la seconde loi de Fick, exprimée en coordonnées sphériques :

Code de champ modifié

Code de champ modifié

$$\frac{\partial C(r,t)}{\partial t} = \frac{D(\partial^2 C(r,t))}{\partial r^2} + \frac{2D}{r} \frac{\partial C(r,t)}{\partial r}$$

Équation I-20

où r est la distance du centre de la sphère.



Figure I-5 : Directions des flux de diffusion et types de diffusion à différentes géométries d'électrodes : (a) diffusion linéaire à une électrode plane, (b) diffusion sphérique à une électrode (telle une goutte pendante).

A l'aide des conditions initiales et aux limites (Tableau I-1), la résolution de ces équations est obtenue par les formules mathématiques de transformées de Laplace.

Code de champ modifié

	Equation de diffusion linéaire	Equation de diffusion sphérique
à $t=0$	$C(x,0) = C^{sol}$	$C(r,0) = C^{sol}$
x ou $r \rightarrow \infty$	$C(\infty,t) = C^{sol}$	$C(\infty,0) = C^{sol}$

à $x = 0$	$C(0, t) = 0$	$C(r_0, t) = 0$
-----------	---------------	-----------------

Code de champ modifié

Tableau I-1 : Conditions initiales et aux limites nécessaires à la résolution de la seconde équation de Fick en coordonnées cartésiennes et sphériques

La réponse en courant, fonction du temps, s'exprime alors :

Electrode plane	Electrode sphérique
$i(t) = nFSDC^{sol} \frac{1}{\sqrt{\pi Dt}}$	$i(t) = nFSDC^{sol} \left(\frac{1}{\sqrt{\pi Dt}} + \frac{1}{r_0} \right)$
Équation I-21	Équation I-22

L'équation I-21 est plus connue sous le nom de relation de Cottrell. Pour une électrode plane, l'intensité diminue au cours du temps, l'épaisseur de la couche de diffusion croît avec le temps et les profils de concentration au sein de cette couche sont présentés Figure I-6.

Code de champ modifié

Figure I-6 : Profils de concentration pour différents temps d'électrolyse ($D=1.10^{-5} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$) (Bard et Faulkner, 2001)

Dans le cas d'une électrode sphérique, la solution

$$i(t)_{\text{sphérique}} = i(t)_{\text{plane}} + \frac{nFSDC^{sol}}{r_0} \quad \text{Équation I-23}$$

Le courant, pour électrode sphérique (Équation I-23) est donc la somme de deux termes, un dépendant du temps dont l'expression est identique à celle du courant pour une électrode plane, et un terme constant.

A des temps suffisamment courts, l'épaisseur de la couche de diffusion est plus petite que le rayon de l'électrode. L'électrode se comporte alors comme une électrode plane et le transport de masse est dominé par une diffusion linéaire à la surface de l'électrode (Figure I-5 a). C'est le terme dépendant du temps de l'équation I-22, qui est prédominant et le courant, induit par l'application d'un potentiel, décroît avec le temps, en accord avec l'équation de Cottrell.

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Pour des temps plus longs, la contribution de ce premier terme diminue et devient négligeable. Le processus de transport de masse est alors dominé par une diffusion radiale (Figure I-5 b). Le courant atteint l'état stationnaire et est égal au terme indépendant du temps.

Code de champ modifié

$$i_{lim} = \frac{nFSDC^{sol}}{r_0} = 4\pi r_0 nFD C^{sol} \quad \text{Équation I-24}$$

Les temps à partir desquels le régime permanent est atteint dépendent du rayon de l'électrode et du coefficient de diffusion (Tableau I-2).

c) Le régime de diffusion pur aux ultramicroélectrodes

Des courants stationnaires de diffusion peuvent être obtenus, soit par la mise en place d'une électrode tournante, soit par l'utilisation de géométries d'électrodes adéquates.

Les ultramicroélectrodes sont des électrodes dont une des dimensions caractéristiques est à l'échelle micrométrique (par exemple pour un microdisque, le rayon doit être inférieur à 50 μm) ou de manière plus générale, dont leur superficie est considérablement plus petite que celle des électrodes usuelles macroscopiques, de l'ordre du μm^2 au lieu du mm^2 .

Il existe différentes géométries de microélectrodes : la microélectrode à disque plan (la plus utilisée pour sa réalisation relativement simple), sphérique (plus complexe à fabriquer pour une large gamme de matériaux), bandes... mais également les réseaux de microélectrodes à disques ou à bandes.

Pour les microélectrodes sphériques, l'évolution du courant au cours du temps est donnée par l'Équation I-23 et le courant à l'état stationnaire est défini par l'Équation I-24. Il est intéressant d'évaluer le temps à partir duquel le comportement à l'état stationnaire devient prédominant et comment cette valeur est affectée par le rayon de l'électrode. Le rapport entre la contribution du courant à l'état stationnaire et celle du courant à l'état transitoire donne une expression

adimensionnelle $(\pi D t)^{1/2} / r_0$. Plus le rayon de l'électrode est petit, plus le temps à partir duquel la contribution du courant stationnaire au courant total est importante, est court (Tableau I-2).

r_0 (μm)	50	25	5	0.5
t (s)	>80	>20	>0.8	>0.008

Tableau I-2 : Temps nécessaires pour atteindre l'état stationnaire à une électrode sphérique ($D=1.10^{-5}\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$)

Pour une microélectrode à disque plan de rayon r_d , la densité de courant à la surface de l'électrode n'est pas uniforme, mais est plus importante au niveau des bords du disque. La seconde loi de Fick peut se formuler ainsi :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{D}{r} \frac{\partial C}{\partial r} + D \frac{\partial^2 C}{\partial z^2}$$

Équation I-25

où r est la distance au centre du disque (à $z=0$), z est la distance au centre du disque, normale au plan de l'électrode (à $r=0$) et C est la concentration de l'espèce électroactive qui dépend de t, de r et de z.

Pour simplifier, les équations concernant les microsphères sont modifiées en substituant r_0 par $\frac{\pi r_d}{4}$. Le courant obtenu pour une microélectrode à disque plan à l'état stationnaire est donné par la relation de Saito :

$$I_{lim} = 4nFD C^{sat} r_d$$

Équation I-26

d) Régime mixte d'activation diffusion

Ce régime est un régime intermédiaire entre le régime d'activation pur et le régime de diffusion pur.

A partir des Équation I-17 et Équation I-18, le rapport des concentrations à l'interface et en solution est :

$$\frac{C^{e\ddagger}}{C^{sol}} = 1 - \frac{I}{I_{lim,\square}}$$

Équation I-27

La relation courant-surtension est donnée par la relation suivante :

$$I = I_0 \left[\left(1 - \frac{I}{I_{lim,a}} \right) \exp\left(\frac{\alpha n F}{RT} \eta\right) - \left(1 - \frac{I}{I_{lim,c}} \right) \exp\left(-\frac{(1-\alpha) n F}{RT} \eta\right) \right]$$

Équation I-28

où $I_{lim,a}$ et $I_{lim,c}$ sont respectivement les intensités limites anodique et cathodique.

Code de champ modifié

Code de champ modifié

La représentation graphique de l'évolution du courant en fonction de la surtension appliquée est donnée à la Figure I-7.



Figure I-7 : Courbes courant – surtension avec I : intensité du courant global, I_a : composante anodique, I_c : composante cathodique ($T=298K$) (Bard et Faulkner, 2001)

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

C. Méthodes expérimentales électrochimiques

La mise en place expérimentale d'une cellule électrochimique fait généralement appel à un montage à trois électrodes (Figure I-8). Le dispositif est piloté par un potentiostat : il impose la différence de potentiel entre l'électrode de travail E_w et l'électrode de référence E_{ref} et on mesure le courant qui circule entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire E_A . Ce montage évite que le courant ne circule dans l'électrode de référence et que sa composition ne varie au cours de la mesure, ce qui engendrerait un potentiel fluctuant.

Figure I-8 : Schéma du dispositif expérimental à trois électrodes : Amplificateur opérationnel (AO)

Le potentiostat est réalisé à partir d'un amplificateur opérationnel (AO). Par définition, la tension de sortie S est égale à $A(E_+ - E_-)$ où A est le gain de l'amplificateur opérationnel. Si A tend vers l'infini (amplificateur idéal), alors $E_+ = E_- = E_{ref}$. Une tension de consigne U_c connue est appliquée entre la masse de l'amplificateur opérationnel et l'entrée +, soit entre l'électrode de travail et l'électrode de référence.

Pour étudier les réactions chimiques et analyser les espèces électroactives, les méthodes ampérométriques sont les plus utilisées. Elles consistent à imposer un potentiel à l'électrode de travail et à mesurer le courant en fonction du temps. L'étude expérimentale de la variation de courant à l'électrode de travail en fonction de son potentiel est appelée voltammétrie et la courbe intensité – potentiel qui en résulte voltammogramme.

1. Choix et positionnement des électrodes

L'électrode auxiliaire est choisie pour que ses propriétés électrochimiques n'affectent pas le comportement de l'électrode de travail : lors de l'électrolyse, il ne doit pas y avoir de production d'espèces qui puissent atteindre l'électrode de travail et y engendrer des réactions parasites. En analyse, ce montage à trois électrodes propose généralement une électrode auxiliaire de grande taille par rapport à l'électrode de travail de façon à ne pas limiter le courant traversant le circuit, l'électrode auxiliaire assurant le passage du courant engendré par les réactions étudiées à l'électrode de travail.

La tension aux bornes d'une cellule d'électrolyse présente une chute ohmique (Équation I-5). Cette chute dépend principalement de la résistivité ρ de la solution, de la distance entre les électrodes l et de leur surface S :

$$R_S = \frac{\rho l}{S}$$

Équation I-29

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Une partie de cette chute ohmique se retrouve entre l'électrode de travail et l'électrode de référence. Pour la minimiser, l'électrode de référence est placée au plus proche de l'électrode de travail. Expérimentalement, cette exigence n'est pas toujours facile à respecter et il est usuel d'utiliser un capillaire, appelé capillaire de Luggin, contenant un électrolyte support dans lequel est insérée l'électrode de référence.

Par ailleurs, ces choix s'accompagnent de celui du dimensionnement de la cellule électrochimique. Pour conserver l'échantillon étudié, l'électrolyse mise en place doit être une microélectrolyse : électrolyse qui s'accompagne d'une variation négligeable de la composition de la solution. La surface de l'électrode de travail doit être faible par rapport au volume d'électrolyte et la durée de l'expérience doit être courte. A contrario, pour transformer une grande quantité de matière, l'électrode doit présenter une grande surface de travail et les temps d'électrolyse doivent être suffisamment longs pour faire réagir l'intégralité des espèces électroactives.

2. La voltammétrie cyclique

Différentes techniques de voltammétrie peuvent être mises en œuvre pour étudier la réponse d'un système électrochimique soumis à une polarisation : voltammétrie linéaire, cyclique, à vague carrée.... Chacune présente une modulation particulière du potentiel en fonction du temps. Le choix se fait généralement au regard des informations souhaitées : les méthodes impulsionnelles sont très souvent mises en place pour détecter de très faibles concentrations (nano molaires), leur seuil de détection et leur sensibilité sont améliorés par une minimisation du courant capacitif.

La voltammétrie cyclique est une des plus importantes techniques d'électroanalyse et une des plus largement utilisées. Sa force réside dans la simplicité de mise en œuvre et la richesse des informations collectées pour l'étude de processus rédox. Cette technique consiste à faire varier linéairement avec le temps, le potentiel de l'électrode de travail entre deux bornes de potentiel et de mesurer le courant qui en résulte. Le balayage du potentiel se fait dans un sens puis dans l'autre, définissant un cycle de mesure.

$$E = E_t \pm vt$$

Équation I-30

avec v vitesse de balayage du potentiel.

Code de champ modifié

L'allure de ces courbes donne de nombreuses informations cinétiques et mécanistiques.

3. Allure et informations des voltammogrammes

Soit une solution électrolytique contenant une espèce réduite. En balayant le potentiel vers les surtensions anodiques, le réducteur s'oxyde : les trois régimes définis plus haut se succèdent (régime d'activation pur, puis régime mixte et régime de diffusion). Au balayage retour, si l'espèce oxydée est capable de se réduire, alors les mêmes phénomènes et observations apparaissent. Si le flux de convection est nul (électrode immobile et non agitation de la solution), la courbe intensité-potentiel présente alors un pic en oxydation et en réduction. En effet, à une électrode immobile (et sans agitation de la solution), la couche de diffusion s'étend avec le temps et la concentration à la surface de l'électrode devient de plus en plus faible. L'intensité diminue après avoir atteint un maximum ce qui se traduit par l'apparition d'un pic et non d'un palier.

La différence des potentiels des pics d'oxydation et de réduction donne une information sur la réversibilité du système (Figure I-9).

Code de champ modifié

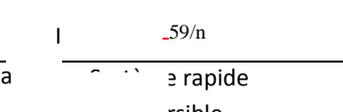
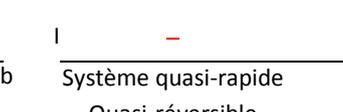
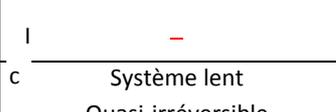
a		b		c	
	Système rapide Réversible		Système quasi-rapide Quasi-réversible		Système lent Quasi-irréversible

Figure I-9 : Allure des voltammogrammes cycliques selon la réversibilité du système (Trémillon, 1993)

a) Les systèmes réversibles

Si le transfert électronique est très rapide à la surface de l'électrode, le rapport des concentrations interfaciales en oxydant et en réducteur est donné par la loi de Nernst et est fonction du temps. Ce problème a été résolu numériquement par Randles et Sevcik puis par Nicholson et Shain et permet d'exprimer les différentes caractéristiques de la courbe intensité-potentiel en fonction des différents paramètres du système.

L'intensité du pic I_p est proportionnelle à la racine carrée de la vitesse de balayage et est donnée par la relation de Randles-Sevcik:

Code de champ modifié

$$I_p = 0,4463 \frac{(nF)^{\frac{3}{2}}}{(RT)^{\frac{1}{2}}} S D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} C^{\text{sol}}$$

Équation I-31

soit, à 25°C :

$$I_p = (2,69 \cdot 10^5) n^{\frac{3}{2}} S D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} C^{\text{sol}}$$

Équation I-32

Le potentiel de demi-vague $E_{1/2}$ est une grandeur thermodynamique permettant d'accéder au potentiel standard apparent E^{af} des systèmes rapides :

Code de champ modifié

Code de champ modifié

$$E_{1/2} = E^{o'} + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{D_{red}}{D_{ox}} \right)^{1/2}$$

Équation I-33

Il peut être évalué expérimentalement :

$$E_p = E_{1/2} + 1,109 \frac{RT}{nF}$$

Équation I-34

Remarque : en régime stationnaire, le potentiel de demi-vague est le potentiel pour lequel la valeur

du courant est $I = \frac{I_{lim,ox} + I_{lim,r}}{2}$.

Code de champ modifié

$$E_{1/2} = E^{o'} + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{D_{red} \delta_{ox}}{D_{ox} \delta_{red}} \right)$$

Équation I-35

En outre, les potentiels des pics en oxydation et en réduction, E_{Pa} et E_{Pr} , permettent de déterminer le potentiel standard apparent :

Code de champ modifié

Code de champ modifié

$$E^{o'} = \frac{E_{Pa} + E_{Pr}}{2}$$

Équation I-36

Cette différence de potentiel de pic permet d'évaluer le nombre d'électrons échangés :

$$E_{Pa} - E_{Pr} = 2,3 \frac{RT}{nF}$$

Équation I-37

En pratique à 25°C, un système rapide présente les caractéristiques suivantes :

- $\Delta E_p = \frac{0,059}{n}$
- E_{Pa} et E_{Pr} indépendants de la vitesse de balayage
- I_p proportionnelle à la racine carrée de la vitesse de balayage

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Remarque : Si les espèces électroactives sont adsorbées à la surface de l'électrode, la réponse électrochimique est plus complexe à analyser. Si ces phénomènes d'adsorption contrôlent la réaction, l'intensité du pic est directement proportionnelle à la vitesse de balayage :

$$I_p = \frac{n^2 F^2 v \Gamma}{4RT}$$

Équation I-38

avec Γ concentration surfacique des espèces adsorbées (en mol.cm⁻²).

Code de champ modifié

b) Les systèmes quasi-réversibles

Dans le cas de systèmes quasi-réversibles (Figure I-9 b), la loi de Nernst ne s'applique plus aux concentrations interfaciales. Ces concentrations obéissent à l'équation de Butler-Volmer. La différence de potentiel des pics varie avec la vitesse de balayage. Enfin, le courant n'est plus proportionnel à la racine carrée de la vitesse de balayage.

Code de champ modifié

c) Les systèmes quasi-irréversibles

Pour un système quasi-irréversible (Figure I-9 c), la réaction inverse peut être alors totalement négligée. Ici aussi, le problème a été traité de manière numérique et il a été démontré que l'intensité de pic est proportionnelle à la racine carrée de la vitesse de balayage :

Code de champ modifié

$$i_p = 0,4958 \frac{(nF)^{\frac{3}{2}} \alpha^{\frac{1}{2}}}{(RT)^{\frac{1}{2}}} S D^{\frac{1}{2}} \nu^{\frac{1}{2}} C^{*0i}$$

Équation I-39

soit, à 25°C :

$$i_p = (2,99 \cdot 10^5) \alpha^{\frac{1}{2}} n^{\frac{3}{2}} S D^{\frac{1}{2}} \nu^{\frac{1}{2}} C^{*0i}$$

Équation I-40

Ce courant maximum peut également être exprimé en fonction du potentiel de pic qui varie en fonction de la vitesse de balayage :

$$i_p = 0,227 n F C^{*0i} k^0 \exp\left(-\frac{\alpha n F}{RT} (E_p - E^{*0})\right)$$

Équation I-41

$$E_p = E^{*0} - \frac{RT}{\alpha n F} \left[0,780 + \ln\left(\frac{D^{\frac{1}{2}}}{k^0}\right) + \ln\left(\frac{\alpha n F \nu}{RT}\right)^{\frac{1}{2}} \right]$$

Équation I-42

D. Les microélectrodes

La miniaturisation des électrodes a largement étendu les potentialités de travail de l'électrochimie. Les microélectrodes ont repoussé plusieurs limitations expérimentales, ont fourni de nouvelles informations et, de ce fait, ont été utilisées pour explorer de nouveaux milieux. Aujourd'hui, la microélectrode est un outil standard et incontournable de l'électrochimie, permettant une mesure rapide, avec une résolution spatiale dans des solutions résistives ou in vivo.

1. Transport de matière et voltammétrie

Le régime de diffusion à une microélectrode est traduit par l'Équation I-23 : la densité de courant mesurée est plus importante à une microélectrode qu'à une électrode plane de taille classique, car elle admet, en plus d'une composante plane, une composante sphérique. Cette dernière conduit à l'existence d'un état stationnaire qui peut être observable d'autant plus rapidement que le rayon de l'électrode est petit. Aux échelles de temps classiquement utilisées (vitesse de balayage inférieure à 500 millivolts par seconde), l'allure des voltammogrammes obtenus à une microélectrode immobile ainsi que leur interprétation sont identiques à ceux tracés avec une électrode de taille conventionnelle dont le régime de convection est contrôlé (électrode tournante ou agitation). La courbe intensité potentiel sigmoïde présente un palier dont l'intensité est directement liée à la concentration de l'espèce étudiée (Équation I-26). Pour des vitesses de balayages plus importantes, en fonction de la taille de la microélectrode, les voltammogrammes répondent aux équations de la diffusion pure, et présentent alors des pics comme pour les électrodes classiques immobiles.

2. Réduction du courant capacitif

Lorsqu'un échelon de potentiel est appliqué à l'électrode, le courant mesuré est la somme du courant faradique et du courant capacitif, lié à la capacité de la double couche électrochimique à la surface de l'électrode. L'existence de cette capacité complique les mesures électrochimiques et plus précisément l'étude des processus faradiques dans les premiers instants. Lors de réactions chimiques impliquant de faibles concentrations d'espèces électroactives, cette capacité ne peut pas être négligée car le courant de charge peut être plus important que le courant faradique.

Ce courant de charge, défini à l'Équation I-7, décroît exponentiellement au cours du temps et dépend du produit $R_s C_d$, appelé constante de temps de la cellule.

Code de champ modifié

Pour une électrode sphérique, la résistance de la cellule dépend du rayon de l'électrode et de la conductance spécifique du milieu d'étude κ . Cette résistance est inversement proportionnelle au rayon de l'électrode :

Code de champ modifié

$$R_s = \frac{1}{4\pi r_0 \kappa}$$

Équation I-43

En revanche, la capacité est directement proportionnelle au carré du rayon de l'électrode et dépend de la capacité spécifique interfaciale C_d^0 :

Code de champ modifié

$$C_d = \pi r_0^2 C_d^0$$

Équation I-44

Donc, la constante de temps de la cellule vaut :

$$R_s C_d = \frac{r_0 C_d^0}{4\kappa}$$

Équation I-45

La capacité de la microélectrode diminue avec son rayon. La réponse de la cellule à un échelon de potentiel est donc plus rapide qu'avec une électrode de taille « normale » et le courant capacitif est moindre.

3. Diminution de la chute ohmique

L'application d'un potentiel pour induire une réaction électrochimique implique une chute ohmique (section A-3), égale au produit du courant total circulant dans la cellule par la résistance de la cellule. En travaillant avec des microélectrodes, les courants faradiques observés sont typiquement plus petits (environ six ordres de grandeurs) que ceux à une « macroélectrode ». Ces faibles intensités permettent souvent de minimiser, voire de négliger cette chute ohmique. Les voltammogrammes peuvent donc être enregistrés dans des milieux peu conducteurs sans ajout d'électrolyte support. Ceci apporte encore un intérêt particulier aux microélectrodes : étude dans des solvants jusqu'ici non traités, étude de milieux réels, voire hostiles (milieu gelé par exemple)... (Forster, 1994 ; Stulik et al., 2000).

4. Avantage de leur taille

Différentes applications des microélectrodes découlent simplement de leur petite taille. Les microélectrodes permettent des analyses dans de très faibles volumes d'échantillon ou sur des zones très localisées. Les microélectrodes sont devenues ainsi un outil privilégié d'étude du monde du vivant par les techniques électrochimiques. Les premières applications *in vivo* concernaient l'évaluation des modifications de concentration des neurotransmetteurs et de leurs métabolites (Wightman, 1981). L'utilisation d'électrodes de faibles tailles est indispensable pour ne pas détruire la région du cerveau soumise aux mesures. Les microélectrodes permettent également des mesures non-invasives qui n'ont ainsi qu'un impact très limité sur le milieu étudié (microélectrolyse), sans destruction des tissus étudiés.

5. Réseaux d'ultramicroélectrodes

Les avantages des ultramicroélectrodes sont nombreux mais une des conséquences de leur très petite taille est un courant très faible, impliquant des contraintes d'instrumentation. Cet inconvénient peut être contrebalancé par la construction d'un ensemble de microélectrodes en réseaux, correctement distribuées dans l'espace, afin de conserver leurs propriétés individuelles. La théorie des réseaux de microélectrodes est présentée entre autres par Sharifker (Montenegro *et al.*, 1991 ; Fleischman *et al.*, 1987).

a) Transport de masse à un réseau de microélectrodes

Pour conserver les avantages des microélectrodes intégrées en réseau, l'écartement entre les microélectrodes doit être suffisamment large par rapport à l'épaisseur de la couche de diffusion.

Aux temps courts, le courant est égal à z fois le courant à chaque microélectrode, avec z le nombre de microélectrodes. L'Équation I-23 définit le courant observé à une microélectrode (Figure I-10, A et B). Puis, au cours du temps, la croissance des couches de diffusion hémisphériques entraîne un recouvrement avec les couches voisines (Figure I-10 C) (Aoki, 1993). Si la distance inter-électrode d n'est pas suffisante, ce recouvrement induit une couche de diffusion plane, comparable à une macroélectrode (Figure I-10 D).

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

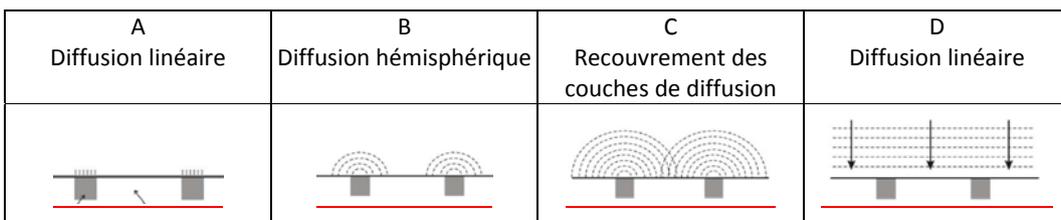


Figure I-10 : Evolution des profils des couches de diffusion au cours du temps (Davies et Compton, 2005)

Sharifker a développé un modèle analytique prenant en compte le recouvrement des zones de diffusion. Il a dans ce but, d'abord considéré une microélectrode disque isolée de rayon r_0 . Aux temps courts, la quantité totale de matière qui diffuse par unité de temps à la surface de la microélectrode peut être définie à l'aide de l'Équation I-22 :

Code de champ modifié

Code de champ modifié

$$\pi r_0^2 j_s(t) = \pi r_0 DC^{sol} \left(1 + \frac{r_0}{\sqrt{\pi Dt}} \right)$$

Équation I-46

Code de champ modifié

Considérons maintenant un ensemble de microélectrodes (Figure I-11). Pour prendre en compte le recouvrement éventuel des couches de diffusion et pour simplifier la résolution du problème en deux dimensions, une surface équivalente à une électrode disque de taille plus importante est définie et la quantité de matière qui diffuse à sa surface est décrite à partir de l'équation de Cottrell (Équation I-21):

$$\pi r_a^2 j_P(t) = \pi r_a^2 DC^{sol} \left(\frac{1}{\sqrt{\pi Dt}} \right)$$

Équation I-47

Code de champ modifié

Code de champ modifié

avec j_P , le flux de diffusion linéaire à cette surface équivalente de rayon r_a .

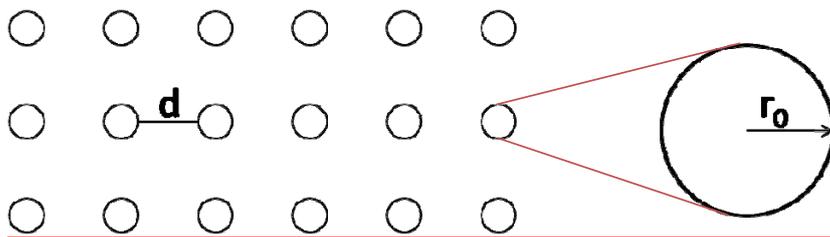


Figure I-11 : Réseau de microélectrodes – Agencement carré

Le rayon de cette surface équivalente peut s'exprimer en fonction du rayon de l'ultramicroélectrode en considérant que la quantité de matière diffusant de manière radiale à la microélectrode (rayon r_0) est égale à la quantité de matière qui diffuse linéairement à la surface équivalente (rayon r_a). A partir des équations Équation I-46 et Équation I-47, il est possible de montrer que :

Code de champ modifié

Code de champ modifié

$$r_a^2 = r_0^2 + r_0 \sqrt{\pi Dt}$$

Équation I-48

La transition entre la diffusion sphérique et la diffusion linéaire à un réseau de microélectrodes peut ainsi se traduire par le recouvrement des zones de diffusion équivalentes. Trois régimes se distinguent :

* pas de recouvrement des zones de diffusion : $r_a < \frac{d}{2}$.

Code de champ modifié

Code de champ modifié

En définissant pour un réseau quadratique, un temps adimensionnel u :

$$u = \frac{r_0 (\pi Dt)^{\frac{1}{2}}}{d^2}$$

Équation I-49

Il a été démontré que le régime de non recouvrement des zones de diffusion est vrai pour les temps tels que :

$$u < \frac{1}{4} - \frac{r_0^2}{d^2}$$

Équation I-50

Le courant issu du réseau de microélectrodes est :

$$I = \frac{\pi r_0 n F D C^{sat}}{d^2} \left(1 + \frac{r_0}{\sqrt{\pi D t}} \right)$$

Équation I-51

Code de champ modifié

*recouvrement total des zones de diffusion : $r_a > \frac{d}{\sqrt{2}}$

Le recouvrement des zones de diffusion est total lorsque :

$$u > \frac{1}{2} - \frac{r_0^2}{d^2}$$

Équation I-52

Le courant peut être déterminé par l'expression suivante (équation de Cottrell):

$$I = n F D C^{sat} \left(\frac{1}{\sqrt{\pi D t}} \right)$$

Équation I-21

Code de champ modifié

*recouvrement partiel des zones de diffusion : $\frac{d}{2} < r_a < \frac{d}{\sqrt{2}}$

Ce régime est intermédiaire entre le non-recouvrement et le recouvrement total des zones de diffusion.

Beriet et al. (2000) ont montré que ce modèle pouvait être utilisé dans le cas de réseaux relativement denses et que l'expression analytique de Shoup et Szabo (1984) convenait mieux pour des réseaux moins compacts. Cet expression est, pour un réseau hexagonal d'électrodes microdisques :

$$f(\tau, \theta) = \sqrt{\frac{\pi}{4\tau} + \frac{\pi}{4}} + \left(1 - \frac{\pi}{4} \right) \exp \left[-\frac{B \theta^2 (3 - 2\theta)}{\sqrt{\tau}} \right] - \frac{1}{1 + \frac{3\sqrt{\pi}}{2\tau} \theta^2} \exp \left[-\sqrt{\frac{\pi}{4\tau}} \left(\frac{\theta}{1 - \theta} \right) + \frac{B \theta^2 (3 - 2\theta)}{\sqrt{\tau}} \right] \left(1 - \frac{\pi}{4} \right)$$

Code de champ modifié

Code de champ modifié

avec $B=0,7823$; $\tau = \frac{4Dt}{r_0^2}$ et $\theta = 1 - \left(\frac{r_0}{r_0 + d/2} \right)^2$.

Cependant, ces résultats ont été donnés pour un nombre infini de microélectrodes. Les processus de diffusion pour un nombre fini de micro-interfaces ont été également étudiés (Morf, 1996) et modélisés afin d'estimer les intensités de courant et les profils de concentration (Morf *et al.*, 2006). Plus récemment, des analyses théoriques des mécanismes diffusionnels spécifiques à des réseaux de microélectrodes disques ont été menées et des simulations numériques ont été réalisées afin d'évaluer l'influence des paramètres géométriques (distance inter-électrodes par exemple) et expérimentaux en voltammétrie linéaire et cyclique (Lee *et al.*, 2001 ; Davies et Compton, 2005 ; Davies *et al.*, 2005 ; Amatore *et al.*, 2009).

b) Voltammétrie cyclique

L'allure des voltammogrammes diffère d'un régime de recouvrement des couches de diffusion à un autre : pour une faible distance inter-électrode, un voltammogramme laissant apparaître un pic est obtenu alors qu'un voltammogramme sigmoïde résulte d'une distance inter-électrode plus grande. La réponse d'un réseau de microélectrodes est donc directement liée à la distance inter-électrode. Cette réponse peut être la somme des réponses individuelles si la distance inter-électrode est plus importante que l'épaisseur des couches de diffusion à chaque électrode. L'échelle de temps de l'expérience est donc à prendre en compte pour prévoir la réponse d'un réseau de microélectrodes. Une des premières conditions reportées dans la bibliographie pour observer le comportement d'un réseau correspondant à la somme des comportements individuels de chaque microélectrode est (Saito, 1968) :

$$\frac{R}{r_0} > 6 \quad \text{ou} \quad \frac{d_{\text{cc}}}{r_0} > 12$$

Équation I-54

Code de champ modifié

Code de champ modifié

Code de champ modifié

où $2R = 2r_0 + d = d_{\text{cc}}$ est la distance inter-électrode centre à centre.

Cependant, cette condition n'est pas vraiment satisfaisante et des modèles plus complets sont proposés dans la bibliographie (Lee *et al.*, 2001 ; Davies *et al.*, 2005 ; Davies et Compton, 2005) : ils prennent en compte d'autres paramètres comme le rapport entre l'épaisseur de la couche de diffusion et le rayon de la microélectrode par exemple, et évaluent le comportement du réseau en fonction de la vitesse de balayage. Plus récemment, des considérations techniques intégrant des exigences inhérentes au domaine d'étude sont également prises en compte (miniaturisation maximale pour les capteurs implantables par exemple) (Rahman et Guiseppi-Elie, 2009).

A de grandes vitesses de balayage, l'épaisseur de la couche de diffusion est faible et s'étend linéairement à la surface de chaque microélectrode. Un voltammogramme, en forme de pic, comparable à une macroélectrode est observé, avec des courants proportionnels à la surface de l'ensemble de la zone active. A des vitesses de balayages plus lentes, la diffusion radiale se développe à chaque micro disque. Le voltammogramme alors sigmoïdal présente un courant limite I_{lim} :

Code de champ modifié

$$I_{\text{lim}} = 4nFDc^{\infty}r_0$$

Équation I-55

Pour des vitesses de balayage très faibles, les couches de diffusion individuelles se rejoignent pour former un champ de diffusion linéaire et l'allure du voltammogramme présente de nouveau un pic, mais avec des intensités de courant proportionnelles à la surface géométrique totale de l'ensemble du réseau.

II. De la pile aux biocapteurs électrochimiques

A. Naissance et histoire de l'électrochimie

L'électrochimie est née avec les travaux de deux scientifiques italiens, Galvani et Volta, à la fin du XVIII^e siècle. Les travaux de Priestley et Cavendish sont cependant les prémices de l'histoire de l'électrochimie : ils étudiaient l'action des étincelles électriques sur de l'air enfermé dans un tube

(Ostwald, 1912). L'existence d'une relation entre les phénomènes électriques et les phénomènes chimiques a été également montrée par Van Marum, physicien néerlandais : en construisant une machine électrique gigantesque, il observa que la décharge électrique décomposait différentes substances et en faisait se dégager des gaz. Mais il faut attendre la découverte du physicien et biologiste Galvani pour créer le lien entre l'électricité et la biochimie : après avoir disséqué une grenouille, sa cuisse, posée sur la table du laboratoire se contracta lorsqu'une des aides du physicien la toucha avec son scalpel (Becquerel et Becquerel, 1858). Il renouvela l'expérience en attachant les cuisses de grenouilles à sa balustrade en fer et pendant les jours d'orages, grâce à l'électricité atmosphérique, il observa les mêmes contractions. A cette époque où les connaissances sur l'électricité et plus précisément sur l'électricité statique ne cessaient d'augmenter, l'électrophysiologie était en train de naître, certes de manière erronée car Galvani définit ces phénomènes sous le nom « d'électricité animale », électricité produite par la cuisse elle-même. Volta, physicien, interpréta ces expériences, non par l'électricité animale mais par l'électricité due au contact des deux métaux. A la suite de ses travaux, il inventa la pile électrique en 1800 : un assemblage de disques de zinc et d'argent (ou de cuivre) séparés les uns des autres par des disques de cartons trempés dans une solution saline. C'est cette invention qui marque la naissance de l'électrochimie et qui est à l'origine d'une cascade de découvertes. Au même moment, Ritter démontrait également qu'il existait une relation de cause à effet entre les phénomènes électriques et les phénomènes chimiques. Il créa la première pile sèche et découvrit la polarisation et les rayons ultraviolets du spectre. Mais c'est la pile de Volta qui permit à deux savants anglais, Nicholson et Carlisle, de réaliser les premières électrolyses de l'eau. Davy décrivit les phénomènes qui s'y déroulaient et posa les bases de l'électrochimie. Il découvrit le potassium (1806), le sodium, le calcium et le magnésium. Le jeune apprenti relieur Faraday, avide de connaissances, fut pris comme aide par Davy à la Royal Institution. Autodidacte, il donna les nouvelles théories sur la décomposition électrochimique (Loi de Faraday - 1834) et les dénominations qu'il définit sont aujourd'hui conservées : électrolyte, électrode, anode, cathode etc. En 1835, Daniell expliqua les questions sans réponse de Faraday sur la composition chimique des ions et s'intéressa à la construction de piles à courant constant : il inventa la première pile qui ne présentait pas de dégagement d'hydrogène, cause de l'affaiblissement du courant : une lame de zinc plongée dans de l'acide sulfurique dilué (plus tard remplacé par une solution de sulfate de zinc) et une lame de cuivre plongée dans une solution de sulfate de cuivre, les deux solutions étant séparées par une cloison poreuse en faïence. Becquerel sera aussi un précurseur (1829). Il donna les lois fondamentales des phénomènes thermoélectriques et les principes de l'électrochimie. Il est également à l'origine de l'électro-analyse : à l'époque, l'analyse quantitative ordinaire proposait de précipiter la substance à doser et d'isoler le précipité par filtration ou par centrifugation ; dans l'électro-analyse, les espèces déterminées sont amenées aux électrodes où elles se déposent sous forme appropriée. L'application de l'électrolyse à l'analyse est due à Becquerel, lors de ses importants travaux sur les piles : en ajoutant un acétate alcalin aux sels de plomb et de manganèse, ces derniers pouvaient se séparer à l'anode (sous forme de peroxyde), mais ceci demanda un fort courant pendant plusieurs heures, expliquant que le procédé ne fut pas adopté. Néanmoins cette technique fut utilisée à d'autres fins (recherches de métaux toxiques dans des milieux inorganiques, séparation du cuivre...).

En 1839, Jacobi inventa la galvanoplastie en remarquant simplement que, dans la pile qu'il avait créée, le cuivre métallique se déposait sur la cathode, épousant parfaitement sa surface et qu'il se laissait facilement détacher. A la même époque, Bunsen découvrit la séparation électrolytique de différents métaux légers.

Outre ces découvertes, la pile elle-même évolue : Leclanché créa la première pile au dioxyde de manganèse (1867), et les accumulateurs furent inventés par Planté qui mit au point la première batterie à base de plomb et d'acide sulfurique. En 1870, Gramme construisit la première dynamo. Au même moment, Joule, Helmholtz, puis Thomson, Favre et Raoult établissent les lois reliant les énergies thermiques aux phénomènes électrochimiques.

En 1884, en énonçant que la conductibilité est une mesure de l'activité chimique, Arrhénius développa sa théorie sur l'équilibre chimique, qui concordait parfaitement avec celle établie plus tôt par Gibbs. De son côté, Ostwald, qui avait déterminé par voie chimique un grand nombre de coefficients d'activité, constata peu de temps après que le principe d'Arrhénius s'appliquait sans exception à toutes les substances qu'il avait étudiées. Une autre théorie, la théorie des solutions de Van't Hoff, publiée en 1885, vit le jour : les solutions obéissent aux lois des gaz.

Nernst, avec ses recherches sur la force électromotrice des piles voltaïques, permit à l'électrochimie de faire des progrès considérables. Il appliqua la thermodynamique à l'électrochimie et introduit en 1889 la relation qui porte son nom.

D'un point de vue cinétique, Tafel établit expérimentalement la première relation entre le courant d'électrolyse et la surtension (1905). Mais il faut attendre vingt ans plus tard les travaux fondamentaux de Butler (1924) puis de Erdey-Grùz et Volmer pour formaliser la loi de vitesse, connue sous le nom de relation de Butler-Volmer.

En 1925, la polarographie, méthode d'analyse électrochimique utilisant une électrode à goutte de mercure tombante, est mise au point par Heyrovsky, qui reçut le Prix Nobel en 1959.

A partir des années 1950, pour conserver les avantages des mesures polarographiques et diversifier l'étude des systèmes électrochimiques, des microélectrodes (surface de l'ordre du millimètre carré) à disque tournant ou immobile sont réalisées à partir d'un fil métallique enrobé dans un tube isolant. Les termes de « voltampérométrie » et « voltampérogrammes » désignent alors la méthode de mesure du courant au cours du balayage automatique du potentiel et les courbes intensité-potentiel en résultant. En 1964, Nicholson et Shain établissent la théorie de la voltampérométrie cyclique qui permet les études de cinétiques électrochimiques et des mécanismes de réaction aux électrodes (Trémillon, 2009). L'utilisation d'ultramicroélectrodes (aire de l'ordre du micromètre carré), utilisées pour la première fois par Wightmann en 1976, améliore les performances de cette technique et fait progresser le domaine de l'électrochimie de molécules biologiques ou de la cellule vivante (Comtat, 1997).

B. Capteurs électrochimiques pour l'analyse biomédicale

L'électrochimie se présente notamment comme une méthode d'analyse intéressante qui relie des mesures électriques (courant, potentiel, charge etc.) à des paramètres chimiques (concentration, vitesse de réaction...). L'exploitation analytique des lois de cinétique électrochimique a trouvé écho dans un grand nombre de domaines, comme l'environnement, l'agroalimentaire, l'industrie (contrôle qualité) et l'analyse biomédicale (Tothill, 2009 ; Spegel *et al.*, 2008 ; Allan *et al.*, 2006 ; Castillo *et al.*, 2004 ; Feeney et Kounaves, 2000). A partir du milieu des années 80, les avancées sont nombreuses : développement des ultramicroélectrodes, couplage de substances biologiques à la transduction électrochimique, développement des techniques de voltammétrie dédiées à l'analyse de traces... Elles rendent très populaire l'électroanalyse, qui permet l'étude de plus en plus d'espèces chimiques (Wang, 2006 ; Laschi et Mascini, 2006). De plus, comparés aux autres types de capteurs, les capteurs électrochimiques sont particulièrement attractifs de par leur simplicité de mise en place et leur faible

coût (Soper *et al.*, 2006). La volonté de répondre aux interrogations sur les fluctuations en temps réel des analytes biologiques a engendré le développement de la détection électrochimique d'espèces en milieu biologique et les biocapteurs ont pris naissance avec la mise au point du biocapteur à glucose de Clark et Lyons en 1962.

Les biocapteurs sont l'une des grandes familles de capteurs électrochimiques dédiés à l'analyse biomédicale. Ils résultent de l'association de techniques électrochimiques et de processus biologiques de reconnaissance spécifique. L'agent biologique est immobilisé sur l'électrode de travail qui convertit la reconnaissance biologique en une réponse ampérométrique ou potentiométrique. Ce processus de reconnaissance peut se faire sous deux formes (Thévenot *et al.*, 2001) :

- dispositif biocatalytique : le dispositif est combiné à un catalyseur, généralement une enzyme. Leur utilisation est extrêmement répandue de par l'efficacité et la sélectivité de ce type de catalyseur. Pour exemple, le capteur à glucose : la glucose oxydase catalyse la réaction d'oxydation du glucose par l'oxygène et la libération du peroxyde d'hydrogène est suivie par ampérométrie sur l'électrode. Cet outil joue un rôle majeur dans le diagnostic et le contrôle du diabète (Castillo *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2000).

- capteur par affinité (bio-ligand) : ces biocapteurs exploitent les liaisons sélectives entre certaines biomolécules comme les anticorps et des espèces cibles, responsables de signaux électriques permettant leur détection. Ces dispositifs proposent des seuils de détection relativement bas et peuvent être utilisés pour le dosage de nombreuses espèces. Parmi eux se trouvent les immunocapteurs, qui reposent sur les liaisons antigène/anticorps et les biocapteurs à hybridation d'ADN (reconnaissance d'acide nucléique) ; ces derniers présentent un intérêt dans le diagnostic de maladies ou d'infections génétiques (Castillo *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2000).

Outre les molécules d'intérêt biologique, la détection des gaz est également importante en biologie clinique. Ces dispositifs électrochimiques présentent une électrode sélective d'un ion particulier, sur laquelle est déposée une solution intermédiaire, le tout encapsulé par une membrane perméable au gaz. Cette solution intermédiaire réagit avec le gaz pour former ou consommer l'ion à détecter. Ces dispositifs ont été développés par exemple pour la détection du dioxyde de carbone dans le sang (détection potentiométrique) et l'oxygène dans différents types d'échantillons biologiques (détection ampérométrique) (Hahn, 1998 ; Fasching *et al.*, 2003 ; Shim *et al.*, 2010).

Aujourd'hui, le développement de réseaux de capteurs, de multi-électrodes, chacune dédiée à un analyte, permet de suivre un phénomène biologique dans son ensemble, de manière à mieux appréhender les processus et réactions qui ont lieu (Wang *et al.*, 2008 ; Spiegel *et al.*, 2008, Johnson *et al.*, 2008, Kintzios *et al.*, 2006 ; Wilson et Gifford, 2005).

C. Fabrication et enjeux économiques

Les capteurs électrochimiques doivent répondre aux exigences suivantes : diminution de la taille des dispositifs, sensibilité, sélectivité, fiabilité, faible coût. Cette approche sous-entend la mise en place de micro- voire nano-électrodes fabriquées à l'aide des microtechnologies. De plus, des critères liés aux biocapteurs sont souvent primordiaux : biocompatibilité, fiabilité dans le temps, portabilité... (Wilson et Gifford, 2005). L'augmentation du champ d'application des microélectrodes coïncide avec la disponibilité et l'adaptation des techniques de la microélectronique.

1. Fabrication des microélectrodes

Les premières études ont été réalisées avec des microélectrodes constituées d'un fil de métal scellé dans un capillaire de verre (Figure II-1). Cette technique est encore utilisée en laboratoire pour préparer les microélectrodes mais ne répond pas à l'approche d'intégration et de simplicité d'utilisation. Ces électrodes restent relativement fragiles et leur préparation délicate.

Code de champ modifié

x 100

Figure II-1 : Microélectrode de platine scellée dans un capillaire de verre (Ruffien-Ciszak, 2005)

Une deuxième approche de fabrication est plus généralement liée aux technologies microélectroniques. Ces technologies « films minces » se sont adaptées aux exigences des transducteurs électrochimiques. Cet effort technologique a permis directement le développement et l'amélioration de procédés disponibles pour la mise en forme de matériaux classiques d'électrodes tels que les métaux nobles ou le carbone. Obtenir des motifs réguliers micrométriques avec ce type de matériaux a été rendu possible par l'utilisation de techniques microlithographiques. La photolithographie est particulièrement intéressante pour produire des géométries complexes d'électrodes, comme un réseau ordonné de microélectrodes à l'échelle du micromètre, ce qui est très difficilement réalisable de manière reproductible avec d'autres moyens de fabrication (Stulik *et al.*, 2000). Depuis les années 80, ces technologies de réalisation à l'échelle micronique sont devenues plus matures et sont maintenant couramment utilisées pour produire des microélectrodes et des réseaux de microélectrodes géométriquement bien définies (Fiaccabrino et Koudelka-Hep, 1998). Deux grandes techniques de productions des capteurs électrochimiques sont actuellement proposées : des technologies « film épais » (screen printing) et « film mince ». Ces technologies seront détaillées au chapitre II (Xu *et al.*, 2009 ; Laschi et Mascini, 2006).

Aujourd'hui, des électrodes sérigraphiées sont disponibles commercialement mais les dimensions sont généralement de l'ordre du millimètre : par exemple, la société Dropsens propose des dispositifs avec des électrodes de travail de 4mm ou 1,6mm (Figure II-2).

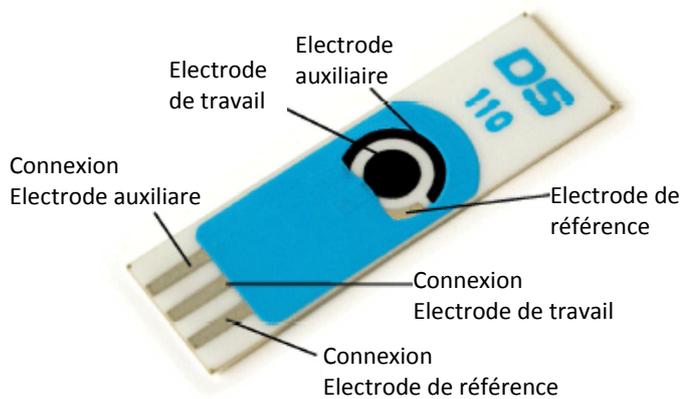


Figure II-2 : Electrodes sérigraphiées proposées par Dropsens (diamètre de l'électrode de travail de 4 mm)

Généralement, la résolution obtenue avec la technologie « film épais » n'est pas très bonne, ce qui explique le développement croissant des microélectrodes fabriquées par les technologies issues de la photolithographie, même si ces techniques sont plus coûteuses et plus difficiles à mettre en place : environnement salle blanche, équipements lourds et onéreux... Quelques dispositifs multi-électrodes sont proposés commercialement mais n'intègrent pas des électrodes de référence. Ayanda Biosystems commercialise par exemple des puces intégrant des réseaux de microélectrodes en or et en platine de 30 à 80 µm de diamètre (www.ayanda-biosys.com)(Figure II-3).

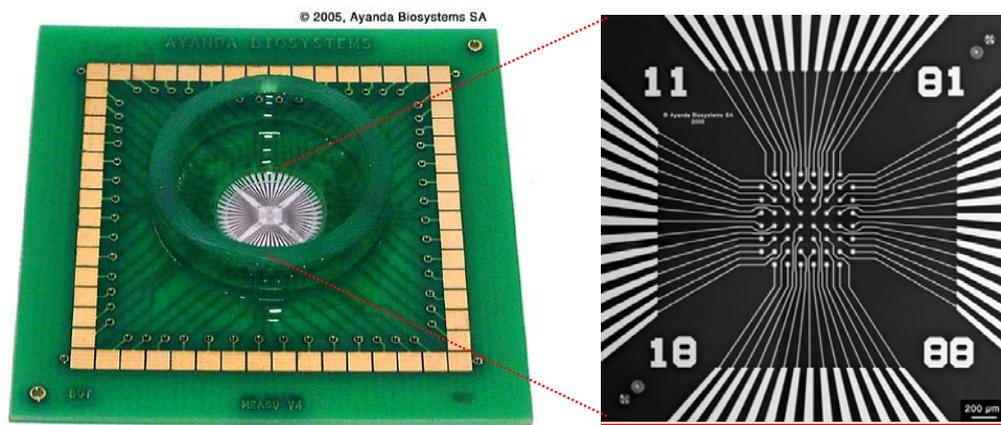


Figure II-3 : Réseau de microélectrodes proposé par la société Ayanda Biosystems (diamètres des électrodes : 30 µm)

2. Applications et enjeux économiques

De par sa simplicité et son faible coût, la technique « screen printing » a permis aux biocapteurs de pénétrer le marché. Une application très bien connue de ce type de capteur est l'analyse du glucose dans le sang pour les diabétiques. Ce capteur ampérométrique fut commercialisé en 1987 avec une électronique embarquée sur un dispositif de la taille d'un stylo. Plus récemment, un dispositif transcutané de détection de l'oxygène a été développé à l'aide de ces techniques de fabrication (Lam et Atkinson, 2002). Son principe ampérométrique repose sur celui de la cellule de Clark. L'approche biocapteur rend cette technique de fabrication encore plus intéressante : elle permet en effet l'immobilisation d'anticorps (immunoanalyse) ou d'acides nucléiques (biocapteurs à ADN). La chronopotentiométrie et la chronoampérométrie sont les techniques électrochimiques mises en place dans la transduction.

La technologie « film mince » a permis elle aussi de développer des biocapteurs pour, par exemple, la détection et le suivi en temps réel du lactate. Ce biocapteur ampérométrique a été testé in vivo, inséré dans la peau d'un animal. Cette méthode de fabrication est plus largement rencontrée pour la production de microélectrodes (Laschi et Mascini, 2006).

L'intérêt que porte le domaine médical et pharmaceutique aux biocapteurs est important tant ces derniers peuvent être une aide précieuse au diagnostic et un outil de compréhension des mécanismes réactionnels. Le capteur dédié au suivi du glucose chez les personnes atteintes de diabète en est un bon exemple et représente un vrai et unique succès commercial (Castillo *et al.*, 2004 ; Wilson, 2005 ; Malhotra et Chaubey, 2003). Aujourd'hui, ces capteurs de glucose, largement répandus pour le suivi en continu par le patient lui-même, ont été miniaturisés et proposent une

mesure en sous-cutané (Figure II-4). Le coût du capteur seul est d'environ 40 €, mais le budget total pour l'acquisition du transmetteur, permettant, via les technologies sans fil, une réponse adaptée de la pompe à insuline à partir de la concentration mesurée, est d'environ 570 € (<http://www.medtronic.com/>).

Code de champ modifié

Figure II-4 : Système de mesure en continu du glucose proposé par Medtronic

De manière plus générale, l'industrie des biocapteurs est en pleine croissance et le domaine médical en est le principal marché. Il faut cependant noter que la détection de pathogènes dans le milieu agroalimentaire n'est pas à négliger, ainsi que la détection des pesticides et des OGM dans le domaine environnemental. Le marché mondial des biocapteurs devrait ainsi atteindre 5.1 milliards de dollars en 2012 d'après un rapport publié par Global Industry Analyst Inc (Dupont, 2009).

Néanmoins, le choix des matériaux et des techniques de fabrication est crucial pour les bonnes performances du biocapteur (Zhang *et al.*, 2000 ; Bakker et Telting-Diaz, 2002). Un certain nombre de problèmes à mettre en lien à la fois avec la fabrication et l'analyse reste encore peu compris et explique ainsi le développement mitigé du marché des biocapteurs.

III. Développement de microélectrodes appliquées à l'analyse de la peau

Les capteurs électrochimiques sont des outils d'analyse confirmés en biologie et représentent une alternative aux méthodes d'étude et d'exploration en physiopathologie, pour les avantages qui ont été cités précédemment. Impliqué dans de nombreuses maladies, le stress oxydant est un des processus biochimiques les plus étudiés. Une de ses cibles privilégiées est la peau car elle est l'interface entre notre organisme et l'environnement extérieur, source d'agressions multiples.

A. La peau et le stress oxydant

1. La peau : une structure particulière, siège de fonctions essentielles à la vie

La peau est un organe complexe de l'organisme : ce tissu possède la plus large surface (2 m² environ) et sert de couche de protection aux organes internes. Située à l'interface entre le corps et l'environnement, la peau est la meilleure cible du stress oxydant mais elle possède de nombreux systèmes de défense contre cette agression.

La peau est constituée de trois couches distinctes superposées sur 3 mm d'épaisseur au total (Figure III-1) : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Mélissopoulos et Levacher, 1998).

- L'hypoderme est une couche de graisse de réserve ou tissu adipeux, ce qui fait de lui le plus grand réservoir énergétique de l'organisme. Il joue un rôle important dans la thermorégulation, du fait du caractère isolant de la graisse, et protège l'organisme des chocs.

- Le derme est un tissu conjonctif fibreux et dense, support solide et nutritif de la peau. Il assure à la fois la résistance, la fermeté, l'élasticité et la souplesse de la peau. Il joue également un rôle important dans la thermorégulation.

- L'épiderme représente la dernière couche, la plus externe de la peau. Son épaisseur est d'environ 100 µm mais varie selon les régions du corps. Ce tissu est un épithélium pavimenteux stratifié, constitué de plusieurs types cellulaires : les keratinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel.

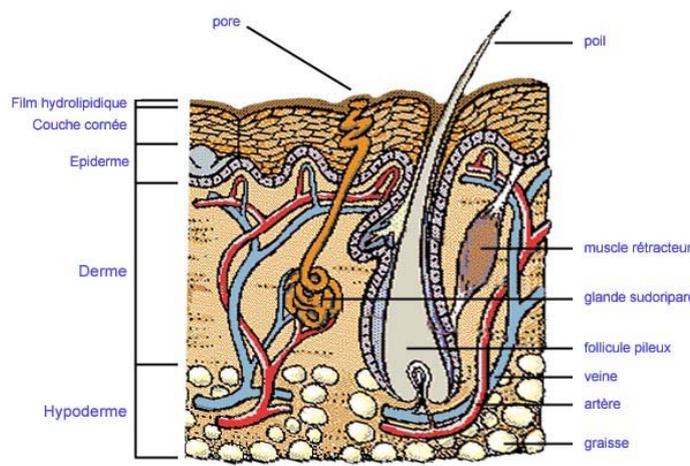


Figure III-1 : Structure de la peau (<http://www.recherche-pierre-fabre.com/>)

Les kératinocytes (80% de l'ensemble des cellules épidermiques) se répartissent en quatre ou cinq couches superposées, expliquant le caractère stratifié de l'épiderme. Elles se créent dans la couche la plus profonde et migrent vers la surface de l'épiderme. Au fur et à mesure de cette migration, ces cellules se remplissent de kératine, protéine fibreuse insoluble dans l'eau, qui confère à l'épiderme sa fonction de protection, et subissent des modifications biochimiques et structurales. La couche la plus superficielle est appelée couche cornée ou *stratum corneum* et les kératinocytes sont alors appelés cornéocytes, cellules complètement kératinisées et ne possédant plus de noyau. Les cellules de cette couche superficielle sont aplaties, ce qui donne le qualificatif pavimenteux à l'épiderme, et sont étroitement soudées. Cette couche joue un rôle fondamental dans la fonction barrière de l'épiderme : elle résiste aux agressions chimiques, au froid et au chaud ainsi qu'à la friction.

Les mélanocytes sont des cellules capables de synthétiser la mélanine, responsable en partie de la couleur de la peau. Ce pigment absorbe les rayons ultraviolets du soleil et assure une photoprotection vitale.

Les cellules de Langerhans assurent également un rôle essentiel pour la défense de l'organisme contre les agressions extérieures car elles appartiennent au système immunitaire de la peau.

Les cellules de Merkel sont des cellules d'origine nerveuse impliquées dans la fonction du tact, jouant le rôle de récepteur sensoriel du toucher.

De plus, il existe un film cutané à la surface de la couche cornée, de 0,5 à 5 µm d'épaisseur, qui assure également la fonction barrière. Il est composé de produits issus de la kératinisation épidermique et du film hydrolipidique. Ce dernier est une fine émulsion, composée d'une phase lipidique et d'une phase aqueuse, contenant principalement de l'eau mais aussi des substances minérales (chlorures de sodium, potassium, calcium, ions phosphates...) et des substances organiques constituées par des composés azotés (urée, acides aminés, acide urique) et des métabolites du glucose (acides lactique et pyruvique). Cette fraction hydrosoluble du film cutané est responsable du pH acide de la peau, compris entre 4 et 6. En outre, ce film de surface protège la peau de la déshydratation par son effet occlusif.

2. Le stress oxydant : un déséquilibre aux origines et conséquences multiples

Les processus physiologiques fondamentaux, comme le métabolisme aérobie ou les mécanismes microbiens et inflammatoires, produisent en permanence de faibles quantités d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species) (Sander *et al.*, 2004). Au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale par exemple, une infime partie de l'oxygène (moins de 5%) échappe à la réduction complète en eau et forme des espèces réactives de l'oxygène, en particulier des radicaux libres (Cadenas et Davies, 2000). Les radicaux libres sont des espèces chimiques qui possèdent un électron célibataire, leur conférant une réactivité plus ou moins importante selon la nature du radical, mais sont pour la plupart de puissants oxydants. Les principaux radicaux libres sont l'anion radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et le radical hydroxyle OH^{\cdot} . Il existe d'autres espèces dérivées de l'oxygène qui ont la capacité d'engendrer des radicaux libres, comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et des radicaux issus de la réaction entre les ROS et les constituants cellulaires, par exemple le radical peroxyde ROO^{\cdot} (Kohen, 1999).

Ces molécules réactives, particulièrement toxiques pour l'intégrité de nos cellules, sont normalement éliminées par des systèmes de défense enzymatiques ou biochimiques. Elles sont transformées par des antioxydants enzymatiques : superoxyde dismutase (SOD), catalase et glutathion peroxydase, qui nécessitent des oligo-éléments pour fonctionner, respectivement cuivre et zinc, fer et sélénium. Elles sont également dégradées par des agents antioxydants non enzymatiques à faible poids moléculaire (ou *Low Molecular Weight Antioxidant* LMWA) que sont les vitamines E et C, le β -carotène (précurseur de la vitamine A), ou le glutathion (Goudable et Favier, 1997). L'équilibre oxydants/antioxydants est donc continuellement régulé. Les ROS sont donc nécessaires au bon fonctionnement de certaines réactions du métabolisme ; néanmoins leur surproduction est néfaste, tant elle peut provoquer la dégradation de molécules biologiques.

Parfois, sous l'influence de diverses pathologies, de facteurs exogènes, environnementaux (comme la pollution, l'exposition prolongée au soleil), le tabagisme, l'absorption d'alcool ou de médicaments, un exercice physique intense mal pratiqué ou mal géré, la production de ces molécules agressives s'exacerbe et les systèmes naturels de défense ou de réparation sont débordés. Ces ROS sont alors amenés à réagir dans l'environnement où ils sont produits, avec toute une série de substrats biologiques. On assiste ainsi à une désorganisation des structures membranaires, à l'oxydation de protéines qui perdent leur fonction, à l'attaque et à la fragmentation de l'ADN (Kohen, 1999). Le syndrome résultant d'un déséquilibre entre les systèmes de défense antioxydants déficients et la production excessive de radicaux libres oxygénés est appelé stress oxydant. Il peut être la cause ou

une des causes d'une sénescence accélérée (Roussel et Ferry, 2002) et de maladies comme le cancer, l'athérome ou la cataracte. Il peut aussi être la conséquence de certains troubles métaboliques tels que le diabète ou les processus infectieux comme le sida (Favier, 1997) (Figure III-2).

Code de champ modifié

Figure III-2 : Principales circonstances pathologiques s'accompagnant d'un stress oxydant (ARDS : syndrome de détresse respiratoire aiguë ; ALS : sclérose latérale amyotrophique ; IRC : insuffisance rénale chronique) (Favier, 1997).

Comme la plupart des organes de notre corps, la peau est fréquemment et directement exposée à un environnement pro-oxydant (polluants atmosphériques, UV du soleil, ozone, prolifération de bactéries pathogènes...) qui est responsable d'une production supplémentaire de ROS et donc de l'apparition du stress oxydant. Elle a développé plusieurs lignes de défense pour se protéger des effets délétères des espèces réactives de l'oxygène (Thiele *et al.*, 2001; Thiele *et al.*, 2002) : des systèmes de réparation, de prévention et de défenses physiques et antioxydantes (Kohen, 1999). Ces dernières constituent le mécanisme de défense le plus important. Le système antioxydant réagit directement avec les ROS afin de se prévenir d'eux lors de l'approche et de l'attaque des sites biologiques. Ce système de défense comprend deux groupes d'antioxydants, enzymatiques et à faible poids moléculaire, qui agissent en synergie. Les antioxydants enzymatiques (catalase, SOD, etc.) interagissent avec les antioxydants à faibles poids moléculaires lipophiles tels que les tocophérols (vitamine E) et les ubiquinol (coenzyme Q) et hydrophiles tels que l'acide ascorbique (vitamine C) et le glutathion (GSH) (Figure III-3). D'autres composés comme les caroténoïdes et l'acide urique possèdent une activité antioxydante mais leurs rôles et leurs interactions dans le réseau cutané d'antioxydants ne sont pas encore clairement connus (Baran et Maibach, 2004).

Code de champ modifié

Figure III-3 : Fonctionnement général du réseau interactif des antioxydants enzymatiques et non-enzymatique de la peau. (Baran et Maibach, 2004)

De manière générale, un antioxydant peut être défini comme une substance qui, présente en faible concentration comparée à celle d'un substrat oxydable, prévient son oxydation, initiée par un pro-oxydant. Ce dernier désigne entre autres les ROS. Un antioxydant peut efficacement réduire un pro-oxydant en formant des produits qui ne sont pas ou faiblement toxiques. Le pro-oxydant induit donc des dégradations qui sont inhibées par la présence d'antioxydants. Cette inhibition est mesurée et reliée à la capacité antioxydante de la peau. C'est l'existence de pro-oxydants variés ou d'espèces réactives *in vivo* qui font que les antioxydants sont essentiels à la vie (Prior et Cao, 1999).

La peau fournit au corps humain une enveloppe protectrice, cruciale pour l'homéostasie. Si les ROS et les altérations qu'ils entraînent sont impliqués dans de nombreux désordres, de la photosensibilité au cancer (Bickers et Athar, 2006 ; Sander *et al.*, 2004), alors un traitement antioxydant efficace pourrait retarder voire empêcher le déclenchement de telles maladies (Halliwell et Whiteman, 2004). Etudier le stress oxydant, en déchiffrer les mécanismes et les processus de défense sont indispensables à la compréhension, aux diagnostics et aux traitements des pathologies qui en découlent.

B. Méthodes d'exploration du stress oxydant

Il existe un très grand nombre de techniques pour évaluer le stress oxydant : détermination de la quantité d'espèces réactives produites et des dommages biologiques induits par l'analyse des produits d'oxydation, quantification des molécules antioxydantes et estimation de la capacité antioxydante globale. Cet important panel de méthodes est mis en œuvre sur des prélèvements de fluides biologiques (sang, urine, etc.) (Winnik et Kitchin, 2008 ; Halliwell et Whiteman, 2004 ; Haleng *et al.*, 2007). Ici, les techniques présentées concernent plus spécifiquement l'évaluation des marqueurs du stress oxydant au niveau de la peau.

1. Mesure directe des radicaux libres :

La mesure directe des radicaux libres est actuellement possible par deux techniques : la résonance paramagnétique électronique (RPE ou ESR) et la chimiluminescence.

La RPE est une méthode spectroscopique qui mesure l'absorption d'énergie produite suite à l'interaction de l'électron libre du radical avec un champ magnétique intense. C'est donc une technique de choix pour la mise en évidence des radicaux libres comme l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et les radicaux lipidiques. L'utilisation de spectromètres à basse fréquence et de « pièges à spins » ou « sondes » (par exemple sondes nitroxyles) qui interceptent les radicaux et les accumulent (stabilisation des radicaux qui ont une très courte durée de vie et augmentation de la sensibilité de la mesure) a permis de réaliser des mesures sur la peau directement *in vivo* (Herrling *et al.*, 2006 ; Halliwell et Whiteman, 2004).

La mesure directe des radicaux libres peut également se faire par chimiluminescence. Cette méthode se base sur la réaction d'une substance chimique appelée sonde chimiluminescente avec un radical libre qui forme un produit dans un état excité. En retournant à son l'état fondamental, ce produit émet de la lumière. L'équipe de Sakurai a étudié l'effet des rayonnements ultraviolets ainsi que l'efficacité des traitements topiques associés directement à la surface de la peau de souris (Sakurai *et al.*, 2005 ; Yasui *et al.*, 2000). Cette technique a été également testée chez l'homme sur des échantillons de *stratum corneum* prélevés à l'aide de bandes adhésives (méthode du « tape stripping ») pour en déterminer la capacité antioxydante. Des radicaux libres, plus exactement des radicaux anions superoxydes, sont générés dans le système de mesure au sein de l'échantillon analysé par une exposition aux rayons ultraviolets. Ils sont alors détectés grâce à la lumière émise suite à leur réaction avec une substance chimiluminescente (photo-chimiluminescence : PCL). Ces radicaux sont partiellement éliminés par les antioxydants contenus dans l'échantillon et les radicaux restants sont alors quantifiés de la même manière (Ziosi *et al.*, 2006). Contrairement à ces études qui nécessitent des sondes chimiluminescentes, la technique basée sur l'émission de très faibles intensités de photons, appelée généralement « ultraweak photon emission » ou « UPE », détecte des émissions de lumière très faibles, provoquées par les réactions d'oxydation elles-mêmes, sans intervention de substances exogènes (seuls les chromophores endogènes tels que les quinones sont nécessaires à ce processus). Cette technique non invasive a été mise en œuvre directement sur la peau humaine pour l'étude *in vivo* du stress induit par les UV A et l'évaluation de l'efficacité des traitements topiques antioxydants (Hagens *et al.*, 2008).

2. Evaluation des métabolites issus des réactions radicalaires

Le stress oxydant entraîne la dégradation des molécules biologiques et des constituants cellulaires. Ces dommages oxydatifs peuvent se manifester de diverses manières, au niveau des protéines, des lipides et de l'ADN. Différentes techniques permettent d'analyser les produits d'oxydation (Tableau III-1).

Code de champ modifié

Par exemple, l'oxydation des protéines entraîne l'apparition de groupements carbonyles. Ces derniers peuvent être détectés par de nombreuses méthodes : spectrophotométrie, chromatographie, électrophorèse suivi d'un Western Blot (détection par un anticorps spécifique) (Mateos et Bravo, 2007). Un exemple de suivi in vivo a été donné par Thiele et son équipe : les protéines carbonylées ont été détectées dans le *stratum corneum*, prélevées in vivo par tape-stripping et analysées par une procédure ELISA : les rubans adhésifs subissent différents traitements afin d'éviter toute réaction parasite et d'identifier spécifiquement les groupements carbonyles. Des anticorps et des enzymes liées sont ensuite utilisés pour permettre le dosage de ces groupements par mesure d'absorbance (Thiele *et al.*, 1998).

Oxidation products	Analytical methods
Lipids	
Hydrocarbons	
Ethane, pentane	GC-MS
Aldehydes	Spectrophotometry (TBARS)
Malondialdehyde	GC-MS
4-Hydroxynonenal	HPLC
Dienals	
Lipid hydroperoxides	HPLC
	Spectrophotometry, fluorometry
	Iodometry
Conjugated dienes	Spectrophotometry
Isoprostanes	GC-MS, LC-MS
	Immunoassays

Tableau III-1 : Méthodes utilisées pour évaluer les dégradations oxydantes des macromolécules (Mateos et Bravo, 2007).

La peroxydation lipidique étant une manifestation importante de l'activité des radicaux libres dans notre système biologique, les produits qui en résultent sont très souvent étudiés. Parmi eux, les hydroperoxydes (ROOH) sont très utilisés comme marqueurs du stress oxydant et sont analysés par différentes méthodes (iodométrie, spectrophotométrie, chromatographie liquide haute performance : HPLC, chromatographie gazeuse-spectromètre de masse : GC-MS) (Laguerre *et al.*, 2007 ; Yamazaki *et al.*, 1999).

Par ailleurs, ces produits se décomposent très vite en d'autres substances relativement plus stables telles que les aldéhydes comme le malondialdéhyde (MDA) (Figure III-4). Ce dernier est déterminé généralement par spectrophotométrie ou HPLC après réaction avec l'acide thiobarbiturique (TBA), dosage appelé TBARS (Mateos et Bravo, 2007 ; Valacchi *et al.*, 2000). Mais cette technique présente un inconvénient majeur : le TBA n'est pas spécifique du MDA. Des méthodes alternatives ont donc été développées en couplant par exemple une dérivatisation du MDA à une détection par chromatographie gazeuse (Laguerre *et al.*, 2007). De manière plus globale, Steeghs et al. (2006) ont étudié les aldéhydes issus de la peroxydation lipidique suite à une exposition aux UV in vivo

Code de champ modifié

directement à la surface de la peau : les composés sont ionisés par des réactions de transfert de proton (PTR) et les produits, pré-séparés par une chromatographie gazeuse (GC), sont analysés par un spectromètre de masse (MS).

Figure III-4 : Mécanisme d'oxydation des acides gras (AG) par les espèces réactives de l'oxygène : vue d'ensemble des différents produits formés (adapté de Cherubini et al., 2005 et Cillard et Cillard, 2006).

Enfin, le suivi des lésions induites par les radicaux libres sur l'ADN est également très important car ces dommages sont impliqués dans le vieillissement et le développement de processus délétères, comme la cancérogenèse (Favier, 1997 ; Mateos et Bravo, 2007 ; Evans *et al.*, 2004). Les dérivés réactionnels sont très nombreux : 8-hydroxyguanine (8-OHGua), 8-hydroxy-2'deoxyguanosine (8-OHdG), thymine glycol (Tg), 5-hydroxymethyluracil (5-OHmU)... et les méthodes de détection relativement variées : techniques chromatographiques, électrophorétiques et immunochimiques (Mateos et Bravo, 2007). La GC-MS, nécessitant une pré-hydrolyse de l'ADN, est appliquée à la détection de 8-OHdG de l'ADN cellulaire extrait. La chromatographie liquide et plus précisément l'HPLC avec détection électrochimique et la LC-MS sont également mises en œuvre pour détecter ces dérivés. D'autres techniques sont également citées telles que les techniques de post marquage (marquage radioactif ou fluorescence) et l'électrophorèse capillaire (CE). Cette dernière fournit une séparation plus efficace que l'HPLC et présente donc un réel avantage dans les matrices biologiques complexes pour lesquelles les interférences peuvent compliquer l'analyse. Elle peut être couplée avec des détecteurs électrochimiques ou UV. Enfin, la technique des comètes, appelé Comet Assay (ou single cell gel electrophoresis assay) est l'une des plus sensibles et des plus faciles à mettre en œuvre. Basée sur les propriétés de migration de l'ADN dans un champ électrique, elle permet de distinguer les brins d'ADN endommagés parmi les brins intacts (Mateos et Bravo, 2007).

3. Analyse des antioxydants

Pour évaluer les capacités de l'organisme à se défendre contre le stress oxydant, des équipes se sont intéressées à l'analyse spécifique des antioxydants. Un certain nombre de travaux proposent de doser le glutathion, l'acide ascorbique et le tocophérol par fluorescence et HPLC couplée entre autres avec une détection électrochimique (HPLC-ED) (Murray *et al.*, 2007 ; Valacchi *et al.*, 2004 ; Fuchs *et al.*, 2003 ; Thiele *et al.*, 1997). Mais ces mesures nécessitent des biopsies de peau. Cependant, Valacchi et al. proposent également de doser par HPLC-ED la vitamine E en utilisant la méthode du « tape stripping » pour prélever le *stratum corneum* (Valacchi *et al.*, 2000) et Vaule et al. (2004) utilisent une lingette nettoyante à base d'alcool pour effectuer le même dosage par HPLC couplée à un spectromètre de masse. Les substances caroténoïdes ont aussi fait l'objet de recherches : elles ont été détectées *in vivo* de manière non invasive par spectroscopie Raman (Darvin *et al.*, 2006 ; Gellermann *et al.*, 2000). Par cette méthode, Darwin et al. (2007) ont étudié l'influence sur la peau d'une supplémentation en caroténoïdes dans notre alimentation.

4. Evaluation de la capacité antioxydante totale

Une dernière approche pour apprécier le stress oxydant consiste à évaluer la capacité antioxydante totale. Cette évaluation bénéficie d'un panel de méthodes qui sont basées sur l'efficacité du milieu à inhiber l'effet des radicaux libres et plus généralement des molécules pro-oxydantes (Bartosz, 2003 ; Prior et Cao, 1999). Par exemple, le test FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) analyse la capacité à réduire les ions Fe^{3+} pour former Fe^{2+} ; le test TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Parameter) évalue la capacité à éliminer les radicaux libres générés par une substance introduite dans le milieu. D'autres acronymes tels que TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), TOSC (Total Oxidant Scavenging Capacity) cachent autant de méthodes mises en place généralement pour déterminer l'état antioxydant dans le plasma. Elles se différencient par les systèmes antioxydants ciblés, par les espèces génératrices de radicaux libres et par le système de détection. Cependant, une équipe de chercheurs s'est orientée sur la détection *in vivo*, directement à la surface de la peau. Kohen et al. (2000 ; 2004) ont ainsi évalué le pouvoir réducteur global par voltammétrie cyclique. Cette technique est basée sur la capacité qu'ont tous les composés LMWA à donner un électron et à agir ainsi comme agents réducteurs. Il a donc été posé comme hypothèse que la mesure du pouvoir réducteur du fluide biologique homogène ou des tissus reflétait l'activité antioxydante totale découlant de tous les acteurs du système. En réalisant cette détection électrochimique, ils ont non seulement accès à une évaluation de la capacité antioxydante globale mais également à une détection, à une identification et à une quantification plus spécifique de groupes d'antioxydants impliqués en fonction du potentiel d'oxydation et de l'intensité des pics observés. Un puits est placé directement à la surface de la peau puis est rempli de solution d'extraction qui est prélevée et analysée, après trente minutes d'incubation, par voltammétrie cyclique. Cette analyse peut être également faite directement : la solution d'extraction contient alors du fer chélaté (cytochrome c) sous sa forme oxydée, qui est réduit par les antioxydants. La mesure de potentiel du couple rédox est suivi par potentiométrie ce qui permet, par la loi de Nernst, d'évaluer le niveau d'espèces réductrices sécrétées (Kohen *et al.*, 1999).

5. Limitations

L'ensemble des méthodes précédemment décrites présente des inconvénients. Les techniques comme l'HPLC et les spectroscopies ne sont pas simples à mettre en place : les phases de prétraitement et d'analyse peuvent être relativement longues, rendant la mesure différée dans le temps, et elles impliquent un équipement onéreux et peuvent nécessiter des biopsies. De plus, les protocoles de prélèvement doivent être correctement respectés pour éviter tout risque de génération non contrôlée d'espèces réactives de l'oxygène. La complexité des mécanismes d'oxydo-réduction impliqués dans le stress oxydant rend son évaluation difficile : l'état des molécules induites est en perpétuel changement (durée de vie courte des radicaux libres), les antioxydants réagissent entre eux et peuvent régénérer d'autres composés. Plusieurs marqueurs doivent donc être étudiés pour refléter au mieux l'état du milieu biologique (Prior et Cao, 1999). La voltammétrie cyclique présentée par Kohen et al. (1999), semble être une réelle alternative : simple à mettre en place, elle détecte simultanément différents groupes d'antioxydants et peut être un outil de compréhension des processus liés au stress oxydant.

Par ailleurs, le nombre de travaux de recherche et de développement de capteurs et biocapteurs électrochimiques pour l'évaluation de l'état antioxydant d'un milieu confirme l'électrochimie comme un puissant outil analytique (Mello et Kubota, 2007 ; Prieto-Simon *et al.*, 2008).

C. Nouvelle méthode exploratoire aux avantages prometteurs

Le Centre de Recherche sur la Peau de la société Pierre Fabre Dermo-Cosmétique a pour mission d'une part, de développer et d'évaluer un éventail de techniques afin de mieux comprendre les mécanismes physiologiques impliqués dans le vieillissement, l'inflammation et la fonction barrière de la peau et d'autre part, d'évaluer la tolérance et l'efficacité de produits dermo-cosmétiques et de traitements à orientation dermatologique. L'évaluation des propriétés antioxydantes du *stratum corneum* est donc un des principaux axes de recherche du Centre.

Une collaboration de recherche établie depuis 2000 entre l'Institut de Recherche Pierre Fabre et l'équipe Capteurs Electrochimiques et Procédés du Laboratoire de Génie Chimique (LGC) a permis d'évaluer les potentialités des techniques électrochimiques pour l'analyse de l'état rédox de la peau. Les travaux réalisés dans le cadre d'une première thèse, soutenue par Audrey Ruffien-Ciszak en 2005, ont permis de proposer un protocole non invasif et d'effectuer des mesures électrochimiques directes à la surface de la peau (Ruffien-Ciszak, 2005). Contrairement à l'équipe de Kohen, ces mesures sont effectuées sans ajout de gel ou de solvant (Figure III-5).

Code de champ modifié

Figure III-5 : Montage électrochimique réalisé sur la peau pour la détection de molécules antioxydantes : A) Microélectrode de travail ; B) Electrode auxiliaire ; C) Electrode de référence (Ruffien-Ciszak, 2005)

La démarche consiste en l'emploi d'ultramicroélectrodes de travail en platine et en or fabriquées manuellement et à la réalisation de mesures potentiométriques et ampérométriques pour déterminer des paramètres physico-chimiques comme le pH, le potentiel rédox et détecter certaines molécules antioxydantes (Ruffien-Ciszak *et al.*, 2006).

La capacité antioxydante globale du *stratum corneum* a été évaluée par voltammétrie cyclique en intégrant la courbe en oxydation. Les voltammogrammes obtenus sont présentés à la Figure III-6.

Code de champ modifié

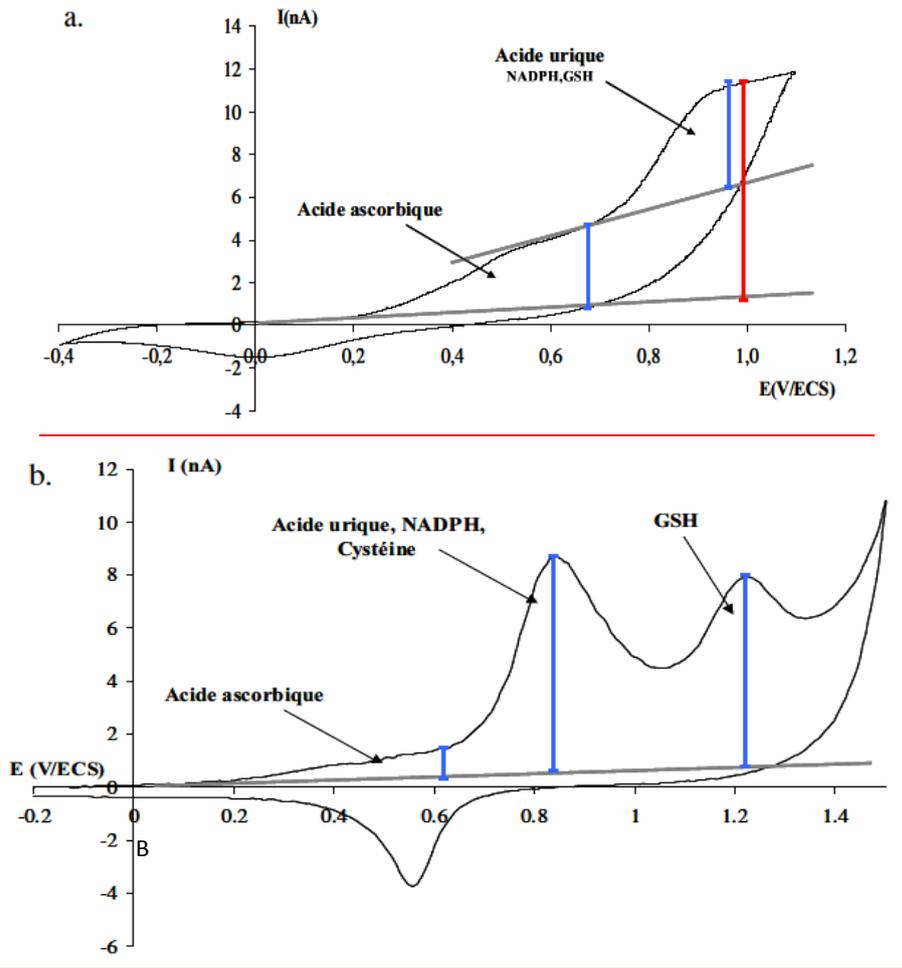


Figure III-6 : Voltammogrammes cycliques réalisés à la surface de l'épiderme : a) avec une microélectrode de platine, b) avec une microélectrode d'or (Vitesse de balayage : $50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) (adapté de Ruffien-Ciszak, 2005)

L'implication des principales espèces antioxydantes dans les processus d'oxydation observés a pu être déterminée après une étude électrochimique dans des solutions modèles et par ajout d'espèces sur la peau. Quatre antioxydants ont été particulièrement étudiés : l'acide ascorbique (vitamine C), l'acide urique, le glutathion et la NADPH. Le Tableau III-2 présente les réactions d'oxydation de quelques antioxydants et les potentiels auxquels ils peuvent être détectés.

Code de champ modifié

Antioxydant	Réactions d'oxydation	Potentiel d'oxydation
-------------	-----------------------	-----------------------

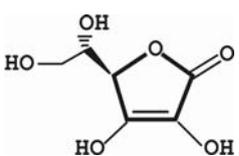
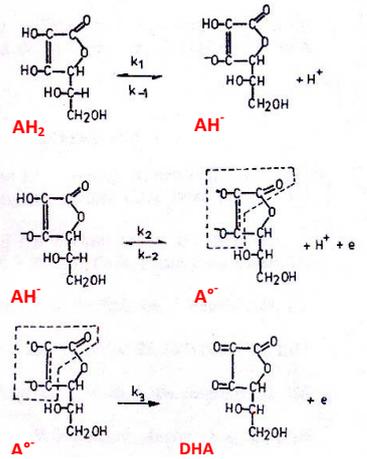
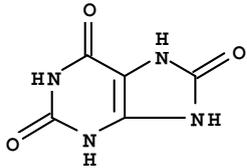
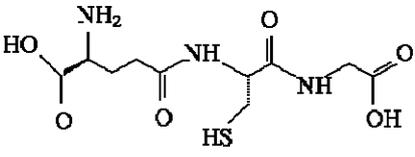
<p>Acide ascorbique</p>  <p> $AH^- = A^{\bullet} + H^+ + e^- \quad E^{\circ} = 0,69V/ESH$ $A^{\bullet} = DHA + e^- \quad E^{\circ} = -0,17V/ESH$ </p>		<p>Or :</p> <p>Palier de diffusion $E_{à\ llim} = 0,6V/ECS$</p> <p>Platine :</p> <p>Palier de diffusion $E_{à\ llim} = 0,6V/ECS$</p>
<p>Acide urique</p>  <p> <i>Acide urique + 3H₂O → alloxan + urée + 2H⁺ + 2e⁻.</i> $C_5N_4O_3H_3^- = C_5N_4O_3H_2^{\bullet} + H^+ + e^- \quad E^{\circ} = 1,00V/ESH$ </p>	<p style="text-align: center;">—</p>	<p>Or</p> <p>Pic $E_{à\ lpic} = 0,8V/ECS$</p> <p>Platine :</p> <p>Pic $E_{à\ llim} = 1V/ECS$</p>
<p>Glutathion</p>  <p> $2\ GSH = GSSG + 2H^+ + 2e^- \quad E^{\circ} = 0,16V/ECS$ $GSH = GS^{\bullet} + H^+ + e^-$ </p>		<p>Or</p> <p>Pic $E_{à\ lpic} = 1,2/ECS$</p> <p>Platine :</p> <p>Palier de diffusion $E_{à\ llim} = 1V/ECS$</p>

Tableau III-2 : Oxydation de l'acide ascorbique, de l'acide urique et du glutathion – Potentiel de détection sur les voltammogrammes réalisés directement à la surface de la peau.

Les possibilités et les performances de cette méthode ont été montrées par les premières études pré-cliniques. Cependant, ce travail a souligné les limites du mode de fabrication manuelle des microélectrodes. En effet, ce procédé de fabrication est long et les surfaces des électrodes, liées à la qualité du polissage, doivent être préalablement déterminées. Or, le dispositif doit être éprouvé sur un plus grand nombre de volontaires et implique donc des améliorations techniques.

Conclusion

La peau, barrière protectrice de notre organisme, est soumise au stress oxydant, impliqué dans de nombreuses pathologies. Un traitement adapté voire une prévention contre des maladies implique une meilleure compréhension des mécanismes rédox induits par ce stress et une évaluation de la capacité antioxydante de la peau. Les biologistes et les dermatologues ont donc besoin d'un dispositif analytique non invasif pour réaliser des mesures directes et rapides. Le dispositif électrochimique présenté dans les travaux d'Audrey Ruffien-Cizsak répond en tous points à ces attentes.

Cependant, des améliorations techniques doivent être apportées, notamment en terme de production de microélectrodes. La fabrication collective par les technologies microélectroniques apporte une solution alternative. Ce procédé de fabrication à bas coût propose une production de masse avec des composants présentant les mêmes spécificités. Les tailles ainsi que les géométries sont contrôlées. Cependant, les microélectrodes issues de ce procédé de fabrication doivent présenter des caractéristiques électrochimiques comparables à celles qui ont été jusqu'ici obtenues. Les procédés d'intégration des couches métalliques doivent donc être étudiés, adaptés et optimisés pour les structures souhaitées et le dispositif de microélectrodes pensé et réalisé pour une application sur la peau. C'est l'objectif de ce travail de thèse présenté dans les chapitres suivants.

Bibliographie

- Allan I.J., Vrana B., Greenwood R., Milles G.A., Roig B. et Gonzales C. (2006). A "toolbox" for biological and chemical monitoring requirements for the European Union's Water Framework Directive. *Talanta*, *69*, 302-322.
- Amatore C., Oleinick A.I. et Svir I. (2009). Numerical Simulation of Diffusion Processes at Recessed Disk Microelectrode Arrays Using the Quasi-Conformal Mapping Approach. *Anal. Chem.*, *81*, 4397-4405.
- Aoki K. (1993). Theory of ultramicroelectrodes. *Electroanalysis*, *5*, 627-639.
- Bakker E. et Telting-Diaz M. (2002). Electrochemical sensors. *Anal. Chem.*, *74*, 2781-2800.
- Baran R. et Maibach H. (2004). *Textbook of cosmetic dermatology, Third edition*. Abingdon: Taylor & Francis.
- Bard, A.J. et Faulkner L.R. (2001). *Electrochemical methods: fundamentals and applications, Second edition*. New York : John Wiley & Sons, Inc.
- Bartosz G. (2003). Total antioxidant capacity. Dans Spiegel H., *Advances in clinical chemistry* (Vol. 37). San Diego : Elsevier Science.
- Becquerel A.C. et Becquerel E. (1858). *Résumé de l'histoire de l'électricité et du magnétisme, et des applications de ces sciences à la chimie, aux sciences naturelles et aux arts*. Paris: Firmin Didot Frères.
- Beriet C., Ferrigno R. et Girault H.H. (2000). Simulation of the chronoamperometric response of a regular array of micro-disk electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, *486*, 56-64.
- Bickers D.R. et Athar M. (2006). Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J. Invest. Dermatol.*, *126*, 2565-2575.
- Cadenas E. et Davies K.J.A. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxydative stress, and aging. *Free Radical Biol. Med.*, *29*, 222-230.
- Castillo J., Gaspar S., Leth S., Niculescu M., Mortari A., Bontidean I., Soukharev V., Dorneanu S.A., Ryabov A.D. et Csöregi E. (2004). Biosensors for life quality - Design, development and applications. *Sens. Actuators, B*, *102*, 179-194.
- Cherubini A., Ruggiero C., Polidori M.C. et Mecocci P. (2005). Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biol. Med.*, *39*, 841-852.
- Cillard J. et Cillard P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Ol., Corps Gras, Lipides*, *13*, 24-29.
- Comtat M. (1997, 15 avril). Deux siècles d'électrochimie au service de l'homme. *Fréquence Chimie*, 2-11.
- Darvin M.E., Gersonde I., Albrecht H., Meinke M., Sterry W. et Lademann J. (2006). Non-invasive in vivo detection of the carotenoid antioxidant substance lycopene in the human skin using the resonance Raman spectroscopy. *Laser Phys. Lett.*, *3*, 460-463.
- Darvin M.E., Gersonde I., Albrecht H., Sterry W. et Lademann J. (2007). Resonance Raman spectroscopy for the detection of carotenoids in foodstuffs. Influence of the nutrition on antioxidative potential on the skin. *Laser Phys. Lett.*, *4*, 452-456.

- Davies T.J. et Compton R.G. (2005). The cyclic and linear sweep voltammetry of regular and random arrays of microdisc electrodes : Theory. *J. Electroanal. Chem.*, 585, 63-82.
- Davies T.J., Ward-Jones S., Banks C.E., Del Campo J., Mas R., Munoz F.X. et Compton R.G. (2005). The cyclic and linear sweep voltammetry of regular arrays of microdisc electrodes: Fitting of experimental data. *J. Electroanal. Chem.*, 585, 51-62.
- Dupont D. (2009). Applications des biocapteurs : du contrôle des aliments à la recherche de vie sur Mars. *Techniques de l'Ingénieur, BIO7100*.
- Evans M., Dizdaroglu M. et Cooke M.S. (2004). Oxidative DNA damage and disease : induction, repair and significance. *Mutat. Res.*, 567, 1-61.
- Fasching R., Kohl F. et Urban G. (2003). A miniaturised amperometric CO₂ sensor based on dissociation of copper complexes. *Sens. Actuators, B*, 93, 197-204.
- Favier A. (1997). Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Bio Clin*, 55, 9-16.
- Feeney R. et Kounaves S.P. (2000). Microfabrication ultramicroelectrode arrays : developments, advances, and applications in environmental analysis. *Electroanalysis*, 12, 677-684.
- Fiaccabrino G.C. et Koudelka-Hep M. (1998). Thin-film microfabrication of electrochemical transducers. *Electroanalysis*, 10, 217-222.
- Fleischmann M., Pons S. et Rolinson D.R. (1987). *Ultramicroelectrodes*. Morgantown: Datatech Systems, Inc.
- Forster R.J. (1994). Microelectrodes : New Dimensions in Electrochemistry. *Chem. Soc. Rev.*, 23, 289-297.
- Fuchs J., Weber S., Podda M., Groth N., Herrling T., Packer L. et Kaufmann R. (2003). HPLC analysis of vitamin E isoforms in human epidermis: correlation with minimal erythema dose and free radical scavenging activity. *Free Radical Biol. Med.*, 34, 330-336.
- Gellermann W., McClan R.W., Katz N.B. et Bernstein P.S. (2000). Method and apparatus for noninvasive measurement of carotenoids and related chemical substances in biological tissue. *Brevet n° WO 00/78217*.
- Girault H.H. (2007). *Electrochimie physique et analytique*, 2^{ème} éd. Lausanne: Presse polytechniques et universitaires romandes.
- Goudable J. et Favier A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr. Clin. Métabol.*, 11, 115-120.
- Hagens R., Khabiri F., Schreiner V., Wenck H., Wittern K.P., Duchstein H.J. et Mei W. (2008). Non-invasive monitoring of oxidative skin stress by ultraweak photon emission measurement. II: biological validation on ultraviolet A-stressed skin. *Skin. Res. Technol.*, 14, 112-120.
- Hahn C.E.W. (1998). Electrochemical analysis of clinical blood-gases, gases and vapours. *Analyst*, 123, 57R-86R.
- Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C. et Chapelle J.P. (2007). Le stress oxydant. *Rev. Med. Liege*, 62, 628-638.
- Halliwell B. et Whiteman M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture : how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.*, 142, 231-255.
- Herrling T., Jung K. et Fuchs J. (2006). Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin. *Spectrochim. Acta, Part A*, 63, 840-845.

- Johnson M.D., Franklin R.K., Gibson M.D., Brown R.B. et Kipke D.R. (2008). Implantable microelectrode arrays for simultaneous electrophysiological and neurochemical recordings. *J. Neurosci. Methods*, 174, 62-70.
- Kintzios S., Marinopoulou I., Moschopoulou G., Mangana O., Nomikou K., Endo K., Papanastasiou I. et Simonian A. (2006). Development of a novel, multi-analyte biosensor system for assaying cell division : Identification of cell proliferation/death precursor events. *Biosens. Bioelectron.*, 21, 1365-1373.
- Kohen R. (1999). Skin antioxydants : their role in aging and in oxidative stress - New approaches for their evaluation. *Biomed. Pharmacother.*, 53, 181-192.
- Kohen R., Fanberstein D., Zolkowicz A., Tirosh O. et Farfour S. (1999). Noninvasive in vivo evaluation of skin antioxidant activity and oxidation status. Dans Abelson J., Simon M. et Packer L. (Éd.), *Methods in Enzymology* (Vol. 300 Oxidants and antioxidants Part B, 428-437). San Diego: Academic Press.
- Kohen R., Oron M., Zolkowicz A., Kanevsky E., Farfour S. et Wormser U. (2004). Low molecular weight antioxidants released from the skin's epidermal layers : an age dependent phenomenon in the rat. *Exp. Gerontol.*, 39, 67-72.
- Kohen R., Vellaichamy E., Hrbac J., Gati I. et Tirosh O. (2000). Quantification of the overall reactive oxygen species scavenging capacity of biological fluids and tissues. *Free Radical Biol. Med.*, 28, 871-879.
- Laguerre M., Lecomte J. et Villeneuve P. (2007). Evaluation of the ability of antioxydants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Prog. Lipid Res.*, 46, 244-282.
- Lam Y.Z. et Atkinson J. (2002). Disposable screen-printed biosensor for transcutaneous oxygen measurement. *Meas. Sci. Technol.*, 13, 2074-2081.
- Laschi S. et Mascini M. (2006). Planar electrochemical sensors for biomedical applications. *Med. Eng. Phy.*, 28, 934-943.
- Lee H.J., Beriet C., Ferrigno R. et Girault H.H. (2001). Cyclic voltammetry at a regular microdisc electrode array. *J. Electroanal. Chem.*, 502, 138-145.
- Malhotra B.D. et Chaubey A. (2003). Biosensors for clinical diagnostics industry. *Sens. Actuators, B*, 91, 117-127.
- Mateos R. et Bravo L. (2007). Chromatographic and electrophoretic methodes for the analysis of biomarkers of oxidative damage macromolecules (DNA, lipids, and proteins). *J. Sep. Sci.*, 30, 175-191.
- Mélissopoulos A. et Levacher C. (1998). *La peau : structure et physiologie*. Paris: Ed. médicales internationales, Cahan et Tecdoc Lavoisier.
- Mello L.D. et Kubota L.T. (2007). Biosensors as tool for the antioxydant status evaluation. *Talanta*, 72, 335-348.
- Montenegro M.I., Queiròs M.A. et Daschbach J.L. (1991). *Microelectrodes : Theory and Applications*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Morf W.E. (1996). Theoretical treatment of the amperometric current response of multiple microelectrode arrays. *Anal. Chim. Acta*, 330, 139-149.
- Morf W.E., Koudelka-Hep M. et De Rooij N.F. (2006). Theoretical treatment and computer simulation of microelectrode arrays. *J. Electroanal. Chem.*, 590, 47-56.

- Murray A.R., Kisin E., Castranova V., Kommineni C., Gunther M.R. et Shvedova A.A. (2007). Phenol-Induced in vivo oxidative stress in skin : evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion. *Chem. Res. Toxicol.*, *20*, 1769-1777.
- Ostwald W. (1912). *L'évolution de l'électrochimie*. (E. Philippi, Trad.) Paris: Félix Alcan.
- Prieto-Simon B., Cortina M., Campas M. et Calas-Blanchard C. (2008). Electrochemical biosensors as a tool for antioxidant capacity assessment. *Sens. Actuators, B*, *129*, 459-466.
- Prior R.L. et Cao G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biol. Med.*, *27*, 1173-1181.
- Rahman A.R.A. et Guiseppi-Elie A. (2009). Design considerations in the development and application of microdisc electrode arrays (MDEAs) for implantable biosensors. *Biomed. Microdevices*, *11*, 701-710.
- Roussel A.M. et Ferry M. (2002). Oxidative stress, nutrition and aging. *Nutr. Clin. Metab.*, *16*, 285-291.
- Ruffien-Ciszak A. (2005). Potentialités des microélectrodes pour une évaluation directe et non invasive des propriétés antioxydantes du *stratum corneum*. Thèse de l'Université Paul Sabatier - Toulouse III.
- Ruffien-Ciszak A., Gros P., Comtat M., Schmitt A.M., Questel E., Casas C. et Redoules D. (2006). Exploration of the global antioxidant capacity of the stratum corneum by cyclic voltammetry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, *40*, 162-167.
- Saito Y. (1968). A theoretical study of the diffusion current at the stationary electrodes of circular and narrow band types. *Rev. Polarogr.*, *15*, 177-187.
- Sakurai H., Yasui H., Yamada Y., Nishimura H. et Shigemoto M. (2005). Detection of reactive oxygen species in the skin of live mice and rats exposed to UVA light : a research review on chemiluminescence and trials for UVA protection. *Photochem. Photobio. Sci.*, *4*, 715-720.
- Sander C.S., Chang H., Hamm F., Elsner P. et Thiele J.J. (2004). Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int. J. Dermatol.*, *43*, 326-335.
- Shim J.H., Do H. et Lee Y. (2010). Simple fabrication of amperometric nitric oxide microsensors based on electropolymerized membrane films. *Electroanalysis*, *22*, 359-366.
- Shoup D. et Szabo A. (1984). Chronoamperometry at an ensemble of microdisk electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, *160*, 19-26.
- Soper S., Brown K., Ellington A., Frazier B., Garcia-Manero G., Gau V., Gutman S.I., Hayes D.F., Korte B., Landers J.L., Larson D., Ligler F., Majumdar A., Mascini M., Nolte D., Rosenzweig Z., Wang J. et Wilson D. (2006). Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics. *Biosens. Bioelectron.*, *21*, 1932-1942.
- Spegel C., Heiskanen A., Skjolding L.H.D. et Emneus J. (2008). Chip Based Electroanalytical Systems for Cell Analysis. *Electroanalysis*, *20*, 680-702.
- Steeghs M.M.L., Moeskops B.W.M., Van Swam K., Cristescu S.M., Scheepers P.T.J. et Harren F.J.M. (2006). On-line monitoring of UV-induced lipid peroxidation products from human skin in vivo using proton-transfer reaction mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, *253*, 58-64.
- Stulik K., Amatore C., Kolub K., Marecek V. et Kutner W. (2000). Microelectrodes. Definitions, characterization, and applications. *Pure Appl. Chem.*, *72*, 1483-1492.
- Thévenot D.R., Toth K., Durst R.A. et Wilson G.S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.*, *16*, 121-131.

- Thiele J.J., Dreher F. et Packer L. (2002). Antioxidant defense systems in skin,. *J. Toxicol.–Cut. Ocul.*, *21*, 119-160.
- Thiele J.J., Schroeter C., Hsieh S.N., Podda M. et Packer L. (2001). The antioxidant network of the stratum corneum. Dans Thiele J., Elsner P. (Éd.), *Oxidants and antioxydants in cutaneous Biology* (Vol. 29). Basel: Karger.
- Thiele J.J., Traber M.G., Re R., Espuno N., Yan L.J., Cross C.E. et Packer L. (1998). Macromolecular carbonyls in human stratum corneum : a biomarker for environmental oxidant exposure ? *FEBS Lett.*, *422*, 403-406.
- Thiele J.J., Traber M.G., Tsang K., Cross C.E. et Packer L. (1997). In vivo exposure to ozone depletes vitamins C and E and induces lipid peroxidation in epidermal layers of murine skin. *Free Radical Biol. Med.*, *23*, 385-391.
- Tothill I.E. (2009). Biosensors for cancer markers diagnosis. *Semin. Cell Dev. Biol.*, *20*, 55-62.
- Trémillon B. (1993). *Electrochimie analytique et réactions en solution - Tome 2 Réactions et méthodes électrochimiques*. Paris: Masson.
- Trémillon B. (2009). L'évolution de l'électrochimie - De la pile de Volta aux nanotechnologies. *Actual. chimique*, *327-328*, 10-26.
- Valacchi G., Pagnin E., Corbacho A., Olano E., Davis P.A., Packer L. et Cross C.E. (2004). In vivo ozone exposure induces antioxidant/stress-related responses in murine lung and skin. *Free Radical Biol. Med.*, *36*, 673-681.
- Valacchi G., Weber S.U., Luu C., Cross C.E. et Packer L. (2000). Ozone potentiates vitamin E depletion by ultraviolet radiation in the murine stratum corneum. *FEBS Lett.*, *466*, 165-168.
- Vaule H., Leonard S.W. et Traber M.G. (2004). Vitamin E delivery to human skin: studies using deuterated α -tocopherol measured by APCI LC-MS. *Free Radical Biol. Med.*, *36*, 456-463.
- Wang J. (2006). *Analytical Electrochemistry, Third Edition*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
- Wang Y., Xu H., Zhang J. et Li G. (2008). Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. *Sensors*, *8*, 2043-2081.
- Wightman R.M (1981). Microvoltammetric electrodes. *Anal. Chem.*, *53*, 1125A-1132A.
- Wilson G.S. et Gifford R. (2005). Biosensors for real-time in vivo measurements. *Biosens. Bioelectron.*, *20*, 2388-2403.
- Winnik W.M. et Kitchin K.T. (2008). Measurement of oxidative stress parameters using liquid chromatography–tandem mass spectroscopy (LC–MS/MS). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, *233*, 100-106.
- Xu X., Zhang S., Chen H. et Kong J. (2009). Integration of electrochemistry in micro-total analysis systems for biochemical assays : Recent developments. *Talanta*, *80*, 8-18.
- Yamazaki S., Ozawa N., Hiratsuka A. et Watabe T. (1999). Increase in cholesterol 7-hydroperoxides in lipids of human skin by sunlight exposure. *Free Radical Biol. Med.*, *26*, 1126-1133.
- Yasui H., Hakozaiki T., Date A., Yoshii T. et Sakurai H. (2000). Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *269*, 131-136.
- Zhang S., Wright G. et Yang Y. (2000). Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosens. Bioelectron.*, *15*, 273-282.
- Ziosi P., Besco E., Vertuani S., Solaroli N. et Manfredini S. (2006). A non-invasive method for the in vivo determination of skin antioxidant capacity (IAC-S[®]). *Skin Res. Technol.*, *12*, 303-308.

Chapitre II

Intégration des microdispositifs électrochimiques

Chapitre II : Intégration des microdispositifs électrochimiques

L'électrochimie offre de puissants outils d'analyse. Cette idée a été d'autant plus renforcée avec l'utilisation de microélectrodes. Leur intégration à un même support pour constituer un dispositif électrochimique à trois électrodes, couplée à leur miniaturisation, est un enjeu majeur pour répondre aux attentes actuelles : étendue de l'analyse au plus grand nombre, faible coût, utilisation simple, mobilité, etc. (Xu *et al.*, 2009). Cependant, un certain nombre de problèmes liés à la fois à la fabrication et à l'analyse reste encore peu compris : la chimie de surface des matériaux au cours des traitements doit être parfaitement connue et contrôlée (Feeney et Kounaves, 2000). Ceci explique d'ailleurs l'utilisation peu répandue des « microdispositifs électrochimiques ». La variabilité dans les dépôts de matériaux, l'instabilité voire l'inadaptabilité des équipements ou des procédés de microfabrication pour produire des films minces identiques (physiquement et chimiquement), les contaminations chimiques ainsi que le manque de données de caractérisation et d'utilisation dans un environnement aqueux sont entre autres les explications d'un développement assez long. En d'autres termes, un capteur peut présenter un comportement électrochimique différent pour chaque altération d'une étape de microfabrication.

Afin de visualiser l'ensemble des outils proposés par les techniques de fabrication microélectronique, nous présentons d'abord dans ce second chapitre un état de l'art des différentes technologies pour la production de microélectrodes. Dans une seconde partie, nous exposerons le cahier des charges lié à l'application visée et les choix adoptés pour la réalisation d'un dispositif électrochimique intégré. Enfin, dans la troisième partie de ce chapitre, la procédure de fabrication sera détaillée ainsi que les résultats et les optimisations qui en découlent.

I. La technologie pour les microélectrodes

La technologie microélectronique est un outil puissant pour la construction de structures miniaturisées et a été largement utilisée pour le développement des capteurs physiques notamment. Comparativement, l'application de ces techniques aux capteurs chimiques a été limitée. Pendant les années 70 et 80, les ISFET (« Ion Sensitive Field Effect Transistor ») et les capteurs de gaz ont été très étudiés, utilisant la base technologique du transistor pour leur fabrication. C'est à partir des années 90 que la recherche sur les systèmes d'analyse miniaturisés s'est intensifiée et s'en est suivi un accroissement important de leur production. L'application des technologies Silicium et Polymères pour les capteurs chimiques s'est alors rapidement répandue.

Les méthodes électrochimiques et les microélectrodes doivent leur essor à leurs propriétés analytiques, rendant leur utilisation bien plus avantageuse qu'un grand nombre d'outils. Mais leur développement, comme nous l'avons vu au chapitre I, est également lié à leur méthode de fabrication qui est devenue beaucoup plus aisée et maîtrisée grâce aux microtechnologies. Historiquement, les premières équipes ont intégré des microélectrodes, puis le travail de miniaturisation s'est orienté sur l'ensemble de la cellule électrochimique (Morita *et al.*, 1988).

Différents matériaux ont été étudiés, différentes techniques mises à l'épreuve pour produire des systèmes aux caractéristiques électrochimiques comparables aux éléments massifs (Tableau I-1).

<i>Techniques ou matériels</i>	<i>Applications</i>
Lift-off	Structuration d'électrode, immobilisation d'enzyme
Screen-printing	Structuration d'électrode, couche d'électrolyte, immobilisation d'enzyme
Dépôt électrochimique	Structuration d'électrode, immobilisation d'enzyme
Gravure sèche	Structuration d'une membrane
Gravure humide isotrope	Structuration d'électrode, structure fluide
Gravure anisotrope	Conteneur, structure fluide, jonction liquide, sonde de type aiguille
« Forage » électrochimique	Formation de cavité
Couche sacrificielle	Préservation de la propreté de la surface de l'électrode, formation d'une membrane perméable au gaz, formation d'une jonction liquide
Polymères photosensibles (Photorésist, résine film mince et film épais, polyimide, polysiloxane)	Isolation, conteneur, structure fluide, couche d'électrolyte, jonction liquide
Laminage	Immobilisation d'enzyme, ou de microorganisme, membrane sensible aux ions, membrane
Silicium poreux	Formation d'une couche d'électrolyte
Découpe à la scie	Couche sensible, jonction liquide
Impression jet d'encre	Découpe, structure fluide, réseau de microélectrodes
	Immobilisation d'enzyme

Tableau I-1 : Vue d'ensemble des techniques et matériaux utilisés pour la microfabrication de capteurs et systèmes électrochimiques (adapté de Suzuki, 2000).

La fabrication d'un microsystème repose sur trois éléments matériels : le substrat, les matériaux d'électrode et d'isolation, et sur les différentes techniques qui permettent de structurer l'ensemble.

A. Les matériaux d'électrodes et leurs techniques de dépôts

Les matériaux d'électrodes classiquement utilisés en électrochimie sont des matériaux massifs. Leur intégration par les techniques de la microélectronique implique des matériaux couches minces (épaisseur comprise entre quelques nanomètres et 10 μm). Leur dépôt peut se faire par deux principales manières : soit à partir d'une phase vapeur obtenue par voie physique, appelée PVD (Physical Vapor Deposition), soit à partir d'une phase gazeuse contenant divers produits réagissant chimiquement entre eux, appelée CVD (Chemical Vapor Deposition).

Le moyen le plus répandu pour réaliser les matériaux d'électrodes est le PVD. Les deux plus importantes techniques sont l'évaporation et la pulvérisation cathodique. L'évaporation consiste à porter dans une enceinte sous vide le matériau à déposer à haute température, afin d'obtenir sa condensation sur le substrat. Le chauffage de la cible (matériau à déposer) peut être réalisé par effet Joules ou par canon à électrons. Ce procédé est très utilisé pour déposer des métaux et alliages métalliques. La pulvérisation cathodique opère à plus basse température : les atomes de la cible sont arrachés par le bombardement des ions du plasma généré dans l'enceinte sous vide, puis se condensent sur le substrat. Différents matériaux d'électrodes comme le platine, l'or et l'argent sont généralement réalisés par ce type de procédé et les techniques CVD sont moins largement répandues car elles présentent plus de risques et sont plus onéreuses.

Les procédés CVD se distinguent des procédés de dépôt physique par la présence de réactions chimiques. Le substrat est placé dans un réacteur dans lequel des molécules sous forme gazeuse réagissent. Ces réactions peuvent avoir lieu à la surface du substrat ou en phase gazeuse ; dans ce dernier cas, les produits issus de la réaction se condensent à la surface du substrat. La CVD se décline sous différentes catégories en fonction des paramètres de pression, de température ou d'énergies mises en œuvre pour réaliser le dépôt : citons par exemple le dépôt à basse pression (LPCVD) ou assisté par plasma (PECVD). La CVD présente d'importants avantages, notamment le fait que les couches déposées sont généralement conformes à la topographie du substrat et qu'une grande variété de matériaux peut être déposée par cette technique : conducteurs ou isolants, métaux (Pt, Cu...), alliages, etc. Cependant, il n'est pas toujours aisé de sublimer ou vaporiser les molécules d'intérêt ; d'autre part, les réactifs ainsi que les produits de réaction peuvent être dangereux et/ou toxiques.

Pour réaliser ces électrodes métalliques, des structures multicouches sont souvent utilisées. En effet, les métaux tels que le platine, l'or, l'argent et l'iridium nécessitent la mise en place d'une couche intermédiaire pour adhérer sur le substrat hôte. Le titane, le tantale ou le chrome sont les promoteurs d'adhérence les plus fréquemment utilisés sur substrat silicium et sont déposés directement juste avant le dépôt métallique fonctionnel (Fiaccabrino et Koudelka-Hep, 1998). Cependant, en fonction des combinaisons de métaux, la performance des électrodes peut se dégrader à cause de l'interdiffusion des atomes (Suzuki, 2000 ; Nicolet, 1978) : suite à des traitements thermiques, des atomes des couches d'adhésion, par exemple le titane pour l'or, peuvent être présents à la surface des électrodes (Martinez *et al.*, 2010). Pour éviter ce type de détérioration, des sous-couches « barrières » peuvent être utilisées et les recuits à hautes températures limités.

D'autres procédés chimiques et électrochimiques permettent de déposer des couches minces à partir d'une phase liquide. Dans les deux cas, une ou plusieurs réactions chimiques spontanées (dépôt électroless) ou contrôlées (électrodéposition) ont lieu à la surface du substrat plongé dans l'électrolyte et entraînent la croissance d'une couche du matériau considéré. L'électrodéposition est limitée aux matériaux conducteurs d'électrons et nécessite au préalable une structure permettant le contact électrique entre le substrat et la source de tension ou de courant, contrairement au dépôt électroless (Ripka et Tipek, 2007). Cette procédure permet de former des films uniformes de métaux tels que l'or et le nickel, avec une épaisseur contrôlée (de 1 à 100 μm), de jouer sur la structure du dépôt et d'obtenir ainsi des propriétés particulières. Elle est notamment utilisée pour produire une couche épaisse d'argent pour la conception d'une électrode Ag/AgCl (Suzuki, 2000).

Enfin, la technique de screen-printing (décrite ci-dessous) implique des matériaux sous forme de pâtes. De nombreuses solutions commerciales existent en fonction des applications et des propriétés recherchées (viscosité, conductivité...). Pour former des électrodes, ces pâtes contiennent généralement un agent liant (résine, solvant) et de la poudre de métal (or, platine, argent...) (Tudorache et Bala, 2007).

B. Les procédés d'intégration – La définition des motifs

Outre les méthodes de dépôt décrites précédemment, des procédures standards de la microélectronique sont indispensables pour structurer, définir les motifs et les différents éléments du composant. Les techniques de base proposées par les technologies semi-conducteur pour créer une cellule miniaturisée présentent trois stratégies de procédé : les procédés soustractifs, les procédés additifs et les procédés lift-off. Les procédés soustractifs éliminent les matériaux de la structure et font appel à des procédures de gravures, contrairement aux procédés additifs. La phase essentielle, commune à l'ensemble de ces procédures, est la photolithographie. Il existe cependant d'autres techniques alternatives qui permettent d'élaborer des électrodes (Figure I-1).

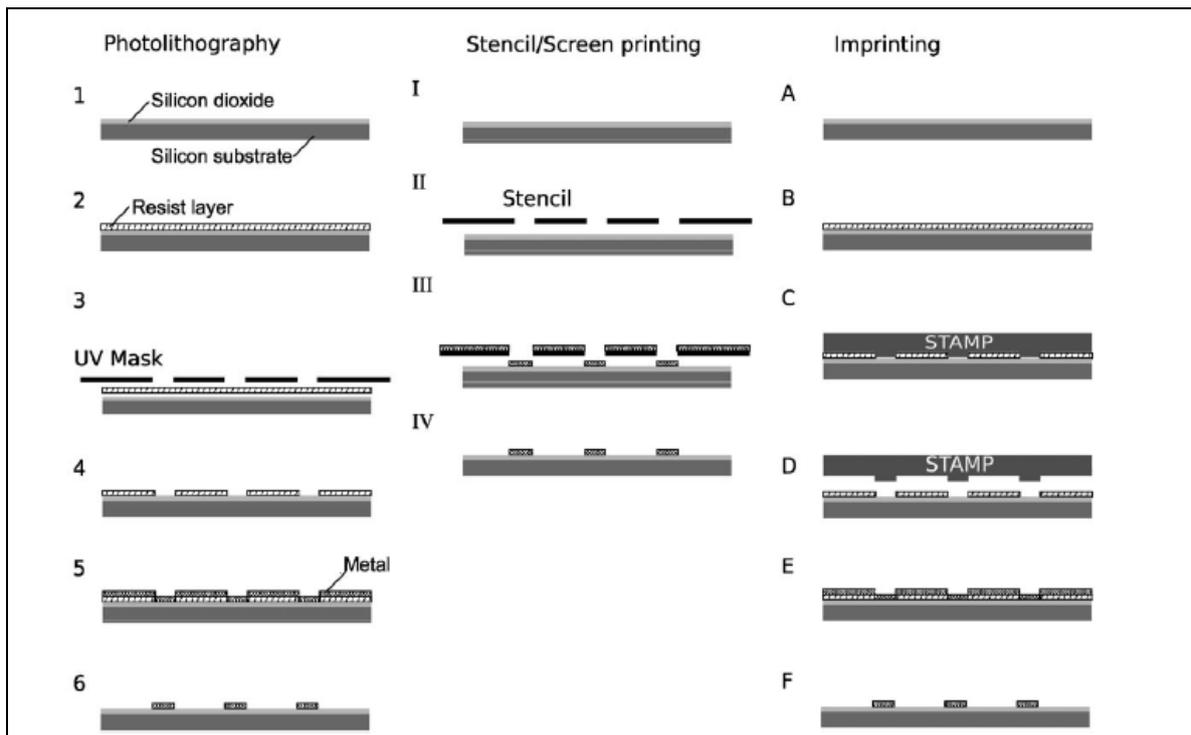


Figure I-1 : Vue d'ensemble des trois principales techniques de fabrication des microélectrodes : Etapes 1 à 6 : principe général de la photolithographie et du procédé lift-off ; Etapes I à IV : principe du « screen printing » ; Etapes A à F : principe de la lithographie douce « microcontact printing » (Spegel *et al.*, 2008).

Fabriquer un composant, quel qu'il soit, demande donc une connaissance des différents moyens d'obtention d'un motif en fonction du matériau traité, de leurs avantages et de leurs inconvénients afin de mettre en place un protocole précis de procédure de fabrication.

1. La photolithographie

La photolithographie est la base de toute conception de système d'électrodes : c'est la technique qui permet de transférer les motifs d'un masque sur la plaquette à traiter. Son rôle est de protéger sélectivement certaines zones du substrat vis-à-vis des opérations à réaliser. Deux éléments sont indispensables pour réaliser ce processus : un polymère photosensible, appelé aussi photorésist, et un masque sur lequel sont définis les motifs à créer.

Les solutions de photorésist sont constituées d'un polymère, d'un composé photosensible et d'un solvant. La composition chimique de la résine varie sous l'action de la lumière, ce qui entraîne une modification de sa solubilité dans des solvants appropriés, appelés développeurs ou révélateurs. Ce comportement des parties insolées dépend de la polarité de la résine :

- positive : les parties insolées sont dégradées et dissoutes dans le révélateur,
- négative : la résine polymérise et réticule à la lumière (les parties insolées sont insolubles dans le révélateur)
- réversible : en fonction des traitements, la résine est soit positive, soit négative.

Le procédé technologique typique d'utilisation des résines peut être décrit ainsi : le substrat est dans un premier temps nettoyé (élimination de toute trace organique) et déshydraté car la plupart des photorésists sont sensibles à l'humidité. Un traitement de surface peut être nécessaire pour améliorer l'adhérence de la résine au substrat. Ce dernier est ensuite enduit de résine (Figure I-1, étapes 1 et 2). Le but de ce dépôt est d'obtenir un film parfaitement adhérent au substrat, exempt de défauts et d'une épaisseur connue et uniforme. L'ensemble est pré-recuit afin d'éliminer les solvants résiduels, d'améliorer l'adhérence et de supprimer les contraintes. Le masque, définissant les motifs, est aligné sur la plaquette et la structure est insolée par des radiations ultraviolettes. Cette insolation permet de créer une image latente du masque dans la résine (Figure I-1, étape 3). Le développement permet ensuite, à l'aide d'une solution de révélation, d'éliminer les parties solubles et de créer ainsi les motifs à la surface du substrat (Figure I-1, étape 4). Une dernière étape de post-recuit permet comme précédemment d'éliminer les solvants résiduels, d'augmenter l'adhérence et d'accroître la résistance de la résine aux agents chimiques. L'opération réelle de mise en place du motif (c'est à dire métallisation, gravure, etc.) a alors lieu (Figure I-1, étape 5) ; une fois terminée, la résine est définitivement enlevée (Figure I-1, étape 6) à l'aide d'un solvant approprié.

Le masque est le point de départ de la réflexion d'intégration : il définit le design, les dimensions et l'agencement des éléments à réaliser. Un masque est lié à un seul matériau à structurer. Généralement, il s'agit d'une plaque de verre ou de quartz métallisée au chrome. En fonction de la nature de l'étape (élimination ou dépôt d'un matériau) et de la polarité de la résine, les motifs seront soit transparents, soit métallisés.

2. Les procédés soustractifs

Le procédé soustractif permet de créer les motifs par masquage sélectif du matériau et par l'élimination des parties dépourvues de protection (Fiaccabrino et Koudelka-Hep, 1998).

Il se déroule en trois étapes et fait intervenir trois techniques : le dépôt du matériau (métaux, isolants...), la photolithographie et la gravure. Ici, l'étape de photolithographie est réalisée pour définir les zones à éliminer.

Dans un premier temps, un film mince du matériau à structurer est déposé sur la totalité de la surface du substrat, par des techniques PVD ou CVD. La plaquette est ensuite enduite d'une résine photosensible. L'ensemble est insolé à travers un masque sur lequel sont définis les motifs. Après le développement de la résine, seules les zones dépourvues de résine sont éliminées par gravure humide ou sèche. La résine restante est ensuite retirée et les motifs souhaités sont ainsi créés (Figure I-2).

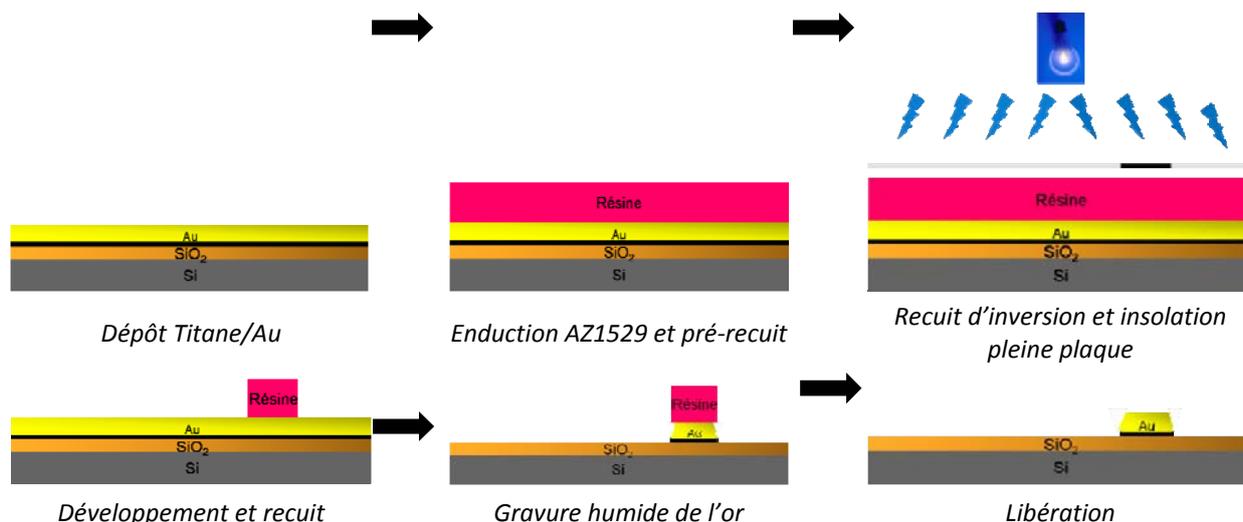


Figure I-2 : Exemple de création d'une microélectrode d'or par le procédé soustractif.

a) La gravure humide

La gravure par voie humide utilise des réactifs chimiques dans un milieu liquide (Tableau I-2). Elle implique généralement des réactions d'oxydo-réduction pour les métaux et des réactions acido-basiques pour les oxydes inorganiques, les produits de réactions étant des sels solubles ou des complexes (Fiaccabrino et Koudelka-Hep, 1998).

	<i>Solution de gravure</i>	<i>Réaction chimique</i>
Si	$\text{HNO}_3 + \text{HF} + \text{H}_2\text{O} + \text{CH}_3\text{COOH}$	$3\text{Si} + 4\text{HNO}_3 + 18\text{HF} \rightarrow 3\text{H}_2\text{SiF}_6(\text{aq}) + 4\text{NO}(\text{g}) + 8\text{H}_2\text{O}$
Au	5 % I_2 + 10% KI + 85% H_2O	$2\text{Au}_{(\text{s})} + \text{I}_{2(\text{aq})} \rightarrow 2\text{AuI}_{(\text{aq})}$
Au	3 HCl (37%) : 1 HNO_3 (70%) : 2 H_2O	$\text{Au}_{(\text{s})} + 4\text{H}^+ + \text{NO}_3^- + 4\text{Cl}^- \rightarrow \text{AuCl}_4^- + \text{NO}(\text{g}) + 2\text{H}_2\text{O}$
Pt	3 HCl (37%) : 1 HNO_3 (70%) : 2 H_2O	$3\text{Pt}_{(\text{s})} + 4\text{NO}_3^- + 16\text{H}^+ + 18\text{Cl}^- \rightarrow 3\text{PtCl}_6^{2-} + 4\text{NO}(\text{g}) + 8\text{H}_2\text{O}$

Tableau I-2 : Exemples de gravures humides (Williams *et al.*, 2003)

b) La gravure sèche

Des gaz sous forme d'un plasma permettent de réaliser une gravure sèche. Une gravure au plasma repose uniquement sur les effets d'un bombardement d'ions sur le matériau pour l'éliminer. Une technique plus largement rencontrée est la RIE (Reactive Ion Etching) : il s'agit d'une attaque physico-chimique dans laquelle interviennent à la fois les effets d'une gravure plasma et une réaction chimique entre des radicaux et le matériau à graver (Tableau I-3).

	<i>Gaz</i>	<i>Réaction chimique</i>
SiO_2	$\text{CF}_4 + \text{CHF}_3 + \text{He}$ (90:30:130 sccm)	$3\text{SiO}_2 + 4\text{CF}_3 \rightarrow 2\text{CO} + 2\text{CO}_2 + 3\text{SiF}_4$ $\text{SiO}_2 + 2\text{CHF}_2 \rightarrow 2\text{CO} + \text{H}_2 + \text{SiF}_4$
Si_3N_4	$\text{SF}_6 + \text{He}$ (175:50 sccm)	$\text{Si}_3\text{N}_4 + 12\text{F} \rightarrow 3\text{SiF}_4 + 2\text{N}_2$
W	SF_6 (80 sccm)	$\text{W} + 6\text{F} \rightarrow \text{WF}_6$

Tableau I-3 : Exemples de gravures sèches (Williams *et al.*, 2003)

Habituellement, cette technique permet de graver le silicium, ses oxydes, ses nitrures, des polymères et d'autres matériaux tels que le diamant (Williams *et al.*, 2003 ; Feeney et Kounaves, 2000).

3. Les procédés additifs

La photolithographie est la première étape du procédé additif. Les motifs sont pré-dessinés sur le substrat par la résine qui a subi tout le cycle de structuration (jusqu'au développement). Généralement, l'électrodéposition est ensuite mise en œuvre pour faire croître le métal sur les zones dépourvues de résine. C'est un procédé plus sélectif car la métallisation n'a pas lieu sur toute la surface de la plaquette et ne nécessite pas d'étape de gravure.

4. Le lift-off

Appartenant aux procédés additifs, le « lift-off » utilise d'autres techniques que l'électrodépôt pour former la couche métallique. Ce procédé, un des plus cités pour la fabrication de microélectrodes, se déroule comme précédemment : le principe est de créer un « pochoir » temporaire directement sur le substrat à l'aide d'une résine photosensible (étape photolithographique), puis de réaliser un dépôt métallique non conforme sur l'ensemble de la structure et enfin de dissoudre la résine sous-jacente pour ne récupérer que les motifs métalliques prédéterminés par le pochoir (Figure I-3).

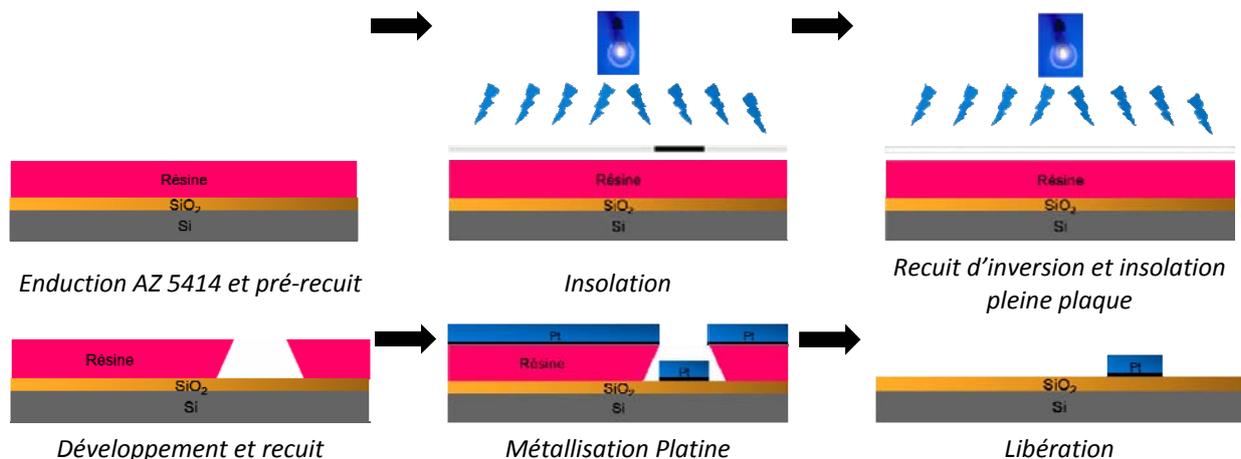


Figure I-3 : Exemple de création d'une microélectrode de platine par le procédé lift-off.

Le lift-off est une méthode simple pour réaliser des motifs métalliques sur un substrat, spécialement pour les films minces de métaux nobles tels que le platine dont la gravure est relativement difficile avec les techniques conventionnelles. Le choix de la résine pour réaliser ce lift-off est conditionné par un certain nombre de critères : l'adhésion du film déposé doit être bonne sur le substrat considéré mais le photorésist doit pouvoir également être facilement enlevé par un solvant approprié. La procédure standard utilise généralement la résine nommée AZ5214. C'est également celle qui a été mise en place au laboratoire. Elle se décompose en trois phases : structuration de la résine, métallisation et libération.

Tout d'abord une préparation du substrat englobe une étape de nettoyage et une étape de traitement de surface : un promoteur d'adhérence, généralement de l'HMDS (HexaMéthylDiSiloxane) est déposé à la surface de la plaquette en silicium afin d'améliorer

l'adhérence du film photosensible au substrat hôte. Ensuite, la résine photosensible réversible est déposée à la tournette, pré-recuite et insolée à travers un masque sur lequel sont définis les motifs. Un recuit dit « d'inversion » et une seconde insolation pleine plaque permettent de réaliser l'inversion des motifs ; la partie insolée lors de la première irradiation devient alors insoluble. Cette réversibilité lui confère des profils de flans dit inversés qui facilitent l'étape de libération. En effet, le dépôt métallique présentera des discontinuités au niveau des ouvertures du film photosensible, ce qui permettra au solvant d'être en contact avec une grande surface de résine et donc de l'éliminer plus rapidement. La résine est alors développée dans un révélateur et les zones à métalliser sont ainsi dépourvues de résine (Figure I-3).

5. Le « screen printing »

Il est également possible de créer des électrodes par « screen-printing » (Figure I-1, étape I à IV). L'avantage de cette technique est d'éviter l'utilisation de résines et de faire appel uniquement à un pochoir qui peut être utilisé indéfiniment. Le matériau à structurer, sous forme de pâte, est directement déposé en couche épaisse (5 à 100 μm) sur le substrat à travers les ouvertures du pochoir (Spegel *et al.*, 2008). Jusqu'à présent, cette technique présentait une résolution latérale faible de 100 μm seulement. Aujourd'hui, certaines équipes proposent des réseaux de microélectrodes d'une dizaine de micromètres de diamètre (Cugnet *et al.*, 2009). Son faible coût en fait une technique répandue commercialement et de nombreuses électrodes de carbone ou de platine réalisées par cette méthode sont utilisées pour des capteurs électrochimiques et bioélectrochimiques (Chen *et al.*, 2007 ; Ripka et Tipek, 2007). D'un point de vue biocapteurs, elle est d'autant plus intéressante qu'elle permet le dépôt de molécules d'intérêt biologique pour des fonctionnalisations enzymatiques par exemple (Laschi et Mascini, 2006 ; Zhang *et al.*, 2000 ; Tudorache et Bala, 2007) : dépôt d'un mélange L-lactate déshydrogénase / NADH pour la détection de l'acide lactique.

6. L'imprinting et le microcontact printing

Outre ces méthodes conventionnelles, l'« imprinting » ou la lithographie « nanoimprint » repose sur le transfert de la topographie d'un timbre dans un matériau structurable par température ou par UV (Figure I-1, étape A à F). Ce matériau ainsi structuré joue le rôle de pochoir, comme pour un procédé lift-off (Spegel *et al.*, 2008).

Une autre méthode d'impression est le « microcontact printing » ou encore la « soft lithography » : c'est une technique en plein développement, notamment pour la modification de surface des microélectrodes. Elle reste cependant quasiment inutilisée pour la production de microélectrodes métalliques. Un timbre en polymère est utilisé pour reproduire les motifs souhaités directement sur le substrat. Ce timbre, généralement fabriqué en PDMS, est encré avec le matériau à déposer et est mis en contact avec le substrat sur lequel les motifs du timbre sont directement « imprimés » à sa surface. Cette technique a été spécialement développée pour des applications biologiques (création de motifs de protéines...) (Thibault *et al.*, 2005 ; Falconnet *et al.*, 2006).

C. Les matériaux d'isolation électrique

La couche d'isolation doit avoir de bonnes propriétés d'isolation électrique, d'adhérence sur les matériaux sous-jacents et être chimiquement inerte. Son rôle est de définir les surfaces actives des électrodes et les plots de contact.

1. Les matériaux inorganiques

Les matériaux diélectriques ou isolants les plus utilisés sont l'oxyde de silicium et le nitrure de silicium. Tous deux se déposent généralement par PECVD (Lakard *et al.*, 2005 ; Triroj *et al.*, 2006 ; Parker *et al.*, 2009 ; Strong *et al.*, 2001). Matériau pivot de la microélectronique, l'oxyde de silicium SiO_2 est un excellent isolant électrique et n'est pas attaqué par la plupart des réactifs à température ambiante. Ses utilisations sont nombreuses : isolation entre les couches conductrices, passivation contre l'humidité et les impuretés... Le nitrure de silicium Si_3N_4 est également un excellent matériau diélectrique (Tableau I-4), qui tend à supplanter l'oxyde de silicium car il constitue une barrière de diffusion plus efficace (faible densité de défauts, faibles contraintes, recouvrement correct). Ces matériaux, considérés biocompatibles, sont utilisés pour des dispositifs biomédicaux (Kristensen *et al.*, 2001 ; Voskerician *et al.*, 2003). Des dépôts d'oxynitrure de silicium SiOxNy peuvent également être utilisés (Xie *et al.*, 2004). La structuration de ces diélectriques passe par des étapes de gravures chimiques et/ou physiques.

	SiO_2	Si_3N_4	Parylène	Polyimide	Epoxy
Constante diélectrique	4,3 – 4,5	7,5	2,6 – 3,2	3,5	3,6
Ref.	a	a	b	C	c

Tableau I-4 : Constantes diélectriques de quelques matériaux isolants utilisés en microtechnologie. a : Ripka et Tipek, 2007 ; b : www.vp-scientific.com/parylene_properties.html ; c : Geddes et Roeder, 2003.

2. Les matériaux organiques

Des matériaux polymères présentent également de bonnes propriétés diélectriques. Le parylène, déposé par évaporation sous vide à température ambiante (CVD), est un bon matériau isolant d'un point de vue électrique et perméabilité. Son excellent pouvoir isolant (Tableau I-4), ses propriétés de barrière d'humidité, sa stabilité chimique et sa biocompatibilité en font un matériau largement répandu dans les dispositifs implantables (Lee *et al.*, 2008 ; Shugg, 1995).

Les polyimides sont également très utilisés pour des applications biomédicales de par leurs propriétés mécaniques et chimiques intéressantes, et permettent notamment d'obtenir des structures flexibles (Stieglitz, 2001 ; Myllymaa *et al.*, 2009 ; Mercanzini *et al.*, 2008 ; Cheung *et al.*, 2007). Les époxydes et plus particulièrement la résine SU-8, sont aussi de bons candidats pour remplir la fonction de matériaux isolants : outre leurs bonnes propriétés diélectriques, ils présentent une excellente résistance aux produits chimiques (Abgrall *et al.*, 2007). Ces polymères polyimides et SU-8 ont l'avantage d'être photo-définissables (élimination de l'étape de gravure) (Figure I-4) et déposables par tournette, laissant accès à un large spectre d'épaisseur, contrairement au parylène (Tijero *et al.*, 2009). En marge de ces matériaux, certaines équipes ont utilisé des photorésist comme la résine Shipley 1813 (Gardner *et al.*, 2009 ; Lowinsohn *et al.*, 2006).

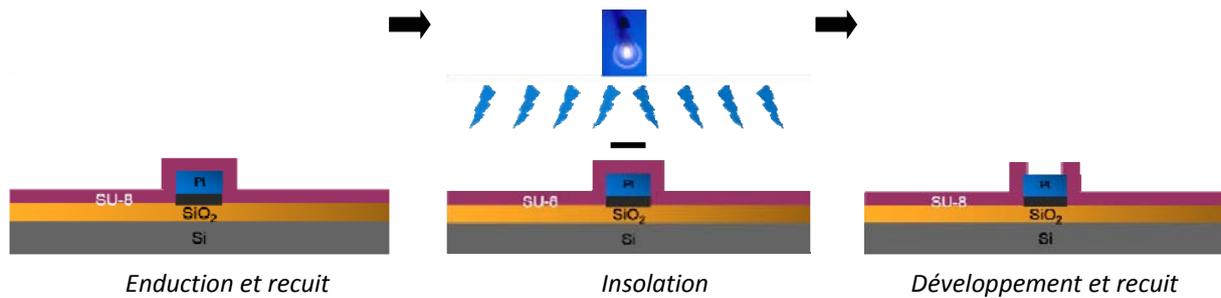


Figure I-4 : Structuration de la résine SU-8.

II. Cahier des charges et choix associés

Les microtechnologies proposent différentes techniques et processus de fabrication pour produire des microélectrodes. Une analyse bibliographique sur les dispositifs électrochimiques miniaturisés a permis d'orienter le choix de la méthode de réalisation, des matériaux et de l'agencement des électrodes pour notre application.

A. Configuration du dispositif électrochimique miniaturisé

1. Structures proposées dans la bibliographie

Une cellule électrochimique est en général composée de trois électrodes : une électrode de travail, une électrode auxiliaire et une électrode de référence.

Tous les travaux de miniaturisation d'une telle cellule ont donné lieu à divers géométries et agencements (Figure II-1). Certaines structures proposent un agencement simple en parallèle (Figure II-1, B), dans lequel l'électrode de travail se retrouve plus proche de l'électrode de référence que de l'électrode auxiliaire. L'électrode de travail peut également être disposée entre les deux autres électrodes (Figure II-1, E). D'autres équipes préfèrent un agencement concentrique où l'électrode de travail est le cœur du dispositif, encerclée soit par l'électrode auxiliaire, soit par l'électrode de référence (Figure II-1, A, C, D et F). Le choix des tailles des électrodes et des espacements entre elles n'est pas toujours bien explicité dans la bibliographie.

Le dispositif proposé par Triroj et al. (2006) (Figure II-1, C) comprend une ultramicroélectrode de travail en or, une électrode auxiliaire en or et une électrode de référence Ag/AgCl. Cette dernière est positionnée dans un environnement très proche de l'électrode de travail (espacement de 9 μm) pour réduire la chute ohmique liée à l'électrolyte. Ces travaux détaillent la surface de chaque électrode : 9 μm^2 , 585 μm^2 et 675 μm^2 pour l'électrode de travail, l'électrode auxiliaire et l'électrode de référence respectivement. L'équipe de Popovtzer a conçu son dispositif avec les mêmes matériaux d'électrodes (Figure II-1, A) mais la notion de microélectrode n'est pas évoquée, les dimensions n'étant pas indiquées (Popovtzer *et al.*, 2008). Les éléments mentionnés permettent simplement de comprendre que la cellule électrochimique est agencée dans un disque de 800 μm de rayon. Cette absence de données géométriques et dimensionnelles se retrouve également dans les travaux présentés par Morimoto *et al.* (2007). Ces cellules électrochimiques, certes intégrées, ont des surfaces actives

relativement importantes, qui peuvent atteindre des tailles de l'ordre du millimètre (Li *et al.*, 2006 ; Matsumoto *et al.*, 2006). C'est le cas du dispositif de Miyashita *et al.* (2009), avec une électrode de travail de 1,35 mm de diamètre (Figure II-1, D). Enfin, si les recherches sont davantage axées sur les microélectrodes, elles s'intéressent d'autant plus aux réseaux de microélectrodes, pour les avantages évoqués au chapitre I. Ces microélectrodes ont généralement des dimensions inférieures à 30 μm mais les rapports de tailles et d'espacement entre elles et les électrodes auxiliaires ou les électrodes de référence ne sont pas mentionnés (Schwake *et al.*, 1998 ; Parker *et al.*, 2009). Des microélectrodes de taille plus petite peuvent être également produites mais nécessitent des techniques moins répandues, comme le FIB (gravure par faisceau d'ions) (Lakard *et al.*, 2005).

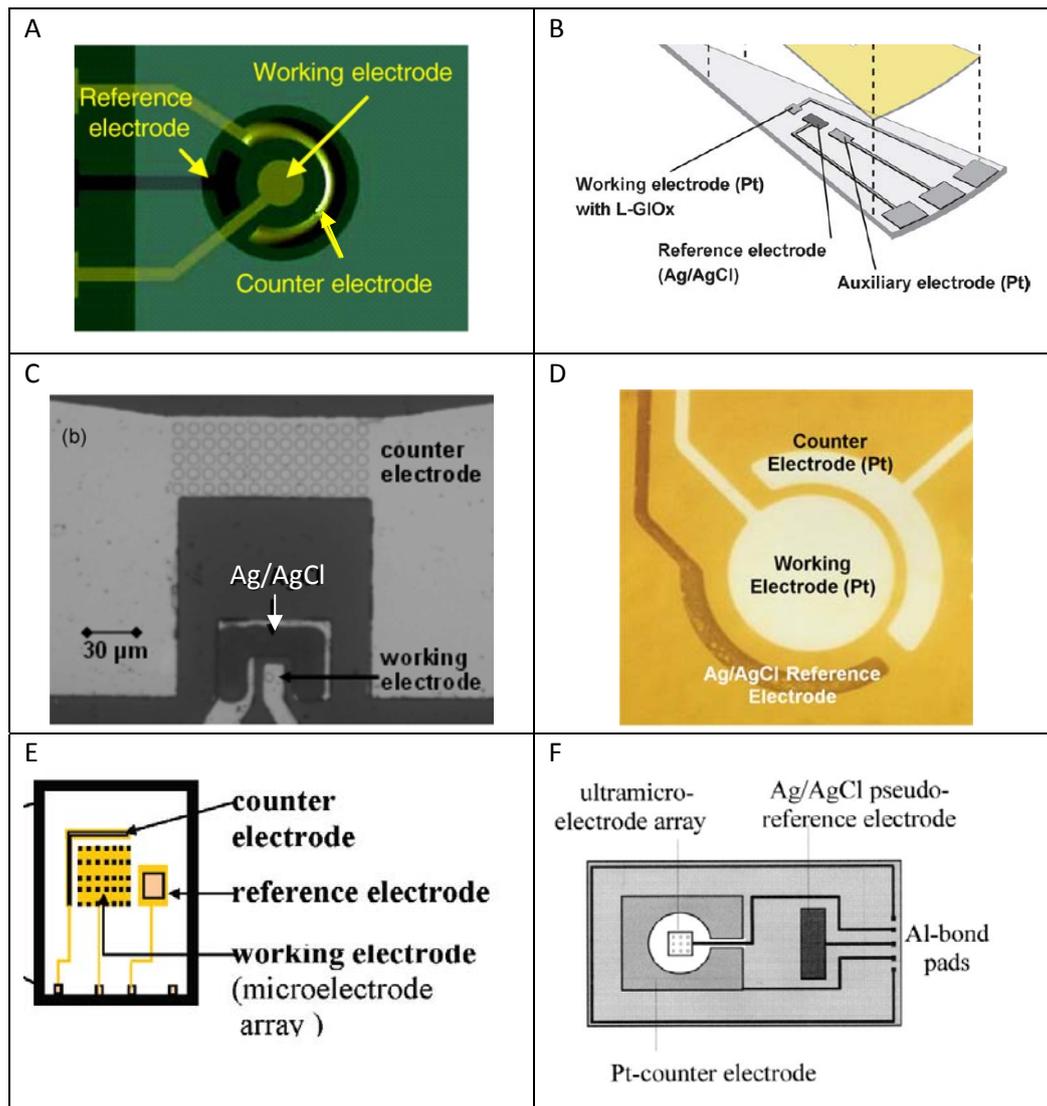


Figure II-1 : Exemples d'agencements de cellules électrochimiques miniaturisées composées d'électrodes, de microélectrodes ou de réseaux de microélectrodes : A) cellule électrochimique pour l'analyse d'anticancéreux (Popovtzer *et al.*, 2008), B) microsystème intégré pour la détection ampérométrique du L-glutamate (Morimoto *et al.*, 2007), C) développement d'un réseau de cellules électrochimiques imbriquées dans un réseau de microcanaux (Tirraj *et al.*, 2006), D) capteur ampérométrique de glucose pour les urines (Miyashita *et al.*, 2009), E) immunocapteur électrochimique (Parker *et al.*, 2009), F) développement d'un réseau de microélectrodes fabriquées par les technologies silicium, pour la détection du peroxyde d'hydrogène dans les eaux de piscine (Schwake *et al.*, 1998).

Même si l'agencement de ces trois électrodes les unes par rapport aux autres ainsi que leurs surfaces actives divergent d'un auteur à un autre, il existe cependant certaines « règles » qu'il est indispensable de respecter afin de pouvoir faire des observations électrochimiques interprétables.

La cellule électrochimique est en général constituée de trois électrodes. Il faut pouvoir d'une part contrôler le potentiel de l'électrode de travail et d'autre part mesurer le courant résultant des réactions qui ont lieu à sa surface. Le potentiel de l'électrode de travail est mesuré par rapport au potentiel de l'électrode de référence. Afin de minimiser la chute ohmique (Chapitre I – Partie I-C.1), il est préférable de placer l'électrode de référence au plus proche de l'électrode de travail. Cependant, nous mettons en œuvre des microélectrodes, ce qui implique des courants de très faible intensité (dans la gamme du nano ampère) ; la chute ohmique est par conséquent faible, voire négligeable.

Par ailleurs, l'électrode auxiliaire doit être judicieusement choisie pour que ses propriétés électrochimiques n'affectent pas le comportement de l'électrode de travail, et que les espèces éventuellement produites à sa surface n'interfèrent pas dans les réactions qui ont lieu à l'électrode de travail. Elle est habituellement d'une surface bien plus importante que l'électrode de travail (cf. Chapitre I).

Hormis ces deux conditions d'agencement, les géométries des microdispositifs restent très variées en termes de disposition, de taille et d'espacement. Le « design » des cellules miniaturisées n'a pas, à ce jour, donné lieu à des explications ou à une étude comparative.

Cependant, des travaux sur les réseaux de microélectrodes détaillent les espacements entre les microélectrodes de travail et l'agencement les unes par rapport aux autres. Plusieurs travaux sur le traitement théorique du transport des espèces par diffusion peuvent être trouvés dans la bibliographie. Lee *et al.* (2001) ont simulé des voltammogrammes cycliques pour un réseau de microélectrodes disques en fonction de la distance inter-électrodes. Des travaux similaires, présentés par Davies *et al.* (2005), ont redéfini la théorie autour des profils de diffusion et ont corroboré leurs résultats avec des données expérimentales. Ces études ont permis également de catégoriser, en fonction de la vitesse de balayage, le comportement d'un réseau de microélectrodes (Tableau II-1).

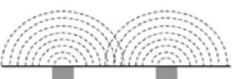
	Diffusion linéaire Petites couches de diffusion individuelles	Diffusion hémisphérique	Recouvrement des couches de diffusion	Diffusion linéaire Recouvrement important des couches de diffusion
				
	$\delta < R_b$ $\delta < d$	$\delta > R_b$ $\delta < d$	$\delta > R_b$ $\delta > d$	$\delta > R_b$ $\delta \gg d$
Type de réponse	Pic : I_p	Etat stationnaire, palier : I_{lim}	Pic plus ou moins marqué : I_p	Pic : I_p
$I=f(v)$?	Oui $I_p \propto v^{0,5}$	Non $I_{lim} \propto R_b$	Oui -	Oui $I_p \propto v^{0,5}$

Tableau II-1 : Caractéristiques associées aux quatre profils de diffusion pouvant être obtenus avec un réseau de microélectrodes en voltammétries linéaire et cyclique. (δ : épaisseur de la zone de diffusion, R_b : rayon du microdisque, d : distance de séparation centre à centre des microélectrodes, v : vitesse de balayage) (Davies et Compton, 2005).

Le profil de diffusion hémisphérique, sans recouvrement des zones de diffusion individuelles, permet d'obtenir le meilleur rapport signal sur bruit, comme nous l'avons vu au chapitre I. Grâce au modèle proposé, il est possible de prévoir la vitesse de balayage à laquelle le recouvrement des profils de diffusion a lieu. Ce modèle peut être utilisé pour concevoir un réseau de microdisques en fonction des paramètres de fonctionnement et des applications visées, notamment s'il s'agit de déterminer la concentration d'espèces rédox. Plus récemment, les travaux de Berduque *et al.* (2007) et son équipe ont évalué l'influence de l'espace inter-électrodes, de la géométrie, du nombre et des dimensions des microélectrodes en réseau et ont comparé leurs résultats expérimentaux aux différents modèles existants afin de déterminer une configuration aux performances optimales. Le réseau comprenant la plus petite taille d'électrode (3 μm de diamètre) et une distance inter-électrodes supérieure ou égale à trente trois fois le diamètre de l'électrode présente les plus importantes densités de courant. Le rapport entre l'espacement des électrodes et leur rayon doit donc être défini correctement pour conserver les avantages d'une microélectrode (profil hémisphérique), considérer la réponse du réseau comme la somme des réponses de toutes les microélectrodes qui le forment et miniaturiser au mieux le système. Cependant, il n'y a pas de consensus sur la valeur optimale de ce ratio (Aguiar *et al.*, 2007). La distance inter-électrode doit être généralement supérieure ou égale à dix fois le diamètre de l'électrode (Gardner *et al.*, 2009).

Le profil géométrique de l'électrode a été étudié depuis que les techniques de photolithographie permettent de produire des microélectrodes : l'influence de l'épaisseur d'encastrement et des profils des flans de la passivation a été détaillée et modélisée par différentes équipes (Bond *et al.*, 1988 ; Ferrigno *et al.*, 1997 ; Guo et Lindner, 2009). Amatore *et al.* (2006a ; 2006b) ont développé une méthode de simulation des profils de concentration pour une microélectrode disque à fleur, en retrait et en avant de la couche d'isolation. Aguiar *et al.* (2007) ont validé expérimentalement ce modèle pour un réseau de microélectrodes en or encastrees. Cependant, les études réalisées avec des microélectrodes issues des microtechnologies effectuent leurs calculs à partir de la définition du courant limite obtenu avec une microélectrode disque plan sans observer d'atténuation du courant liée à cette épaisseur d'encastrement (Orozco *et al.*, 2007). Si le rapport h/r_d (h =profondeur du puits d'encastrement et r_d =rayon de l'électrode) est inférieur à 0,5 et que l'angle d'encastrement α (angle entre le microdisque plan et le matériau d'isolation) est supérieur ou égal à $3\pi/4$ (Figure II-2), l'erreur réalisée en omettant ce dénivelé est évaluée à environ 9% (Aguiar *et al.*, 2007).

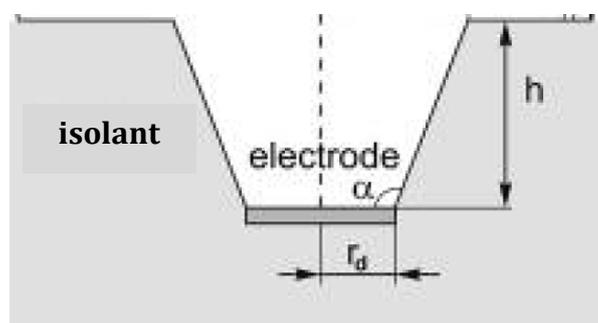


Figure II-2 : Profil de l'électrode encastree

Aujourd'hui, la miniaturisation des cellules n'est pas en soi répandue et il n'y a pas de retour d'expérience sur les tailles et les agencements à employer. De plus, aucun travail n'a porté, à notre

connaissance, sur la disposition planaire à l'échelle micrométrique de l'électrode de travail par rapport à l'électrode auxiliaire et à l'électrode de référence.

Par ailleurs, ces différentes études ont présenté les méthodes de fabrication d'un dispositif électrochimique complet à trois électrodes par les techniques de la microélectronique. Cependant, à ce jour, peu d'informations ont émergé concernant à la fois les procédés de fabrication et les caractéristiques d'une cellule électrochimique totalement intégrée, avec plus particulièrement des microélectrodes de travail et des matériaux d'électrodes variés.

L'ensemble de ces données est le point de départ de la conception de nos dispositifs. Pour proposer un outil d'analyse performant pour l'étude de milieux complexes, ces différentes géométries ont été prises en compte et retranscrites dans le cadre du cahier de charges.

2. Choix des géométries et des tailles

L'objectif affiché dans ce projet est d'atteindre des résultats comparables à ceux d'un macrosystème couplant une microélectrode de fabrication manuelle, une électrode de référence commerciale au calomel saturée et une électrode auxiliaire constituée par une tige de platine. Les microélectrodes disque plan fabriquées jusqu'à présent sont formées d'un fil de platine ou d'or d'un rayon de 25 μm et présentent après ponçage un rayon moyen de 30 μm (Ruffien-Ciszak, 2005). C'est donc sur cette base que la dimension de l'électrode de travail a été déterminée. Outre cette valeur, les dimensions des deux autres électrodes constituant le dispositif classique ainsi que les écartements entre elles se chiffrent en millimètres, voire en centimètres. Ces grandeurs seront remplacées par des dimensions micrométriques, caractéristiques de la miniaturisation. Les paramètres mis en avant dans la définition des microcellules électrochimiques ont donc été les distances inter-électrodes, les surfaces actives, les rapports de surface et l'agencement des électrodes les unes par rapport aux autres.

Deux grandes familles d'agencement ont été mises en place : agencement « parallèle » et concentrique (Tableau II-2). Une famille dédiée au réseau de microélectrodes a été également créée. Les largeurs des composants varient de 1 à 8 mm.

Une première série de puces, composée de treize modèles (Modèle A1 à A13) présente un agencement simple, avec l'électrode de travail sur le bord du composant, l'électrode de référence située au centre et l'électrode auxiliaire située de l'autre côté. Les trois éléments sont disposés de manière parallèle. Ces modèles se rapprochent d'un point de vue géométrique du dispositif mis en place jusqu'à présent dans le projet (Ruffien-Ciszak, 2005). La microélectrode de travail présente un diamètre de 50 μm , la surface de l'électrode de référence est égale à $2 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$ sauf pour les modèles A12 et A13 ($S_{\text{ref}} = 1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^2$) et la surface de l'électrode auxiliaire est comprise entre $2 \cdot 10^4$ et $1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^2$. Ces dispositifs doivent permettre de valider la technologie, c'est-à-dire de vérifier que les résultats obtenus avec ces systèmes miniaturisés sont semblables à ceux obtenus avec un « macrodispositif ». Les différentes tailles d'électrodes, ainsi que les différentes distances inter-électrodes offertes par ces composants, sont autant de paramètres dont l'influence est à démontrer afin d'optimiser le signal pour l'application visée.

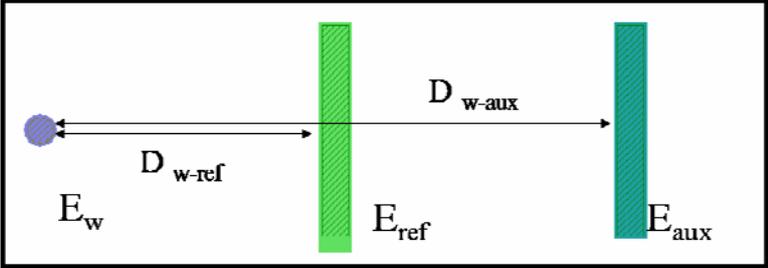
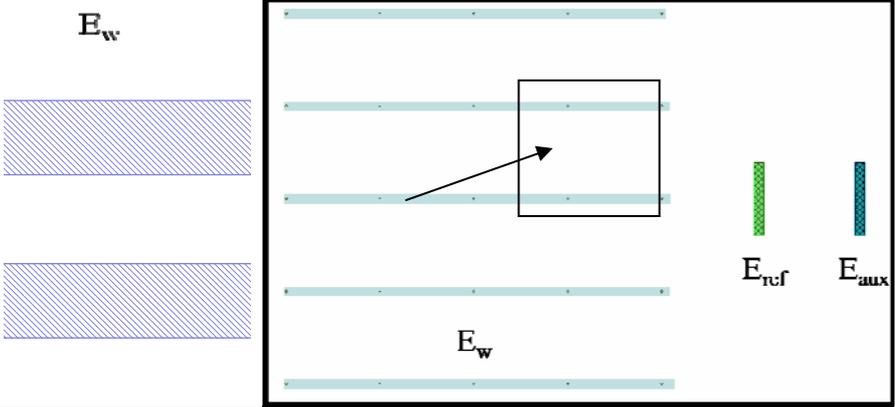
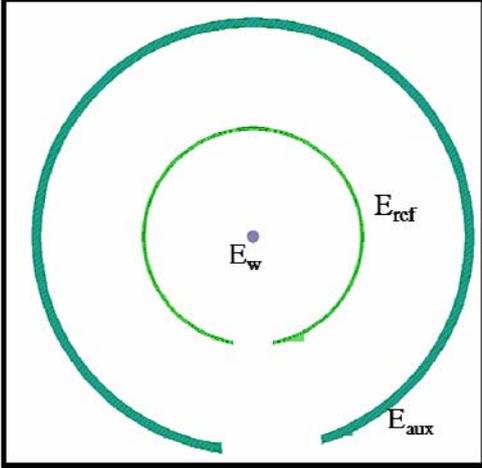
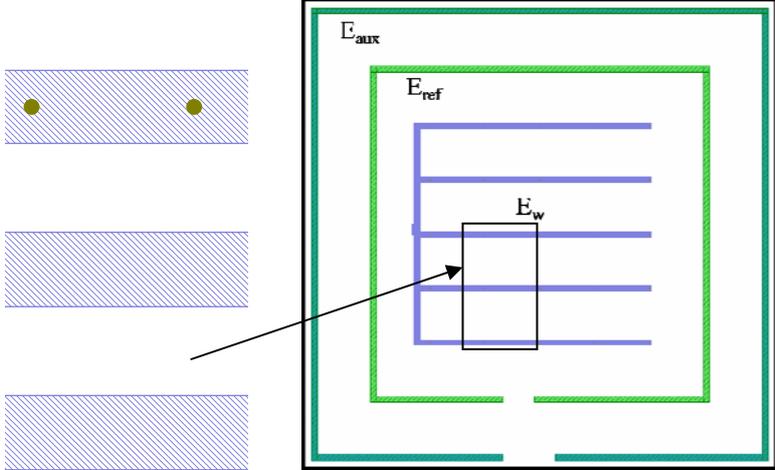
<p>Modèle A1 : E_w = Microélectrode unique Agencement parallèle</p>	
<p>Modèle D1 : E_w = Réseau de microélectrodes Agencement parallèle</p>	
<p>Modèle B1 : E_w = Microélectrode unique Agencement concentrique</p>	
<p>Modèle D7 : E_w = Réseau de microélectrodes Agencement concentrique</p>	

Tableau II-2 : Modèles de cellules électrochimiques à trois électrodes miniaturisées réalisées au laboratoire.

De plus, le rapport signal sur bruit est en lien direct avec la surface de la microélectrode de travail. En effet, lors d'un balayage en potentiel, le courant capacitif I_c est égal au produit de la vitesse de balayage v par la capacité de la double couche C_d à l'état stationnaire. Cette capacité est proportionnelle à la surface de l'électrode : $C_d = \pi r^2 C_d^0$ (C_d^0 étant la capacité interfaciale spécifique, évalué entre 10 et 50 $\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$). Le courant faradique pour une microélectrode disque plan s'exprime lui directement en fonction du rayon de l'électrode ($I_{lim} = 4nFDvC^{sol}r$, équation I-26, chapitre I). Le ratio courant faradique/courant capacitif est donc inversement proportionnel au rayon de l'électrode r : il augmente lorsque r diminue (Tableau II-3).

r (μm)	25	10	5	2
I_c (pA)	49,1	7,8	2,0	0,3
I_f (nA)	33,8	13,5	6,8	2,7
I_f/I_c	688	1720	3440	8600

Tableau II-3 : Valeurs du rapport courant faradique/courant capacitif pour différents rayons d'ultramicroélectrodes ($C_d=50 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$; $v=50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $D=7\cdot 10^{-6} \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$; $C^{sol}=5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; $n=1$)

C'est donc dans cette optique d'amélioration que trois modèles (A4, A5 et A6) ont été réalisés avec des microélectrodes de travail de rayon compris entre 25 à 5 μm . Mais l'intensité recueillie à partir de ces dispositifs sera en théorie beaucoup moins importante, rendant l'utilisation de réseau de microélectrodes très avantageuse.

La seconde série de composants (Modèle D1 à D7) présente une électrode de travail constituée d'un réseau de microélectrodes, avec pour chacune un diamètre de 10 μm (D1 à D3 et D7) ou de 5 μm (D4 à D6). L'espacement inter-électrodes, égal à 10 à 100 fois le diamètre des microélectrodes, est aussi pris en compte dans l'étude. A noter que ces microélectrodes sont supportées par la même structure métallique ; il n'est donc pas possible dans cette configuration de porter chaque microélectrode à des potentiels différents.

Enfin, afin de répondre au mieux aux problèmes d'uniformité des lignes de courant et de champs de potentiels, deux alternatives dites « concentriques » ont été créées (Modèle B1 et D7): l'électrode de travail est placée au cœur de la structure, encerclée par l'électrode de référence. L'ensemble est lui-même entouré par l'électrode auxiliaire.

B. Procédé d'intégration

L'objectif des cellules électrochimiques intégrées est de proposer une structure comprenant une microélectrode de travail en or ou en platine, une électrode auxiliaire en platine et une électrode de référence (dispositif comparable au macro système). Ces électrodes doivent présenter des réactivités comparables à celles constituées de matériaux massifs. Or, les techniques d'intégration rassemblent un grand nombre de produits et d'environnements au contact desquels les composants passent obligatoirement lors de leur fabrication. Leurs effets et les mécanismes réactionnels impliqués ne sont pas toujours bien connus ou bien maîtrisés, notamment lors de gravures humides. De plus, pour réaliser un dispositif par les procédés soustractifs, l'ensemble des solutions d'attaque pour graver tous les matériaux doit être disponible et compatible avec les différentes technologies employées. Pour éviter ces étapes de gravure et leurs développements éventuels, le lift-off représente la solution

idéale : cette technique ne nécessite pas d'étapes de gravure, ce qui explique son utilisation massive pour la production de microélectrodes.

Par ailleurs, une étude de contrainte et d'adhérence a été menée en amont pour vérifier la faisabilité de la procédure dans son ensemble. Ces tests permettent de minimiser les contraintes des structures et de rationaliser la mise en œuvre des étapes par un choix cohérent de l'ordre et de l'épaisseur des dépôts ainsi que des produits associés. De plus, l'agencement des étapes a été guidé par les études chimiques en portant notre attention sur la stabilité des matériaux choisis par rapport aux nombreux produits qui peuvent être utilisés au cours des étapes de fabrication. La surface des matériaux d'intérêt ne doit pas subir d'altération (oxydation, complexation...) et/ou de pollution (adsorption...) irrémédiables qui entraîneraient un comportement électrochimique bien différent d'un matériau massif. La réactivité des matériaux d'électrodes purs doit pouvoir être conservée ou facilement retrouvée après de simples étapes de nettoyage. Ceci implique une attention particulière portée à l'électrode d'argent : en effet ce métal est susceptible de s'oxyder pendant le processus de fabrication (Bhagat *et al.*, 2006). Cette observation a été faite notamment après un nettoyage de résine au plasma oxygène (Figure II-3).

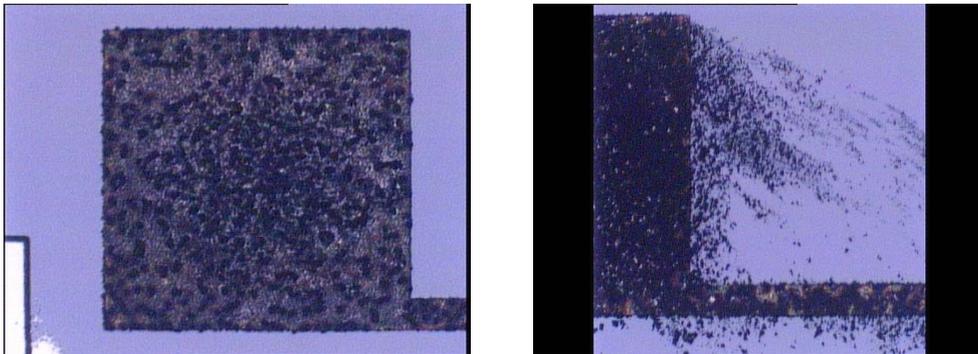


Figure II-3 : Dégradation de l'argent par plasma oxygène.

Le processus de fabrication a donc été défini en prenant en compte ces données : les trois matériaux d'électrodes sont structurés par lift-off. Le platine, l'or et l'argent sont déposés dans cet ordre afin de limiter au mieux le contact de l'électrode d'argent avec les différentes solutions de nettoyage. Leur adhérence au substrat est assurée par un film mince de titane. En effet, les métaux nobles adhèrent peu sur l'oxyde de silicium, cette adhérence étant fonction des propriétés chimiques et physiques des matériaux, comme la chimie d'interface ou le comportement élastique/plastique (Dauskardt *et al.*, 1998 ; Bullett et Prosser, 1972). De plus, pour minimiser les contraintes et les phénomènes d'interdiffusion, le dépôt de platine joue le rôle de base d'accroche à l'or et à l'argent (Kanamori, 1981 ; Jackson et Schroter, 2000).

C. Procédé d'isolation

Le matériau d'isolation a été sélectionné en fonction des propriétés attendues, notamment de biocompatibilité, car les cellules ont pour but d'être directement apposées sur la peau, et en tenant compte de contraintes d'ordre technologique (équipement, savoir-faire du laboratoire...). Les matériaux d'isolation les plus cités dans la bibliographie, comme l'oxyde et le nitrure de silicium, le parylène, la résine SU-8, répondent au critère de biocompatibilité (Kotzar *et al.*, 2002 ; Voskerician *et*

al., 2003). Cependant, la structuration de l'oxyde et du nitrure de silicium et du parylène nécessite des étapes supplémentaires de gravure pour ouvrir les zones actives. Ces étapes peuvent entraîner des modifications et/ou des pollutions de surface des microélectrodes, contrairement aux matériaux photo-définissables (comme la résine SU-8). Ces hypothèses ont notamment été confirmées pour l'électrode d'argent qui a été totalement corrodée après une étape de gravure sèche RIE.

De plus, les isolations à base de silicium peuvent présenter une fonction barrière insuffisante lorsque les dispositifs sont utilisés dans des solutions : il est possible de détecter des courants de fuite qui peuvent être reliés aux contraintes mécaniques du film et/ou à des défauts ponctuels de la structure. Certaines équipes pallient ce problème par un empilement de couches oxyde/nitrure, déposées par PECVD optimisé (Feeney et Kounaves, 2000).

Les matériaux polymères photosensibles présentent l'avantage de n'impliquer qu'une seule étape de photolithographie et les matériaux d'électrodes sont en général « inertes » vis-à-vis des solutions de développement utilisées pour dissoudre les parties non réticulées (Section I-2, Figure I-4). La résine époxyde SU-8, utilisée au laboratoire, répond à toutes ces exigences. Les solutions de développement ont été testées sur les matériaux d'électrode et aucune dégradation « visuelle » n'a été observée.

De plus, l'épaisseur d'isolation doit être bien adaptée : d'un point de vue théorique, sa valeur doit être minimale pour éviter les effets d'encastrement. Cette exigence est également vraie d'un point de vue applicatif car l'élasticité de la peau n'est pas connue à l'échelle micrométrique. Au regard de l'épaisseur du film hydrolipidique à la surface de la peau (cf. chapitre I), l'épaisseur de la couche d'isolation ne doit pas excéder 5 μm , de manière à assurer un contact entre la surface de l'électrode et le *stratum corneum*. Cette contrainte n'en est pas une pour la résine SU-8 choisie.

D. Electrode de référence

Une grande variété de microcapteurs électrochimiques a été développée sous l'impulsion de ces nouvelles technologies de fabrication. Mais, jusqu'à présent, l'absence d'une électrode de référence intégrée, fiable et durable, représente un des obstacles pour une première commercialisation (Simonis *et al.*, 2004 ; Suzuki et Taura, 2001 ; Suzuki *et al.*, 1998). La miniaturisation de ces capteurs est souvent limitée à l'électrode de travail et à l'électrode auxiliaire et, dans de nombreux cas, une électrode de référence commerciale macroscopique est utilisée. Ce constat va à l'encontre de l'objectif des microdispositifs qui est d'impliquer de faibles quantités de solution à tester. Leurs développements sont donc pénalisés par l'inexistence d'une électrode de référence intégrée, qui nécessite donc des volumes plus importants pour accueillir une électrode macroscopique.

La stabilité de l'électrode de référence est un point clé du bon fonctionnement d'un capteur électrochimique : en effet, une électrode de référence instable empêche un contrôle efficace du potentiel de l'électrode de travail et, par conséquent, entraîne un résultat erroné fourni par le capteur (Migdalski *et al.*, 2009). Cependant, un certain nombre de capteurs électrochimiques admettent une quasi-électrode de référence miniaturisée (Tableau II-4).

	Dépôt Ag	Formation AgCl	
		Technique	Conditions
(Popovtzer <i>et al.</i> , 2006)	Electrolyse à intensité constante	Electrolyse à intensité constante	0,1mol.L ⁻¹ HCl I=0,5μA ; t=10s
(Morimoto <i>et al.</i> , 2007)	Evaporation par pulvérisation	Electrolyse à intensité constante	KCl saturé I=1A.cm ⁻² ; t=5min
(Triroj <i>et al.</i> , 2006)	Evaporation par faisceau d'électrons	Plasma Cl ₂	Cl ₂ : 100sccm ; t=120s P=100mTorr ; 100W RF
(Miyashita <i>et al.</i> , 2009)	Evaporation	Electroless	50mmol.L ⁻¹ FeCl ₃ pH=2,1
(Parker <i>et al.</i> , 2009)	Electrolyse à potentiel constant	Electroless	1mol.L ⁻¹ FeCl ₃ t=60s
(Schwake <i>et al.</i> , 1998)	Evaporation par pulvérisation	Electrolyse à potentiel constant	0,1mol.L ⁻¹ KCl E=150mV _{/Ag/AgCl/3MKCl} ; t=60s

Tableau II-4 : Différentes méthodes de fabrication de l'électrode de référence Ag/AgCl.

Ce sont classiquement des électrodes Ag/AgCl car la procédure d'intégration de l'argent est compatible avec les microtechnologies silicium. Ces électrodes Ag/AgCl sont généralement appelées des « quasi-électrodes de référence » car elles sont directement mises en contact avec la solution d'étude, sans aucun électrolyte interne (Shinwari *et al.*, 2010). Le potentiel de ces électrodes évolue avec la variation de concentrations des ions chlorures, en accord avec la loi de Nernst.

La réaction caractéristique de l'électrode Ag/AgCl est :



Son potentiel s'exprime de la façon suivante :

$$\frac{E_{Ag}}{Cl^-} = E_{AgCl}^0 - \frac{RT}{F} \ln a_{Cl^-} = E_{Ag}^0 + \frac{RT}{F} \ln N_s - \frac{RT}{F} \ln a_{Cl^-}$$

où $K_s = a_{Ag^+} \times a_{Cl^-} = 1,8.10^{-10}$, est le produit de solubilité du chlorure d'argent.

Plusieurs facteurs peuvent limiter la durée de vie de cette électrode de référence : le plus important est la solubilité du chlorure d'argent. Une des solutions est de créer des couches d'argent et de chlorure d'argent très épaisses par électrodéposition (Polk *et al.*, 2006). Le « screen printing » et les pâtes Ag/AgCl peuvent constituer une alternative (Desmond *et al.*, 1997). Des approches différentes consistent à réaliser une électrode de référence miniaturisée avec son propre électrolyte et/ou sa propre jonction ionique. Les électrodes peuvent être recouvertes entièrement de couches protectrices (Nafion, polyuréthane) qui préviennent de la dissolution d'AgCl dans l'environnement étudié et le passage d'espèces interférentes (Suzuki *et al.*, 1998 ; Matsumoto *et al.*, 2002). Actuellement, l'amélioration des électrodes de référence passe par la mise en place de gels ou de membranes contenant du chlorure de potassium à la surface de l'électrode (Guth *et al.*, 2009 ; Suzuki et Shiroishi, 1999 ; Huang et Huang, 2002 ; Simonis *et al.*, 2004).

Le chlorure d'argent peut être produit par deux méthodes principales: réaction chimique spontanée ou réaction électrochimique contrôlée. La première procédure est simple à mettre en place et ne nécessite pas d'équipement particulier : généralement l'échantillon est plongé dans une solution de

chlorure de fer (III). Cependant, l'épaisseur et les caractéristiques du dépôt ne sont pas maîtrisées. Les méthodes galvanostatiques et potentiostatiques permettent, a contrario, de contrôler la croissance du chlorure d'argent. Les différents travaux semblent favoriser les méthodes galvanostatiques. Le maintien à un courant constant permet un contrôle simple de l'épaisseur d'AgCl produit par coulométrie (Loi de Faraday, chapitre I, équation I-6).

Pour l'application visée, qui nécessite des mesures sur une courte durée, la mise en place d'une membrane ou d'un gel contenant une solution de KCl de concentration connue ne semble pas être dans un premier temps primordiale, l'électrode de référence Ag/AgCl simple présentant une bonne stabilité sur les temps de détection impliqués (Simonis *et al.*, 2004). Le dépôt par voltammétrie linéaire utilisant une faible vitesse de balayage permet de créer un dépôt stable et homogène. Une vitesse de balayage trop importante peut engendrer un dépôt poreux, source d'un défaut de stabilité : si des espèces du milieu d'étude se retrouvent piégées dans la matrice Ag/AgCl, elles peuvent modifier le potentiel de l'électrode de référence.

Par ailleurs, des problèmes inhérents à la structure issue de la fabrication peuvent apparaître. L'argent présente une faible adhésion sur les substrats silicium et notamment SiO₂ ; une couche d'accroche (titane ou chrome) est donc nécessaire. Il est indispensable par la suite d'isoler les tranches du dépôt afin de ne pas altérer le potentiel du couple Ag/AgCl. De plus, l'argent peut être contaminé par l'interdiffusion des atomes des sous-couches. L'argent est donc déposé sur une couche intermédiaire de platine qui joue le rôle de barrière de diffusion.

III. Description du procédé de fabrication des dispositifs électrochimiques

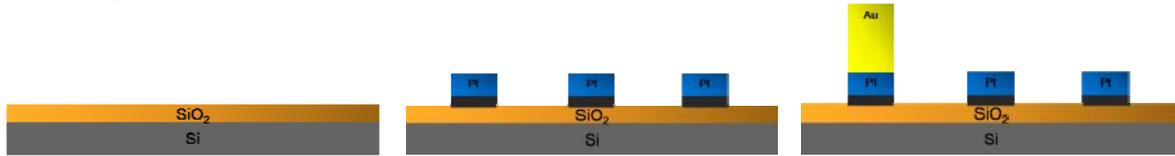
Les exigences et les choix précédemment énoncés ont permis de définir les étapes du procédé de fabrication (Figure III-1). La réalisation de cellules électrochimiques peut se détailler en trois étapes de type photolithographie lift-off, définissant les trois matériaux d'électrodes et une étape de photolithographie pour l'isolation SU-8 et la définition des zones actives. Ce processus de fabrication comprend au total douze étapes à partir du choix du substrat jusqu'à l'obtention de la cellule électrochimique finalisée (connectique comprise).

Le choix des géométries, des matériaux, et des techniques mises en œuvre pour la fabrication des microcellules a permis de créer les masques de photolithographie associés. Ils transcrivent de manière réelle les designs voulus pour les microcellules et prennent en compte, outre les résines impliquées dans le processus de fabrication, le choix des paramètres et des agencements à étudier. In fine, ils présentent 21 configurations différentes (13 modèles A, 1 modèle B et 7 modèles D), démultipliées six fois sur le substrat, dont une moitié admet une électrode de travail en or, et la seconde moitié une électrode de travail en platine, ce qui permet d'obtenir au total 126 composants. Ce chiffre pourra par la suite être redéfini à la hausse lorsqu'une optimisation de la configuration et des tailles sera mise en place.

Les puces ont une longueur totale d'un centimètre. Les plots de contacts permettant d'établir les futures connexions électriques du composant sont placés à l'extrémité opposée aux zones actives. En effet, le relief engendré par les connectiques et leurs protections peuvent être un obstacle au bon

contact de la structure sur la peau. En déportant cette partie, l'extrémité du composant admettant les zones actives peut être correctement apposée sur la peau.

Vue en coupe



Vue de dessus



Préparation des plaquettes

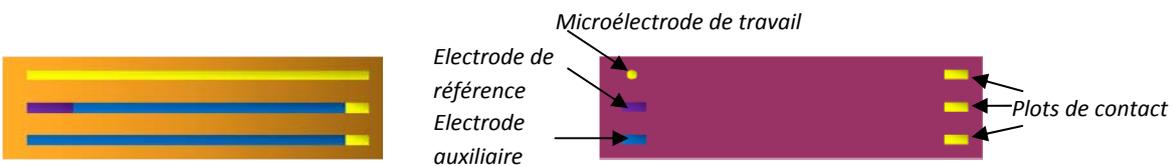
Niveau 1 : Métallisation Platine

Niveau 2 : Métallisation Or

Vue en coupe



Vue de dessus



Niveau 3 : Métallisation Argent

Niveau 4 : Isolation SU-8

Figure III-1 : Principales phases du processus de fabrication des microcellules électrochimiques.

Quatre masques ont été définis, représentant chaque étape du procédé de fabrication. Un premier correspond au dépôt de titane/platine, définissant une partie des électrodes de travail, l'ensemble des électrodes auxiliaires et des pistes de conduction. Un second masque fixe le dépôt de l'or sur les électrodes de travail concernées et sur l'ensemble des plots de contact par lesquels la puce est connectée au circuit imprimé. Ce dernier supporte la connectique adaptée à l'appareillage de mesure. Un troisième masque correspond au dépôt d'argent spécifiant les électrodes de référence. Le dernier assure l'ouverture des zones actives et des plots de contact dans la couche d'isolation SU-8.

La fabrication des capteurs est automatiquement suivie d'investigations électrochimiques utilisant la voltammétrie cyclique. Cette technique d'analyse est sensible, témoin de la surface et est un bon outil pour détecter les contaminants de surface et les résidus provenant des étapes de fabrication lors du procédé.

A. Procédé de fabrication

Choix du substrat

Le substrat a un rôle purement mécanique : il est le support des microélectrodes et n'a aucune fonction dans la mesure électrochimique. Le choix s'est focalisé sur un substrat standard, de faible coût : des plaquettes de silicium, appelées wafer, de type P (dopage au bore), orienté <100> et de 525 µm d'épaisseur. La taille de ce substrat doit être de plus compatible avec les équipements disponibles dans la centrale technologique au LAAS-CNRS, ce qui a imposé le choix d'une plaquette 4 pouces (le diamètre de la plaquette est d'environ 10,16 cm). Cette taille a dicté le nombre de cellules électrochimiques disponibles en fin de processus de fabrication.

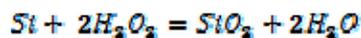
Au regard de l'application visée, d'autres types de substrats auraient pu être envisagés. Des substrats souples type polyimides auraient pu jouer ce rôle de support mécanique, ce qui aurait demandé des développements supplémentaires.

Préparation des plaquettes

Etape 1 : Nettoyage des plaquettes

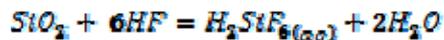
Cette première étape permet d'éliminer les impuretés présentes en surface du substrat. Elle se déroule de la façon suivante :

- Immersion pendant deux minutes des plaquettes dans une solution composée d'acide sulfurique (solution commerciale à 96%) et d'eau oxygénée (solution commerciale à 30%) en proportion volumique 1/1. Une couche mince d'oxyde de silicium se forme, piégeant lors de sa croissance toutes les impuretés en surface.



Les contaminants organiques sont également dégradés en formant des espèces volatiles telles que CO₂ et O₂ (Choi *et al.*, 2003 ; Ruzyllo et Novak, 1998).

- Rinçage des plaquettes dans l'eau déionisée (EDI).
- Immersion pendant trente secondes dans une solution d'acide fluorhydrique à 10%. L'oxyde créé précédemment ainsi que les impuretés sont alors éliminés (Williams et Muller, 1996).



- Rinçage des plaquettes dans l'EDI.
- Séchage sous azote dans une centrifugeuse.

Etape 2 : Oxydation de masquage

Le silicium est un semi-conducteur ; il est donc dans un premier temps isolé électriquement par la croissance d'un film diélectrique. Son rôle est de déconnecter électriquement les électrodes les unes des autres et du substrat et d'éviter toute réaction chimique de ce dernier avec le milieu d'étude. Il est pour cela oxydé à haute température (1150°C) sous atmosphère d'oxygène et d'hydrogène, afin de former à sa surface une couche d'oxyde de silicium SiO₂, d'épaisseur supérieure à 1 µm (Figure III-1, préparation des plaquettes). L'épaisseur de l'oxyde n'est pas un paramètre primordial pour

l'application. Il faut cependant qu'il soit suffisamment épais pour garantir l'isolation électrique du silicium. A titre d'exemple, le cycle thermique de l'oxydation pour une épaisseur de SiO_2 de $1,1 \mu\text{m}$ est représenté sur la Figure III-2.

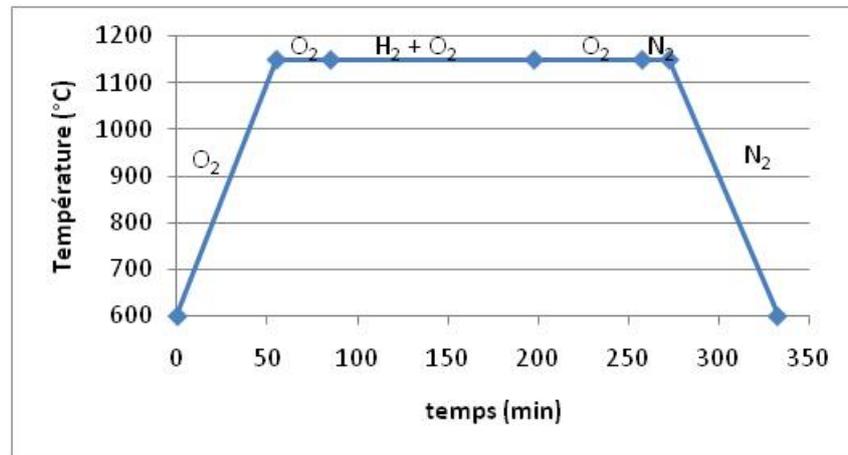


Figure III-2 : Cycle thermique de l'oxydation du silicium (épaisseur formée= $1,1\mu\text{m}$).

Niveau 1 : Création des pistes de conduction et des électrodes auxiliaires.

Etape 3 : Photolithographie du dépôt Titane/Platine : premier niveau de masque

Cette étape permet de créer l'ensemble des pistes métalliques qui servent de base d'accroche pour les matériaux déposés par la suite. Elle est la première du processus de création des motifs métalliques utilisés. Le processus mis en place est le lift-off réalisé avec la résine AZ5214, présenté à la section I-B 4.

Etape 4 : Métallisation Titane/Platine (20 nm/200 nm)

Cette étape permet de créer l'ensemble des pistes métalliques qui servent de support à tous les dépôts métalliques ultérieurs et dont une partie constitue les microélectrodes de platine. Le platine est déposé par évaporation par faisceau d'électrons sur l'ensemble de la surface de la plaquette. Une couche de titane est préalablement déposée comme couche d'accroche pour améliorer l'adhérence du platine sur l'oxyde de silicium (étape « métallisation », Figure I-3). La résine est ensuite dissoute dans un bain d'acétone, éliminant ainsi le platine non directement déposé sur le substrat (étape de libération, Figure I-3).

Etape 5 : Recuit de métallisation

Les plaquettes subissent un recuit pendant vingt minutes sous azote à 250°C . Cette étape permet à la fois de diminuer les contraintes des zones métallisées et d'améliorer l'accroche des matériaux métalliques sur leur sous-couche. En effet, le recuit favorise la diffusion des matériaux à l'interface du dépôt et affecte le degré de plasticité de la structure (Kriese *et al.*, 1998).

Niveau 2 : définition des microélectrodes de travail en or et des plots de contact

Etape 6 : Photolithographie du dépôt d'or : deuxième niveau de masque

Sur le même principe que l'étape 3, cette opération permet de prédessiner sur la plaquette de silicium les motifs qui doivent être métallisés en or, notamment les microélectrodes en or et les plots de contact. Ces derniers sont sollicités lors de la phase d'assemblage pour souder les fils de connexion. L'ordre des étapes ainsi que les produits utilisés sont strictement les mêmes que pour le dépôt Ti/Pt ; seul le masque définissant les ouvertures diffère.

Etape 7 : Métallisation Or (800 nm)

Le dépôt d'or est également réalisé par évaporation par faisceau d'électrons. Aucune couche d'accroche n'est nécessaire car l'or adhère bien sur le platine.

Les plaquettes de silicium sont ensuite plongées dans l'acétone afin d'éliminer la résine encore présente et de libérer les structures « actives » (niveau 2, Figure III-1). L'étape est un peu plus longue pour ce dépôt que pour le dépôt de platine, l'épaisseur de l'or déposé étant un peu plus importante ; les zones d'« attaque » entre la solution et la résine s'en trouvent donc réduites. Cette épaisseur de dépôt (800 nm) est nécessaire à la phase de soudure pour l'assemblage.

Etape 8 : Recuit de métallisation

Une étape de recuit, identique à l'étape 5, est effectuée après la métallisation d'or.

Niveau 3 : définition des microélectrodes de référence

Etape 9 : Photolithographie du dépôt d'Argent : troisième niveau de masque

Le principe de cette étape, correspondant à la dernière phase de métallisation, est calqué sur celui des deux premières photolithographies. Le masque utilisé ici permet de dessiner l'ensemble des dépôts qui définissent les électrodes d'argent.

Etape 10 : Métallisation Argent (400 nm)

La métallisation d'argent est réalisée dans un bâti d'évaporation par effet Joule.

Niveau 4 : Isolation : définition des zones actives

La cellule électrochimique ainsi élaborée présente trois matériaux d'électrodes constituant l'électrode de travail, l'électrode auxiliaire et l'électrode de référence. Il faut maintenant définir les surfaces géométriques des électrodes dont les caractéristiques répondent au cahier des charges : en effet, la largeur des pistes de conduction étant de 100 μm et leur longueur cent fois plus importante, il est essentiel de dessiner les zones actives pour obtenir des électrodes de travail de taille micrométrique mais également pour maîtriser la surface des autres électrodes. De plus, la qualité de la surface active doit être maîtrisée. Les flancs des dépôts métalliques ne doivent donc pas être en contact avec les solutions d'étude, seuls les matériaux d'intérêt devant interagir avec le milieu d'étude. Si les couches d'accroche viennent à réagir également, des phénomènes rédox supplémentaires peuvent être observés et l'interprétation générale des voltammogrammes en est d'autant plus compliquée.

Etape 11 : Photolithographie de la passivation : quatrième niveau de masque

La photo-résine négative SU-8 permet d'isoler électriquement les pistes de conduction du milieu d'étude et de définir les zones actives, les ouvertures des électrodes et les plots de contacts. Les dépôts métalliques présentant des épaisseurs d'environ 1 μm pour les plus épais (électrode d'or), nous avons choisi de mettre en place une couche d'isolation de 1 à 2 μm d'épaisseur de manière à limiter l'encastrement des électrodes (cf. section II-C). Les processus de structuration de cette résine ont été mis en place au laboratoire pour des épaisseurs relativement importantes, supérieures à 10 μm . Afin de répondre au mieux à la problématique, le développement d'un film mince de SU-8 est nécessaire. Des études préliminaires ont donc été menées avec la résine SU-8 3005 dont les caractéristiques (viscosité et épaisseur) répondent au mieux aux attentes.

Dans un premier temps, la stabilité et l'inertie chimique des matériaux d'électrodes vis-à-vis des composés utilisés pour réaliser les photolithographies (résine, solutions de développement et de libération) ont été testées. Des observations au microscope n'ont pas mis en évidence de dégradation, même ponctuelle, de tous les matériaux. Dans un second temps, le processus de structuration a été mis en place : la vitesse de rotation de la tournette lors de l'enduction, la dose d'insolation et les temps de recuit ont été définis par rapport aux épaisseurs de résine et aux résolutions souhaitées, en corrélation avec les données du fabricant.

La résine SU-8 est enduite sur la plaquette. Le pré-recuit est effectué sur une plaque chauffante. La plaquette est ensuite insolée à travers un masque sur lequel sont dessinées les surfaces de travail des électrodes. La partie insolée est polymérisée. Après le post-recuit, effectué également sur plaque chauffante, et le développement au PGMEA (propylène glycol monométhyl éther acétate), les zones actives sont ouvertes et les plots de contact libérés de toute résine. L'épaisseur obtenue de SU-8 est de 1,6 μm en moyenne.

Assemblage

Etape 12 : Montage des composants

La plaquette est ensuite découpée à l'aide d'une scie diamantée ; elle est préalablement enduite d'une résine de protection pour éviter tout risque de détérioration et de contamination des composants par les poussières générées par la coupe. Une fois individualisés et nettoyés (élimination de la résine de protection), les composants sont reportés sur des circuits imprimés : ils sont collés et câblés sur leur support à l'aide de fils d'or afin d'assurer les connexions électriques. Un silicone biocompatible LOCTITE 5248 (Henkel Loctite) est déposé sur la zone de connexion (encapsulation). Il protège et renforce mécaniquement les connectiques. Il affranchit également les fils conducteurs de tout contact avec le milieu d'étude.

B. Mise au point et optimisation du procédé de fabrication

Le procédé de fabrication précédemment décrit a présenté divers problèmes qui sont détaillés ici. La procédure clé du processus de réalisation, le lift-off, ainsi que l'élément de passivation ont été repris.

1. Lift-off

Lors du premier procédé de fabrication dès la première étape de lift-off, l'état de surface de la plaquette n'était pas bon : en effet, dès la sortie de l'équipement de dépôt par évaporation, la résine se décollait de manière aléatoire. Après libération et dissolution de la résine, des traces de matériaux métalliques étaient visibles en dehors des motifs métallisés voulus. La résine n'est pas capable d'assurer la création de motifs bien définis. L'état de surface de la plaquette est mauvais et les risques de court-circuit entre les électrodes sont importants (Figure III-3).

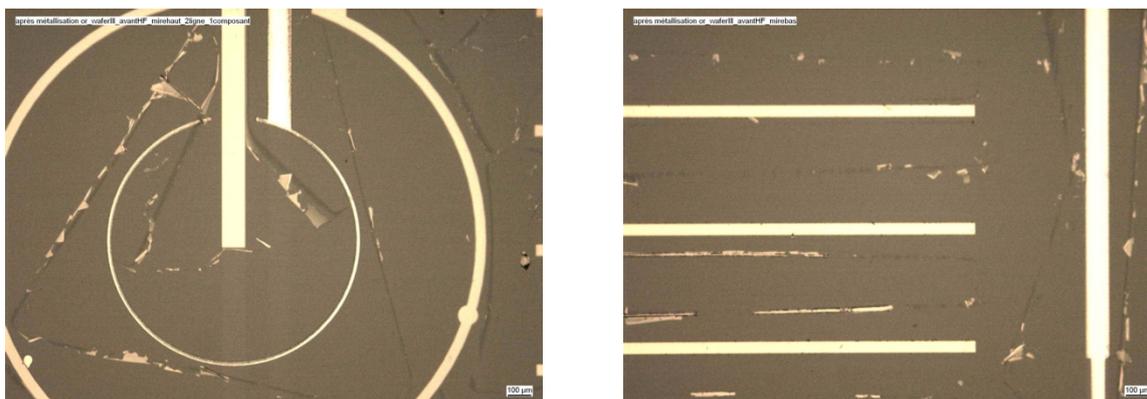
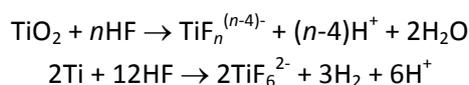


Figure III-3 : Photos prises avec un microscope optique des structures métalliques réalisées avec un process monocouche AZ5214.

Plusieurs hypothèses ont été émises. Tout d'abord, le dépôt métallique restant et non souhaité est toujours sur la résine AZ5214 mais celle-ci a subi une modification structurelle la rendant insoluble dans l'acétone lors de la libération. Cette hypothèse a été réfutée par un test simple : la plaquette a été placée dans un plasma oxygène une quinzaine de minutes afin d'éliminer de manière physique et chimique la résine subsistante. Mais l'état de surface de la plaquette en sortie de plasma n'a pratiquement pas été modifié.

Une deuxième hypothèse a porté sur la stabilité de la résine et sur sa capacité à adhérer au substrat face à des dépôts métalliques plus ou moins contraints. Chaque matériau possède des caractéristiques mécaniques propres (coefficient d'expansion thermique, par exemple) et la différence de ces propriétés induit des contraintes lors de la juxtaposition des matériaux au sein de cet assemblage. La contrainte exercée par ces couches métalliques en cours de dépôt est supérieure à la force d'adhésion de la résine, ce qui entraîne une délamination de la structure. Ceci se traduit par le fait que, lors du dépôt, la résine se craquelle et présente alors des défauts de structure, des fissures accessibles aux matériaux évaporés. Le titane et le platine se déposent alors en dehors des motifs désirés, sur des zones en théorie dépourvues de tout métal. Ceci a été vérifié en plongeant la plaquette dans une solution d'acide fluorhydrique qui attaque le titane (Sutter et Goetz-Grandmont, 1990) :



Les dépôts métalliques entre les motifs sont alors éliminés en grande partie, permettant de récupérer une plaquette avec un état de surface relativement bon. L'interface entre l'oxyde de

silicium et la résine de lift-off est donc encore mal maîtrisée pour obtenir des dépôts métalliques bien définis.

Mais cette étape de lift-off représente le cœur du processus de fabrication des électrodes : elle est renouvelée trois fois afin d'obtenir les trois matériaux métalliques. Les matériaux utilisés pour réaliser ce lift doivent présenter une très bonne fiabilité structurale et d'adhérence sur le substrat quels que soient les matériaux déposés, plus ou moins contraints, et ne pas présenter de défaut de décollement ou de craquellement.

Pour améliorer cette stabilité, d'autres procédures ont été développées. En effet, il existe différentes méthodes pour effectuer un lift-off : la procédure « mono-couche » de résine utilisée ici et la procédure « bi-couche ». La procédure standard, appelée « mono couche », est réalisée avec une seule résine photosensible réversible, l'AZ5214. C'est une méthode simple et plus facile à mettre en œuvre que la technique bi-couche qui implique le dépôt de deux résines. Cependant, cette double couche de résine permet en général d'obtenir un lift-off propre et de bonnes définitions de motifs grâce à une très bonne adhérence sur les substrats et sur les matériaux généralement utilisés en microtechnologies.

La procédure de mise en œuvre du procédé bi-couche est la suivante : une première résine non photosensible, ici le LOR 30B, est déposée à la surface du wafer, puis une seconde, elle photosensible, l'AZ1529 (étape 2 et 3 « enduction », Figure III-4)(Tableau III-1). La structure est ensuite insolée à travers un masque sur lequel ont été dessinés les motifs à créer (étape 4 : « alignement et insolation », Figure III-4) . Ces motifs sont ensuite « révélés » sur la plaquette de silicium, c'est-à-dire qu'ils se retrouvent prédessinés sur le wafer (étape 5 « révélation », Figure III-4). La résine photosensible insolée est dissoute dans une solution de développement. La résine LOR est éliminée chimiquement au niveau des ouvertures dessinées sur la résine supérieure à l'aide de cette même solution de révélation.

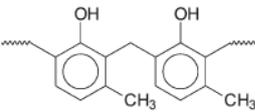
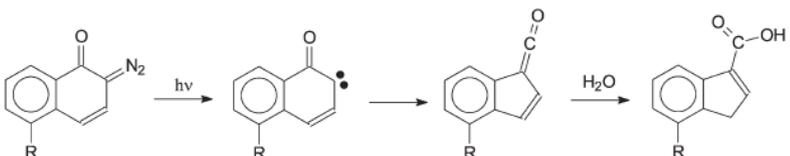
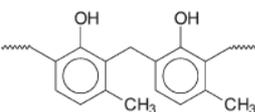
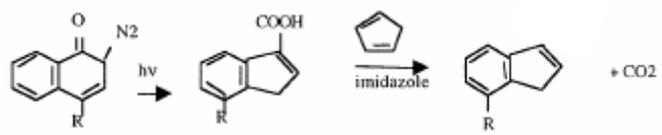
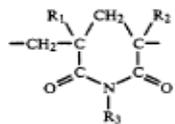
Résine	Réaction chimique du composé photosensible
- positive (AZ1529) 	Diazonaphthoquinone 
- réversible (AZ5214) 	
- LOR 	/

Tableau III-1 : Résines utilisées en photolithographie et la réaction chimique de leur composé photosensible (Ito, 2005).

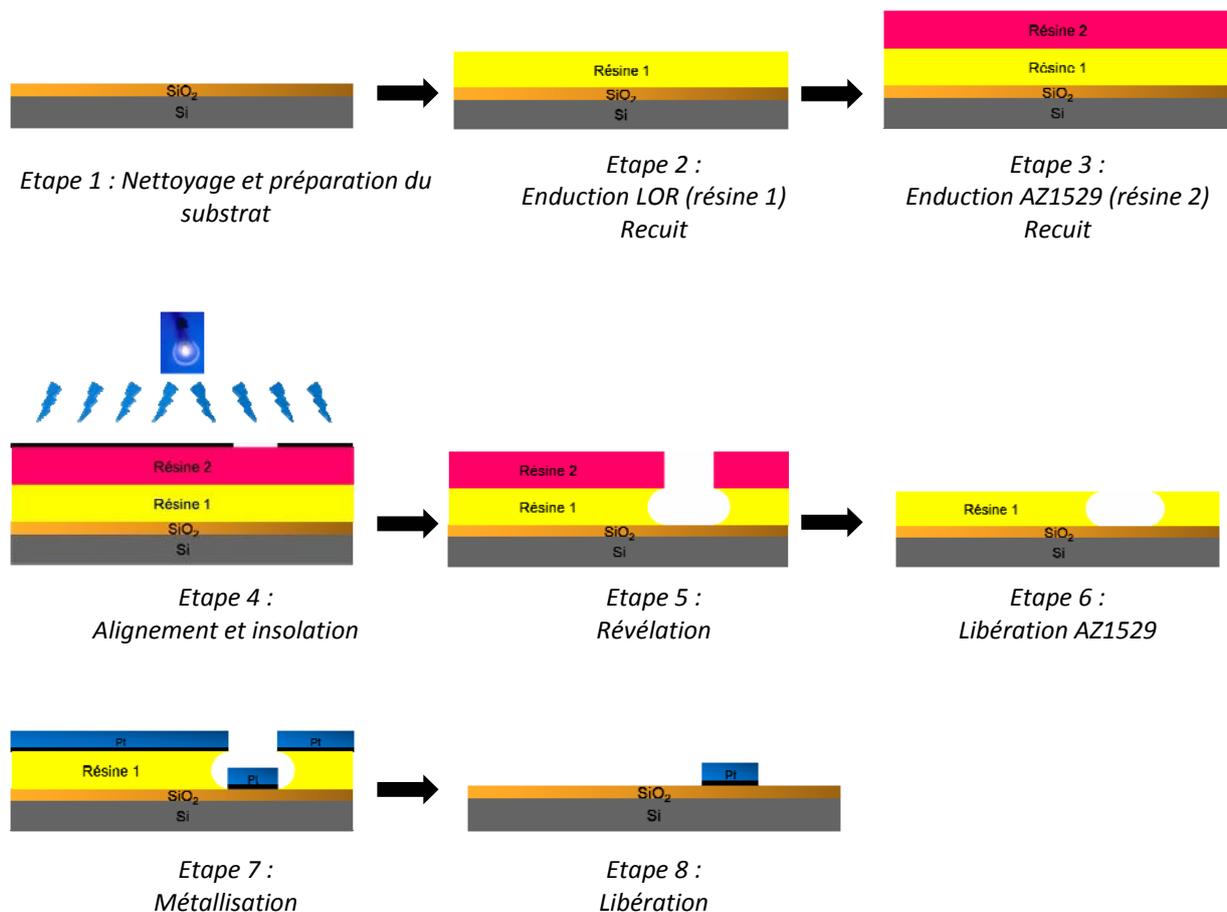


Figure III-4 : Etapes du procédé lift-off « bi-couche ».

La résine LOR est le pochoir des pistes métalliques. Elle a été choisie pour sa grande stabilité et sa tenue mécanique vis-à-vis de matériaux très contraints qui sont déposés dessus. La résine supérieure, photodéfinissable, est ensuite éliminée une fois l'ensemble des motifs révélés : elle n'est pas aussi stable que le LOR et peut polluer par dégazage le bâti de métallisation dans lequel la plaquette est ensuite placée (étape 6 « Libération AZ1529 », Figure III-4).

Après le dépôt, l'étape suivante permet de définir des pistes métalliques. Pour cela, la résine restante LOR et par conséquent les zones métalliques non souhaitées sont éliminées en plongeant la plaquette dans de l'AZ400K, solution aqueuse à base de KOH. Ainsi, seules les structures métalliques constituant le dispositif électrochimique sont conservées sur le wafer (étape 8, « libération », Figure III-4).

La plaquette obtenue avec ce procédé lift-off bi-couche présente un très bon état de surface avec des électrodes correctement définies, quel que soit le matériau métallique déposé, comme le montre les observations Figure III-5. Après ces tests concluants, cette procédure a été mise en place pour les trois étapes photolithographiques correspondant aux trois matériaux d'électrodes. Le processus de

fabrication amélioré a été réalisé dans son ensemble pour fabriquer une nouvelle série de composants.

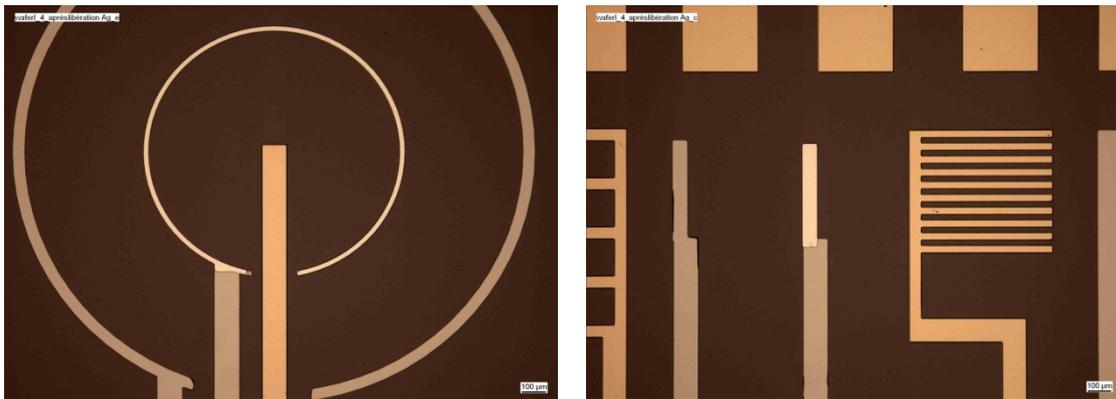


Figure III-5 : Photographies de structures trois microélectrodes réalisées avec une procédure bi-couche (LOR+AZ1529).

2. Validation du processus de fabrication

Les microélectrodes ainsi obtenues diffèrent des électrodes fabriquées manuellement (présentées au chapitre I). Film mince/matériau massif, couche d'isolation électrique, stabilité chimique, modification de surface, définition des zones actives sont autant de pistes de réflexion et d'interrogation sur la validité du processus de fabrication. Le comportement et la réactivité électrochimique des couches métalliques créées par un dépôt par évaporation sont-ils comparables à ceux des métaux purs utilisés jusqu'à présent ? L'exposition, lors du procédé de fabrication, à un grand nombre de solutions organiques et aqueuses, dont les compositions ne sont pas toujours bien connues, et les procédures de nettoyage qui s'y rattachent ont-elles engendré une pollution de surface ?

Pour répondre à ces questions et valider le processus de fabrication et la « fonctionnalité » de la couche de passivation, les premiers prototypes ont été testés : chaque matériau d'électrode a été caractérisé par voltammétrie cyclique dans des solutions électrolytiques modèles ; les courbes sont comparées à celles classiquement obtenues avec des électrodes de fabrication conventionnelle.

Pour ces tests, le montage électrochimique est un montage classique à trois électrodes : une électrode auxiliaire en platine, une électrode de référence au calomel saturée (ECS), toutes deux non intégrées, et l'électrode de travail constituée par la microélectrode issue de la technologie silicium. Tous les potentiels exprimés dans la suite du texte sont donnés par rapport à ECS. Un multipotentiostat de la marque Bio-logic, piloté par le logiciel EC-Lab, permet de réaliser les mesures électrochimiques. Les balayages de potentiel débutent classiquement du potentiel d'abandon, vont vers les potentiels positifs au balayage aller et se dirigent vers les potentiels négatifs au balayage retour. Les solutions sont préalablement dépourvues d'oxygène par barbotage d'azote pendant vingt minutes. Les solutions ne sont pas agitées pendant les mesures.

a) Microélectrode de platine

Métal de transition, le platine est un matériau noble. Ses propriétés physiques démontrent qu'il se dilate peu sous la chaleur et qu'il est un bon conducteur électrique (Tableau III-2).

	Résistivité ($n\Omega \cdot m$) à 20°C	Conductivité thermique ($W \cdot m^{-1} \cdot K^{-1}$) à 20°C	Module d'Young (Gpa)
Platine	105	71	177
Or	22	320	79
Argent	16	426	81

Tableau III-2 : Quelques constantes physiques des trois matériaux d'électrodes (Lide, 2000).

L'interface platine/solution est l'une des plus étudiées par les électrochimistes du fait des propriétés électrocatalytiques du film d'oxyde de platine (Conway et Jerkiewicz, 1992 ; Aldaz *et al.*, 1994). La stabilité théorique du platine peut être évaluée par le diagramme de Pourbaix (Figure III-6) qui ne donne aucune information cinétique.

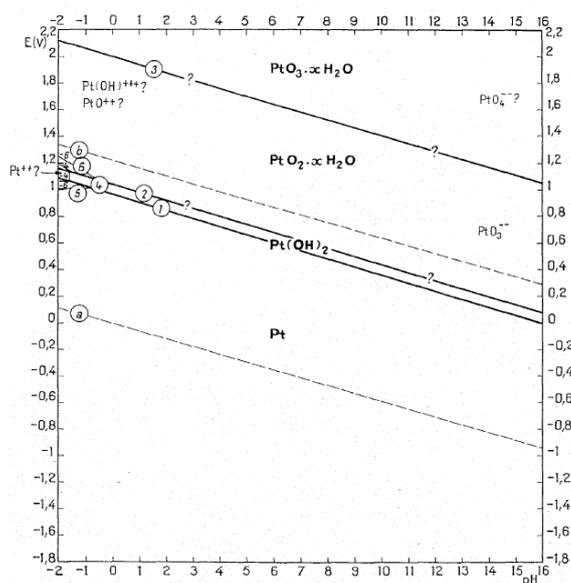


Figure III-6 : Diagramme d'équilibres potentiel-pH du système platine-eau à 25°C (Pourbaix, 1963).

Le comportement électrochimique du platine dans un milieu aqueux est généralement illustré par le tracé d'un voltammogramme cyclique dans une solution d'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ (Figure III-7). La formation de l'oxyde s'opère à partir de 0,94 V/ESH avec un épaulement visible à 0,89 V/ESH. Les pics observés entre 0 et 0,4 V/ESH sont liés aux différentes étapes de la réduction du proton et à l'oxydation de l'hydrogène. Ces réactions et leurs cinétiques dépendent des faces cristallographiques du métal (Figure III-7, B).

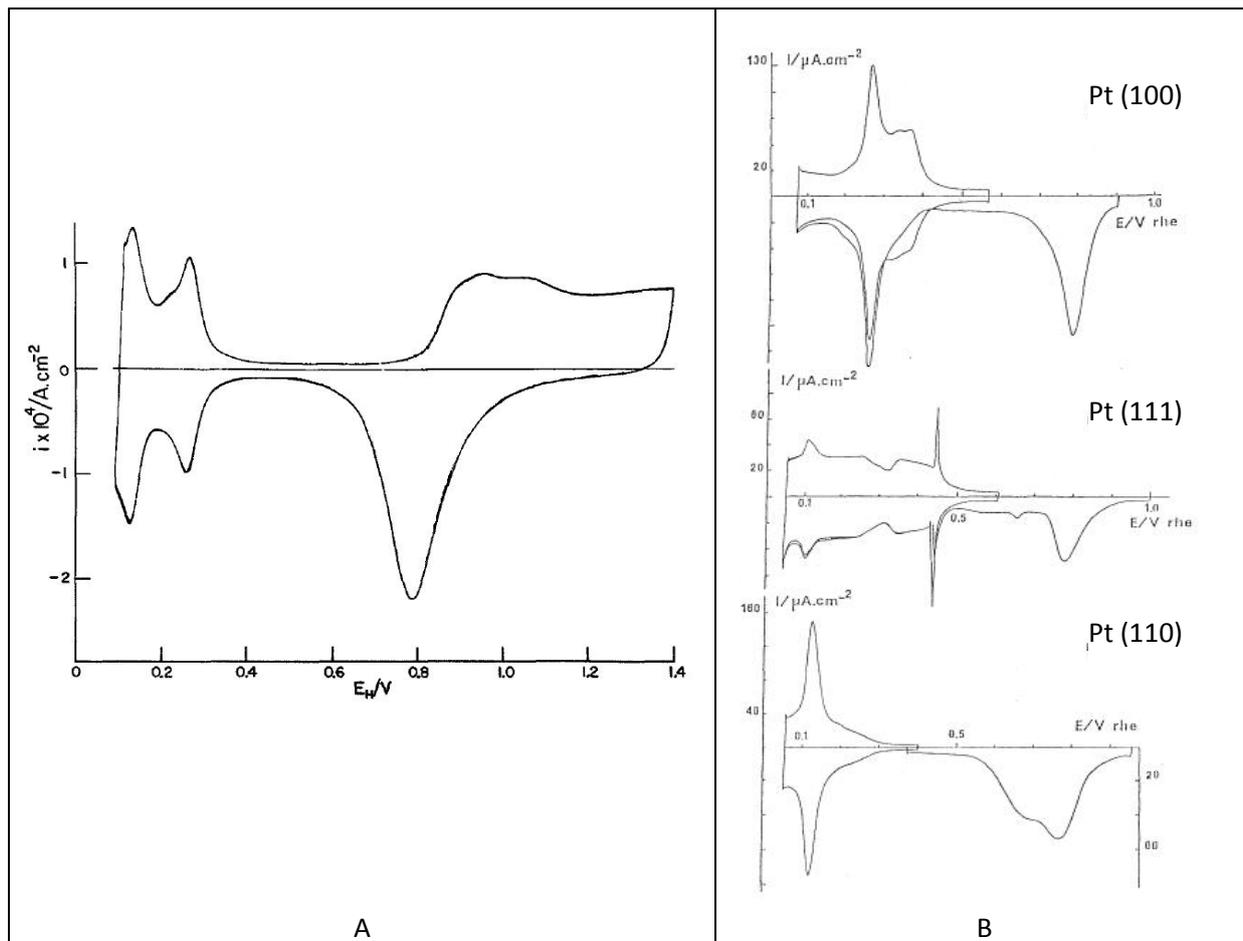
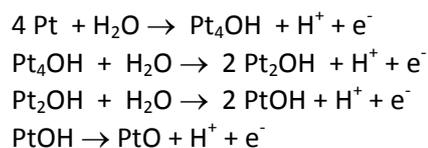


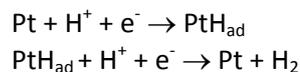
Figure III-7 : Voltammogrammes cyclique d'une électrode de platine dans une solution d'acide sulfurique. A) Pt polycristallin, $[H_2SO_4] = 1 \text{ mol.L}^{-1}$, vitesse de balayage = 100 mV.s^{-1} (Tilak *et al.*, 1973) ; B) Pt cristallin : surface (100), (111) et (110), $[H_2SO_4] = 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Vitesse de balayage = 50 mV.s^{-1}

L'oxydation du platine est relativement complexe. En effet, le schéma réactionnel présenté par Angerstein-Kozłowska *et al.* (1973) propose la formation successive de quatre espèces oxydées du platine :



La réduction de ces oxydes, résumée généralement par la réaction $\text{PtO} + 2 \text{ H}^+ + 2 \text{ e}^- \rightarrow \text{Pt} + \text{H}_2\text{O}$, a lieu à $0,8 \text{ V/ESH}$.

Les réactions électrochimiques de l'hydrogène impliquent l'électrosorption et l'électrodésorption du proton. A pH acide, les processus sont décrits par les réactions suivantes, appelées étapes de Volmer-Heyrovsky :



où H_{ad} représente le proton chimisorbé (Conway et Tilak, 2002 ; Barber *et al.*, 1998).

Pour une électrode « fraîchement » préparée, la forme du voltammogramme est modifiée pendant les premiers cycliques, ces changements devenant moins importants après une vingtaine de cycles. L'application de balayages de potentiel impliquant des traitements anodique et cathodique est connue pour permettre une augmentation significative des propriétés électrocatalytiques du platine. De tels traitements sont appelés « activation » de la surface d'électrode. De nombreux travaux sont consacrés à la compréhension des mécanismes pendant ces traitements, particulièrement sur le platine. En général, l'activation est attribuée à l'élimination des impuretés de surface et à un réarrangement structural superficiel du métal (Rand et Woods, 1972).

Le voltammogramme obtenu avec une microélectrode de platine réalisée par les technologies silicium dans une solution d'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ non agitée, entre $-0,25$ et $+1,2 \text{ V/ECS}$, est présenté à la Figure III-8.

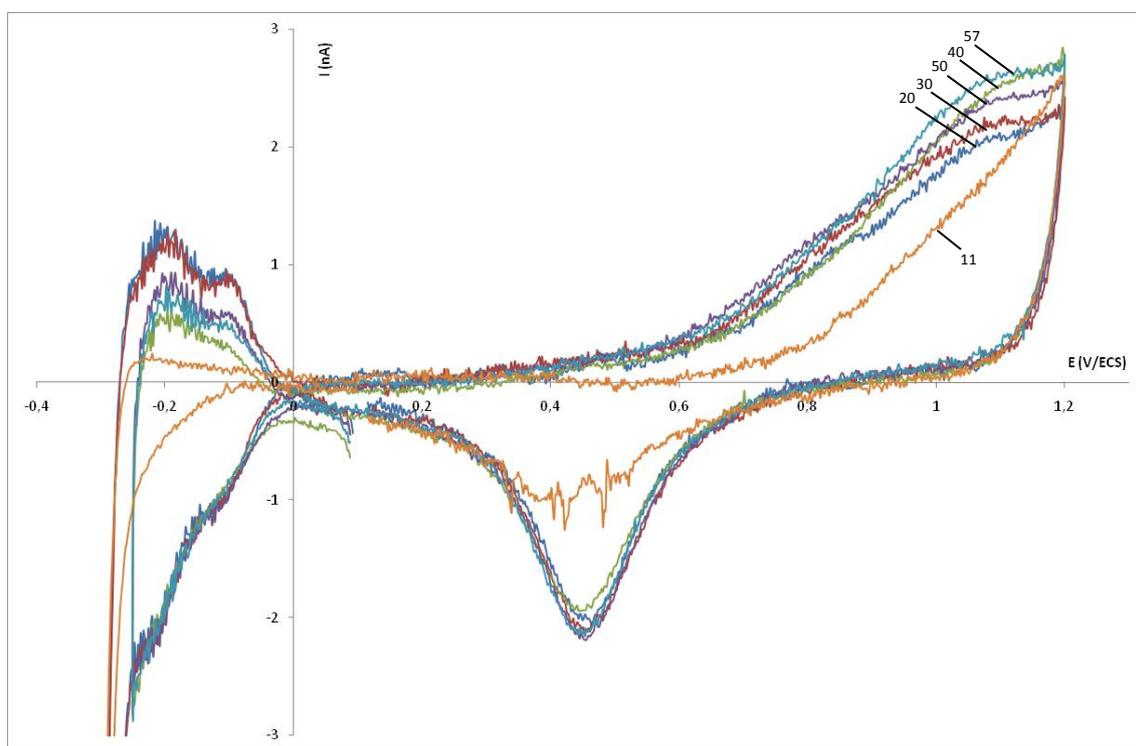


Figure III-8 : Voltammogrammes cycliques d'une microélectrode de platine réalisée par les technologies silicium, dans une solution d'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Vitesse de balayage = 50 mV.s^{-1} . Les chiffres indiquent le nombre de cycles.

La réponse ampérométrique obtenue est typique du platine polycristallin dans une solution d'acide sulfurique. Les pics correspondant aux phénomènes de réduction et d'oxydation de PtH sont situés entre $-0,25$ et 0 V . Le recouvrement de la surface par les formes oxydées débute vers $0,6\text{V}$ et l'oxydation du solvant commence à partir de $1,2\text{V}$. Le pic d'intensité correspondant à la réduction des oxydes de platine apparaît clairement entre $0,6$ et $0,3\text{V}$.

Après une phase d'activation, le platine couche mince présente une activité électrochimique tout à fait comparable au matériau massif. Le platine n'a pas été dégradé ou pollué par le processus de fabrication réalisé.

b) Microélectrode d'or

Métal de transition comme le platine, l'or est le plus noble des métaux, le plus malléable et le plus ductile des métaux connus. Ce métal est bon conducteur de la chaleur et de l'électricité (Tableau III-2).

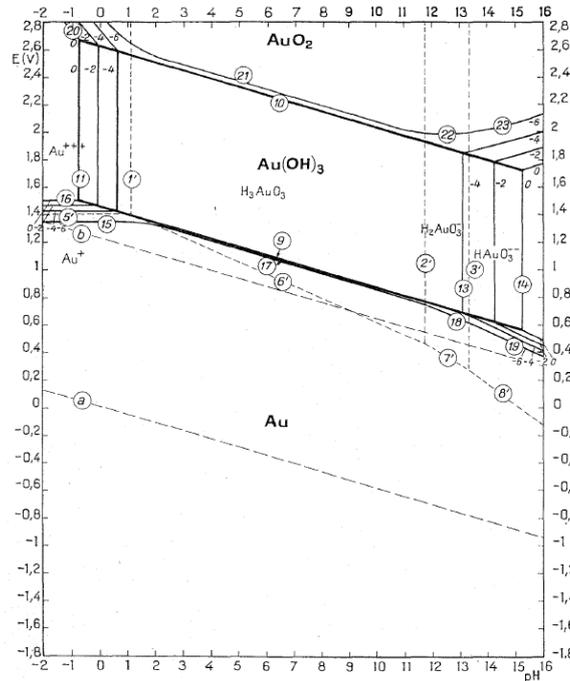
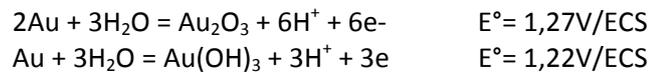
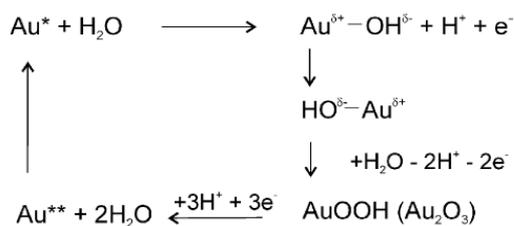


Figure III-9 : Diagramme d'équilibres potentiel-pH du système or-eau à 25°C (Pourbaix, 1963)

Le diagramme d'équilibre potentiel-pH du système or-eau (Figure III-9), met en évidence les différents degrés d'oxydation possibles de l'or : + I, + III et + IV. Cependant, ce diagramme devient plus complexe en présence de ligands qui favorisent les états d'oxydation prédominants +I et +III. Les potentiels d'oxydation de l'or et de réduction de ses oxydes dépendent du pH de la solution. En effet, ils se déplacent de 60mV vers les potentiels négatifs pour une augmentation d'une unité pH. Les réactions thermodynamiques qui en témoignent sont respectivement aux pH acides et basiques :



Les travaux de différentes équipes montrent que l'oxydation de l'or est également complexe et est intimement liée aux conditions expérimentales : l'allure des voltammogrammes cycliques dépend des solutions d'étude, de la vitesse de balayage... (Nicol, 1980 ; Conway, 1995). Les faces cristallographiques influencent également la forme des voltammogrammes mais généralement, en solution acide, le potentiel d'oxydation de l'or se situe entre 1,3 et 1,5 V/ESH (Figure III-10). Toutes les étapes impliquées dans l'oxydation de l'or et la réduction des oxydes peuvent être représentées par le schéma réactionnel suivant (Burke et Nugent, 1997 ; Petrović *et al.*, 2009) :



où Au^* est un atome régulier de surface et Au^{**} un atome déplacé de surface.

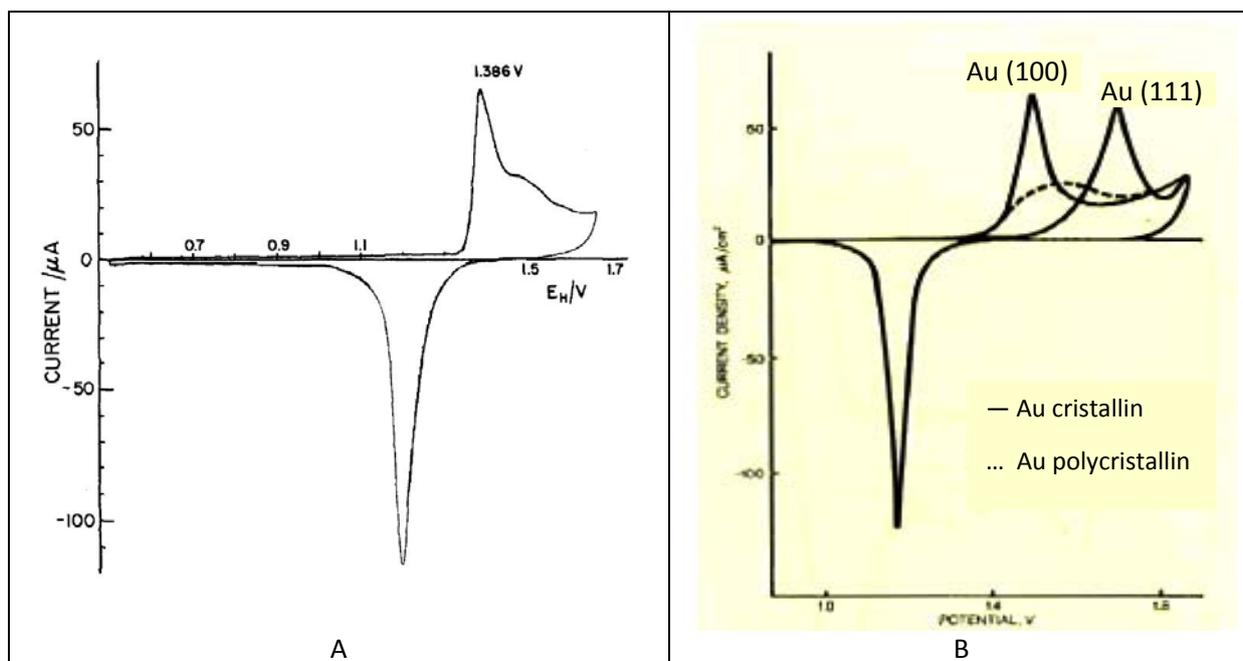


Figure III-10 : Voltammogrammes cyclique d'une électrode d'or. A) Au polycristallin, acide sulfurique à $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, vitesse de balayage= 20 mV.s^{-1} (Angerstein-Kozłowska *et al.*, 1979); B) Au polycristallin/Au cristallin : surface (100), (111). Acide perchlorique à 1 mol.L^{-1} . Vitesse de balayage= 10 mV.s^{-1} (Nicol, 1980).

Le voltammogramme cyclique d'une microélectrode d'or réalisée en salle blanche, effectué dans une solution non agitée d'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ entre $-0,3$ et $+1,6 \text{ V/ECS}$ (Figure III-11) présente bien les processus d'oxydation de l'or et la réduction des oxydes d'or correspondants. L'oxydation débute entre 1 et $1,2 \text{ V}$ et le pic de réduction atteint son maximum d'intensité à $0,86 \text{ V}$.

Cependant, d'autres phénomènes rédox plus ou moins marqués peuvent être observés sur les voltammogrammes, notamment lors de cycles de potentiel successifs (Figure III-12) : en réduction, un pic et une vague apparaissent à partir de $0,5 \text{ V}$ et 0 V respectivement ; en oxydation, une augmentation du courant est également visible à partir de $0,25 \text{ V}$ et une vague se dessine à partir de $0,8 \text{ V}$, vague suivie par la vague d'oxydation du métal. Ceci peut être lié à deux principaux éléments : soit la couche de passivation fournit des espèces électroactives sur l'or qui est de plus en plus électrocatalytique au cours des cycles, soit le platine, élément de la couche d'accroche de l'or sur le silicium, est en contact avec la solution acide. En effet, le platine est capable de présenter des courants d'oxydation et de réduction liés à l'adsorption et à la désorption du proton dans la plage des potentiels négatifs ainsi qu'un pic de réduction vers $0,4 \text{ V}$ lorsqu'il est associé à l'or (Möller et Pistorius, 2004). Cette seconde hypothèse implique l'existence de défauts structuraux du film de

passivation SU-8, notamment sur les flans des pistes métalliques ou dans le volume (interdiffusion) qui permettent aux sous-couches de réagir avec le milieu d'étude.

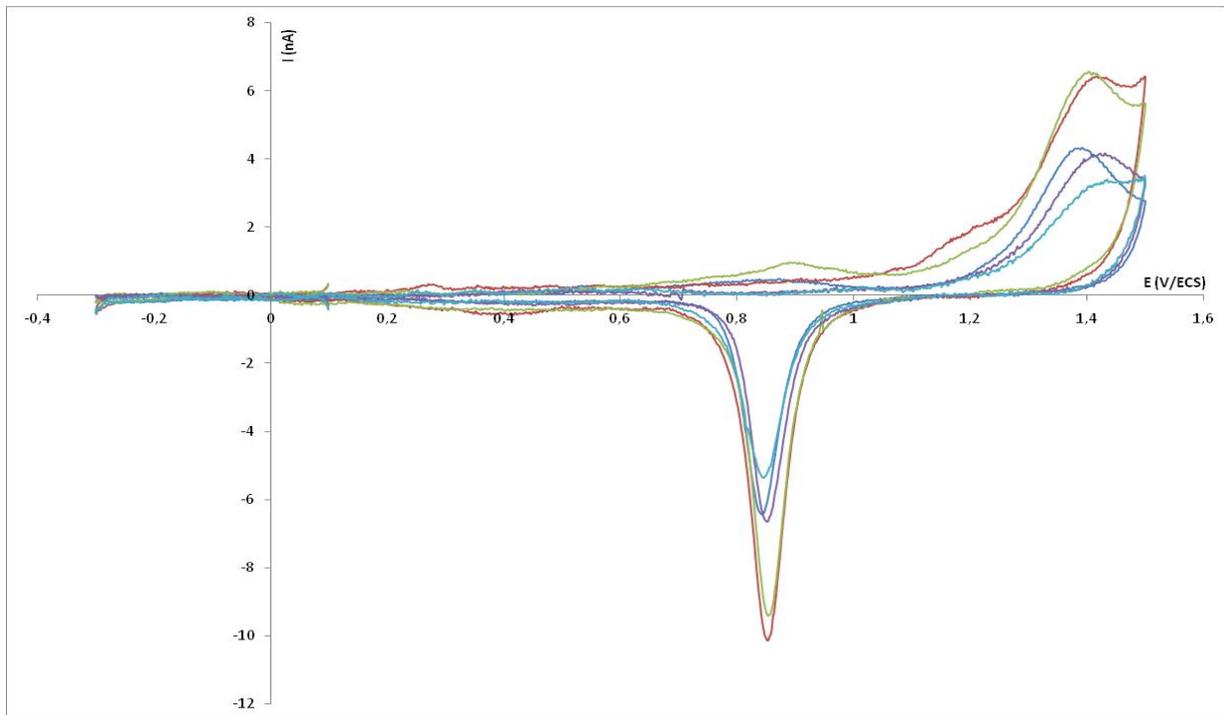


Figure III-11 : Voltammogrammes cycliques réalisés avec cinq microélectrodes d'or dans une solution désaérée d'acide sulfurique à 0.5 mol.L^{-1} . Vitesse de balayage = 50 mV.s^{-1} .

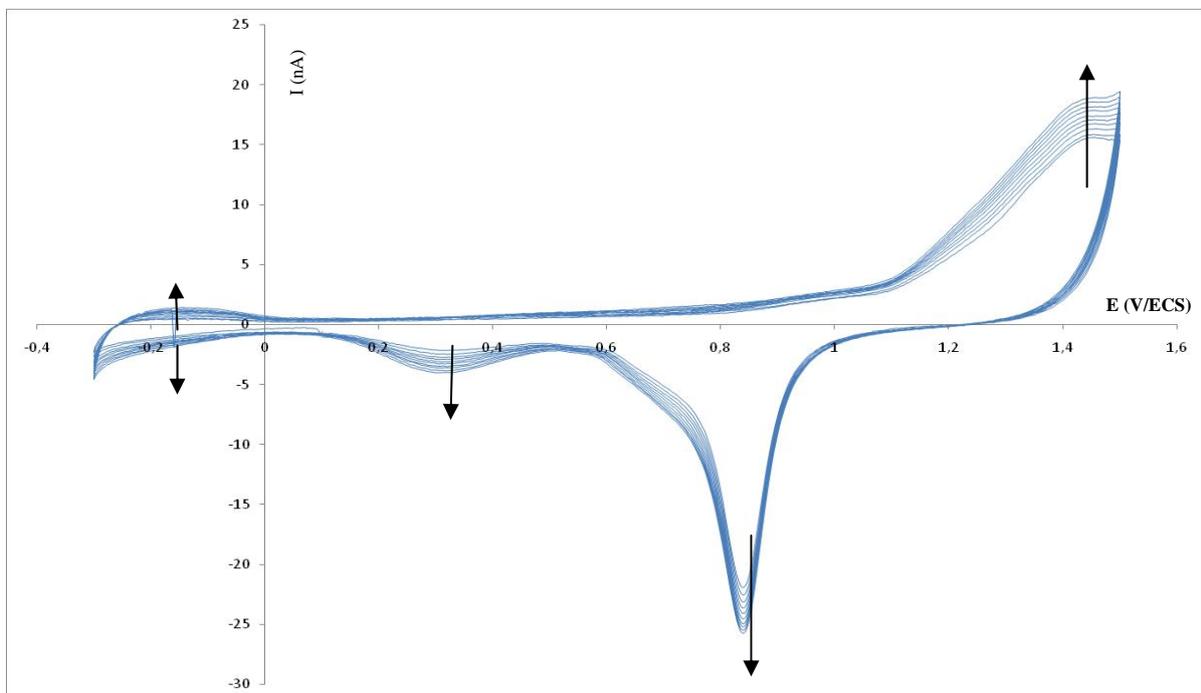


Figure III-12 : Voltammogrammes cycliques réalisés lors de cycles de potentiel successifs entre $-0,25$ à $1,5 \text{ V}$ avec une microélectrode d'or dans une solution désaérée d'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ (Vitesse de balayage = 100 mV.s^{-1}). Les flèches représentent l'évolution de l'intensité au cours de cycles.

Les électrodes film mince d'or ne présentent donc pas le comportement électrochimique attendu d'une électrode massive. Des phénomènes rédox s'ajoutent à la signature électrochimique de l'or pur dans de l'acide sulfurique.

c) Microélectrodes d'argent

L'argent, comme l'or, est un matériau malléable et ductile. C'est un excellent conducteur thermique et électrique : l'argent présente la résistivité la plus faible de tous les métaux à température ambiante (Tableau III-2).

Le diagramme potentiel-pH du système argent-eau à 25°C propose trois degrés d'oxydation possibles de l'argent : +I, +II et +III (Figure III-13).

De plus, soumis à certains environnements oxydants, il réagit rapidement : exposé à un milieu contenant de l'ozone, sa surface s'oxyde rapidement en Ag_2O (Waterhouse *et al.*, 2001).

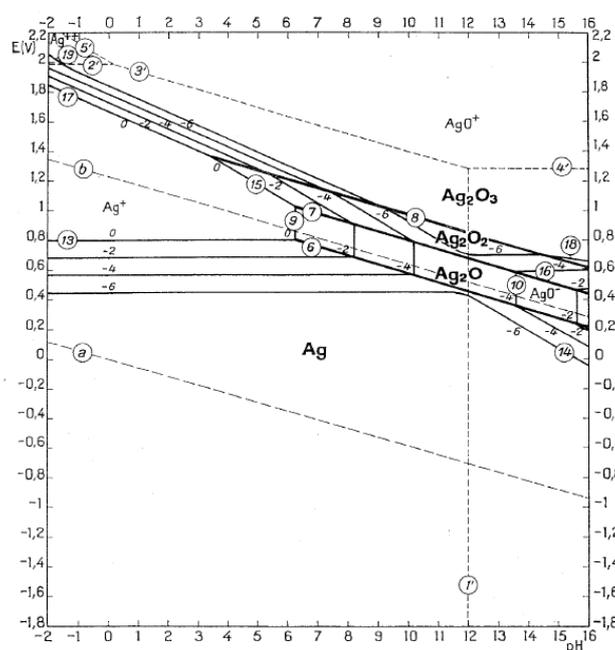


Figure III-13 : Diagramme d'équilibres potentiel-pH du système argent-eau à 25°C (Pourbaix, 1963)

Le voltammogramme réalisé avec une électrode d'argent dans une solution de nitrate de potassium KNO_3 acidifiée ($\text{pH}=3,5$) est présenté Figure III-14. Cette caractérisation n'est pas effectuée dans une solution d'acide sulfurique comme pour l'or et le platine, pour éviter la formation de Ag_2SO_4 au cours de l'oxydation électrochimique de l'argent métallique selon la réaction $2 \text{Ag} + \text{SO}_4^{2-} = \text{Ag}_2\text{SO}_4 + 2\text{e}^-$.

Ce voltammogramme présente deux phénomènes rédox :

- l'oxydation de l'argent, mise en évidence par un courant d'électrolyse exponentiel qui débute vers 0,3 V/ECS,
- la réduction du proton, $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- = \text{H}_2$, visible par la vague qui se dessine dès -0,5V/ECS (Ruffien-Ciszak, 2005).

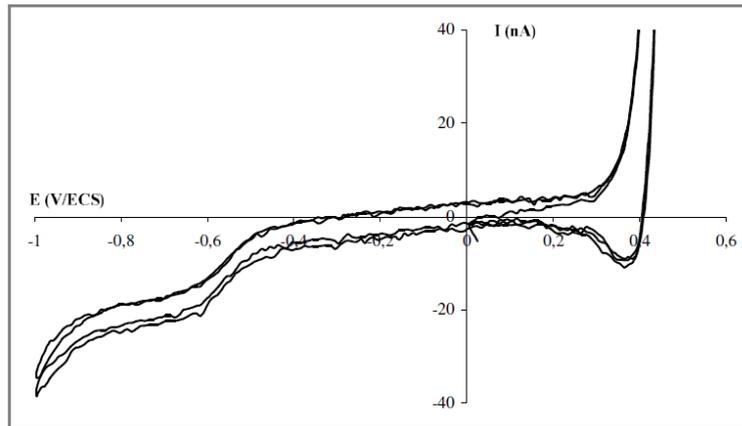


Figure III-14 : Voltammogramme d'une électrode d'argent au contact d'une solution désaérée et non-agitée de nitrate de potassium à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 3,5. Vitesse de balayage= 50 mV.s^{-1} (Ruffien-Ciszak, 2005).

Le voltammogramme réalisé avec une électrode d'argent couche mince, fabriquée par les technologies Silicium et Polymères, est tout à fait similaire à celui d'une électrode massive (Figure III-15). Certes, le premier cycle met en évidence une série de pics de réduction, mais ces derniers disparaissent dès le second cycle. Les intensités mesurées sont plus importantes que celles obtenues avec les microélectrodes de travail en or et en platine, car ces dernières présentent une surface dix fois plus petite que la surface de l'électrode d'argent.

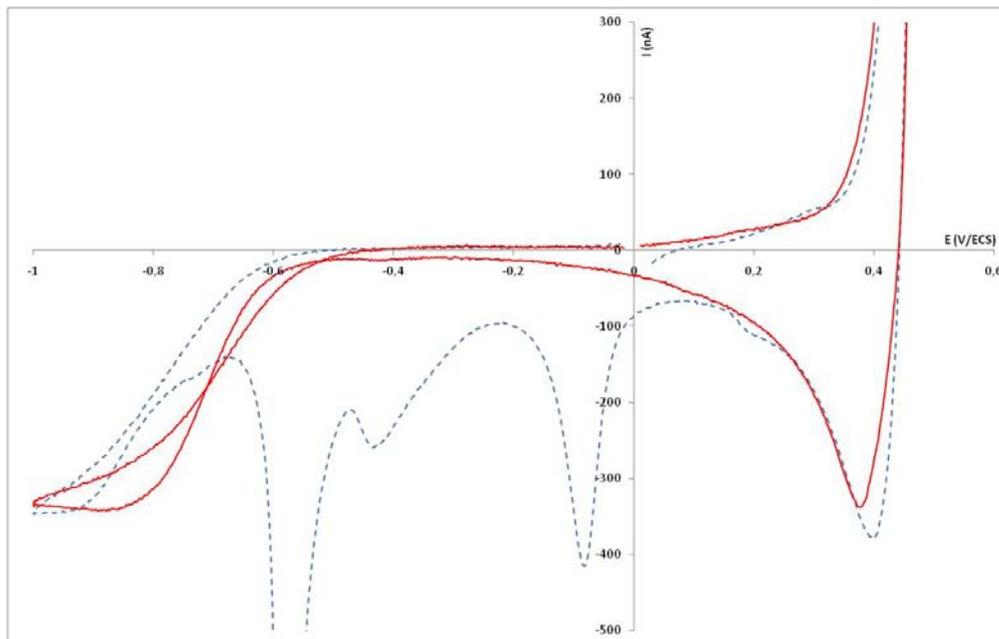


Figure III-15 : Voltammogrammes cycliques réalisés avec une microélectrode d'argent dans une solution acidifiée (pH=2) de nitrate de potassium à 0.1 mol.L^{-1} . Vitesse de balayage= 50 mV.s^{-1} . (---) 1^{er} cycle, (—) 2^{ème} cycle.

3. Isolation SU-8

La qualité de l'isolation est à mettre directement en lien avec la définition de la surface des zones actives : les caractérisations électrochimiques nous renseignent donc sur l'adhésion et sur les propriétés électrochimiques de la SU-8.

a) Détermination de la surface des microélectrodes de travail

La voltammétrie cyclique et l'utilisation d'un système électrochimique connu tel que le couple rédox hexacyanoferrate (III)/(II) permettent également de déterminer la qualité d'une électrode et sa surface. La vitesse de transfert électronique de ce couple est rapide sur l'or et le platine purs massifs. Le voltammogramme renseigne donc très simplement sur l'état de surface de l'électrode. De plus, il est possible, à partir du courant limite I_{lim} obtenu sur le palier de diffusion, de déterminer le rayon r de l'électrode (Chapitre I – équation I-26) :

$$I_{lim} = 4nFDcR$$

Pour le platine film mince, une vitesse de transfert électronique rapide ainsi qu'un palier de diffusion sont clairement observés (Figure III-16). L'intensité de ce palier correspond à un rayon de 25 μm (environ 34 nA pour une solution à 5 mM ; $D[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}] = 7.10^{-6} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$) en accord avec la dimension du masque réalisé.

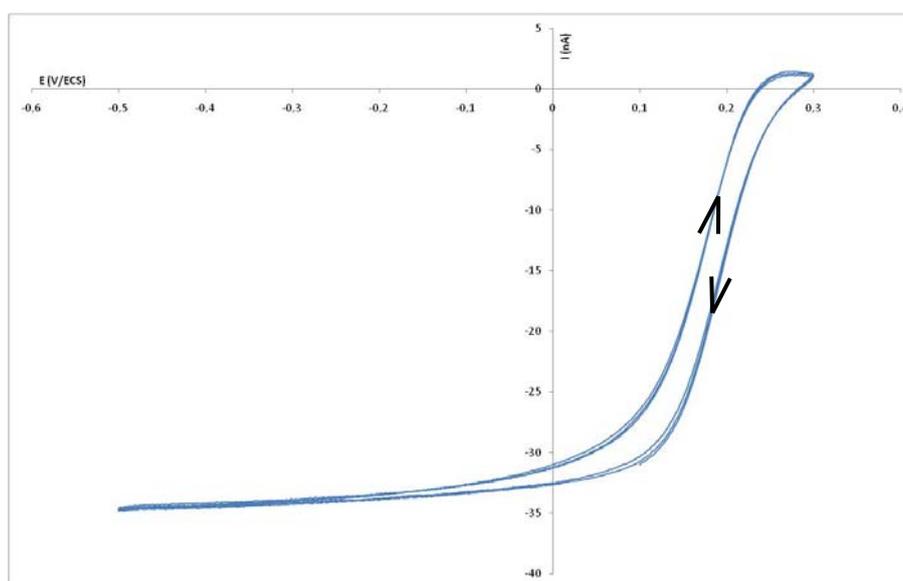


Figure III-16 : Voltammogrammes cycliques réalisés avec une microélectrode de platine fabriquée en salle blanche dans une solution de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ à 5 $\text{mmol}.\text{L}^{-1}$. Vitesse de balayage=50 $\text{mV}.\text{s}^{-1}$.

Pour l'or, les résultats sont plus variables : la vitesse de transfert électronique, facilement observable par la pente qui précède le palier de diffusion, est plus faible sur un certain nombre de microélectrodes en or (Figure III-17). De plus, le palier n'est pas toujours clairement défini et ne se stabilise pas sur la valeur de 34 nA. Les intensités relevées pour les microélectrodes d'or sont souvent bien plus importantes que celles attendues, soit un rayon en moyenne compris entre 40 et 50 μm .

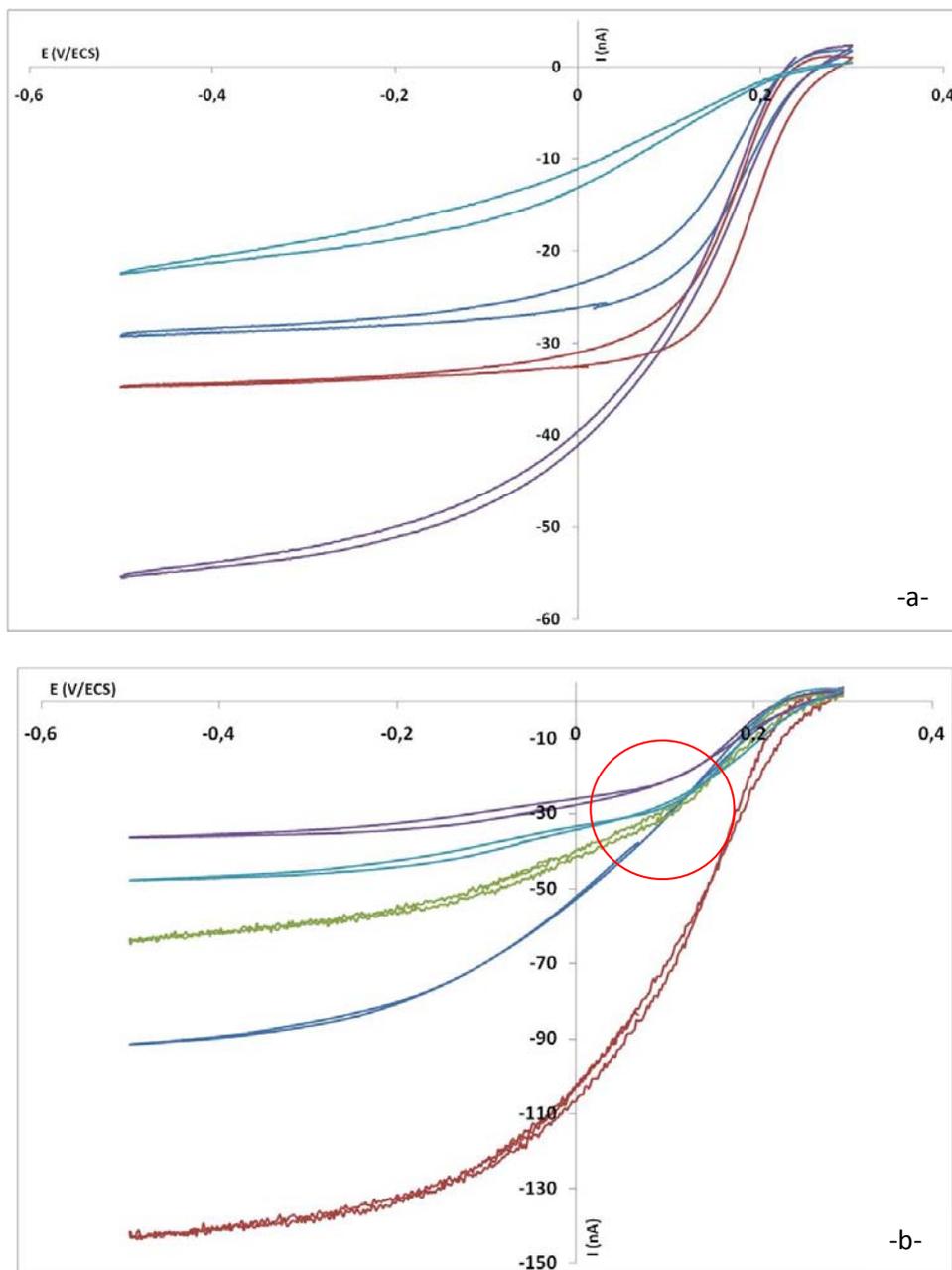


Figure III-17 : Voltammogrammes cycliques réalisés avec quatre microélectrodes de platine (-a-) et cinq microélectrodes d'or (-b-) dans une solution de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ à 5 mmol.L^{-1} . Vitesse de balayage = 50 mV.s^{-1} .

De plus, des voltammogrammes réalisés avec des microélectrodes d'or mettent en évidence des phénomènes rédox qui s'ajoutent à l'unique réduction du ferricyanure (Figure III-17, cercle rouge). Une réduction supplémentaire semble avoir lieu dès $-0,1\text{V/ECS}$, l'intensité augmentant lentement à partir de ce potentiel (Figure III-18). Au cycle retour, l'intensité de réduction est moindre, laissant penser à une diminution de la concentration de l'espèce oxydée ou à une modification de surface.

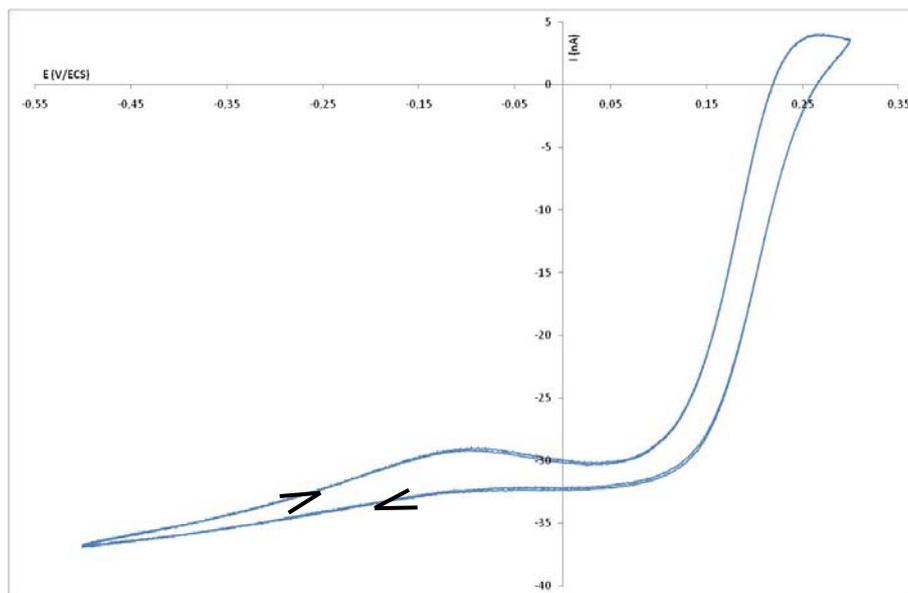


Figure III-18 : Voltammogramme cyclique réalisé avec une microélectrode d'or dans une solution de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ à 5mmol.L^{-1} . Vitesse de balayage= 50mV.s^{-1} . Les flèches indiquent le sens du balayage.

Ces constatations renforcent nos premières interrogations sur les anomalies que présentent les voltammogrammes réalisés avec les microélectrodes d'or dans la solution d'acide sulfurique (voir section 2b). Des défauts structurels de la couche d'isolation peuvent être à l'origine de ces résultats. Un recouvrement non conforme (mauvaise protection des flans des microélectrodes) ou une fissuration du matériau pourrait entraîner des réactions supplémentaires entre le milieu d'étude et les sous-couches des microélectrodes. De plus, les propriétés chimiques et électriques de la SU-8 peuvent être remises en cause : l'isolation diélectrique qu'elle doit conférer au dispositif est peut-être insuffisante, ce qui permet, dans une moindre mesure, aux matériaux électroactifs de réagir avec les solutions étudiées. Une pollution de surface des microélectrodes est également envisageable.

Pour répondre au mieux à l'ensemble des hypothèses posées, différentes modifications ont été apportées à l'étape 11 du processus de fabrication, concernant l'étape de photolithographie de la résine SU-8. Pour pallier d'éventuels défauts structurels et renforcer l'isolation, l'épaisseur de la couche d'isolation est doublée, passant de $1,6\ \mu\text{m}$ à $3\ \mu\text{m}$ environ. De plus ce développement doit s'accompagner d'une étude approfondie de la structuration de la résine SU-8 afin d'éviter toute diffusion d'une espèce résiduelle constituant ce polymère à la surface de l'électrode.

b) Etude détaillée de la résine SU-8

Pour identifier les étapes et les paramètres importants qui peuvent influencer les propriétés mécaniques et chimiques de ce polymère, il est indispensable de connaître son mécanisme de polymérisation.

(1) Polymérisation

Le polymère SU-8 est une résine époxy photosensible. Sa composante époxy lui confère en théorie d'excellentes propriétés d'adhésion sur un grand nombre de substrats et d'isolation électrique ainsi que des résistances mécanique et chimique élevées (Lorenz, 1998 ; Lee et Neville, 1967 ; Shaw *et al.*,

1997). Cependant cette résine est enrichie de composés, responsables de sa forte sensibilité aux rayonnements ultraviolets qui permettent de déclencher et maîtriser sa réticulation. Son principe de polymérisation le définit comme un photorésist « à amplification chimique », composé de trois principaux éléments : le monomère SU-8, un solvant : le cyclopentanone et un photo-générateur d'acide ou photo amorceur (PAG) qui initie la polymérisation sous l'action d'une insolation ultraviolette (Figure III-19). En effet, la réticulation de la résine implique une propagation en cascade de la réaction photochimique induite par l'exposition aux rayonnements ultraviolets : dans un premier temps, la photolyse du composé photosensible, le PAG, entraîne la production d'un acide fort ; dans un second temps, cet acide déclenche la polymérisation de la résine.

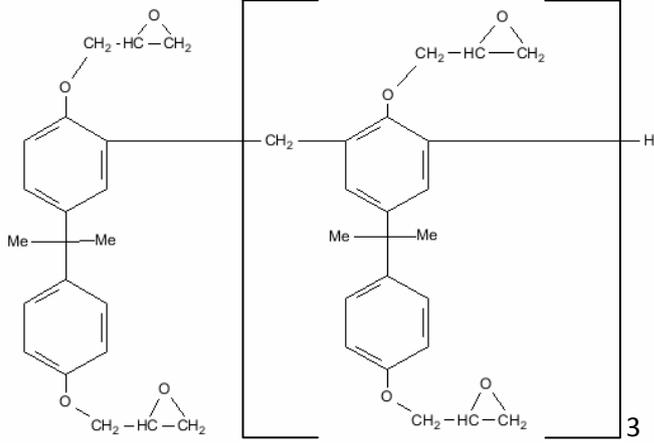
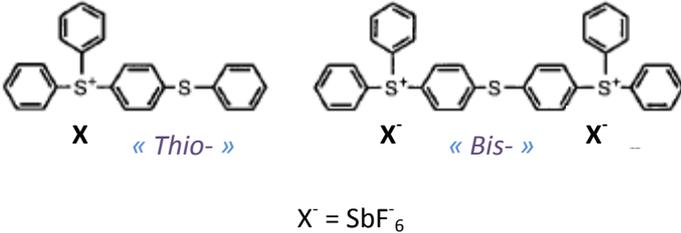
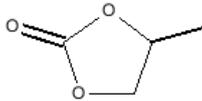
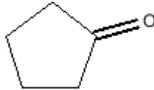
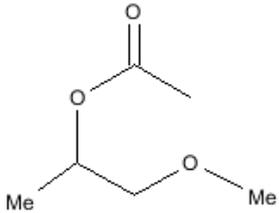
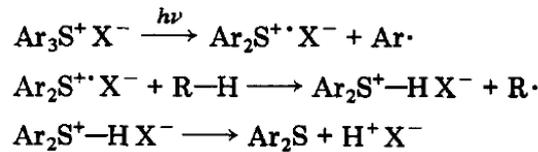
<p>Monomère</p>		
<p>Sel de triarylsulfonium hexafluoroantimoine</p>	 <p style="text-align: center;">$X^- = \text{SbF}_6^-$</p>	
		
<p>Propylène carbonate</p>	<p>Cyclopentanone</p>	<p>Propylène glycol monométhyl éther acétate</p>

Figure III-19 : Structure moléculaire des constituants de la solution commerciale de SU-8 et des solvants nécessaires à sa structuration.

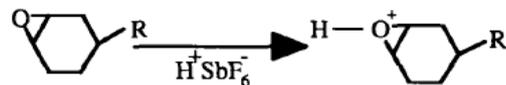
La structuration de cette résine se décompose donc en plusieurs étapes. Après l'enduction de la solution commerciale, un recuit appelé « Soft-Bake » permet d'éliminer partiellement le solvant et de solidifier la résine. Ensuite, le film est exposé aux rayonnements ultraviolets et structuré ainsi par l'utilisation d'un masque photolithographique. Pendant cette étape, le sel de triarylsulfonium et d'hexafluoroantimoniate, $\text{Ar}_3\text{S}^+\text{X}^-$, jouant le rôle de PAG, est décomposé dans les zones insolées et un

acide fort de Bronsted est généré (Pappas, 1985 ; Crivello, 1999). Ce dernier induit une réaction de protolyse sur un cycle époxy du monomère SU-8 et initialise la polymérisation cationique par l'ouverture des groupements époxy (Anhoj *et al.*, 2006 ; Lorenz, 1998). La réticulation a lieu si, dans un environ proche de la chaîne époxy ouverte, un autre groupement époxy est disponible, grâce à des phénomènes de diffusion et au réarrangement au sein même du polymère (Figure III-20). L'étape de recuit permet ensuite d'activer la réticulation, de durcir la résine et de rendre la partie exposée du photorésist insoluble.

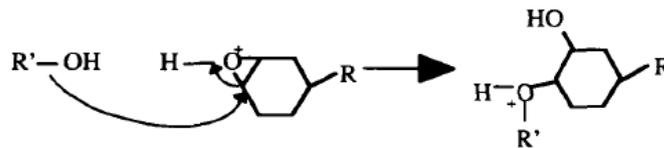
Phase (I) : Photolyse du PAG



Phase (II) : Protolyse



Phase (III) : Ouverture de l'anneau époxy



Phase (IV) : Réticulation

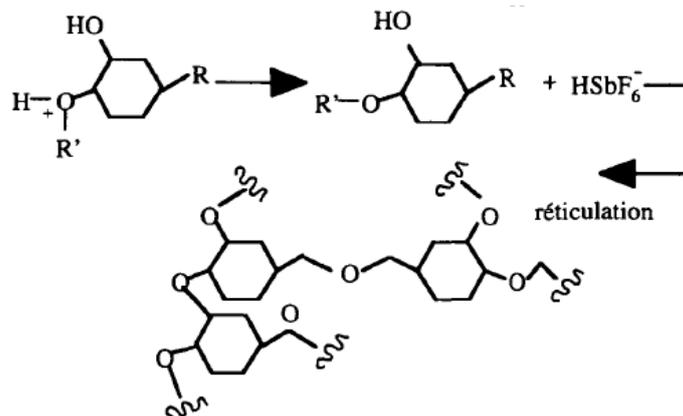


Figure III-20 : Etapes de la polymérisation cationique catalysée par un acide (Pappas, 1985 ; Lorenz, 1998).

(2) Structuration : optimisation

Les cinq étapes de structuration de la SU8 représentent chacune un élément d'optimisation. En effet, de nombreux efforts ont porté sur la compréhension et la contribution de ces étapes sur les propriétés et les caractéristiques du polymère en fin de procédé : les fortes épaisseurs sont largement développées pour des applications telles que la structuration de moules sacrificiels et de

constructions microfluidiques (Zhang *et al.*, 2001 ; Williams et Wang, 2004). Un des principaux problèmes de ces structures, présentant un haut rapport de forme, est la formation de craquelures, liées aux contraintes initiées pendant la procédure de structuration.

Comparé au nombre de publications consacrées aux processus de fabrication de films épais, celui relatif à la réalisation de couches minces SU-8 est très limité. Seuls les travaux de Stephan Keller et son équipe (2008) portent sur l'influence des conditions du pré-recuit, des doses d'insolation et des paramètres de recuit après exposition sur les contraintes, sur la stabilité structurelle et sur la résolution des films de SU8 de 2 μm d'épaisseur. Un des premiers points importants est la quantité de solvant résiduel contenue dans le film pendant l'étape de polymérisation : une faible teneur en solvant réduit la diffusion du photo-acide et limite la mobilité des monomères dans la matrice. La vitesse de polymérisation est d'autant plus grande et la densité des liaisons de réticulation d'autant plus importante que la température du « soft-bake » est basse (Anhoj *et al.*, 2006). Cependant, si le pourcentage de solvant évaporé est trop faible, deux problèmes peuvent apparaître : une mauvaise résolution des motifs et une porosité du film. La perte de résolution est due à la diffusion du photo-acide dans les zones non insolées (Shaw *et al.*, 1997) alors que la porosité est liée directement au solvant. En effet, le solvant non évaporé à l'étape de soft-bake est retenu dans la matrice polymère pendant l'étape de polymérisation mais, lors du post-recuit, il est évaporé, laissant place à des pores. L'insolation et le post-recuit influencent également la stabilité du film. Plus la dose d'insolation est forte, plus la concentration en photo-acide nécessaire à la réticulation est importante. Cependant, une surexposition peut entraîner une perte de résolution des motifs. Le post-recuit agit sur les contraintes du film et notamment sur les contraintes thermiques : la dilatation thermique, affectant différemment le substrat, la SU-8 exposée et la SU-8 non exposée, va créer des tensions au sein de la structure, qui peuvent entraîner également des problèmes de résolution, de fissuration, voire de délamination (Anhoj *et al.*, 2006). Les rampes en température de faibles vitesses permettent de minimiser ces contraintes.

La photolithographie de l'isolation (étape 11) a donc été redéfinie en prenant en compte ces études et ces observations. Pour répondre à l'hypothèse de mauvais recouvrement des flans des dépôts métalliques, la résine SU-8 a été redéveloppée pour obtenir une épaisseur de 3 μm . De plus, afin d'améliorer la stabilité structurelle de la résine et éviter tout craquèlement, le développement du processus de structuration s'est orienté vers l'augmentation de la densité des liaisons de polymérisation : la résine est ré-insolée après l'étape de développement, afin de générer la plus grande concentration de photo-acide et favoriser ainsi une réticulation maximum. Le post-recuit est effectué sur plaque chauffante selon un cycle thermique où les montées et descentes en température sont maîtrisées, ceci afin :

- d'engendrer un minimum de contraintes pendant l'évaporation du solvant,
- de permettre un réarrangement de la structure au fur et à mesure de l'évacuation du solvant. Ceci évite toute création de microcavités qui pourraient être à l'origine également d'un contact entre les sous-couches d'accroche du matériau d'électrode et le milieu d'étude.

Les plaquettes issues de ce développement ont été découpées et assemblées. La qualité des matériaux d'électrodes a de nouveau été testée dans des solutions modèles, ceci permettant également d'évaluer les propriétés de la résine SU-8 redéveloppée.

c) *Caractérisation électrochimique des électrodes : SU-8 3 μ m*

(1) Microélectrode de platine

Le voltammogramme cyclique réalisé avec une microélectrode de platine, définie par une couche de passivation SU-8 de 3 μ m d'épaisseur, dans une solution désaérée et non agitée d'acide sulfurique est présenté Figure III-21.

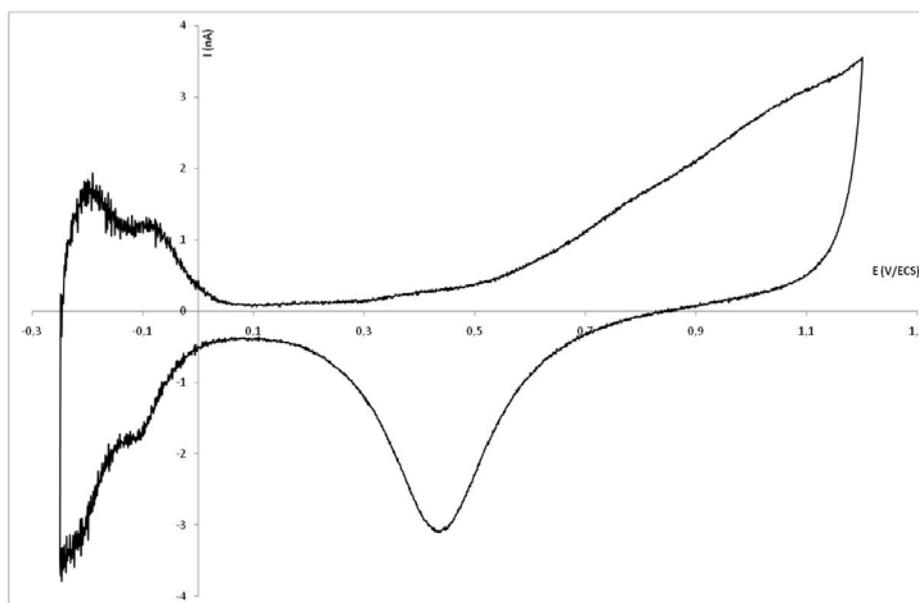


Figure III-21 : Voltammogramme cyclique réalisé avec une microélectrode de platine dans une solution d'acide sulfurique à 0,5 mol.L⁻¹. Vitesse de balayage = 50 mV.s⁻¹.

La forme de ce voltammogramme est quasiment identique pour toutes les microélectrodes étudiées et correspond à ce qui peut être obtenu typiquement avec du platine massif. La réduction du proton et l'oxydation de l'hydrogène sont clairement visibles : les pics sont observables entre -0,25 et 0 V/ECS ; l'oxydation du matériau commence vers 0,6 V/ECS et le pic correspondant à la réduction des oxydes atteint son maximum d'intensité à environ 0,45 V/ECS.

(2) Microélectrode d'or

La réponse ampérométrique d'une microélectrode d'or isolée par un film SU-8 de 3 μ m d'épaisseur, soumise à un balayage de potentiel dans une solution d'acide sulfurique à 0,5 mol.L⁻¹ est tout à fait comparable au voltammogramme cyclique d'une électrode de fabrication manuelle (Figure III-22). La formation des oxydes d'or démarre à 1 V/ECS environ et ces oxydes se réduisent au balayage retour à partir de 1 V/ECS.

Contrairement à la première série de prototypes isolés avec une couche de SU-8 non optimisée, l'allure des voltammogrammes est identique d'une microélectrode à une autre. Seuls l'oxydation et la réduction de l'or sont observables. Ceci valide les choix qui ont été faits pour améliorer la qualité de la passivation.

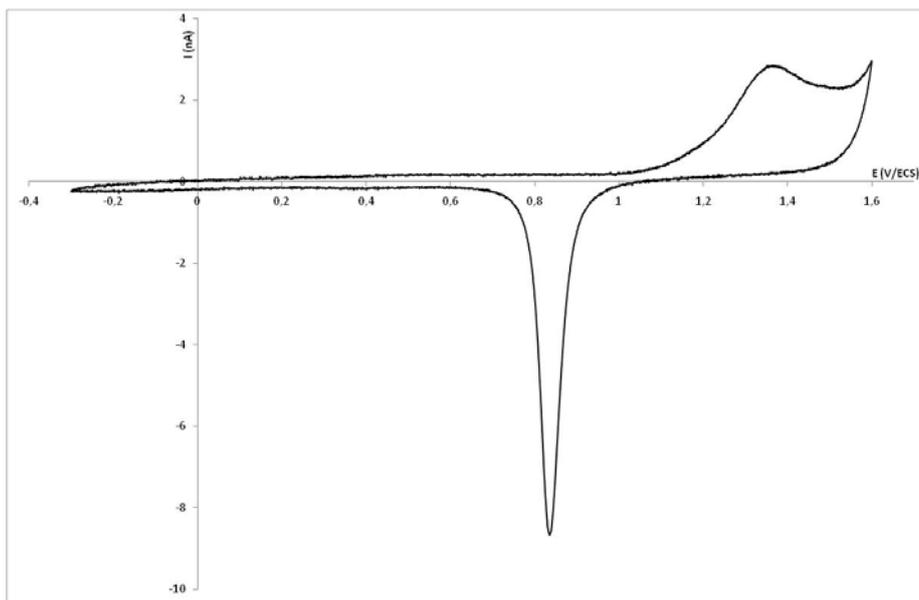


Figure III-22 : Voltammogramme cyclique réalisé avec une microélectrode d'or dans une solution d'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Vitesse de balayage = 50 mV.s^{-1} .

(3) Qualité de la passivation : détermination de la surface active des microélectrodes

Les voltammogrammes cycliques présentés Figure III-23 ont été réalisés dans une solution d'hexacyanoferrate III avec des microélectrodes d'or issues du nouveau processus de fabrication (isolation SU-8 de $3\mu\text{m}$ d'épaisseur).

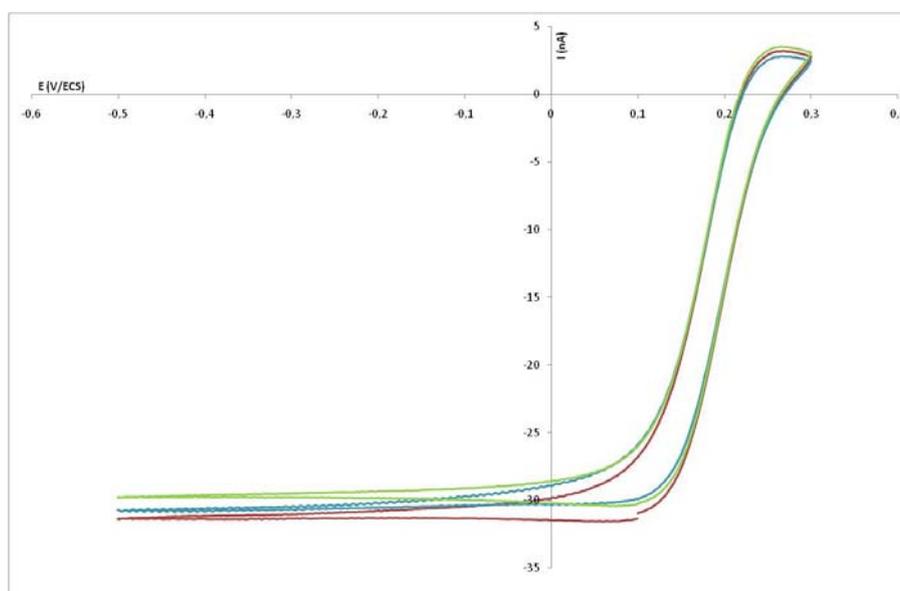


Figure III-23 : Voltammogrammes cycliques obtenus avec trois microélectrodes d'or de fabrication collective, dans une solution désaérée et non agitée d'hexacyanoferrate III de potassium à 5 mmol.L^{-1} . Vitesse de balayage = 50 mV.s^{-1} .

Ils présentent clairement la réponse sigmoïdale typique de la réduction de Fe(CN)_6^{3-} , témoin de l'état stationnaire sur une microélectrode d'or. Ces observations sont également vraies pour les microélectrodes de platine.

A l'aide du courant limite mesuré sur le palier de diffusion (d'environ 30nA), il est possible d'évaluer le rayon des microélectrodes (cf. équation I-26). Ce dernier a été estimé à $23 \mu\text{m} \pm 1 \mu\text{m}$. Cette valeur est cohérente avec le rayon théorique des motifs disques du masque photolithographique utilisé pour l'étape 11 de structuration de la SU-8 ($25 \mu\text{m}$) et tenant compte de la résolution des équipements d'alignement utilisés en salle blanche.

Les microélectrodes fabriquées par les technologies silicium et polymères répondent en tous points aux exigences définies par leur utilisation : les propriétés électrochimiques des matériaux couches minces sont comparables à celles des matériaux massifs et la définition des zones actives est satisfaisante pour obtenir les caractéristiques recherchées des microélectrodes.

4. Electrode de référence Ag/AgCl

A ce stade de l'étude, l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire sont fonctionnelles. Cependant, pour obtenir une cellule électrochimique totalement autonome, c'est à dire qui intègre les trois électrodes miniaturisées, l'argent doit être oxydé en chlorure d'argent pour finaliser l'électrode de référence.

Dans un premier temps, l'état de surface de l'électrode d'argent nu a été évalué par voltammétrie cyclique dans une solution acidifiée de nitrate de potassium à $0,1\text{mol.L}^{-1}$. Le voltammogramme (Figure III-24) présente clairement les mêmes phénomènes électrochimiques observés à la Figure III-15.

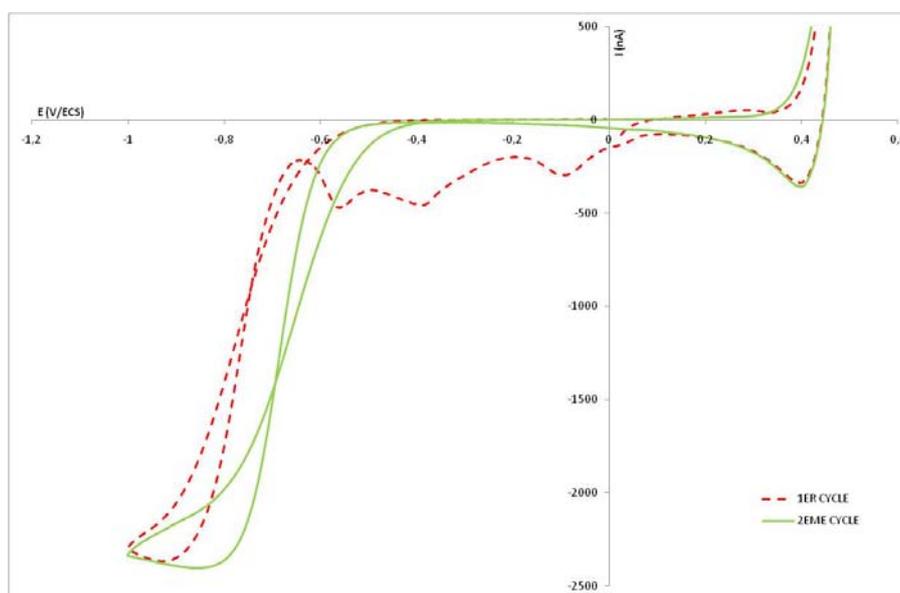


Figure III-24 : Voltammogramme cyclique d'une électrode d'argent au contact d'une solution désaérée et non-agitée de nitrate de potassium à $0,1\text{mol.L}^{-1}$. Vitesse de balayage= 50mV.s^{-1} .

L'argent est ensuite oxydé en chlorure d'argent par voltammétrie linéaire avec un balayage de potentiel de 1 mV.s^{-1} entre $0,1\text{V}$ et $0,25\text{V/ECS}$, dans une solution de chlorure de potassium à 10^{-2}mol.L^{-1} . Au cours de ce balayage, un dépôt de chlorure d'argent est formé à la surface de l'électrode.

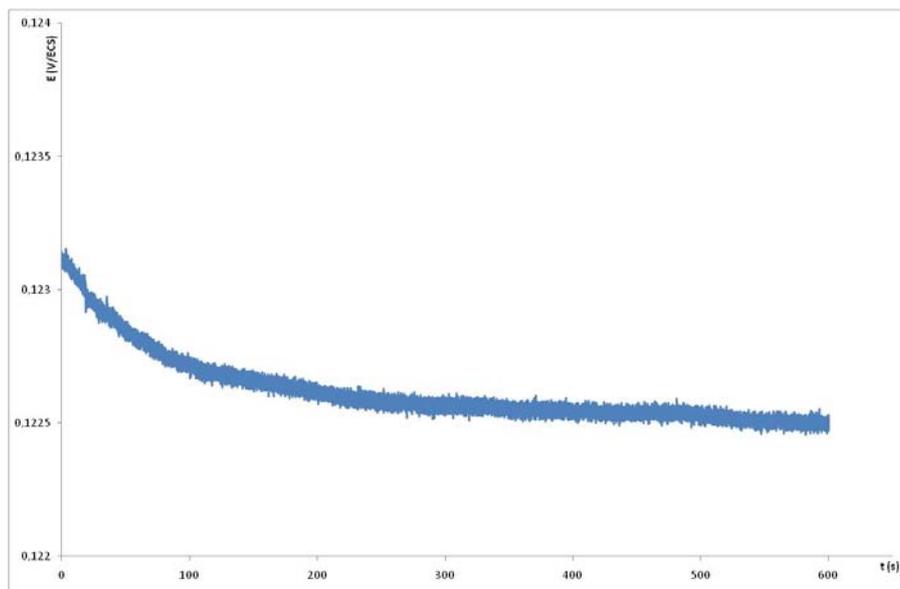


Figure III-25 : Variation au cours du temps du potentiel à courant nul d'une microélectrode d'argent recouverte de chlorure d'argent dans une solution de chlorure de potassium à 10^{-2} mol.L $^{-1}$.

Pour évaluer les performances de l'électrode de référence ainsi préparée, le potentiel de l'électrode est mesuré par rapport à une électrode commerciale au calomel saturée, pendant une dizaine de minutes (les temps d'analyse sur la peau n'excédant pas cette durée) dans une solution de KCl à 10^{-2} mol.L $^{-1}$ (Figure III-25). Après une légère décroissance, inférieure à 0,5 mV, pendant les premiers points d'enregistrement, le potentiel reste relativement stable, égal à 123 ± 1 mV/ECS avec une dérive évaluée à environ $1\mu\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$. Cette valeur du potentiel est supérieure à celle calculée avec la loi de Nernst (98mV/ECS). Cette différence de potentiel est souvent observée dans la bibliographie et peut être lié à des défauts dans la couche de chlorure d'argent formé et à l'activité des espèces (Shinwari *et al.*, 2010 ; Polk et al., 2006). De même, la stabilité de cette électrode est comparable à celle des électrodes de quasi-référence présentées dans la bibliographie (Shinwari *et al.*, 2010).

Conclusion

L'électrode de travail, l'électrode auxiliaire et l'électrode de référence, qui constituent à elles trois la base d'une cellule électrochimique, ont été intégrées et miniaturisées par les technologies Silicium et Polymères (Figure III-26).

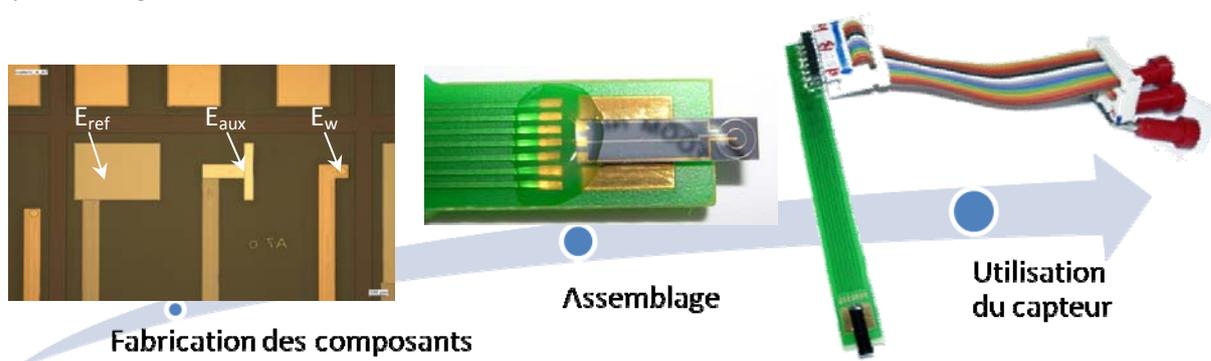


Figure III-26 : Cycle de vie du composant : de sa fabrication à sa caractérisation.

Les propriétés électrochimiques attendues des différentes couches métalliques ont pu être obtenues grâce à l'optimisation de la procédure de passivation en résine SU-8. Les surfaces des zones actives ont été clairement définies et les dimensions respectées. L'utilisation d'un tel dispositif permet donc de profiter des avantages des microélectrodes et de maîtriser l'agencement et la géométrie de la cellule électrochimique à l'échelle du micromètre. De plus, la robustesse et la reproductibilité des composants font de ces technologies une méthode de choix pour la fabrication des dispositifs électrochimiques.

Bibliographie

- Abgrall P., Conédéra V., Camon H., Gue A.M. et Nguyen N. (2007). SU-8 as a structural material for labs-on-chips and microelectromechanical systems. *Electrophoresis*, 28, 4539-4551.
- Aguiar F.A., Gallant A.J., Rosamond M.C., Rhodes A., Wood D. et Katakly R. (2007). Conical recessed gold microelectrode arrays produced during photolithographic methods: Characterisation and causes. *Electrochem. Commun.*, 9, 879-885.
- Aldaz A., Clavilier J. et Feliu J. (1994). Effet de la structure cristalline sur les propriétés d'adsorption des électrodes de platine. *J. Phys. IV*, 4, C1 75 - C1 93.
- Amatore C., Oleinick A.I. et Svir I. (2006a). Construction of optimal quasi-conformal mappings for the 2D-numerical simulation of diffusion at microelectrodes. Part 1: Principle of the method and its application to the inlaid disk microelectrode. *J. Electroanal. Chem.*, 597, 69-76.
- Amatore C., Oleinick A.I. et Svir I. (2006b). Construction of optimal quasi-conformal mappings for the 2D numerical simulation of diffusion at microelectrodes. Part 2. Application to recessed or protruding electrodes and their arrays. *J. Electroanal. Chem.*, 597, 77-85.
- Angerstein-Kozłowska H., Conway B.E. et Sharp W.B.A. (1973). The real condition of electrochemically oxidized platinum surfaces: Part I. Resolution of component processes. *J. Electroanal. Chem.*, 43, 9-36.
- Angerstein-Kozłowska, H., Conway, B.E., Barnett B. et Mozota J. (1979). The role of ion adsorption in surface oxide formation and reduction at noble metals: general features of the surface process. *J. Electroanal. Chem.*, 100, 417-446.
- Anhoj T., Jorgensen A.M., Zauner D.A. et Hübner J. (2006). The effect of soft bake temperature on the polymerization of SU-8 photoresist. *J. Micromech. Microeng.*, 16, 1819-1824.
- Barber J., Morin S. et Conway B.E. (1998). Specificity of the kinetics of H₂ evolution to the structure of single-crystal Pt surfaces, and the relation between opd and upd H. *J. Electroanal. Chem.*, 446, 125-138.
- Bard A. et Faulkner L. (2001). *Electrochemical methods : fundamentals and applications*, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Berduque A., Lanyon Y.H., Beni V., Herzog G., Watson Y.E., Rodgers K., Stam F., Alderman J., Arrigan D.W.M. (2007). Voltammetric characterisation of silicon-based microelectrode arrays and their application to mercury-free stripping voltammetry of copper ions. *Talanta*, 71, 1022-1030.
- Bhagat S., Han H. et Alford T.L. (2006). Tungsten-titanium diffusion barriers for silver metallization. *Thin Solid Films*, 515, 1998-2002.
- Bond A.M., Luscombe D., Oldham K.B. et Zoski C.G. (1988). A comparison of the chronoamperometric response at inlaid and recessed disc microelectrodes. *J. Electroanal. Chem.*, 249, 1-14.
- Bullett T.R. et Prosser J.L. (1972). The measurement of adhesion. *Prog. Org. Coat.*, 1, 45-71.
- Burke L.D. et Nugent P. (1997). The electrochemistry of gold: I the redox behaviour of the metal in aqueous media. *Gold Bull.*, 30, 43-53.
- Chen Z., Fang C., Wang H., He J. et Deng Z. (2008). A novel disposable amperometric UA strip. *Sens. Actuators, B*, 129, 710-715.

- Cheung K.C., Renaud P., Tanila H. et Djupsund K. (2007). Flexible polyimide microelectrode array for in vivo recordings and current source density analysis. *Biosens. Bioelectron.*, 22, 1783-1790.
- Choi K., Ghosh S., Lim J. et Lee C.M. (2003). Removal efficiency of organic contaminants on Si wafer by dry cleaning using UV/O₃ and ECR plasma. *Appl. Surf. Sci.*, 206, 355-364.
- Conway B.E. (1995). Electrochemical oxide film formation at noble metals as a surface-chemical process. *Prog. Surf. Sci.*, 49, 331-452.
- Conway B.E. et Jerkiewicz G. (1992). Surface orientation dependence of oxide film growth at platinum single crystals. *J. Electroanal. Chem.*, 339, 123-146.
- Conway B.E. et Tilak B.V. (2002). Interfacial processes involving electrocatalytic evolution and oxidation of H₂, and the role of chemisorbed H. *Electrochim. Acta*, 47, 3571-3594.
- Crivello J.V. (1999). UV and electron beam-induced cationic polymerization. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., B*, 151, 8-21.
- Cugnet C., Zaouak O., René A., Pécheyran C., Potin-Gautier M. et Authier L. (2009). A novel microelectrode array combining screen-printing and femtosecond laser ablation technologies: Development, characterization and application to cadmium detection. *Sens. Actuators, B*, 143, 158-163.
- Dauskardt R.H., Lane M., Ma Q. et Krishna N. (1998). Adhesion and debonding of multi-layer thin film structures. *Eng. Fract. Mech.*, 61, 141-162.
- Davies T.J. et Compton R.G. (2005). The cyclic and linear sweep voltammetry of regular and random arrays of microdisc electrodes : Theory. *J. Electroanal. Chem.*, 585, 63-82.
- Davies T.J., Ward-Jones S., Banks C.E., Del Campo J., Mas R., Munoz F.X. et Compton R.G. (2005). The cyclic and linear sweep voltammetry of regular arrays of microdisc electrodes : Fitting of experimental data. *J. Electroanal. Chem.*, 585, 51-62.
- Desmond D., Lane B., Alderman J., Glennon J.D., Diamond D. et Arrigan D.W.M. (1997). Evaluation of miniaturised solid state reference electrodes on a silicon based component. *Sens. Actuators, B*, 44, 389-396.
- Falconnet D., Csucs G., Grandin H.M. et Textor M. (2006). Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials*, 27, 3044-3063.
- Feeney R. et Kounaves S. (2000). Microfabrication ultramicroelectrode arrays: developments, advances, and applications in environmental analysis. *Electroanalysis*, 12, 677-684.
- Ferrigno R., Brevet P.F. et Girault H.H. (1997). Finite element simulation of the chronoamperometric response of recessed and protruding microdisc electrodes. *Electrochim. Acta*, 42, 1895-1903.
- Fiaccabrino G.C. et Koudelka-Hep M. (1998). Thin-film microfabrication of electrochemical transducers. *Electroanalysis*, 10, 217-222.
- Gardner R.D., Zhou A. et Zufelt N.A. (2009). Development of a microelectrode array sensing platform for combination electrochemical and spectrochemical aqueous ion testing. *Sens. Actuators, B*, 136, 177-185.
- Geddes L.A. et Roeder R. (2003). Criteria for the selection of materials for implanted electrodes. *Ann. Biomed. Eng.*, 31, 879-890.
- Guo J. et Lindner E. (2009). Cyclic voltammetry at shallow recessed microdisc electrode: theoretical and experimental study. *J. Electroanal. Chem.*, 629, 180-184.
- Guth U., Gerlach F., Decker M., Oelßner W. et Vonau W. (2009). Solid-state reference electrodes for potentiometric sensors. *J. Solid State Electrochem.*, 13, 27-39.

- Huang I.Y. et Huang R.S. (2002). Fabrication and characterization of a new planar solid-state reference electrode for ISFET sensors. *Thin Solid Films*, 406, 255-261.
- Ito H. (2005). Chemical amplification resists for microlithography. *Adv. Polym. Sci.*, 172, 37-245.
- Jackson K.A. et Schröter W. (2000). *Handbook of semiconductor technology, Vol. 2*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Kanamori S. (1981). A study on the penetration of platinum into silicon in Ti/Pt/Au beam lead metallizations systems. *Thin Solid Films*, 75, 19-27.
- Keller S., Blagoi G., Lillemose M., Haefliger D. et Boisen A. (2008). Processing of thin SU-8 films. *J. Micromech. Microeng.*, 18, 1-10.
- Kotzar G., Freas M., Abel P., Fleischman A., Roy S., Zorman C., Moran L.M. et Melzak J. (2002). Evaluation of MEMS materials of construction for implantable medical devices. *Biomaterials*, 23, 2737-2750.
- Kriese M.D., Moody R.N. et Gerberich W.W. (1998). Effects of annealing and interlayers on the adhesion energy of copper thin films to SiO₂/Si substrats. *Acta Mater.*, 46, 6623-6630.
- Kristensen B., Noraberg J., Thiébaud P., Koudelka-Hep M. et Zimmer J. (2001). Biocompatibility of silicon-based arrays of electrodes coupled to organotypic hippocampal brain slice cultures. *Brain Res.*, 896, 1-17.
- Lakard B., Jeannot J.C., Spajer M., Herrlem G., De Labachellerie M., Blind P. et Fahys B. (2005). Fabrication of a miniaturized cell using microsystem technologies for electrochemical applications. *Electrochimi. Acta*, 50, 1863-1869.
- Laschi S. et Mascini M. (2006). Planar electrochemical sensors for biomedical applications. *Med. Eng. Phy.*, 28, 934-943.
- Lee C.Y. et Wu G.W. et Hsieh W.J. (2008). Fabrication of micro sensors on a flexible substrate. *Sens Actuators, A*, 147, 173-176.
- Lee H.J., Beriet C., Ferrigno R. et Girault H.H. (2001). Cyclic voltammetry at a regular microdisc electrode array. *J. Electroanal. Chem.*, 502, 138-145.
- Lee H. et Neville K. (1967). *Handbook of epoxy resins*. New York: McGraw-Hill.
- Li H., Guo Z., Wang H., Cui D. et Cai X. (2006). An amperometric bienzyme biosensor for rapid measurement of alanine aminotransferase in whole blood. *Sens. Actuators, B*, 119, 419-424.
- Lide D. (2000). *Handbook of Chemistry and Physics - 74th ed*. Boca Raton: CRC Press, Inc.
- Lorenz H. (1998). Nouvelles Technologies de microstructuration de type UV-LIGA et fabrication de composants micromécaniques. Thèse de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne.
- Lowinsohn D., Peres H.E.M., Kosminsky L., Paixão T.R.L.C., Ferreira T.L., Ramirez-Fernandez F.J. et Bertolli M. (2006). Design and fabrication of a microelectrode array for iodate quantification in small sample volumes. *Sens. Actuators, B*, 113, 80-87.
- Martinez W.E., Gregori G. et Mates T. (2010). Titanium diffusion in gold thin films. *Thin Solid Films*, 518, 2585-2591.
- Matsumoto T., Ohashi A. et Ito N. (2002). Development of a micro-planar Ag/AgCl quasi-reference electrode with long-term stability for an amperometric glucose sensor. *Anal. Chim. Acta*, 462, 253-259.
- Matsumoto T., Saito S. et Ikeda S. (2006). A multilayer membrane amperometric glucose sensor fabricated using planar techniques for large-scale production. *J. Biotechnol.*, 122, 267-273.

- Mercanzini A., Cheung K., Buhl D.L., Boers M., Maillard A., Colin P., Bensadoun J.C., Bertsch A. et Renaud P. (2008). Demonstration of cortical recording using novel flexible polymer neural probes. *Sens. Actuators, A*, 143, 90-96.
- Migdalski J., Bas B., Blaz T., Golimowski J. et Lewenstam A. (2009). A miniaturized and integrated galvanic cell for the potentiometric measurement of ions in biological liquids. *J. Solid State Electrochem.*, 13, 149-155.
- Miyashita M., Ito N., Ikeda S., Murayama T., Oguma K. et Kimura J. (2009). Development of urine glucose meter based on micro-planer amperometric biosensor and its clinical application for self-monitoring of urine glucose. *Biosens. Bioelectron.*, 24, 1336-1340.
- Möller H. et Pistorius P.C. (2004). The electrochemistry of gold–platinum alloys. *J. Electroanal. Chem.*, 570, 243-255.
- Morimoto K., Upadhyay S., Higashiyama T., Ohgami N., Kusakabe H., Fukuda J. et Suzuki H. (2007). Electrochemical microsystem with porous matrix packed-beds for enzyme analysis. *Sens. Actuators, B*, 124, 477-485.
- Morita M., Longmire M. et Murray R. (1988). Solid-state voltammetry in a three electrode electrochemical cell-on-a-chip with a microlithographically defined microelectrode. *Anal. Chem.*, 60, 2770-2775.
- Myllymaa S., Myllymaa K., Korhonen H., Töyräs J., Jääskeläinen J., Djupsund K., Tanila H. et Lappalainen R. (2009). Fabrication and testing of polyimide-based microelectrode arrays for cortical mapping of evoked potentials. *Biosens. Bioelectron.*, 24, 3067-3072.
- Nicol M.J. (1980). The anodic behaviour of gold. *Gold Bull.*, 13, 46-55.
- Nicolet A. (1978). Diffusion barriers in thin films. *Thin Solid Films*, 52, 415-443.
- Orozco J., Suárez G., Fernández-Sánchez C., McNeil C. et Jiménez-Jorquera C. (2007). Characterization of microelectrode arrays combining electrochemical techniques and optical microscopy imaging. *Electrochim. Acta*, 53, 729-736.
- Pappas S.P. (1985). Photoinitiation of cationic and concurrent radical-cationic polymerization. Part V. *Prog. Org. Coat.*, 13, 35-64.
- Parker C.O., Lanyon Y.H., Manning M., Arrigan D.W.M. et Tothill I.E. (2009). Electrochemical immuno-chip sensor for aflatoxin M1 detection. *Anal. Chem.*, 81, 5291-5298.
- Petrović Ž., Metikoš-Huković M., Babić R., Katić J. et Milun M. (2009). A multi-technique study of gold oxidation and semiconducting properties of the compact α -oxide layer. *J. Electroanal. Chem.*, 629, 43-49.
- Polk B.J., Stelzenmuller A., Mijares G., MacCrehan W. et Gaitan M. (2006). Ag/AgCl microelectrodes with improved stability for microfluidics. *Sens. Actuators, B*, 114, 239-247.
- Popovtzer R., Neufeld T., Popovtzer A., Rivkin I., Margalit R., Engel D., Nudelman A., Rephaeli A., Rishpon J. et Shacham-Diamand Y. (2008). Electrochemical lab on a chip for high-throughput analysis of anticancer drugs efficiency. *Nanomedicine: NBM*, 4, 121-126.
- Popovtzer R., Neufeld T., Ron E., Rishpon J. et Shacham-Diamand Y. (2006). Electrochemical detection of biological reactions using a novel nano-bio-chip array. *Sens. Actuators, B*, 119, 664-672.
- Pourbaix M. (1963). *Atlas d'équilibres électrochimiques*. Paris: Gauthier-Villars & Cie.
- Rand D. et Woods R. (1972). A study of the dissolution of platinum, palladium, rhodium and gold electrodes in 1M sulphuric acid by cyclic voltammetry. *J. Electroanal. Chem.*, 35, 209-218.
- Ripka P. et Tipek A. (2007). *Modern sensors handbook* (Chap. 11: New technologies and Materials). London: ISTE.

- Ruffien-Ciszak A. (2005). Potentialités des microélectrodes pour une évaluation directe et non invasive des propriétés antioxydantes du *stratum corneum*. Thèse de l'Université Paul Sabatier - Toulouse III.
- Ruzyllo J. et Novak R. (1998). *Cleaning technology in semiconductor device manufacturing V*. Pennington: The Electrochemical Society, Inc.
- Schwake A., Ross B. et Cammann K. (1998). Chrono amperometric determination of hydrogen peroxide in swimming pool water using an ultramicroelectrode array. *Sens. Actuators, B*, *46*, 242-248.
- Shaw J.M., Gelorme J.D., Labianca N.C., Conley W.E. et Holmes S.J. (1997). Negative photoresists for optical lithography. *IBM J. Res. Dev.*, *41*, 81-94.
- Shinwari M.W., Zhitomirsky D., Deen I.A., Selvaganapathy P.R., Deen M. J. et Landheer D. (2010). Microfabricated reference electrodes and their biosensing applications. *Sensors*, *10*, 1679-1715.
- Shugg W.T. (1995). *Handbook of electrical and electronic insulating materials, 2nd Ed*. New York: IEEE, Inc.
- Simonis A., Lüth H., Wang J. et Schöning M.J. (2004). New concepts of miniaturised reference electrodes in silicon technology for potentiometric sensor systems. *Sens. Actuators, B*, *103*, 429-435.
- Spegel C., Heiskanen A., Skjolding L.H.D. et Emnéus J. (2008). Chip based electroanalytical systems for cell analysis. *Electroanalysis*, *20*, 680-702.
- Stieglitz T. (2001). Flexible biomedical microdevices with double-sided electrode arrangements for neural applications. *Sens. Actuators, A*, *90*, 203-211.
- Strong T.D., Cantor H.C. et Brown R.B. (2001). A microelectrode array for real-time neurochemical and neuroelectrical recording in vitro. *Sens. Actuators, A*, *91*, 357-362.
- Sutter E.M.M. et Goetz-Grandmont G.J. (1990). The behaviour of titanium in nitric-hydrofluoric acid solutions. *Corros. Sci.*, *30*, 461-476.
- Suzuki H. (2000). Advances in the microfabrication of electrochemical sensors and systems. *Electroanalysis*, *12*, 703-715.
- Suzuki H. et Shiroishi H. (1999). Microfabricated liquid junction Ag/AgCl reference electrode and its application to a one-chip potentiometric sensor. *Anal. Chem.*, *71*, 5069-5075.
- Suzuki H. et Taura T. (2001). Thin-film Ag/AgCl structure and operational modes to realize long-term storage. *J. Electrochem. Soc.*, *148*, E468-E474.
- Suzuki H., Hiratsuka A., Sasaki S. et Karube I. (1998). Problems associated with the thin-film Ag/AgCl reference electrode and a novel structure with improved durability. *Sens. Actuators, B*, *46*, 104-113.
- Thibault C., Le Berre V., Casimirius S., Trevisiol E., François J. et Vieu C. (2005). Direct microcontact printing of oligonucleotides for biochip applications. *J. Nanobiotechnol.*, *3*, 7-19.
- Tijero M., Gabriel G., Caro J., Altuna A., Hernández R., Villa R., Berganzo J., Blanco F.J., Salido R. et Fernández L.J. (2009). SU-8 microprobe with microelectrodes for monitoring electrical impedance in living tissues. *Biosens. Bioelectron.*, *24*, 2410-2416.
- Tilak B.V., Conway B.E. et Angerstein-Kozłowska H. (1973). The real condition of oxidized Pt electrodes. Part III : Kinetic theory of formation and reduction of surfaces oxides. *J. Electroanal. Chem.*, *48*, 1-23.
- Triroj N., Lapierre-Devlin M.A., Kelley S.O. et Beresford R. (2006). Microfluidic three-electrode cell array for low-current electrochemical detection. *IEEE Sens. J.*, *6*, 1395-1402.

- Tudorache M. et Bala C. (2007). Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis. *Anal. Bioanal. Chem.*, 388, 565-578.
- Voskerician G., Shive M.S., Shawgo R.S., Von Recum H., Anderson J.M., Cima M.J. et Langer R. (2003). Biocompatibility and biofouling of MEMS drug delivery devices. *Biomaterials*, 24, 1959-1967.
- Waterhouse G.I.N., Bowmaker G.A. et Metson J.B. (2001). Oxidation of a polycrystalline silver foil by reaction with ozone. *Appl. Surf. Sci.*, 183, 191-204.
- Williams J.D. et Wang W. (2004). Study on the postbaking process and the effects on UV lithography of high aspect ratio SU-8 microstructures. *J. Microlithogr. Microfabr. Microsyst.*, 3, 563-568.
- Williams K.R. et Muller R.S. (1996). Etch Rates for Micromachining Processing. *J. Microelectromech. Syst.*, 5, 256-269.
- Williams K.R., Gupta K. et Wasilik M. (2003). Etch rates for micromachining processing - Part II. *J. Microelectromech. Syst.*, 12, 761-777.
- Xie X., Stüben D., Berner Z., Albers J., Hintsche R. et Jantzen E. (2004). Development of an ultramicroelectrode arrays (UMEAs) sensor for trace heavy metal measurement in water. *Sens. Actuators, B*, 97, 168-173.
- Xu X., Zhang S., Chen H. et Kong J. (2009). Integration of electrochemistry in micro-total analysis systems for biochemical assays: Recent developments. *Talanta*, 80, 8-18.
- Zhang J., Tan K.L., Hong G.C., Yang L.J. et Gong H.Q. (2001). Polymerization optimization of SU-8 photoresist and its applications in microfluidic systems and MEMS. *J. Micromech. Microeng.*, 11, 20-26.
- Zhang S., Wright, G. et Yang Y. (2000). Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosens. Bioelectron.*, 15, 273-282.

Chapitre III

Application du dispositif
électrochimique pour une
analyse de l'état rédox en
surface de la peau

Chapitre III : Application du dispositif électrochimique pour une analyse de l'état rédox en surface de la peau

Les caractérisations électrochimiques des matériaux intégrés couches minces dans des solutions modèles, présentées au chapitre II, montrent que leur comportement est comparable à celui des matériaux massifs. Dans ce chapitre, leurs performances analytiques sont évaluées dans des solutions contenant des antioxydants, comme l'acide ascorbique et l'acide urique, et les résultats comparés à ceux obtenus avec un montage classique comprenant une microélectrode de fabrication manuelle. Les microdispositifs ont été également confrontés à la surface de la peau. Dans la seconde partie de ce chapitre, les potentialités du microsystème pour l'exploration du milieu cutané sont discutées.

I. Détection des antioxydants en solution modèle

Les antioxydants ont jusqu'à présent été détectés et quantifiés avec des microélectrodes de fabrication manuelle et un montage macroscopique. Pour continuer à identifier et doser ces molécules sur les différents matériaux d'électrode, dans des mélanges, dans des milieux plus ou moins complexes, synthétiques ou non et compléter les données, il est indispensable d'évaluer les performances des microdispositifs et de les comparer aux résultats obtenus avec le dispositif classique. Les deux antioxydants choisis sont l'acide ascorbique et l'acide urique, ainsi que leur mélange. Leur oxydation a été réalisée sur des microélectrodes d'or, de fabrication manuelle et de fabrication collective. Ces dernières ont été fabriquées par Fadhila Sekli, dont la thèse s'inscrit dans ce projet collaboratif. Les travaux de Fadhila Sekli ont été consacrés au développement d'une modification de surface d'électrode, pour améliorer la sélectivité et la sensibilité de la détection électrochimique des antioxydants, et plus précisément de ces deux acides, dans des milieux biologiques réels. Les mesures présentées dans cette partie ont été réalisées sans fonctionnalisation, de manière à évaluer, in fine, les performances analytiques des microdispositifs avec modification de surface.

A. Matériels et méthodes

1. Le montage électrochimique

Pour les caractérisations avec les microélectrodes d'or de fabrication manuelle, le montage électrochimique comprend une électrode auxiliaire en platine sous forme de tige et une électrode de référence au calomel saturée. Dans le cas d'une détection réalisée avec une microélectrode d'or intégrée sur silicium, l'électrode auxiliaire est celle du microdispositif. Ce montage est relié à deux types de systèmes de régulations de potentiel :

- un multipotentiostat VMP de marque Bio-logic, piloté par le logiciel EClab,
- un potentiostat autolab Metrohm, contrôlé par le logiciel GPES.

2. Les microélectrodes

Les microélectrodes de fabrication manuelle sont réalisées suivant le protocole décrit dans la thèse d'Audrey Ruffien-Ciszak (2005). Brièvement, un fil d'or de 50 μm de diamètre, fourni par la société Goodfellow, est inséré dans un capillaire de verre vendu par Clark Electromedical Instruments. A l'aide d'une microétireuse (Narishige, Modèle PC 10), le capillaire est étiré pour former deux microélectrodes. Les extrémités effilées des microélectrodes sont de nouveau chauffées pour consolider la cohésion entre le verre et le métal. La pointe est ensuite poncée grâce à une rectifieuse équipée d'un disque à résine diamantée (Narishige, EG-44). Cet équipement est muni d'un micromanipulateur qui permet de maintenir l'électrode perpendiculaire au plan du disque et ainsi d'obtenir une surface d'électrode en forme de disque plan.

Le procédé des microélectrodes intégrées est celui décrit au chapitre II.

3. Caractérisations

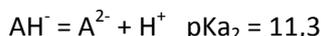
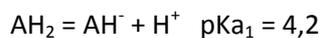
Les microélectrodes de fabrication manuelle ainsi que les microélectrodes de fabrication collective sont caractérisées préalablement par voltammétrie cyclique en solution modèle. Dans un premier temps, les voltammogrammes sont tracés dans une solution désaérée d'acide sulfurique à 0,5 mol.L⁻¹ afin de vérifier la bonne qualité des électrodes et des états de surface des matériaux. Dans un second temps, le rayon des électrodes est déterminé par le tracé d'un voltammogramme entre -0,5 V et 0,3 V/ECS à la vitesse de 50 mV.s⁻¹ dans une solution désaérée d'hexacyanoferrate III de potassium à 5 mmol.L⁻¹. Pour une meilleure comparaison, les voltammogrammes résiduels réalisés dans une solution phosphate tamponnée à pH 7 ont été soustraits des voltammogrammes obtenus dans les solutions d'antioxydants. Les courbes présentées dans la suite de cette partie sont les voltammogrammes résultants de cette soustraction.

B. Détection électrochimique de l'acide ascorbique

L'acide ascorbique (vitamine C) est une espèce hydrosoluble disponible dans de nombreux systèmes biologiques et produits alimentaires (légumes frais). Le développement de systèmes de détection fiables et sensibles de l'acide ascorbique est lié à deux contraintes. D'une part, ces dernières années, l'augmentation des directives agroalimentaires a entraîné la croissance et l'amélioration de procédures d'analyse des vitamines et additifs (Ambrosi *et al.*, 2008 ; Pisoschi *et al.*, 2008). D'autre part, des études cliniques ont démontré que la concentration de cet acide dans les fluides biologiques pouvait être utilisée pour évaluer le stress oxydant humain (Ambrosi *et al.*, 2008 ; Chepda *et al.*, 1999). Certaines études cliniques ont montré que l'acide ascorbique pouvait être utilisé en complément pour prévenir ou traiter les rhumes, les maladies mentales, l'infertilité, le cancer et le sida (Davies *et al.*, 1991 ; Arrigoni et De Tullio, 2002). Un grand nombre de techniques peut être utilisé pour quantifier l'acide ascorbique mais les méthodes électroanalytiques, et plus précisément la voltammétrie et l'ampérométrie, se développent et deviennent de plus en plus populaires (Chen et Yu, 1999 ; Fei *et al.*, 2004 ; Pisoschi *et al.*, 2008).

1. Mécanisme d'oxydation

L'oxydation de l'acide ascorbique a été étudiée en détail par différentes équipes sur des électrodes de mercure (Ruiz *et al.*, 1977 ; Tur'yan et Kohen, 1995), de platine (Karabinas et Jannakoudakis, 1984 ; Březina *et al.*, 1972 ; Ernst et Knoll, 2001), d'or (Xing *et al.*, 1992a ; Rueda *et al.*, 1978 ; Sullivan et Kohl, 1998) et de carbone (Deakin *et al.*, 1986). Ce diacide, noté AH₂, présente deux constantes d'acidité (Tur'yan et Kohen, 1995 ; Hinoue *et al.*, 1999 ; Davies *et al.*, 1991) :



Au pH physiologique (7,4) et au pH de l'épiderme (5-6), cet antioxydant est donc principalement sous la forme anionique AH⁻.

Le mécanisme d'oxydation de l'acide ascorbique, pour un pH inférieur à 8, est présenté sur la Figure I-1. L'acide ascorbique, sous forme AH⁻, est oxydé en acide déhydroascorbique (DHA). Cette oxydation est biélectronique et fait intervenir un intermédiaire radicalaire anionique, l'acide mono-déhydro-ascorbique (MDA) (Hinoue *et al.*, 1999 ; Rueda *et al.*, 1978 ; Ruiz *et al.*, 1977).

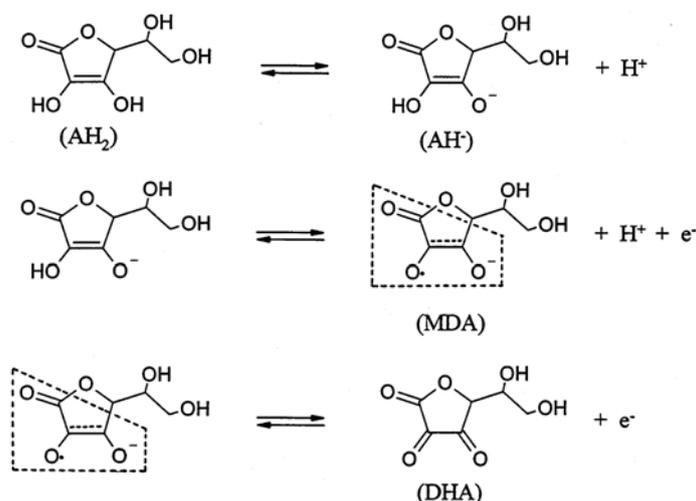


Figure I-1 : Mécanisme d'oxydation de l'acide ascorbique en milieu acide et neutre (pH<8) (Hinoue *et al.*, 1999).

Cette oxydation est suivie par l'hydratation des groupes carbonyles (Rueda *et al.*, 1978 ; Ruiz *et al.*, 1977), détaillée à la Figure I-2.

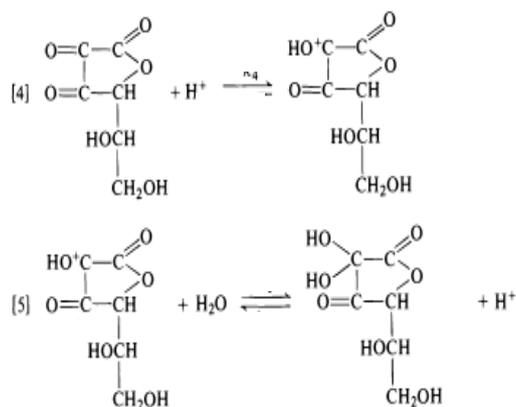


Figure I-2 : Mécanisme d'hydratation de l'acide déhydroascorbique (Ruiz *et al.*, 1977).

2. Oxydation électrochimique sur une microélectrode d'or

Aux pH acides ou neutres, l'acide ascorbique présente une seule vague d'oxydation et aucune vague de réduction (Rueda *et al.*, 1978 ; Hinoue *et al.*, 1999). Dans la bibliographie, sur une électrode d'or massive, en milieu tamponné phosphate à pH 7, l'oxydation démarre à 0,2 V et le courant atteint son maximum à 0,52 V/ECS (Fei *et al.*, 2004 ; Raj et Ohsaka, 2003). Le potentiel de demi-vague $E_{1/2}$, a été évalué pour différents matériaux d'électrodes : 0,15 V/ECS sur une électrode de graphite (Xing *et al.*, 1992b) ; 0,34 V/ECS sur une électrode de carbone vitreux dans une solution phosphate tamponnée à pH 7,2 (Chevion *et al.*, 2000).

Les voltammogrammes présentés à la Figure I-3 ont été obtenus avec une microélectrode d'or fabriquée manuellement et une microélectrode d'or de fabrication collective dans une solution désaérée d'acide ascorbique à 1 mmol.L^{-1} préparée dans une solution tamponnée de phosphate à pH 7.

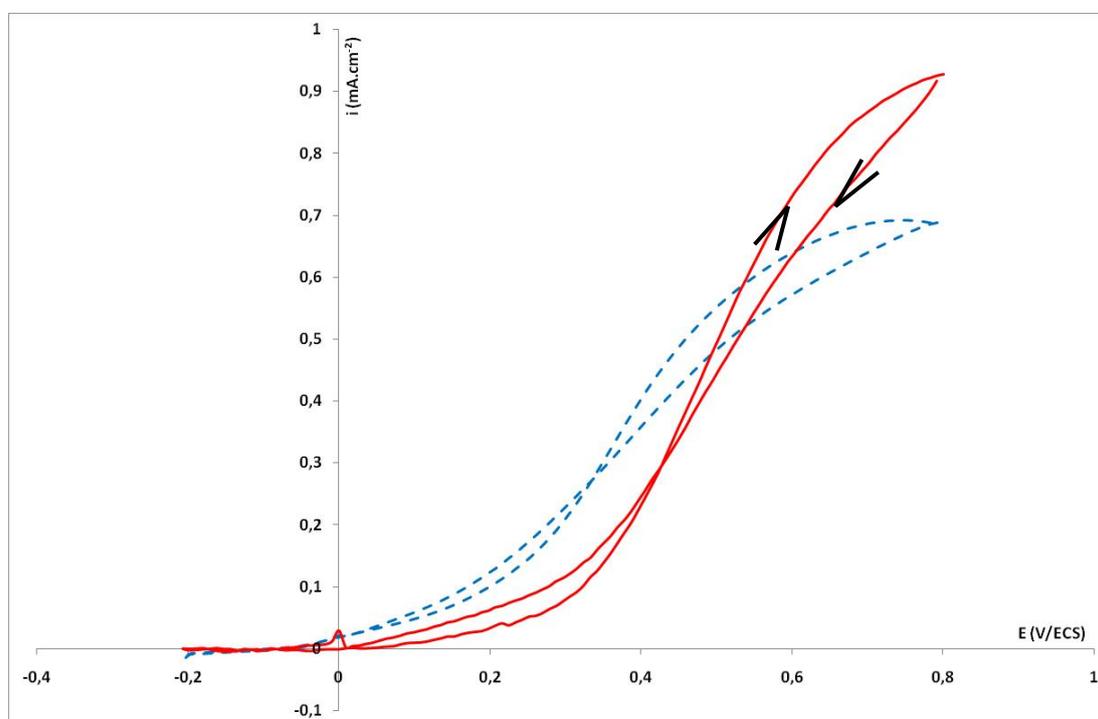


Figure I-3 : Voltammogrammes cycliques réalisés dans une solution phosphate tamponnée à pH 7 contenant 1 mmol.L^{-1} d'acide ascorbique, avec une microélectrode d'or de fabrication manuelle (---) et une microélectrode d'or de fabrication collective (—). Vitesse de balayage : 50 mV.s^{-1} .

Ces voltammogrammes mettent en évidence une vague d'oxydation de l'ion ascorbate, qui débute vers 0,04 V/ECS. Le potentiel de demi-vague est estimé à $0,35 \pm 0,02 \text{ V/ECS}$ sur une microélectrode de fabrication manuelle. Cependant, les réponses des microélectrodes de fabrication collectives sont moins reproductibles que celles obtenues avec les microélectrodes de fabrication manuelle et les performances analytiques ne sont pas totalement identiques. En effet, sur les électrodes de fabrication collective, le potentiel de demi-vague est de $0,47 \pm 0,08 \text{ V/ECS}$. La non-reproductibilité des réponses des électrodes de fabrication collective peut être liée d'une part à l'adsorption des produits d'oxydation (Wang *et al.*, 2007 ; Nassef *et al.*, 2007 ; Raj et Ohsaka, 2003) et d'autre part au

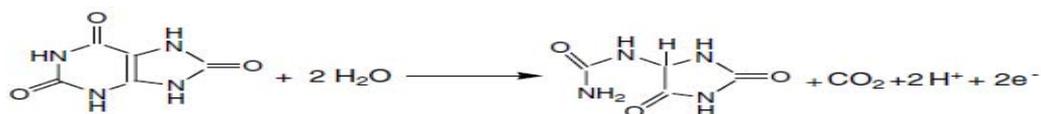
prétraitement des électrodes (Izumi *et al.*, 1991). La structure cristalline n'est pas évoquée car l'oxydation de l'acide ascorbique semble y être insensible (Xing *et al.*, 1992a).

C. Détection électrochimique de l'acide urique

Des taux élevés d'acide urique dans les urines et dans le sang sont les symptômes de plusieurs maladies comme la goutte, l'hyperuricémie et le syndrome de Lesch-Nylan (Shi et Shiu, 2001 ; Jinnah, 2009). Par ailleurs, l'acide urique est impliqué dans les mécanismes du stress oxydant mais son rôle reste encore mal défini. L'importance médicale de cette molécule a induit le développement de méthodes simples et rapides de détection de l'acide urique. Parmi celles-ci, les plus utilisées sont les techniques colorimétriques, enzymatiques et électrochimiques. Ces dernières sont plus rapides, plus sélectives (mise en place d'électrodes modifiées) et moins coûteuses (Premkumar et Khoo, 2005 ; John, 2005 ; Raj et Ohsaka, 2003).

1. Mécanisme d'oxydation

De manière générale, l'oxydation de l'acide urique est biélectronique et irréversible sur les électrodes métalliques (Luo *et al.*, 2006). Cependant, les produits d'oxydation et les mécanismes réactionnels peuvent varier en fonction du milieu d'étude, de son pH et du matériau d'électrode employé (Goyal *et al.*, 1982a). Le produit issu directement de l'oxydation de l'acide urique est instable et différents réarrangements sont possibles, conduisant notamment à l'alloxane, l'allantoïne ou l'urée (Dryhurst, 1974 ; Goyal *et al.*, 1982b). A pH 7, la réaction peut se résumer de la façon suivante (Owens *et al.*, 1978 ; John, 2005 ; Marsh et Dryhurst, 1979) :



où l'acide urique s'oxyde pour donner majoritairement l'allantoïne et du dioxyde de carbone.

2. Oxydation électrochimique sur une microélectrode d'or

La largeur du pic d'oxydation obtenu en voltammétrie linéaire et cyclique sur une électrode d'or suggère une cinétique de transfert électronique relativement lente, probablement due à l'adsorption des produits d'oxydation à la surface de l'électrode. L'oxydation de l'acide urique implique deux électrons et deux protons et a lieu à 0,45 V environ à pH neutre (pH ≈ 7) (Owens *et al.*, 1978 ; Raj et Ohsaka, 2003 ; Wang *et al.*, 2007). Cette oxydation est irréversible sur les électrodes métalliques et de carbone vitreux. Le potentiel de demi-vague a été évalué sur une électrode en carbone vitreux à 0,38 V/ECS dans une solution phosphate tamponnée à pH 7,2 (Chevion *et al.*, 2000).

Les voltammogrammes présentés à la Figure I-4 ont été obtenus avec une microélectrode en or de fabrication manuelle et une microélectrode d'or de fabrication collective dans une solution tamponnée phosphate à pH 7 contenant de l'acide urique à la concentration de 1 mmol.L⁻¹. La vague

d'oxydation de l'acide débute vers 0,28 V/ECS et est irréversible. Le potentiel de demi-vague obtenu pour l'oxydation de l'acide urique sur des électrodes de fabrication manuelle est de $0,48 \pm 0,02$ V/ECS. Comme pour l'acide ascorbique, le potentiel de demi-vague obtenu pour l'oxydation de l'acide sur des microélectrodes de fabrication collective est un petit peu plus élevé, estimé à $0,51 \pm 0,03$ V/ECS. Par ailleurs, l'intensité limite observée sur les voltammogrammes tracés avec les microélectrodes de fabrication collective ($i_{lim} = 1,10 \pm 0,3$ mA.cm⁻²) est plus grande que celle mesurée sur les voltammogrammes obtenus avec des microélectrode de fabrication manuelle ($i_{lim} = 0,67 \pm 0,05$ mA.cm⁻²).

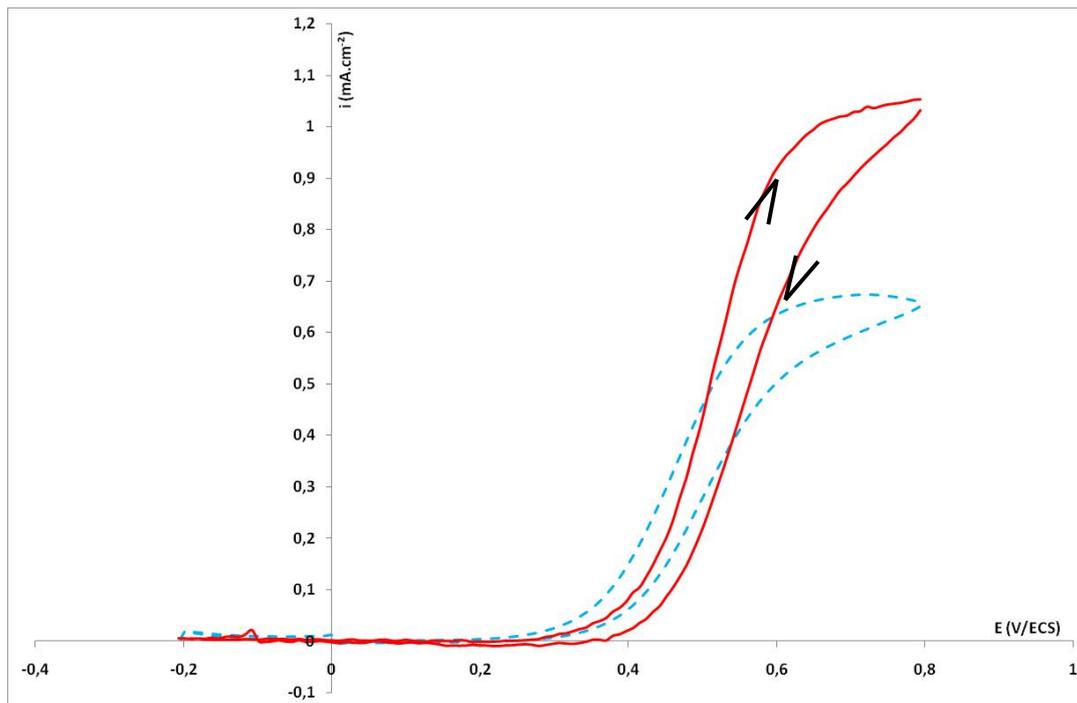


Figure I-4 : Voltammogrammes cycliques réalisés dans une solution phosphate tamponnée à pH 7 contenant 1 mmol.L⁻¹ d'acide urique avec une microélectrode d'or de fabrication manuelle (---) et une microélectrode d'or de fabrication collective (—). Vitesse de balayage : 50 mV.s⁻¹.

Cette dispersion perceptible des résultats avec les deux types d'électrodes peut être liée à la structure superficielle des matériaux d'électrode : le mode de préparation influence sur l'arrangement atomique, sur les défauts de surface et sur la rugosité du matériau étudié. Ceci se traduit par des différences de propriétés physico-chimiques comme la mouillabilité (Cognard, 1984) et influence la cinétique électrochimique (Zei *et al.*, 1983).

D. Détection électrochimique d'un mélange équimolaire d'acide ascorbique et d'acide urique

Indicateurs du stress oxydant et considérés comme des marqueurs biochimiques de différentes pathologies (Spitsin *et al.*, 2002 ; Kashyap *et al.*, 2005 ; Aycicek *et al.*, 2006 ; Boots *et al.*, 2009), l'acide ascorbique et l'acide urique doivent pouvoir être dosés simultanément.

1. Détection des deux acides

La détection électrochimique simultanée de l'acide ascorbique et de l'acide urique présente plusieurs difficultés : le potentiel d'oxydation de l'acide ascorbique est proche de celui de l'acide urique ; les surtensions à imposer sont importantes sur les électrodes métalliques nues et la détection souffre de l'adsorption des produits d'oxydation (Ernst et Knoll, 2001 ; Wang *et al.*, 2007 ; Fei *et al.*, 2004 ; Xiao *et al.*, 2000). Pour résoudre ces problèmes, les électrochimistes ont développé un panel de modifications de surface qui tend à améliorer la sélectivité et la sensibilité de la mesure. Des électrodes en carbone et métalliques très fortement oxydées (Premkumar et Khoo, 2005), des électrodes modifiées par réduction électrochimique de sels de diazonium (Nassef *et al.*, 2007), par auto-assemblage d'une monocouche de thiols (Zhao *et al.*, 2006 ; Raj et Ohsaka, 2003), par nanoparticules d'or (Kannan et John, 2009), ou par polymères conducteurs (Sekli-Belaidi *et al.*, 2010) ont été développées pour mieux discriminer les réponses électrochimiques des deux acides. Ces quelques exemples montrent la diversité des approches ainsi que l'étendue des recherches et met en évidence l'importance de cette détection. Dans la suite, il s'agit simplement d'évaluer les performances électrochimiques des microélectrodes d'or nues de fabrication collective par rapport à celles de fabrication manuelle, pour la détection simultanée des deux acides.

2. Sur une électrode d'or

Les réponses électrochimiques obtenues sur une électrode d'or avec un mélange d'acide ascorbique et d'acide urique préparé dans une solution phosphate tamponnée à pH 7, sont mal séparées et les pics ou vagues ne sont pas clairement définis (Wang *et al.*, 2007 ; Zhao *et al.*, 2006). Par contre, sur les électrodes en carbone vitreux, à pH 7, dans une solution équimolaire d'acide ascorbique et d'acide urique (1 mmol.L⁻¹), la séparation entre les deux oxydations apparaît plus nettement avec une différence de potentiel de 0,21 V entre les deux pics (John, 2005). Cependant, la fabrication manuelle de microélectrodes en carbone vitreux n'est pas simple (fragilité des fils disponibles) et leur production par les microtechnologies demande la mise en place d'un environnement et de machines dédiés.

Les voltammogrammes cycliques présentés à la Figure I-5 ont été réalisés avec une microélectrode d'or de fabrication collective et une microélectrode d'or de fabrication manuelle, dans une solution désaérée de tampon phosphate à pH 7 contenant l'acide urique (1 mmol.L⁻¹) et l'acide ascorbique (1 mmol.L⁻¹). Ils mettent en évidence une vague d'oxydation avec un épaulement vers 0,4 V/ECS. La distinction entre les deux oxydations n'est pas aisée, en accord avec les résultats donnés dans la bibliographie montrant le chevauchement des deux vagues d'oxydation. Le potentiel de demi-vague de la première vague est évalué, pour les électrodes de fabrication manuelle, à $0,31 \pm 0,03$ V/ECS. Cette valeur est identique pour les microélectrodes de fabrication collective. Cette première vague correspond à l'oxydation de l'acide ascorbique. Le potentiel de demi-vague de la seconde, témoin de l'oxydation de l'acide urique, est égal à $0,52 \pm 0,02$ V/ECS pour les électrodes de fabrication manuelle, et à $0,53 \pm 0,01$ V/ECS pour les électrodes de fabrication collective. De plus, comme pour les espèces étudiées séparément, les intensités limites obtenues avec les microdispositifs (pour la seconde vague : $I_{lim}=0,91 \pm 0,07$ mA.cm⁻²) sont légèrement supérieures à celles acquises avec des microélectrodes de fabrication classiques ($I_{lim} = 0,81 \pm 0,07$ mA.cm⁻²).

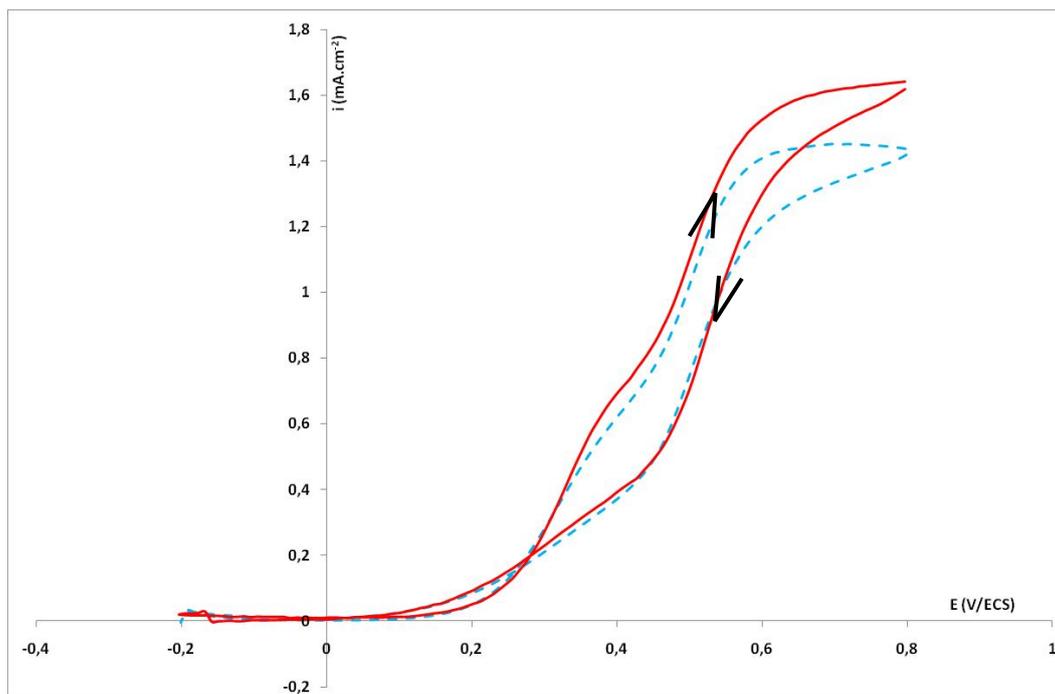


Figure I-5 : Voltammogrammes cycliques réalisés dans une solution phosphate tamponnée à pH 7 contenant 1 mmol.L^{-1} d'acide urique et d'acide ascorbique avec une microélectrode d'or de fabrication manuelle (---) et une microélectrode d'or de fabrication collective (—). Vitesse de balayage : 50 mV.s^{-1} .

Les voltammogrammes cycliques réalisés avec les microélectrodes intégrées sont semblables à ceux obtenus avec les microélectrodes à fils métalliques mais les performances analytiques ne sont pas totalement similaires. Pour expliciter les différences relevées, il semble important d'approfondir les études sur les états et la qualité de surface des électrodes. Cette étude est d'autant plus importante pour prévoir et évaluer les propriétés de la fonctionnalisation future, indispensable pour détecter et quantifier simultanément l'acide ascorbique et l'acide urique.

II. Détection électrochimique pour l'analyse du milieu cutané

L'application de ces microdispositifs vise à détecter les molécules antioxydantes impliquées dans les mécanismes du stress oxydant et à évaluer la capacité antioxydante globale de l'épiderme. Cette méthode de détection électrochimique présente un intérêt majeur dans la compréhension des phénomènes pathologiques liés au stress oxydant et dans l'appréciation des performances des traitements proposés. Cette technique est une réelle alternative à toutes les méthodes utilisées actuellement, qui nécessitent des prélèvements plus ou moins traumatisants pour le patient et dont les résultats d'analyse sont généralement différés dans le temps. Pour valider et démontrer la fiabilité de ce dispositif électrochimique, les données analytiques doivent être complétées et des études cliniques plus importantes doivent être menées avec un grand nombre de volontaires.

A. Avantages du microdispositif électrochimique

La thèse d'Audrey Ruffien-Ciszak a démontré les potentialités des électrodes micrométriques et de la mesure électrochimique pour évaluer la capacité antioxydante globale et détecter certaines

molécules antioxydantes hydrophiles (Ruffien-Ciszak, 2005). Mais ces travaux ont également montré les limites du protocole de fabrication et d'utilisation des microélectrodes. En effet, ces dernières, constituées d'un fil métallique scellé dans un capillaire en verre, sont produites à l'aide d'une microétireuse et d'une microponceuse. Chaque électrode doit être caractérisée pour vérifier la bonne cohésion entre le métal et le verre. Cette procédure est relativement longue et a un impact direct sur la mise en place d'études cliniques ainsi que le nombre de cas à étudier.

Outre cette limitation, la mise en place du dispositif n'est pas simple : elle nécessite l'utilisation de statifs et de micromanipulateurs pour apposer avec précision et délicatesse les microélectrodes de travail. Chaque matériau d'électrode apporte des informations complémentaires qui peuvent être couplées pour évaluer la capacité antioxydante globale de l'épiderme et les molécules qui y participent. Or, le montage permettant une détection simultanée avec une microélectrode d'or et une microélectrode de platine devient un peu plus difficile et son encombrement plus important (Figure II-1).

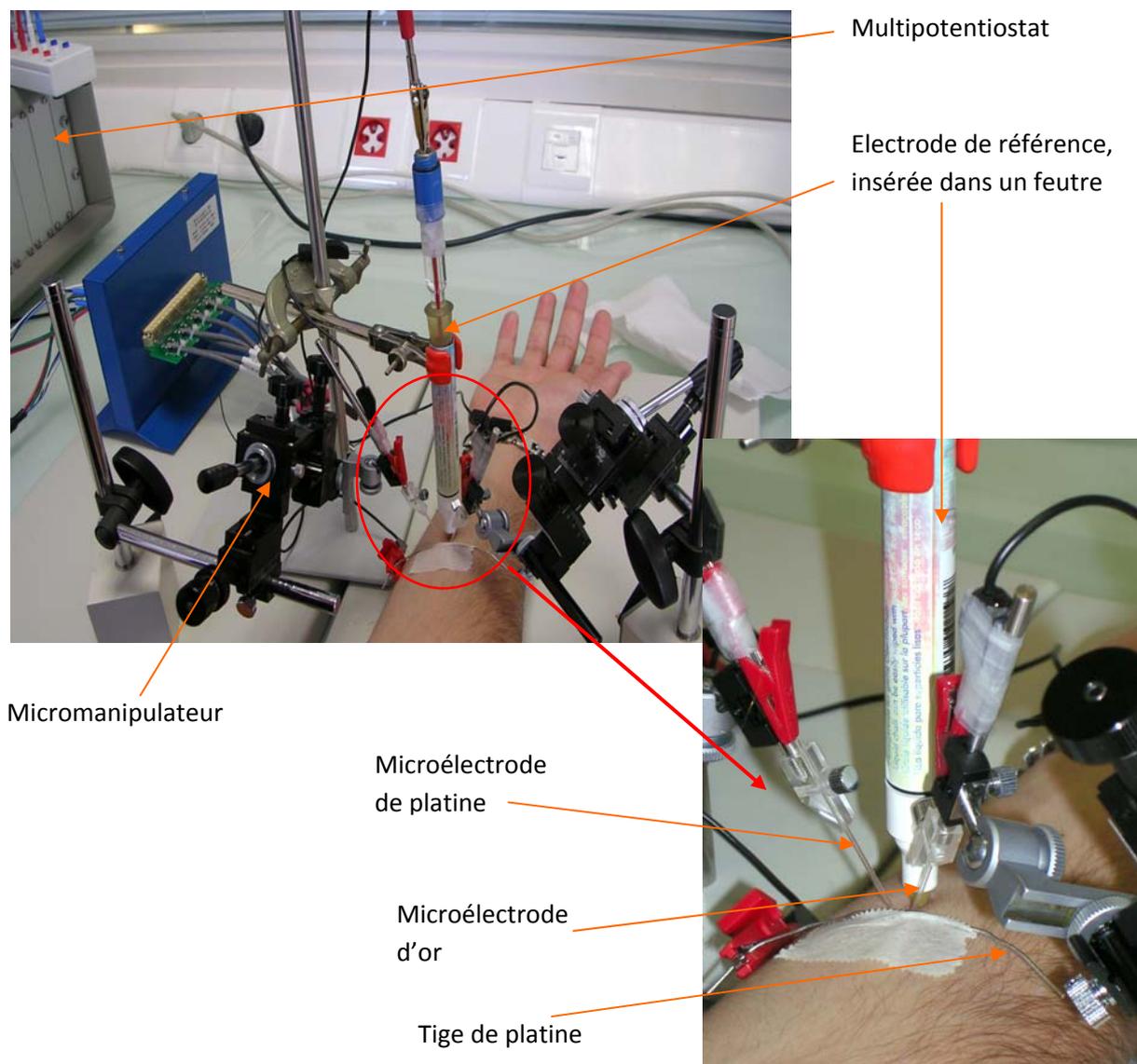


Figure II-1 : Montage réalisé pour effectuer des mesures simultanées sur la peau avec deux microélectrodes de fabrication classique, une en or et une en platine

Les mesures ont été réalisées jusqu'à présent sur l'avant-bras mais il serait intéressant d'étudier d'autres parties du corps, comme le dos ou le visage. Dans ces cas, le montage proposé est totalement inadapté.

Comparativement, les avantages proposés par le nouveau dispositif électrochimique miniaturisé sont nombreux. L'intégration des trois électrodes sur un seul et même support rend l'utilisation et la mise en place simples. Le dispositif ne nécessite plus de statifs ni de micromanipulateur et son encombrement est maintenant fortement réduit par rapport au montage réalisé jusqu'ici (Figure II-2). Le système est mobile et des mesures électrochimiques sur des zones corporelles d'intérêts pour le clinicien, autres que l'avant-bras, sont maintenant envisageables. Enfin, cette technologie de fabrication permet d'intégrer différents matériaux d'électrodes, laissant la possibilité de créer un dispositif multi-détection.

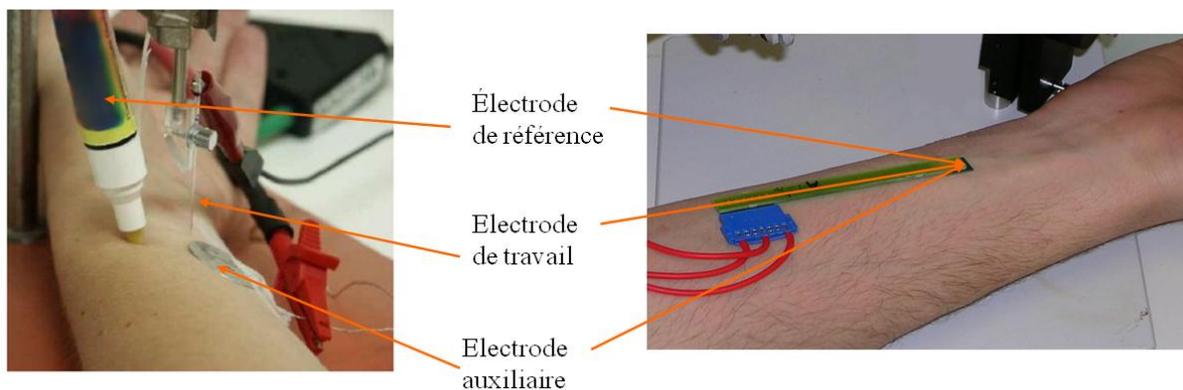


Figure II-2 : Réalisation de mesures directes à la surface de la peau, avec un dispositif classique (à gauche) et un microdispositif intégré (à droite).

B. Performances des dispositifs réalisés

Préalablement aux tests réalisés sur des volontaires, les électrodes ont été caractérisées dans des solutions modèles, afin d'une part d'en vérifier le bon fonctionnement et d'autre part la qualité. Après cette phase de caractérisation, le dispositif intégré est mis en place sur l'avant bras du volontaire. Au départ, seules les électrodes de travail et auxiliaire du microdispositif sont reliées au potentiostat. Le montage est complété par une électrode de référence au calomel saturée (ECS) commerciale, insérée dans un feutre. Ce feutre joue le rôle de capillaire de Luggin et permet de rendre son contact à la surface de la peau plus agréable qu'un capillaire classique en verre.

1. Microdispositif avec une couche d'isolant de 3 μm

Les voltammogrammes réalisés à la surface de la peau avec les microdispositifs admettant une couche d'isolation de SU-8 de 3 μm d'épaisseur ne présentent aucun signal : l'intensité reste nulle au cours du balayage. Le fonctionnement du capteur n'a pas été remis en question : en effet, après avoir déposé quelques gouttes de solution phosphate tamponnée à pH 7 directement sur la peau, les voltammogrammes obtenus mettent en évidence l'oxydation et la réduction du matériau d'électrode. Nos hypothèses se sont naturellement tournées vers un problème de contact entre l'électrode de travail du microdispositif et la peau. En effet, l'épaisseur sur laquelle est effectuée la

mesure électrochimique à la surface de l'épiderme a été évaluée entre 1 et 3 μm , pour une vitesse de balayage de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (Ruffien-Ciszak, 2005). Cette valeur correspond à l'épaisseur de la couche de diffusion, égale à $2\sqrt{Dt}$, l'ordre de grandeur des coefficients de diffusion dans la couche cornée étant de 10^{-9} à $10^{-10} \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ (Bard et Faulkner, 2001). Or, la pénétration de la peau dans cette « pseudo-cavité » (50 μm de diamètre pour 3 μm de hauteur) est une donnée inconnue et l'épaisseur du film hydrolipidique disponible à la surface de la peau, qui pourrait assurer la matrice de contact, est inférieure à 0,5 μm sur l'intérieur de l'avant bras (Pailler-Mattei *et al.*, 2009). Afin de vérifier si l'épaisseur de la couche d'isolation est le véritable obstacle à une possible mesure à la surface du *stratum corneum*, les mêmes tests ont été réalisés avec la première série de composants avec des microélectrodes d'encastrement moins profond (50 μm de diamètre pour 1,6 μm de hauteur).

2. Microdispositif avec une couche d'isolant de 1,6 μm

Les voltammogrammes tracés dans les solutions d'acide sulfurique et d'hexacyanoferrate III avec les microélectrodes issues du premier procédé de fabrication ont montré des phénomènes rédox supplémentaires comparés à ceux de l'or et du platine purs. Malgré ces résultats variables obtenus en phase aqueuse, ces dispositifs ont été testés sur la peau. Pour cette étude, ce sont les électrodes dont les caractérisations électrochimiques étaient le plus comparables à celle de matériaux massifs qui ont été utilisées.

a) Etude avec une électrode de référence macroscopique

Les voltammogrammes obtenus à la surface de la peau avec des microélectrodes d'or, à une vitesse de balayage de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, sont présentés à la Figure II-3.

Le voltammogramme tracé avec une microélectrode d'or de fabrication classique présente une vague d'oxydation qui débute vers 0,2 V/ECS, suivie de deux pics dont les intensités maximales se situent à environ 0,8 V et 1,2 V/ECS. Ces réponses correspondent à l'oxydation d'espèces réduites présentes à la surface du *stratum corneum* (Ruffien-Ciszak, 2005 ; Kohen *et al.*, 2000). L'oxydation de l'acide ascorbique est responsable de la première vague d'oxydation d'intensité maximale observée vers 0,6 V/ECS. Le premier pic vers 0,8 V/ECS est dû à la présence d'acide urique, de NADPH et de cystéine et le second pic vers 1,2 V/ECS est lié à l'oxydation du glutathion. Le pic de réduction observé à 0,6 V environ correspond à la réduction des oxydes d'or.

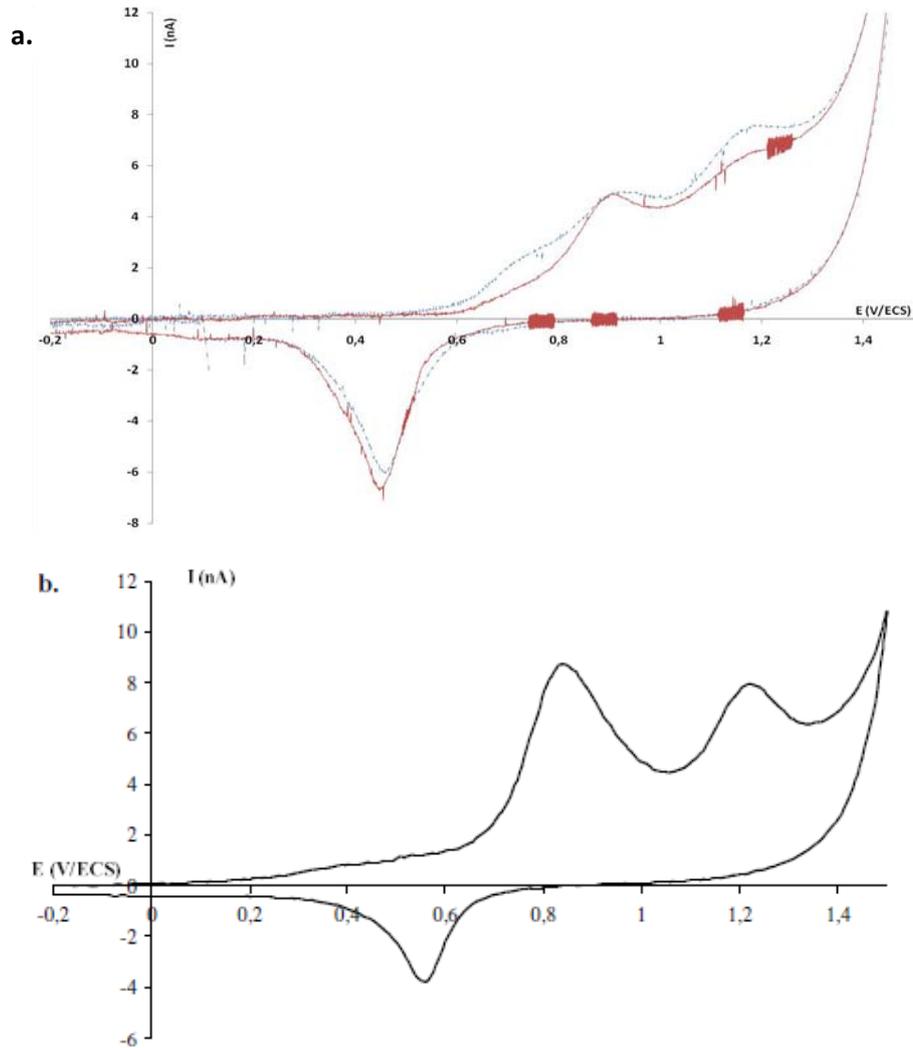


Figure II-3 : Voltammogrammes cycliques réalisés à la surface de l'épiderme avec la microélectrode de travail en or et l'électrode auxiliaire du microdispositif et une électrode de référence ECS (a) 1^{er} cycle(---), 2^{ème} cycle (—) ; avec une microélectrode d'or de fabrication manuelle et un montage classique (b).

L'ensemble de ces phénomènes d'oxydation est également observable sur les voltammogrammes obtenus avec une microélectrode d'or intégrée au substrat silicium. La première vague d'oxydation débute vers 0,4V/ECS et les intensités des deux pics peuvent être mesurées vers 0,9 V et 1,2 V/ECS respectivement. Cette similarité des résultats a été également vérifiée avec des microélectrodes de platine de fabrication classique et collective (Figure II-4).

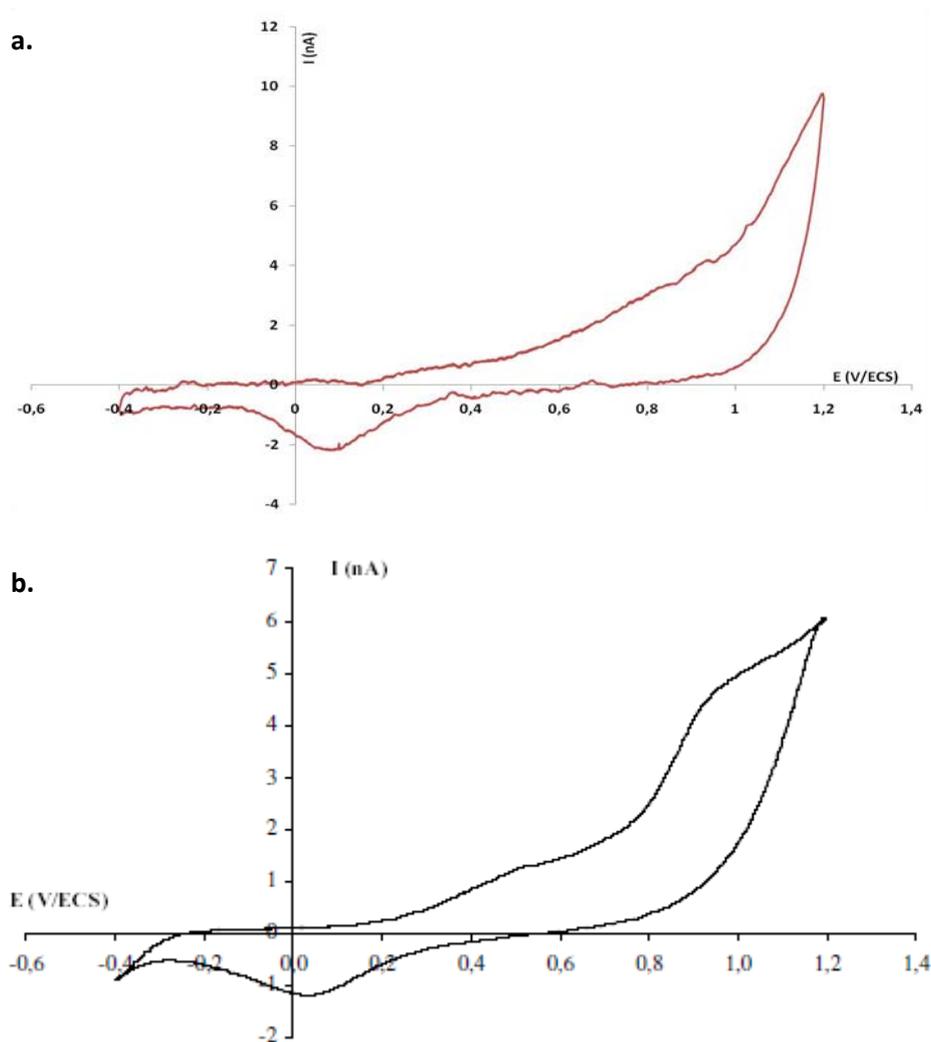


Figure II-4 : Voltammogrammes cycliques réalisés à la surface de la peau avec la microélectrode de travail en platine et l'électrode auxiliaire du microdispositif et une électrode de référence ECS (a) ; avec une microélectrode de platine de fabrication manuelle et un montage classique (b)

Le voltammogramme réalisé avec une microélectrode de platine classique présente un pic de réduction vers 0 V/ECS et deux vagues d'oxydation avec des potentiels de demi-vague d'environ 0,40 et 0,85 V/ECS. Ces dernières sont également dues à l'oxydation d'espèces réduites présentes à la surface de l'épiderme (Ruffien-Ciszak, 2005). La première vague anodique ($E_{1/2} = 0,4$ V/ECS) implique essentiellement l'oxydation de l'acide ascorbique. La seconde vague ($E_{1/2} = 0,85$ V/ECS) reflète principalement l'oxydation de l'acide urique et, dans une moindre part, celle du NADPH et du glutathion.

Ces premières observations corroborent l'hypothèse d'un défaut de contact entre les électrodes et la peau pour une hauteur d'encastrement des électrodes de 3 μm . Le développement d'un film isolant de plus faible épaisseur semble donc être indispensable pour détecter in vivo les antioxydants présents à la surface du *stratum corneum*.

b) Dispositif autonome

Pour vérifier les potentialités du capteur dans son ensemble, l'électrode de référence intégrée a été ensuite utilisée pour réaliser des voltammogrammes directement à la surface de la peau.

Les voltammogrammes obtenus sur la peau avec les dispositifs autonomes sont similaires à ceux réalisés avec un montage classique (Figure II-5). Les potentiels d'oxydation des molécules antioxydantes sont comparables sur les deux matériaux de microélectrodes.

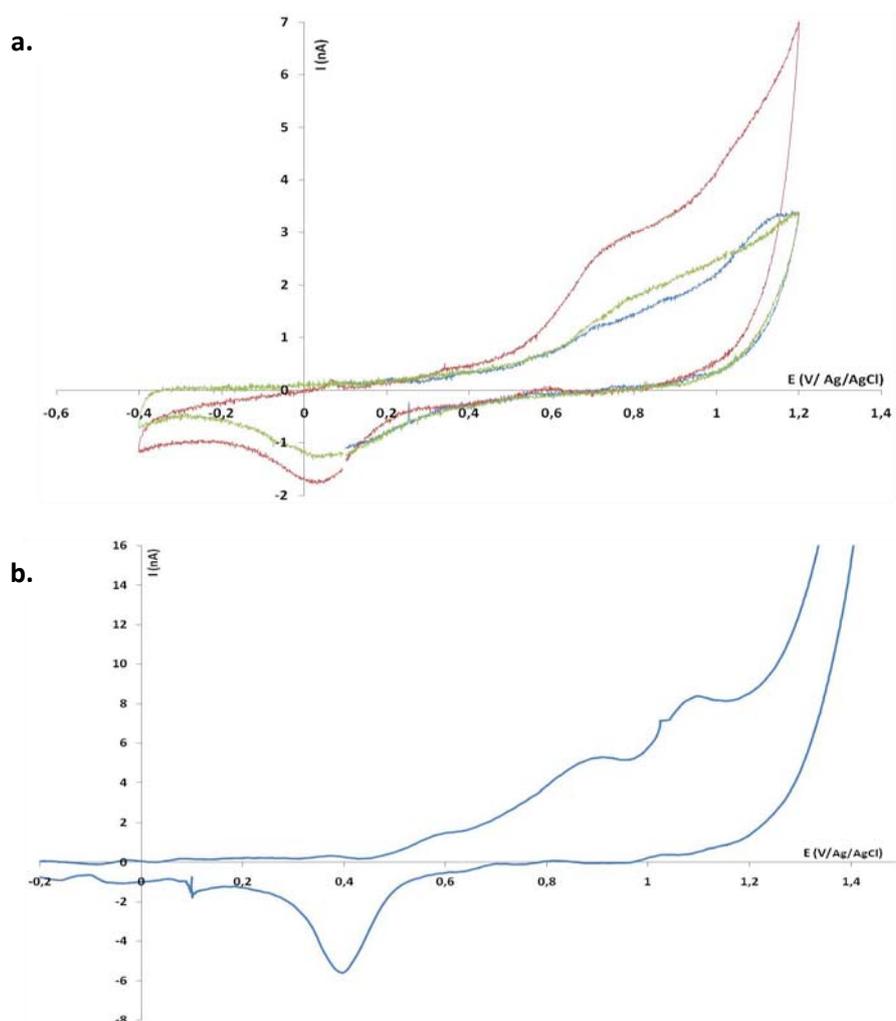


Figure II-5 : Voltammogrammes cycliques réalisés à la surface de la peau avec trois microdispositifs comprenant une microélectrode de travail en platine (a) ; avec un microdispositif comprenant une microélectrode de travail en d'or (b) et leur électrode auxiliaire et leur électrode de référence respectives intégrées sur les microdispositifs.

Mais l'interprétation de ces résultats reste délicate, à cause des réponses électrochimiques non cohérentes obtenues en solution avec les microdispositifs qui ont une couche d'isolation de 1,6 μm d'épaisseur (Chapitre II, Partie III-B 2). De plus, l'obtention de voltammogrammes cohérents reste trop aléatoire. Par ailleurs, la formulation utilisée ici pour créer des couches d'isolation de 1,6 μm n'est pas réellement optimale pour ce type d'épaisseur. En effet, la solution de SU-8 série 3005 est généralement utilisée pour réaliser des épaisseurs de films de 4 à 10 μm , dans les conditions standards. Certains paramètres de la phase d'enduction ont été modifiés pour atteindre les épaisseurs de 3 et 1,6 μm .

Pour répondre à cette problématique, une troisième série de composants a été fabriquée avec une épaisseur d'isolation de 0,9 μm . Cette couche a été structurée avec une formulation mieux adaptée à l'épaisseur recherchée et suivant le protocole développé pour un film de résine de 3 μm d'épaisseur (présenté au chapitre II).

3. Microdispositif avec une couche d'isolant de 0,9 μm

La résine pour isoler cette série de composants provient d'une série différente. En effet, les films d'isolation de 1,6 et 3 μm d'épaisseur ont été créés à partir de la résine SU-8 série 3005. Pour développer une couche de 900 nm, la résine SU-8 série 2000.5 a été utilisée car elle est classiquement employée pour réaliser des films de 0,5 à 0,8 μm d'épaisseur. Les deux séries contiennent les mêmes constituants principaux mais leur pourcentage ainsi que les adjuvants en très faibles proportions diffèrent.

a) *Caractérisations électrochimiques dans les solutions modèles*

Comme précédemment, avant toute campagne de mesure sur la peau, les composants sont caractérisés dans une solution d'acide sulfurique puis d'hexacyanoferrate III, afin de vérifier l'état de surface et la dimension des microélectrodes. Les voltammogrammes réalisées dans une solution désaérée d'acide sulfurique à 0,5 mol.L⁻¹ avec les microélectrodes de platine et d'or issues de cette nouvelle série de microdispositifs sont présentés à la Figure II-6.

Ces voltammogrammes sont tout à fait comparables à ceux présentés dans la bibliographie et à ceux tracés avec des microélectrodes avec une couche d'isolation de 3 μm d'épaisseur. Pour les microélectrodes de platine, les voltammogrammes sont quasiment superposables, les intensités ainsi que les potentiels d'oxydation et de réduction sont similaires. De même, les potentiels d'oxydation de l'or et de réduction des oxydes d'or, quelle que soit l'épaisseur d'isolation, sont identiques, respectivement 1,35V et 0,84 V/ECS. Par contre, les intensités observées sont différentes pour les microélectrodes d'or. Le voltammogramme réalisé avec une microélectrode d'or isolée par une couche de 900 nm présente des pics d'oxydation et de réduction, d'intensités égales à 25 nA et 7 nA respectivement, bien plus intenses que ceux obtenus avec une microélectrode définie par 3 μm de SU-8 (8 nA et 3 nA respectivement), pour une même surface théorique. Les interrogations posées lors du développement des premières microélectrodes d'or définies par une couche de polymère de 1,5 μm non optimisée sont ici de nouveau formulées, malgré une vérification d'adhérence et de recouvrement de la résine sur les dépôts métalliques. En effet, une solution de gravure, contenant de l'iode et de l'iodure de potassium, a été testée sur quelques composants pour évaluer visuellement les éventuels défauts de recouvrement. Après avoir plongé les dispositifs dans cette solution, l'or est éliminé au niveau des zones actives, laissant place à une zone grise correspondant à la sous couche de platine, et non sur le reste de la piste métallique. La protection des pistes métalliques et donc leur recouvrement semblent être assurés par la couche d'isolation développée.

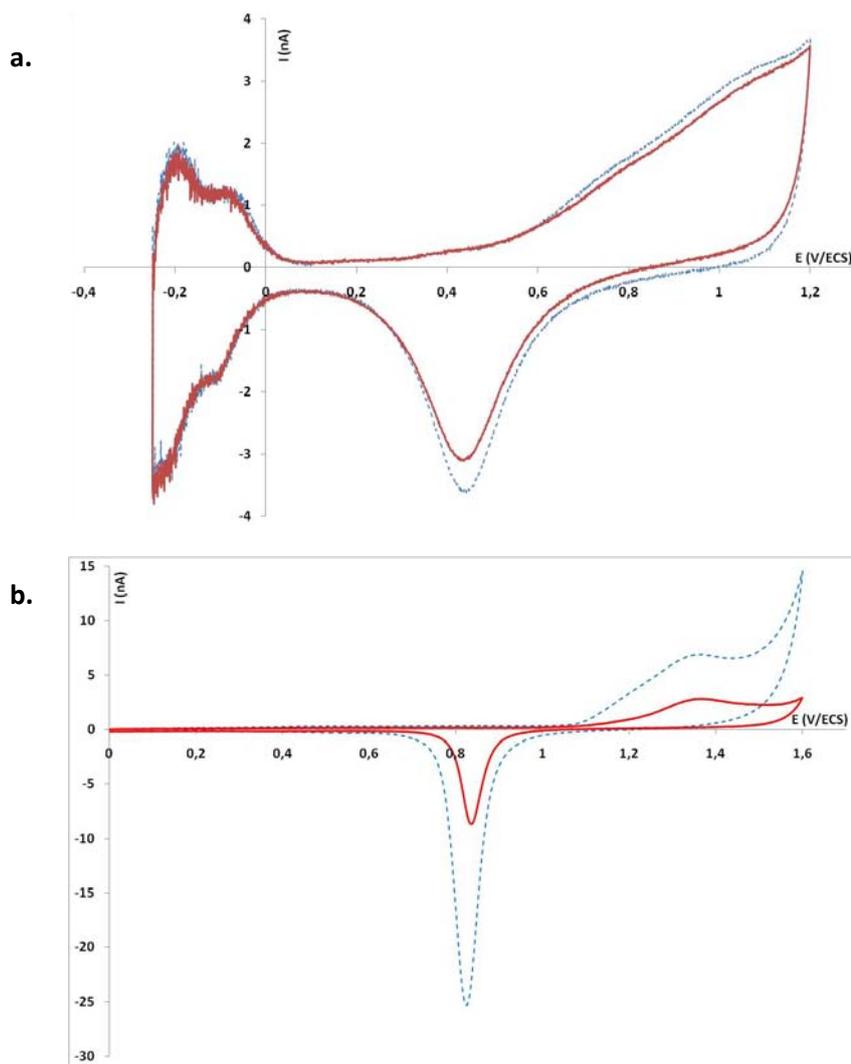


Figure II-6 : Voltammogrammes cycliques réalisés dans une solution d'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ avec des microélectrodes de platine (a) et des microélectrodes d'or (b) admettant une couche de SU-8 de 900 nm (---) ou une couche de SU-8 de $3 \mu\text{m}$ (—). Vitesse de balayage : 50 mV.s^{-1}

Pour compléter ces premières caractérisations, les composants ont été étudiés par voltammétrie cyclique dans une solution d'hexacyanoferrate III, entre $0,3 \text{ V}$ et $-0,5 \text{ V/ECS}$. Les voltammogrammes réalisés avec une microélectrode de platine et une microélectrode d'or définies par une couche de polymère de 900 nm , à une vitesse de balayage de 10 mV.s^{-1} , sont présentés à la Figure II-7. Sur les microélectrodes de platine, la réduction de l'hexacyanoferrate III débute entre $0,2 \text{ V}$ et $0,3 \text{ V/ECS}$ et l'intensité limite du palier de diffusion peut être mesurée dès $-0,1 \text{ V/ECS}$ (Figure II-7, a). Cette intensité est égale à 34 nA , qui correspond à une microélectrode de $25 \mu\text{m}$ de rayon. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec des microélectrodes admettant une couche d'isolation de $3 \mu\text{m}$. Par contre, pour les microélectrodes d'or, les voltammogrammes ne sont pas ceux attendus (Figure II-7, b). La réduction de l'hexacyanoferrate III sur ce type de microélectrodes n'est pas rapide et l'intensité ne se stabilise pas, aucun palier de diffusion n'étant observable. De plus, comme pour les caractérisations dans l'acide sulfurique, les intensités obtenues sont très importantes, supérieures à 50 nA , alors que théoriquement elles ne dépassent pas les 40 nA pour ces tailles de microélectrodes.

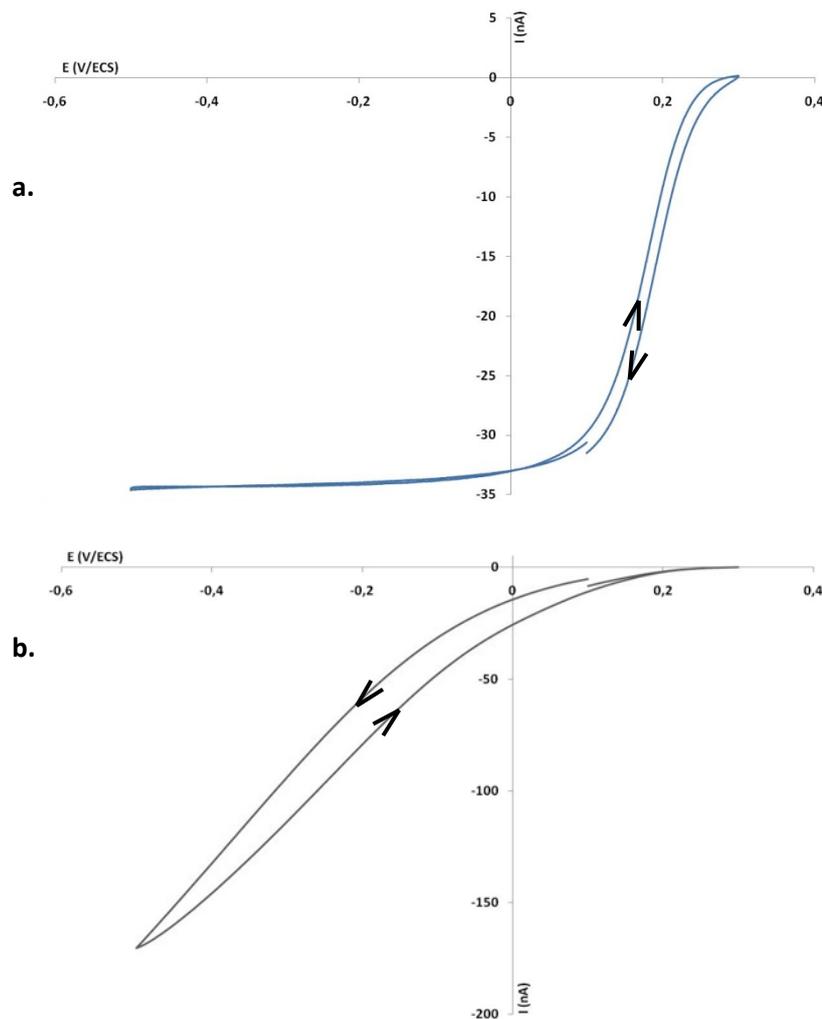


Figure II-7 : Voltammogrammes cycliques réalisés dans une solution d'hexacyanoferrate III à 5 mmol.L^{-1} avec une microélectrode de platine (a) et une microélectrode d'or (b) admettant une couche de SU-8 de 900 nm. Vitesse de balayage : 10 mV.s^{-1}

Ces voltammogrammes montrent une activité électrochimique supplémentaire à ce qui est théoriquement attendu. Des éléments électroactifs ou modifiant la surface sont capables de masquer ou de rendre plus difficile la réduction du ferricyanure sur l'or. Cette réflexion s'oriente vers la SU-8. En effet, ce polymère époxyde contient un sel de triarylsulfonium. Ce sel est le photogénérateur d'acide nécessaire à la polymérisation. Il contient des atomes de soufre. Or l'or est connu pour avoir des interactions fortes avec les atomes de soufre qui peuvent conduire à des monocouches autoassemblées. Cette adsorption peut bloquer la réactivité de l'électrode et rendre quasiment impossible la réduction de hexacyanoferrate III sur l'électrode d'or (Civit *et al.*, 2010). Pour tenter de comprendre les interactions particulières qui semblent avoir lieu entre les constituants du matériau isolant et les électrodes d'or, des voltammogrammes cycliques ont de nouveau été tracés dans une solution d'hexacyanoferrate III à 5 mmol.L^{-1} avec des fenêtres de balayage de potentiel plus larges. La borne positive reste égale à 0,3 V et la borne négative varie jusqu'à -1,2 V/ECS (Figure II-8), afin de visualiser s'il est possible d'atteindre le palier de diffusion de l'hexacyanoferrate III et le comportement de l'électrode jusqu'à la réduction du solvant. Les premiers voltammogrammes mettent en évidence une réduction lente qui débute vers 0,3 V/ECS. Un palier de diffusion est clairement appréciable à partir de -0,7 V/ECS. Lorsque le potentiel de l'électrode d'or

atteint -1 V/ECS, la réduction du solvant a lieu et la forme exponentielle de cette réduction est observable lorsque le potentiel de la borne négative de balayage atteint -1,2 V/ECS. A partir de ce dernier tracé, les voltammogrammes successifs présentent une intensité du palier de diffusion de plus en plus importante. De plus, au cours de ces différents balayages, le potentiel de réduction du solvant se décale vers les potentiels positifs et la cinétique de réduction à 0,3 V/ECS est de plus en plus importante.

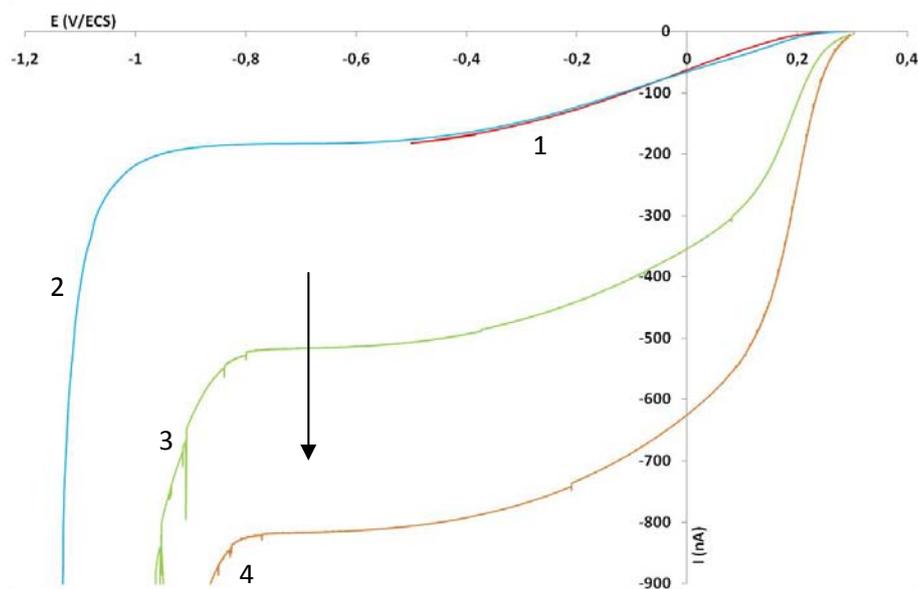


Figure II-8 : Voltammogrammes réalisés avec une microélectrode intégrée en or de 0,3V à -0,5V (1) puis à -1,2 V/ECS (2) Cycles suivants (3) puis (4). Vitesse de balayage : $10\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}] = 5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

A la lumière de ces résultats, lorsque le potentiel de la réduction du solvant ($2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2 + 2\text{OH}^-$) est atteint, les molécules soufrées qui se seraient adsorbées sur la microélectrode d'or sont alors désorbées. La réduction rapide du hexacyanoferrate III est alors de nouveau observable. Cependant, les intensités mesurées du palier de diffusion augmentent au cours des cycles.

Deux hypothèses peuvent être formulées : d'une part, au cours des balayages, la couche d'isolation se dégrade et la zone active s'agrandit, laissant une plus grande surface d'électrode. D'autre part, les molécules soufrées, après avoir été désorbées suite à la réduction du solvant, catalysent la réduction de l'hexacyanoferrate III. Cette hypothèse semble être vérifiée par les voltammogrammes cycliques tracés après avoir atteint le front du solvant, avec la même microélectrode intégrée en or (Figure II-9). Le cycle aller présente une réduction rapide sur l'or, comparable à celle de l'hexacyanoferrate III dans des conditions standards, mais le palier de diffusion n'atteint une intensité limite mesurable qu'à partir de -0,6 V/ECS. Au cycle retour, de -0,9 V à -0,1 V/ECS, les courbes sont quasiment superposables. Mais à partir de -0,1 V/ECS, un autre palier de réduction peut être observé. Deux vagues de réduction se distinguent : une qui peut correspondre au couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, dont l'intensité du palier de diffusion peut être estimée à 0 V/ECS et une correspondant peut-être à la réduction du sel de triarylsulfonium avec une intensité maximale observable vers -0,6V/ECS. Au cycle retour, les molécules désorbées ou les produits de la réduction du sel catalysent la réduction de l'hexacyanoferrate III.

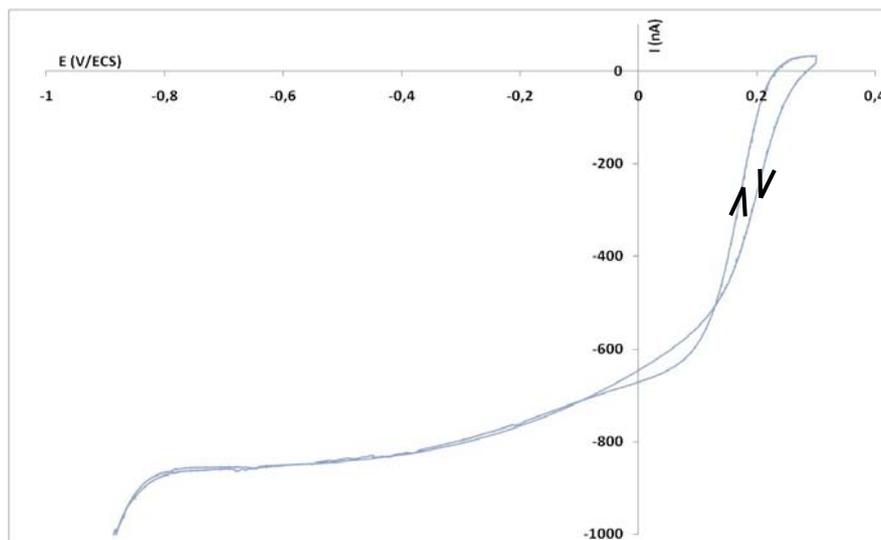


Figure II-9 : Voltammogramme cyclique réalisé dans une solution d'hexacyanoferrate III à 5mmol.L^{-1} avec une microélectrode intégrée en or de $0,3\text{V}$ à $-0,9\text{V/ECS}$. Vitesse de balayage : 10mV.s^{-1}

Les sels de sulfonium sont généralement réductibles en milieu à la fois aqueux et aprotiques (Colichman et Love, 1953 ; Vase *et al.*, 2008 ; Saeva et Morgan, 1984). Sur des électrodes en carbone vitreux, le sel de triarylsulfonium se réduit à un potentiel de pic de $-1,54\text{V/ECS}$ et les produits de la réduction s'oxydent à un potentiel de pic de $1,56\text{V/ECS}$. Cette réduction donne lieu au greffage des produits issus de la réaction, comme le montre le schéma réactionnel Figure II-10 (Vase *et al.*, 2008).

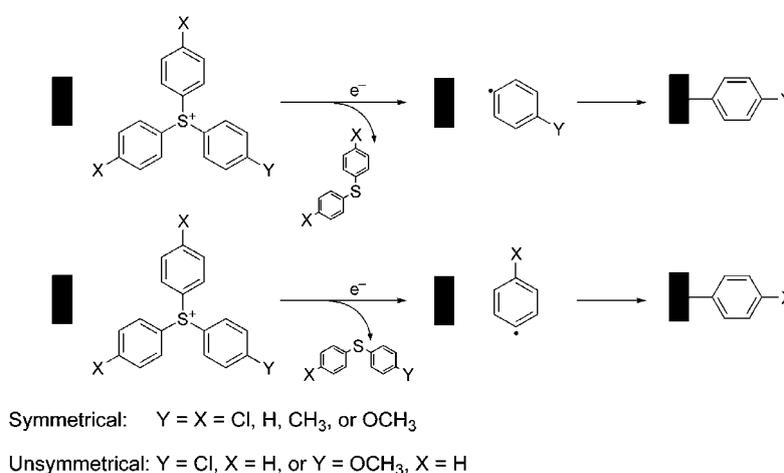


Figure II-10 : Mécanismes de réduction possibles des sels de triarylsulfonium symétriques et asymétriques (Vase *et al.*, 2008)

Les effets de ces balayages successifs dans la solution d'hexacyanoferrate III ont été également étudiés en plongeant les microélectrodes d'or ainsi traitées dans une solution d'acide sulfurique à $0,5\text{mol.L}^{-1}$. La forme de ce voltammogramme (Figure II-11) n'est pas totalement la même que celle des voltammogrammes tracés avant traitement dans la solution d'hexacyanoferrate III (Figure II-6). Ces derniers étaient globalement équivalents à ceux qui étaient attendus (cf. Figure III-22, Chapitre II). L'oxydation de l'or débute ici vers 1V/ECS et la vitesse de réaction est beaucoup plus rapide que celle présentée avant le traitement. Un premier pic est visible à $1,1\text{V/ECS}$, suivi d'une vague qui

atteint son maximum à 1,2 V/ECS, puis d'un second pic à 1,3 V/ECS. L'oxydation du solvant a lieu après 1,4 V/ECS. Le pic de réduction est lui situé toujours au même potentiel, 0,83 V/ECS.

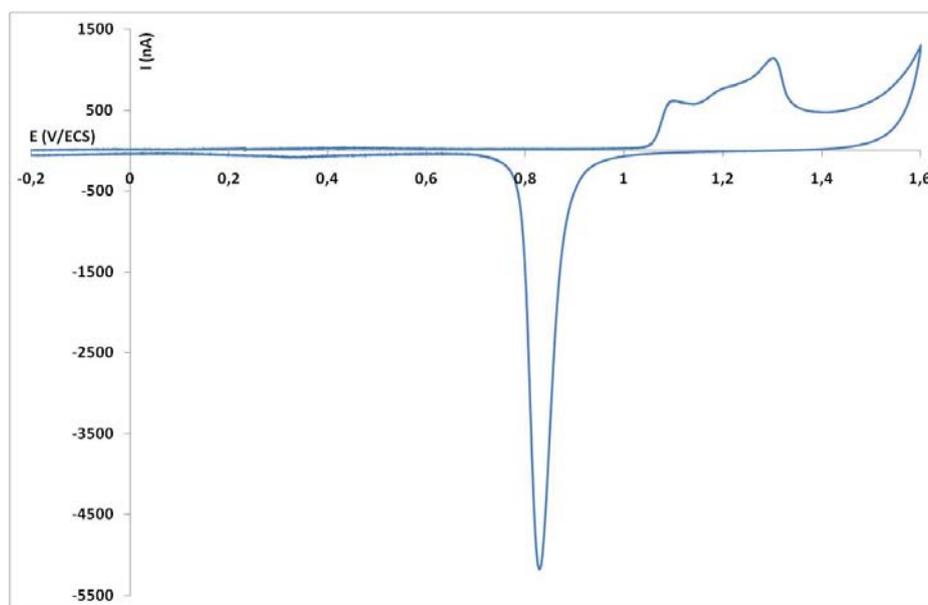


Figure II-11 : Voltammogramme cyclique réalisé avec une microélectrode d'or intégrée dans une solution d'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Vitesse de balayage : 50 mV.s^{-1}

Ces observations laissent à penser que certaines faces cristallographiques ont été plus sollicitées lors de la désorption des molécules soufrées et que leur réactivité est plus clairement visible sur le voltammogramme effectué dans la solution d'acide. En effet, les molécules soufrées s'adsorbent préférentiellement sur certaines faces cristallographiques : il a été montré que l'adsorption des thiols sur le plan (111) de l'or amène à des concentrations de surface plus denses en comparaison avec les autres orientations (Kostelitz et Oudar, 1971). Le traitement par balayages successifs dans la solution d'hexacyanoferrate III des microélectrodes d'or a activé particulièrement ces plans cristallins. Par ailleurs, les intensités mesurées sont bien plus grandes que celles observées avant le traitement (Figure II-6, b). Pour référence, les microélectrodes d'or réalisées avec une couche d'isolation de $3 \mu\text{m}$ s'oxydent à partir de 1 V/ECS et l'intensité des pics obtenus est comprise entre 3 et 4 nA. Avant les balayages successifs dans la solution d'hexacyanoferrate III, le pic d'oxydation des microélectrodes d'or définies par une couche de polymère de 900 nm débute un peu après 1 V/ECS et atteint environ 7 nA. Au regard de la bibliographie, cette augmentation d'intensité peut être attribuée à l'oxydation de la couche de soufre adsorbée qui a lieu au même potentiel que l'oxydation de l'or (Miah *et al.*, 2010, Lamy-Pitara et Barbier, 1986). Mais les voltammogrammes tracés après les balayages successifs en potentiel dans la solution d'hexacyanoferrate III présentent un pic d'oxydation de l'or débutant vers 1 V/ECS et atteignant un intensité de plus de 1000 nA.

Même si ce traitement a activé la surface de l'électrode, il ne peut pas être responsable d'une si grande amplification de l'intensité, qui a été multipliée par plus de 100. Cette évolution peut être assimilée à la dégradation du matériau polymère qui recouvre l'ensemble de la piste métallique sauf au niveau de la zone active (Figure II-12). La surface d'or en contact avec la solution d'étude serait devenue beaucoup plus importante, entraînant un pic d'oxydation plus intense.

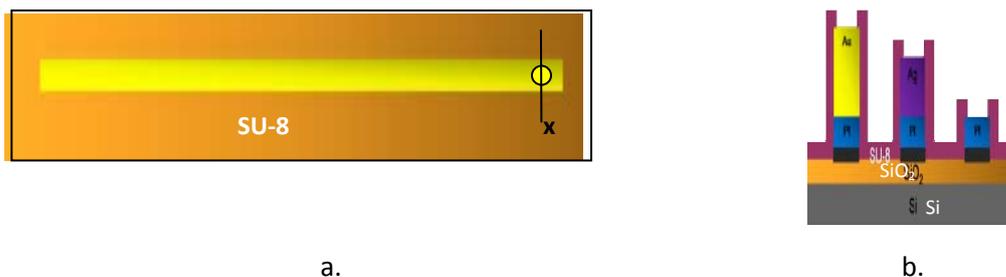


Figure II-12 : Vue schématique de dessus (a.) et en coupe selon l'axe x (b.) d'une microélectrode d'or intégrée

Afin de mieux évaluer l'électroactivité du polymère époxyde SU-8 et son comportement au cours des cycles de balayages en potentiel, une étude électrochimique de la solution commerciale de SU-8 2000.5 a été réalisée avec des électrodes d'or pur. Ces résultats sont commentés et discutés dans la partie III.

Cependant, pour finaliser la réflexion sur le compromis entre l'épaisseur de la couche d'isolation et un bon contact de l'électrode sur la peau, les composants issus de ce processus de fabrication (SU-8, 900 nm) ont été testés pour la détection de molécules antioxydantes à la surface de l'épiderme.

b) A la surface de la peau

Les voltammogrammes cycliques présentés à la Figure II-13 ont été réalisés avec les microélectrodes intégrées en platine et en or apposées directement sur l'avant bras, ainsi que leur électrode auxiliaire respective disponible sur le microdispositif et une électrode de référence macroscopique au calomel saturée, à une vitesse de balayage de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Les microélectrodes utilisées ici ont été préalablement caractérisées dans une solution d'acide sulfurique puis d'hexacyanoferrate III avec les paramètres classiquement mis en place au chapitre II, sans subir les différents traitements présentés précédemment.

Cette épaisseur d'encastrement permet d'observer des voltammogrammes directement à la surface de l'épiderme, comparables à ceux obtenus jusqu'ici. Cependant, le pic de réduction des oxydes d'or est beaucoup plus large et moins bien défini que celui tracé avec les précédentes microélectrodes. De même, les pics d'oxydation des molécules antioxydantes ne sont pas tous clairement observables. L'interprétation de ces voltammogrammes serait de toute façon délicate au vu des résultats obtenus en solution.

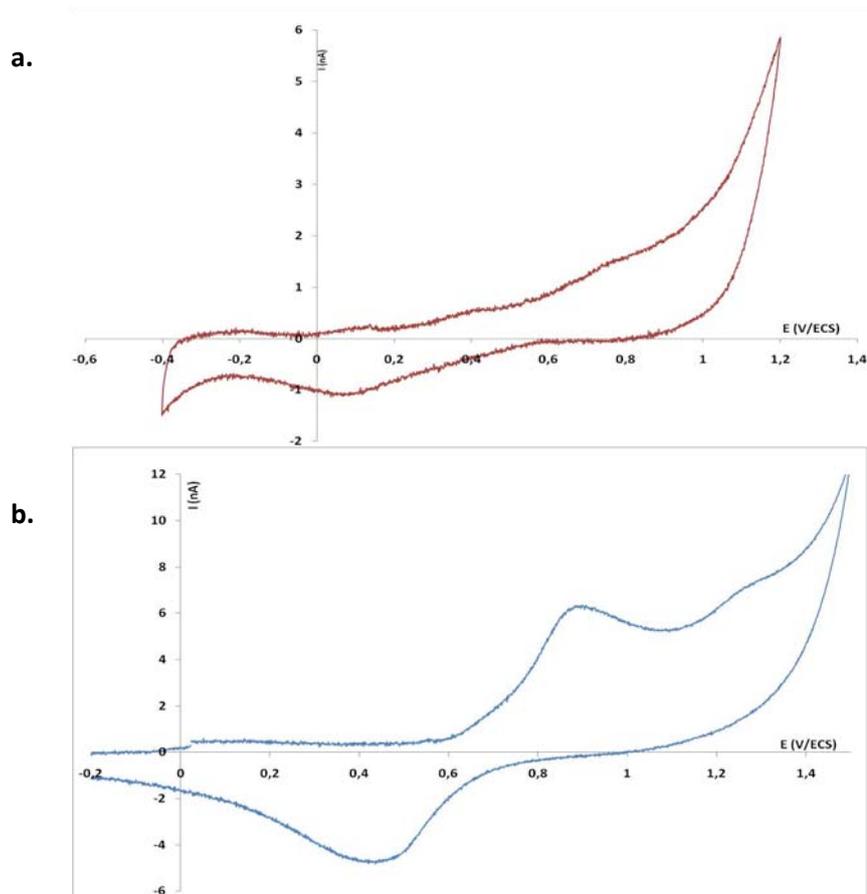


Figure II-13 : Voltammogrammes cycliques réalisés à la surface de l'épiderme avec une microélectrode intégrée en platine (a) ; avec une microélectrode intégrée en or (b). Vitesse de balayage : $10\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Les origines des phénomènes électrochimiques observés sur les microélectrodes d'or définies par une couche de polymère SU-8 de 900 nm d'épaisseur, doivent être déterminées pour permettre un rédeveloppement cohérent du processus de structuration de cette couche d'isolation. Une étude plus spécifique de la structure Si/Pt/Au/SU-8 2000.5 a donc été démarrée pour déterminer les raisons de cette activité électrochimique parasite.

III. Etude de l'activité électrochimique parasite

Les questions auxquelles tente de répondre cette partie sont les suivantes : la dégradation de la couche d'isolation au cours de la réticulation (et/ou au cours des cycles de balayages) ou/et l'activité chimique ou électrochimique de la SU-8 seraient-elles responsables des phénomènes électrochimiques observés sur une microélectrode d'or définie par une couche de polymère de 900 nm ?

A. Comportement électrochimique du titane

Si l'intensité importante observée avec une microélectrode d'or est la conséquence d'une dégradation de la couche de polymère, les sous-couches de l'or peuvent alors réagir avec le milieu d'étude. Le dépôt d'or a été réalisé sur des couches d'accroche métalliques titane/platine. Si la

couche d'isolation est perméable aux solutions d'étude, l'ensemble de ces matériaux métalliques peut réagir avec ce milieu. Les voltammogrammes cycliques du platine dans une solution d'acide sulfurique et d'hexacyanoferrate III sont connus. Ainsi, afin de vérifier si le titane sous-jacent des dépôts métalliques n'est pas responsable de certains phénomènes rédox, des microélectrodes en titane ont été réalisées avec le même processus de fabrication.

Le voltammogramme obtenu avec une électrode de titane dans une solution d'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, à une vitesse de balayage de 50 mV.s^{-1} est présenté à la Figure III-1 – a.

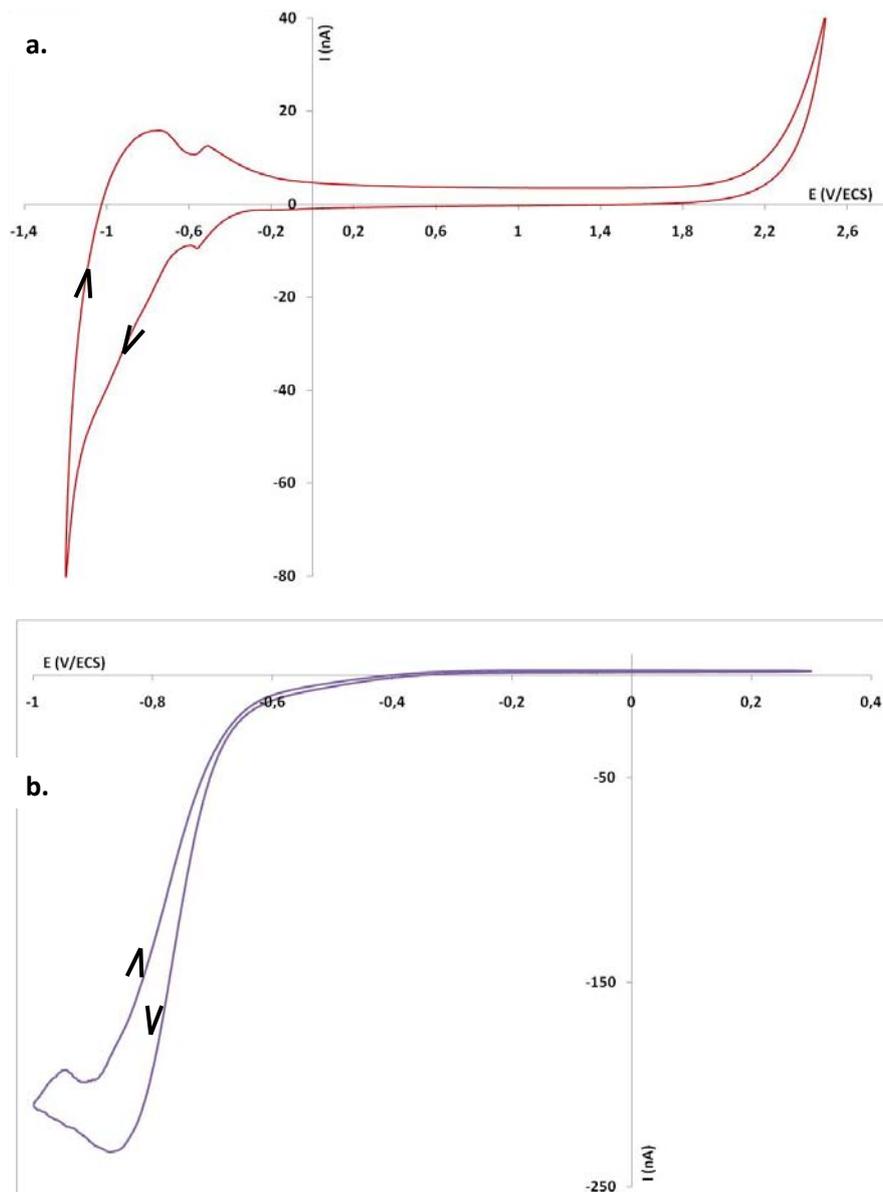


Figure III-1 : Voltammogrammes cycliques réalisés avec une microélectrode de titane dans une solution d'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ (a) et dans une solution d'hexacyanoferrate III à 5 mmol.L^{-1} (b). Vitesse de balayage : 50 mV.s^{-1}

Une exponentielle est visible en oxydation, à partir de $1,8 \text{ V/ECS}$ et deux pics anodiques vers $-0,74 \text{ V}$ et $-0,51 \text{ V/ECS}$. En réduction, un pic, d'intensité maximale mesurée à $-0,57 \text{ V/ECS}$ suivi d'une vague qui présente un petit épaulement vers $-0,8 \text{ V/ECS}$ apparaissent. L'oxydation observée à partir de $-1,0 \text{ V/ECS}$ correspond à la croissance d'un film d'oxyde uniforme à la surface de l'électrode,

principalement du TiO_2 , inhibant la dissolution du titane: $\text{Ti} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{TiO}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$. Lors de cette première oxydation, Ti_2O_3 peut être également formé. Mais cette espèce est instable en solution et est rapidement oxydée en TiO_2 : $\text{Ti}_2\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{TiO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ (Marino *et al.*, 2001 ; De Souza et Robin, 2007). Cette réaction est peut-être à mettre en lien avec le second pic observé à $-0,57$ V/ECS. Dans la fenêtre d'étude de l'or dans l'acide sulfurique, définie entre $1,6$ V et $-0,3$ V, le titane ne peut donc apporter aucun phénomène rédox supplémentaire à l'oxydation de l'or et la réduction des oxydes d'or théoriquement visibles dans cette plage de potentiel.

De même, les voltammogrammes réalisés avec les mêmes électrodes de titane dans une solution d'hexacyanoferrate III à 5 mmol.L^{-1} , ne présentent pas de signaux d'oxydo-réduction entre $-0,6\text{V}$ et $0,3\text{V/ECS}$ (Figure III-1, b). Une vague de réduction est observable à partir de $-0,5\text{V/ECS}$. Les phénomènes observés sur le titane ne peuvent donc pas interférer dans les réactions d'oxydo-réduction qui ont lieu sur l'or.

B. Electroactivité du polymère époxy SU-8

Afin de connaître les propriétés électrochimiques du polymère époxy SU-8 ou de l'un de ces constituants, des études ont été directement menées dans la solution organique SU-8 2000.5 fournie par Microchem. Cette solution commerciale utilisée pour créer la couche d'isolation sur les microdispositifs a été étudiée par voltammétrie cyclique sur électrodes en or massif.

Une première série de voltammogrammes tracée avec différentes fenêtres de potentiels balayés sur la même électrode d'or dans la solution commerciale sont présentés à la Figure III-2.

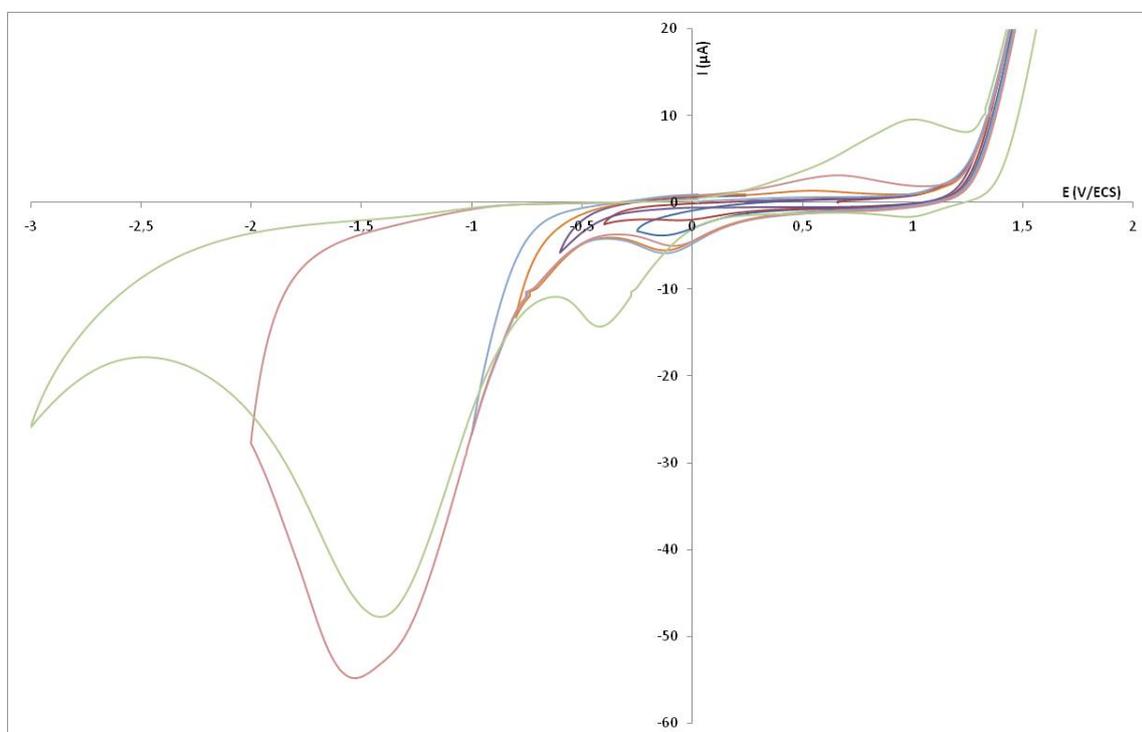


Figure III-2 : Voltammogrammes cycliques réalisés avec une électrode d'or dans une la solution commerciale de SU-8 2000.5, sur différentes plages de potentiels

Ces cycles mettent en évidence le domaine d'électroactivité de l'or dans la solution de SU-8 2000.5. Les cycles présentent en oxydation un courant croissant de manière exponentielle visible à partir de 1 V/ECS. La forme de cette vague n'évolue pas au cours des différents balayages. En réduction, le cycle tracé entre -0,25 V et 1,5 V/ECS présente une vague de très faible intensité à 0,4 V avec un palier de diffusion mesurable vers 0,15 V/ECS. Cette vague est suivie d'un pic, qui débute vers 0,08 V/ECS et qui présente un maximum vers -0,1 V/ECS. La distinction entre cette vague et ce pic n'est pas toujours visible. Une dernière vague de réduction est observable dès -0,32 V/ECS. Il s'agit d'un pic de très forte intensité observable dans sa totalité lorsque le potentiel atteint -2,5 V/ECS. Lorsque de tels potentiels sont atteints, un pic d'oxydation est visible vers 1 V.

Le pic en réduction détecté à partir de 0,4V/ECS est clairement visible sur un domaine de balayage compris entre -0,5V et 1,5V/ECS mais disparaît lorsque la fenêtre en oxydation s'arrête à 1,3V au cours des cycles suivants (Figure III-3). D'après le mécanisme de greffage présenté à la Figure II-10, la réduction du sel de triarylsulfonium pourrait avoir lieu à 0,2V/ECS et les sites greffés ne sont alors plus actifs. Si le potentiel atteint 1,5V/ECS, l'oxydation des produits adsorbés a lieu, libérant ainsi les sites occupés par les groupements phényles.

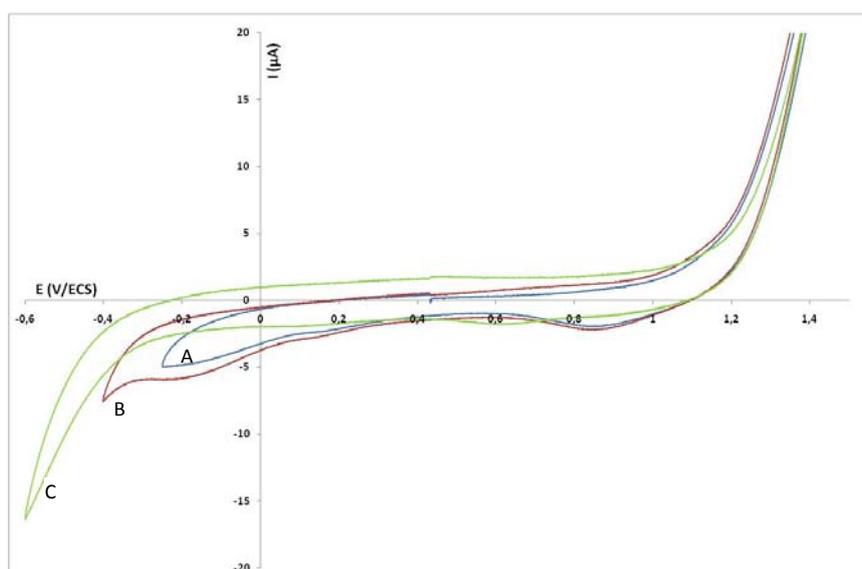


Figure III-3 : Voltammogrammes cycliques réalisés avec une électrode d'or dans une la solution commerciale de SU-8 2000.5. Borne de potentiels : de -0.25V à 1,5V/ECS (A), de -0.4V à 1,5V/ECS (B), de -0.6V à 1.4V/ECS (C)

Après l'apparition du pic à -0,1V/ECS, le cycle suivant est réalisé en portant le potentiel à 1,4V/ECS, l'intensité de la vague de réduction est alors plus faible. Mais quand la borne supérieure est fixée à 1,6V/ECS, cette vague apparait de nouveau et est plus intense si l'électrode atteint au minimum un potentiel de -0,8V/ECS, potentiel auquel démarre clairement le pic de réduction intense. Ceci semble confirmer que le pic en réduction à -0,1V/ECS pourrait correspondre à la réduction du sel de triarylsulfonium et à l'électrogreffage des radicaux phényles qui pourraient être désorbés à partir de 1,5V/ECS.

Pour vérifier que ces réductions sont liées aux constituants de la solution commerciale et non au matériau d'électrode, la solution commerciale de SU-8 2000.5, de concentration C, a été diluée dans de la cyclopentanone, solvant du polymère. Trois concentrations ont été préparées : dilution à 1/2, à 1/3 et à 1/6. Les voltammogrammes tracés dans ces différentes solutions avec une électrode d'or, à

une vitesse de balayage de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ sont présentés à la Figure III-4. Le domaine de potentiel est compris entre $-0,6 \text{ V}$ et $1,6 \text{ V/ECS}$.

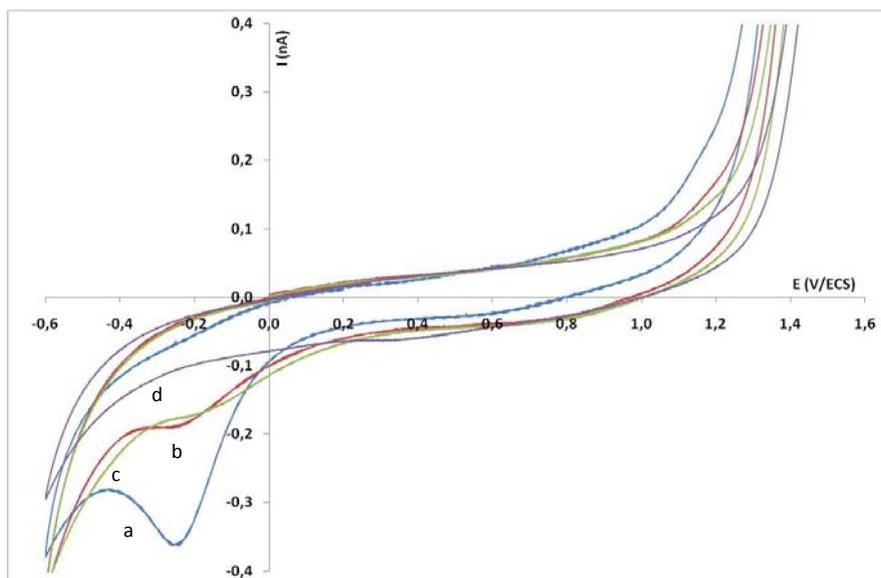


Figure III-4 : Influence de la concentration de la solution commerciale de SU-8 2000.5. Vitesse de balayage : $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.
(a) C, (b) C/2, (c) C/3, (d) C/6

Les voltammogrammes tracés dans la solution non diluée C et diluée à 1/2 et 1/3 présentent un pic de réduction relativement large qui démarre vers $0,1 \text{ V/ECS}$ et qui atteint une intensité maximale vers $-0,23 \text{ V/ECS}$. Ce pic est clairement marqué pour la concentration initiale de la solution commerciale mais son intensité décroît très rapidement après dilution. Cette réduction n'est plus visible pour la solution C/6. Ce pic est donc directement lié à un des constituants de la solution commerciale et peut conforter que cette réduction est peut-être celle du sel de triarylsulfonium. Si c'est le cas, le traitement par voltammétrie cyclique dans cette solution de SU-8 a greffé à la surface de l'or un film de radicaux phényles, comme le montre le schéma réactionnel Figure II-10.

Des voltammogrammes cycliques ont été obtenus dans une solution d'acide sulfurique avant et après les balayages de potentiel dans la solution commerciale de SU-8 (Figure III-5). Quelque soit le facteur de dilution, le premier cycle présente une vague d'oxydation qui démarre au même potentiel que l'oxydation de l'or, vers 1 V/ECS . Cette vague ne laisse pas apparaître les pics d'oxydation du matériau d'électrode et aucun palier n'est visible. L'intensité ne cesse d'augmenter de manière exponentielle et rejoint directement la vague d'oxydation du solvant. Au cycle retour, le pic de réduction des oxydes d'or est visible à un potentiel semblable à celui avant traitement. Les cycles suivants semblent permettre de nouveau d'observer les pics d'oxydation de l'or mais avec des intensités plus importantes.

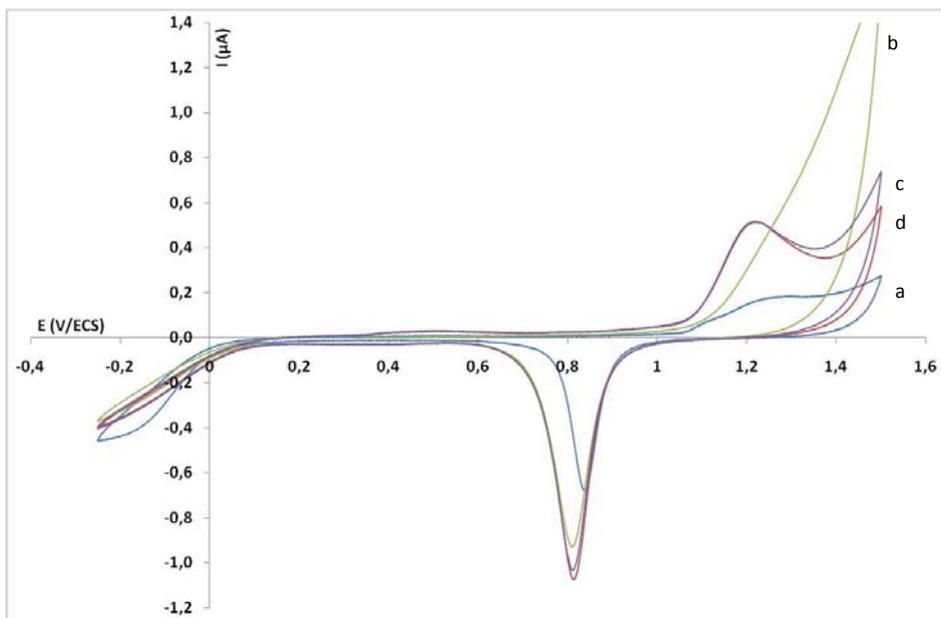


Figure III-5 : Voltammogrammes cycliques sur une électrode d'or dans une solution d'acide sulfurique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ avant (a) et après traitement dans la solution de SU-8 non diluée : 1^{er} cycle (b), 2^{ème} cycle (c), 3^{ème} cycle (d). Vitesse de balayage : 50 mV.s^{-1} .

La surface de l'électrode d'or a donc été modifiée par le balayage en potentiel dans la solution de SU-8. Les voltammogrammes tracés ensuite avec les mêmes électrodes dans une solution d'hexacyanoferrate III à 5 mmol.L^{-1} sont présentés à la Figure III-6.

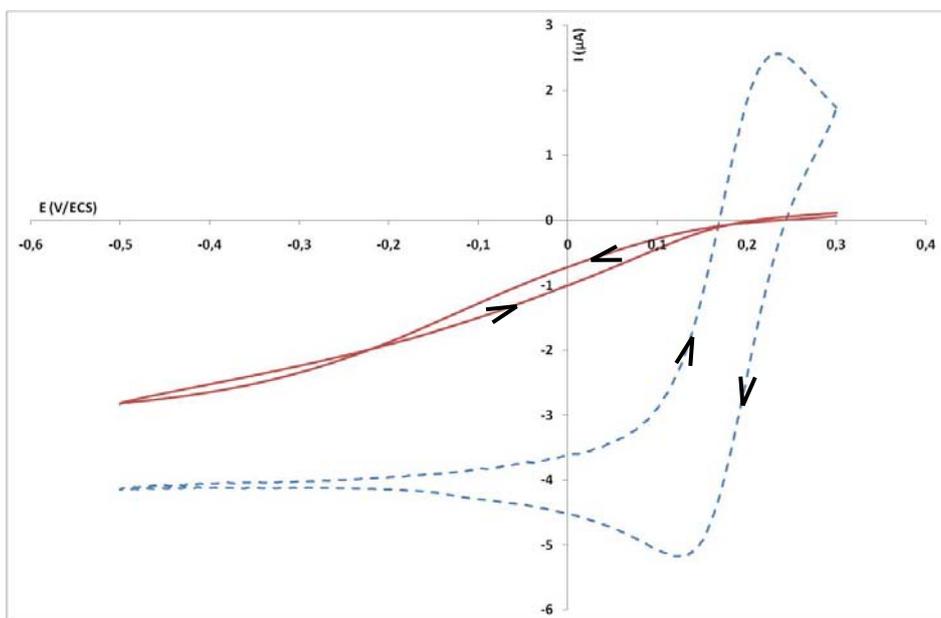


Figure III-6 : Voltammogrammes cycliques réalisés avec une électrode d'or dans une solution d'hexacyanoferrate III à 5 mmol.L^{-1} avant (---) et après traitement dans la solution de SU-8 (—). Vitesse de balayage : 50 mV.s^{-1} .

Les balayages effectués dans la solution d'acide sulfurique ne permettent pas de retrouver une surface d'or comparable à celle du matériau nu. La vague de réduction de l'hexacyanoferrate III est moins intense que celle observée avant l'étude en solution organique de SU-8. De plus, la cinétique de la vague est moins importante que celle obtenue avec une électrode d'or nue et le palier de

diffusion n'est pas observable. Ces deux dernières constatations sont similaires à celles observées sur les voltammogrammes avec les microélectrodes définies avec une couche de 900nm.

Pour valider et affiner les hypothèses posées sur la formation de couches adsorbées sur les électrodes d'or, des études spectroscopiques telles que des études XPS et SIMS pourraient permettre d'identifier clairement les groupements adsorbés ainsi que les liaisons formées.

Dans certaines conditions et formulations, la résine époxy SU-8 présente une électroactivité. Celle-ci est incompatible avec les objectifs fixés : seuls les matériaux d'électrodes doivent réagir avec les molécules d'intérêt. Le processus de réticulation et la composition chimique de la solution de SU-8 doivent donc être étudiés plus en détail afin de proposer un développement technologique permettant de structurer un matériau isolant non électroactif.

C. Influence des paramètres de réticulation

Les paramètres de réticulation liés à la formulation de la résine SU-8 semblent influencer le caractère électroactif de ce matériau. Le processus de réticulation proposé pour une résine SU-8 de 3 μm a permis d'obtenir un matériau isolant inerte et les microélectrodes définies par ce film présentent de bonnes caractéristiques électrochimiques. Si la résine mise en œuvre ici (formulation 2000.5) n'a pas été totalement dépourvue de son solvant, ses constituants peuvent diffuser à la surface de l'électrode et les caractérisations des microélectrodes réalisées en solution aqueuse se font en réalité également dans la matrice polymère, occasionnant les interférences électrochimiques observées. Les différents paramètres évoqués au chapitre II, tels que la dose d'insolation et la température de recuit, peuvent tous être étudiés. Mais c'est la dernière étape d'évaporation du solvant et de solidification de la résine qui nous intéresse ici. L'influence de la température de recuit après l'étape de révélation a donc été analysée à l'aide de mesures spectroscopiques en infrarouge à transformée de Fourier, FT-IR.

1. Etude FTIR

Les composés admettant de petits cycles époxy absorbent généralement dans les domaines de nombres d'onde 1280-1230 cm^{-1} , 950-815 cm^{-1} et 880-750 cm^{-1} . Les études plus ciblées sur les résines époxy montrent que, lorsque la résine polymérise, les pics de vibration liés à l'élongation de la liaison C-O du groupe époxy, situés vers 912 cm^{-1} et 860 cm^{-1} , disparaissent (Rath *et al.*, 2004 ; Keller *et al.*, 2008 ; Tan *et al.*, 2004).

Cinq plaquettes de silicium ont donc été enduites de SU-8 2000.5 pour une épaisseur de 850 nm. Une plaque référence est arrêtée à cette étape et maintenue dans l'obscurité. Les quatre autres plaquettes subissent le même processus de réticulation jusqu'à l'étape de développement. Seules trois plaques font l'objet ensuite d'un recuit. Les températures sont 110°C, 150°C et 200°C. Les spectres obtenus sont présentés à la Figure III-7. Les pics à 912 et 864 cm^{-1} disparaissent avec le recuit post-développement. La réticulation semble donc être effective à l'étape de développement. Les spectres ne paraissent pas être révélateurs de grandes modifications liées à la température de recuit. Le seul effet clairement visible est l'apparition et l'augmentation de l'intensité du pic à 1724 cm^{-1} avec la température. Ce pic peut être lié à une dégradation de la résine (Ollier-Duréault et Gosse, 1998).

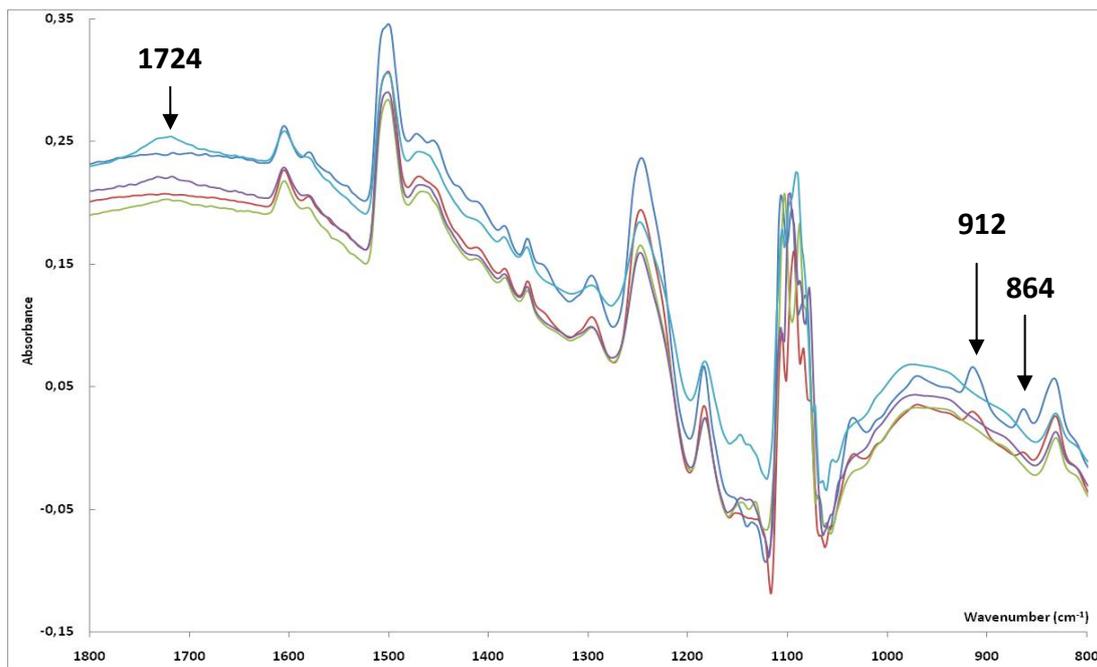


Figure III-7 : Spectre FT-IR d'un film SU-8 de 850nm d'épaisseur : SU-8 non insolée (—), SU-8 insolée et développée (—), SU-8 insolée, développée et recuite à 110°C (—), à 150°C (—), à 200°C (—)

2. Etude électrochimique

Si l'influence de la température n'est pas très appréciable sur les spectres infrarouge, elle est un peu plus visible sur les voltammogrammes réalisés avec une microélectrode d'or définie par une couche d'isolation de 850 nm recuite à 150 °C au lieu de 110 °C. Les voltammogrammes tracés dans une solution d'acide sulfurique à 0,5 mol.L⁻¹ (Figure III-8 a), présentent une vague d'oxydation et un pic de réduction de plus grande intensité par rapport à ceux obtenus avec une microélectrode dont la couche de polymère a été recuite à 110 °C (Figure II-6 b). De plus, un pic de réduction est visible vers 0,4 V. L'élévation de la température de recuit a pu fragiliser les liaisons entre la couche adsorbée et l'or. Lorsque le potentiel atteint le potentiel d'oxydation de l'or ou du solvant, la couche se désorbe et se réadsorbe au cycle retour. Le pic à 0,4V est peut-être lié à la réduction des oxydes de platine si la dégradation amène les sous-couches à réagir avec les solutions d'études. Il est peut-être également lié à la réduction du sel de triarylsulfonium.

Le voltammogramme tracé dans la solution de d'hexacyanoferrate III avec une microélectrode d'or définie par une couche recuite à 150 °C présente également des différences majeures de celui obtenu dans les mêmes conditions avec une résine recuite à 110 °C. Ici, dès 0,2 V/ECS, la vague de réduction démarre et est rapide. Un palier de diffusion est observable à partir de 0 V/ECS. Une seconde vague de réduction apparaît vers -0,5 V/ECS. Au cycle retour, l'intensité du palier mesurée à -0,2 V/ECS est légèrement plus grande que celle du cycle aller. Ce comportement est à rapprocher de celui observé à la Figure II-9 : l'électrode semble exempte de couches adsorbées mais la réaction de réduction qui pourrait être celle du sel de triarylsulfonium a toujours lieu, après celle de l'hexacyanoferrate III.

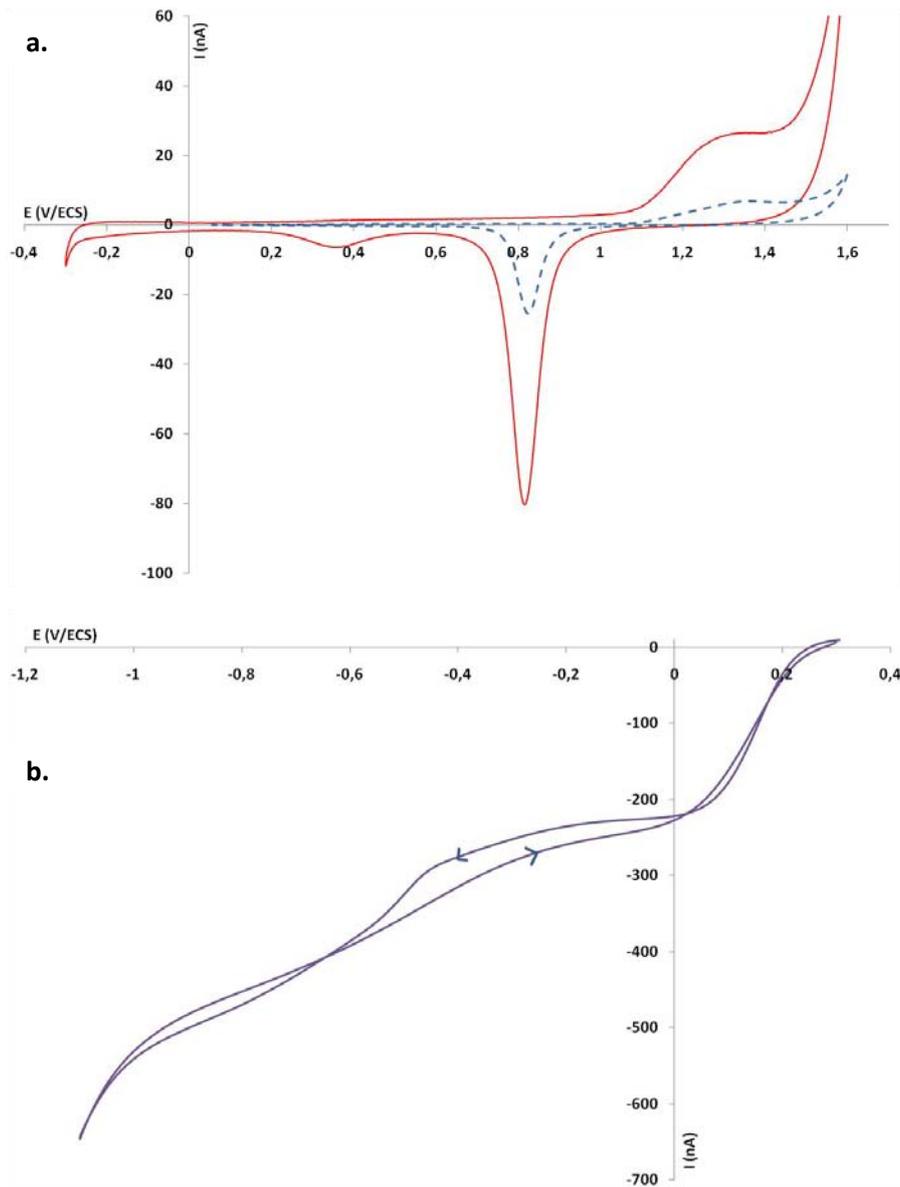


Figure III-8 : Voltammogrammes cycliques réalisés avec une microélectrode d'or définie par une couche isolante de 850 nm recuite à 150 °C (—) et à 110 °C (---), dans une solution d'acide sulfurique à 0,5 mol.L⁻¹ à 50 mV.s⁻¹ (a), dans une solution d'hexacyanoferrate III à 5 mmol.L⁻¹ à 10 mV.s⁻¹ (b)

D'autres méthodes peuvent être utilisées pour contrôler la polymérisation, comme la calorimétrie différentielle à balayage, DSC (Ramirez *et al.*, 2008). Cette technique détecte les effets endothermiques et exothermiques qui sont liés à des changements d'états ou à des réactions chimiques. Mais elle n'est pas simplement disponible au LAAS et n'a pas pu être mise en oeuvre dans le cadre de mes travaux de thèse.

Conclusion

La couche d'isolation de 900 nm d'épaisseur présente une électroactivité influencée par les paramètres de structuration, notamment par la température de recuit. Une meilleure connaissance des matériaux et particulièrement du matériau isolant permettra d'obtenir des microélectrodes intégrées dont le comportement électrochimique est similaire à celui des métaux purs. Cette connaissance nécessite des études physico-chimiques approfondies et notamment d'électroactivité.

Les paramètres de structuration mis en place au cours de ces travaux, pour une épaisseur de 900 nm, ont permis d'obtenir quelques microélectrodes en platine présentant de bonnes caractéristiques électrochimiques. Ces résultats ponctuels laissent entrevoir une possible optimisation pour réaliser ce type de microélectrodes. L'élaboration de telles couches d'isolation sur l'or, à l'aide de la résine époxy SU-8 2000.5, reste problématique et ne permet pas actuellement, pour ce matériau d'électrode, une détection électrochimique fiable. Or, la mise en place d'un film mince isolant pour définir les microélectrodes semble être la condition sine qua non pour réaliser des mesures directement sur la peau. Elle doit donc être redéveloppée afin de présenter une bonne inertie chimique. D'autres alternatives sont envisageables : la mise en place d'un autre matériau isolant et/ou la modification de certaines étapes technologiques. Des polymères, comme les polyimides, pourraient être utilisés pour remplacer la résine époxy SU-8. En effet, ses propriétés semblent correspondre à notre cahier des charges : biocompatibilité, isolant diélectrique et possibilité de développer des films minces (Cheung *et al.*, 2007). Des microélectrodes de type aiguilles peuvent être également envisagées : la société Blackrock Microsystems commercialise des réseaux de microélectrodes de type aiguille et Zhou *et al.* (2009) proposent une procédure de fabrication pour des microélectrodes de type pointe. Cette technique de réalisation pourrait être appliquée pour proposer un dispositif électrochimique à trois électrodes (travail, auxiliaire et référence) non plus encastrées, mais protubérantes.

Bibliographie

- Ambrosi A., Morrin A., Smyth M.R. et Killard A.J. (2008). The application of conducting polymer nanoparticle electrodes to the sensing of ascorbic acid. *Anal. Chim. Acta*, 609, 37-43.
- Arrigoni O. et De Tullio M.C. (2002). Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim. Biophys. Acta*, 1569, 1-9.
- Aycicek A., Iscan A., Erel O., Akcali M. et Selek S. (2006). Total antioxidant/oxidant status in meningism and meningitis. *Pediatr. Neurol.*, 35 (6), 382-386.
- Bard A. et Faulkner L. (2001). *Electrochemical methods : fundamentals and applications*, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Boots A.W., Drent M., Swennen E.L.R., Moonen H.J.J., Bast A. et Haenen G.R.M.M. (2009). Antioxidant status associated with inflammation in sarcoidosis: A potential role for antioxidants. *Resp. Med.*, 103, 364-372.
- Březina M., Koryta J., Loučka T. et Maršíková D. (1972). Adsorption and kinetics of oxidation of ascorbic acid at platinum electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, 40, 13-17.
- Chen Z.L. et Yu J.C. (1999). Potentiometric detection of ascorbate using a graphite carbon electrode. *Talanta*, 49, 661-665.
- Chepda T., Perier C., Chamson A. et Frey J. (1999). Effets pro- et antioxydants de l'ascorbate. *Nutr. Clin. Métabol.*, 13, 115-120.
- Cheung K.C., Renaud P., Tanila H. et Djupsund K. (2007). Flexible polyimide microelectrode array for in vivo recordings and current source density analysis. *Biosens. Bioelectron.*, 22, 1783-1790.
- Chevion S., Roberts M.A. et Chevion M. (2000). The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. *Free Radical Biol. Med.*, 28, 860-870.
- Civit L., Fragoso A. et O'Sullivan C.K. (2010). Thermal stability of diazonium derived and thiol-derived layers on gold for application in genosensors. *Electrochem. Commun.*, 12, 1045-1048.
- Cognard J. (1984). Adhesion to gold : a review. *Gold Bull.*, 17, 131-139.
- Colichman E.L. et Love D.L. (1953). Polarography of sulfonium salts. *J. Org. Chem.*, 18, 40-46.
- Davies M. B., Austin J. et Partridge D.A. (1991). *Vitamin C: Its chemistry and biochemistry*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- De Souza K.A. et Robin A. (2007). Influence of concentration and temperature on the corrosion behavior of titanium, titanium-20 and 40% tantalum alloys and tantalum in sulfuric acid solutions. *Mater. Chem. Phys.*, 103, 351-360.
- Deakin M.R., Kovach P.M., Stutts K.J. et Wightman R.M. (1986). Heterogeneous mechanisms of the oxidation of catechols and ascorbic acid at carbon electrodes. *Anal. Chem.*, 58, 1474-1480.
- Dryhurst G. (1974). Electrochemical oxidation of some biologically-important purines. Relationship to biochemistry of purines. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1, 49-66.
- Ernst H. et Knoll M. (2001). Electrochemical characterisation of uric acid and ascorbic acid at a platinum electrode. *Anal. Chim. Acta*, 449, 129-134.
- Fei J., Luo L., Hu S. et Gao Z. (2004). Amperometric determination of ascorbic acid at an electrodeposited redox polymer film modified gold electrode. *Electroanalysis*, 16, 319-323.

- Goyal R.N., Brajter-Toth A. et Dryhurst G. (1982a). Further insights into the electrochemical oxidation of uric acid. *J. Electroanal. Chem.*, 131, 181-202.
- Goyal R.N., Brajter-Toth A., Dryhurst G. et Nguyen N.T. (1982b). A comparison of the peroxidase-catalysed and electrochemical oxidation of uric acid. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 9, 39-60.
- Hinoue T., Kuwamoto N. et Watanabe I. (1999). Voltammetry using an electrode surface continuously renewed by laser ablation and its demonstration on electro-oxidation of L-ascorbic acid. *J. Electroanal. Chem.*, 466, 31-37.
- Izumi T., Xatanabe I. et Yokoyama Y. (1991). Activation of a gold electrode by electrochemical oxidation-reduction pretreatment in hydrochloric acid. *J. Electroanal. Chem.*, 303, 151-160.
- Jinnah H.A. (2009). Lesch-Nyhan disease: from mechanism to model and back again. *Dis. Model. Mech.*, 2, 116-121.
- John S.A. (2005). Simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid using glassy carbon electrodes in acetate buffer solution. *J. Electroanal. Chem.*, 579, 249-256.
- Kannan P. et John S.A. (2009). Determination of nanomolar uric and ascorbic acids using enlarged gold nanoparticles modified electrode. *Anal. Biochem.*, 386, 65-72.
- Karabinas P. et Jannakoudakis D. (1984). Kinetic parameters and mechanism of the electrochemical oxidation of L-ascorbic acid on platinum electrodes in acid solutions. *J. Electroanal. Chem.*, 160, 159-167.
- Kashyap M.K., Yadav V., Sherawat B.S., Jain S., Kumari S., Khullar M., Sharma P.C. et Nath R. (2005). Different antioxidants status, total antioxidant power and free radicals in essential hypertension. *Mol. Cell. Biochem.*, 277, 89-99.
- Keller S., Blagoi G., Lillemose M., Haefliger D. et Boisen A. (2008). Processing of thin SU-8 films. *J. Micromech. Microeng.*, 18, 1-10.
- Kohen R., Vellaichamy E., Hrbac J., Gati I. et Tirosh O. (2000). Quantification of the overall reactive oxygen species scavenging capacity of biological fluids and tissues. *Free Radical Biol. Med.*, 28, 871-879.
- Kostelitz M. et Oudar J. (1971). Etude thermodynamique et structurale de l'adsorption dans le système or-soufre. *Surf. Sci.*, 27, 176-190.
- Lamy-Pitara E. et Barbier J. (1986). Adsorption du soufre sur l'or en milieu acide. *Electrochim. Acta*, 31, 717-721.
- Luo Y.C., Do J.S. et Liu C.C. (2006). An amperometric uric acid biosensor based on modified Ir-C electrode. *Biosens. Bioelectron.*, 22, 482-488.
- Marino C.E.B., De Oliveira E.M., Rocha-Filho R.C. et Biaggio S.R. (2001). On the stability of thin-anodic-oxide films of titanium in acid phosphoric media. *Corros. Sci.*, 43, 1465-1476.
- Marsh H.A. et Dryhurst G. (1979). Enzymatic and electrochemical oxidation of uric acid - A mechanism for the peroxidase catalysed oxidation of uric acid. *J. Electroanal. Chem.*, 95, 81-90.
- Miah M.R., Alam M.T. et Ohsaka T. (2010). Sulfur-adlayer-coated gold electrode for the in vitro electrochemical detection of uric acid in urine. *Anal. Chim. Acta*, 669, 75-80.
- Nassef H.M., Radi A.E. et O'Sullivan C. (2007). Simultaneous detection of ascorbate and uric acid using a selectively catalytic surface. *Anal. Chim. Acta*, 583, 182-189.
- Ollier-Dur eault V. et Gosse B. (1998). Photo-oxidation and electrical aging of anhydride-cured epoxy resins. *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul.*, 5, 935-943.

- Owens J.L., Marsh H.A. et Dryhurst G. (1978). Electrochemical oxidation of uric acid and xanthine - An investigation by cyclic voltammetry, double potential step chronoamperometry and thin-layer spectroelectrochemistry. *J. Electroanal. Chem.*, *91*, 231-247.
- Pailler-Mattei C., Nicoli S., Pirot R., Vargiolu R. et Zahouani H. (2009). A new approach to describe the skin surface physical properties in vivo. *Colloids Surf., B*, *68*, 200-206.
- Pisoschi A.M., Danet A.F. et Kalinowski S. (2008). Ascorbic acid determination in commercial fruit juice samples by cyclic voltammetry. *J. Autom. Methods Manage. Chem.*, 1-8.
- Premkumar J. et Khoo S.B. (2005). Electrocatalytic oxidations of biological molecules (ascorbic acid and uric acids) at highly oxidized electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, *576*, 105-112.
- Raj C.R. et Ohsaka T. (2003). Voltammetric detection of uric acid in the presence of ascorbic acid at a gold electrode modified with a self-assembled monolayer of heteroaromatic thiol. *J. Electroanal Chem.*, *540*, 69-77.
- Ramirez C., Rico M., Torres A., Barral L., Lopez J. et Montero B. (2008). Epoxy/POSS organic-inorganic hybrids: ATR-FTIR and DSC studies. *Eur. Polym. J.*, *44*, 3035-3045.
- Rath S.K., Boey F.Y.C. et Abadie M.J.M. (2004). Cationic electron-beam curing of a high-functionality epoxy: effect of post-curing on glass transition and conversion. *Polym. Int.*, *53*, 857-862.
- Rueda M., Aldaz A. et Sanchez-Burgos F. (1978). Oxidation of L-ascorbic acid on a gold electrode. *Electrochim. Acta*, *23*, 419-424.
- Ruffien-Ciszak A. (2005). Potentialités des microélectrodes pour une évaluation directe et non invasive des propriétés antioxydantes du *stratum corneum*. Thèse de l'Université Paul Sabatier - Toulouse III.
- Ruiz J.J., Aldaz A. et Domínguez M. (1977). Mechanism of L-ascorbic acid oxidation and dehydro-L-ascorbic acid reduction on a mercury electrode. I. Acid medium. *Can. J. Chem.*, *55*, 2799-2806.
- Saeva F.D. et Morgan B.P. (1984). Mechanism of one-electron electrochemical reductive cleavage reactions of sulfonium salts. *J. Am. Chem. Soc.*, *106*, 4121-4125.
- Sekli-Belaidi F., Temple-Boyer P. et Gros P. (2010). Voltammetric microsensor using PEDOT modified gold electrode for the simultaneous assay of ascorbic and uric acids. *J. Electroanal. Chem.*, *647*, 159-168.
- Shi K. et Shiu K.K. (2001). Determination of uric acid at electrochemically activated glassy carbon electrode. *Electroanalysis*, *13*, 1319-1325.
- Spitsin S.V., Scott G.S., Mikheeva T., Zborek A., Kean R.B., Brimer C.M., Koprowski H. et Hooper D.C. (2002). Comparaison of uric acid and ascorbic acid in protection against EAE. *Free Radical Biol. Med.*, *33*, 1363-1371.
- Sullivan A.M. et Kohl P.A. (1998). Electro-oxidation of ascorbic acid in an aqueous citrate buffer solution. *Plat. Surf. Finish.*, *85*, 56-60.
- Tan T.L., Wong D., Lee P., Rawat R.S. et Patran A. (2004). Study of a chemically amplified resist for X-ray lithography by Fourier transform infrared spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, *58*, 1288-1294.
- Tur'yan Y.I. et Kohen R. (1995). Formal redox potentials of dehydro-L-ascorbic acid / L-ascorbic acid system. *J. Electroanal. Chem.*, *380*, 273-277.
- Vase K.H., Holm A.H., Norrman K., Pedersen S.U. et Daasbjerg K. (2008). Electrochemical surface derivatization of glassy carbon by the reduction of triaryl- and alkyldiphenylsulfonium salts. *Langmuir*, *24*, 182-188.

- Wang L., Bai J.Y., Huang P.F., Wang H.J., Wu X.W. et Zhao Y.Q. (2007). Selective determination of uric acid in the presence of ascorbic acid using a penicillamine self-assembled gold electrode. *Microchim. Acta*, 158, 73-78.
- Xiao L., Chen J. et Cha C.S. (2000). Elimination of the interference of ascorbic acid in the amperometric detection of biomolecules in body fluid samples and the simple detection of uric acid in human serum and urine by using the powder microelectrode technique. *J. Electroanal. Chem.*, 495, 27-35.
- Xing X., Shao M., Hsiao M.W., Adzic R.R. et Liu C.C. (1992a). Structural effects in electrocatalysis: electro-oxidation of L-ascorbic acid on single-crystal gold surfaces. *J. Electroanal. Chem.*, 339, 211-225.
- Xing X., Tan T.C., Shao M. et Liu C.C. (1992b). Electrochemical oxidation of L-ascorbic acid at the graphite electrode and its monitoring by a thick-film graphite sensor assembly. *Electoanalysis*, 4, 191-197.
- Zei M.S., Nakai Y., Lehmpfuhl G. et Kolb D.M. (1983). The structure of gold and silver films evaporated on glass - A LEED and RHEED study. *J. Electroanal. Chem.*, 150, 201-208.
- Zhao Y., Bai J., Wang L., E X., Huang P., Wang H. et Zhang L. (2006). Simultaneous electrochemical determination of uric acid and ascorbic acid using L-cysteine self-assembled gold electrode. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 1, 363-371.
- Zhou H., Li G., Sun X., Zhu Z., Xu B., Jin Q., Zhao J. et Ren Q.S. (2009). A new process for fabricating tip-shaped polymer microstructure array with patterned metallic coatings. *Sens. Actuators, A*, 150, 296-301.

Conclusion générale

De nombreuses pathologies, de la sénescence précoce aux cancers cutanés, sont un réel problème de santé publique et présentent un enjeu économique pour les industries pharmaceutiques et dermo-cosmétiques qui développent une recherche active dans ce domaine. Ces maladies diverses ont un point commun : le stress oxydant. Il est donc indispensable d'en comprendre les mécanismes moléculaires pour proposer des outils de diagnostic, de prévention et des solutions thérapeutiques. Le Centre de Recherche sur la peau de Pierre Fabre Dermo-Cosmétique a pour mission principale d'identifier et de développer des techniques physico-chimiques afin de mieux comprendre les processus physiologiques impliqués dans le vieillissement de la peau, son inflammation, etc.... Les investigations favorisent la mise au point et l'utilisation en routine d'outils analytiques simples, fiables et peu onéreux. Ces exigences font écho à l'électrochimie et aux microtechnologies. Le Laboratoire de Génie Chimique a proposé une méthode électrochimique pour explorer le milieu cutané. La voltammétrie cyclique réalisée avec des microélectrodes permet de suivre directement à la surface de la peau et en temps réel l'état rédox du *stratum corneum*. S'appuyant sur compétences du Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes, la fabrication des microélectrodes, mise au point durant ces trois ans, a été rendue collective et reproductible.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis d'établir un protocole de production de microélectrodes intégrées « films minces » en or, en platine et en argent en utilisant les techniques de fabrication collective issues de la microélectronique, ainsi que les procédés d'encapsulation en résine époxy SU-8. Ils ont permis d'obtenir des caractéristiques électrochimiques comparables aux microélectrodes réalisées à partir de matériaux massifs. Des dispositifs électrochimiques miniaturisés, admettant une ultramicroélectrode de travail en or ou en platine, une microélectrode auxiliaire en platine et une microélectrode de référence Ag/AgCl, ont été réalisés. Les premiers tests ont montré que ce dispositif est capable de fonctionner de manière autonome : relié à un potentiostat, il est possible d'obtenir des réponses comparables à un montage électrochimique classique macroscopique. Les performances analytiques des microdispositifs Au-Pt-Ag/AgCl ont commencé à être explorées dans le cadre de l'analyse du stress oxydant. Il a ainsi été possible de détecter l'acide urique ou l'acide ascorbique en phase liquide et d'étendre cette détection pour l'analyse de la peau sans apport de liquides.

L'étude réalisée avec ces microélectrodes, dont les premiers résultats sont prometteurs, reste toutefois à être finalisée. Tout d'abord, la robustesse, la reproductibilité et la durée de vie de la microélectrode de référence intégrée Ag/AgCl doivent être évaluées en fonction des paramètres analytiques et du procédé de fabrication pour proposer, in fine, un capteur fiable. Ensuite, le champ de détection doit être étendu à un plus grand nombre de molécules antioxydantes (glutathion, cystéine, NADH,...). Cela permettra d'apprécier d'autant mieux la fonctionnalisation poly(3,4-éthylènedioxythiophène) (PEDOT) développée dans le cadre de la thèse de Fadhila Sekli réalisée en parallèle au Laboratoire de Génie Chimique, afin d'améliorer le capteur en termes de sélectivité et sensibilité. Cette modification de surface, réalisée par voie électrochimique, dont le potentiel analytique a été démontré sur des microélectrodes de fabrication manuelle, est aujourd'hui déjà testée sur nos microélectrodes intégrées et présente de bonnes perspectives d'amélioration. Le

procédé de fonctionnalisation associé devra être également réfléchi afin d'obtenir un traitement collectif des microélectrodes par électrodéposition dans le cadre des technologies « Silicium & Polymères ».

Mais, le véritable verrou est aujourd'hui lié au passage d'un milieu aqueux modèle à un milieu biologique réel. La peau représente un milieu complexe qu'il faut savoir appréhender d'un point de vue analytique, mécanique et structurel. La configuration des microélectrodes est un premier obstacle à la mise en contact du capteur à la surface de la peau. L'expérience semble démontrer que la structure du milieu cutané impose une très faible profondeur d'encastrement des microélectrodes, i.e. inférieure à 1,5 μm . Le choix du matériau s'est arrêté sur la résine époxy SU-8, dont les propriétés (isolation électrique, inertie chimique, biocompatibilité, etc.) et la facilité de structuration lui confèrent un véritable attrait. La stratégie de réticulation développée au cours de ces travaux, associée à la formulation SU-8 3005 pour une épaisseur de 3 μm , permet de fournir un dispositif fiable en solution. Mais cette procédure de polymérisation n'est pas adaptée à la formulation commerciale disponible pour des épaisseurs inférieures au micron: le film mince de l'encapsulation polymère modifie les réactions aux électrodes dans les solutions modèles. Le développement d'une couche d'isolation de faible épaisseur est donc aujourd'hui requis afin d'aboutir à un dispositif directement utilisable sur la peau. L'étude de l'influence des paramètres de réticulation ainsi qu'une étude « matériau » plus approfondie doit permettre de juger de la cohérence du matériau choisi avec l'application visée. Différentes voies d'amélioration sont possibles. Repenser le processus de fabrication des microélectrodes permettrait d'obtenir un relief mieux adapté à une détection en surface tout en conservant les optimisations développées pour une couche de 3 μm d'épaisseur. Une autre alternative est le choix du matériau lui-même. L'étude de la résine SU-8 2000.5 entamée dans cette thèse doit être poursuivie en cela. Cependant, d'autres polymères tels que les polyimides peuvent aussi répondre à notre cahier des charges : bonne isolation diélectrique, biocompatibilité, structuration collective en couches minces de faible épaisseur (inférieure à 1 micron). Une fois ces problèmes résolus, les performances analytiques des réseaux de microélectrodes pourront être étudiées.

Au-delà de ces considérations, pour diffuser au plus grand nombre la méthode électrochimique développée par le Laboratoire de Génie Chimique et les Laboratoires Pierre Fabre, la mise en place d'une structure électrochimique miniaturisée, fabriquée collectivement à bas coût, est la condition sine qua non et lui permettra alors, d'être présentée comme une méthode d'analyse de routine pour des applications grand-public liées à la santé et à la dermo-cosmétique... Ce futur dispositif permettra de plus de collecter un grand nombre d'informations sur les processus moléculaires du métabolisme cellulaire et sera sans doute une aide précieuse au développement de thérapies efficaces.

Principaux symboles

Symbole	Signification	Unité
a_i	activité de l'espèce i	<i>sans unité</i>
C_i	concentration de l'espèce i en solution	mol.cm ⁻³
d	distance inter-électrode	cm
D	coefficient de diffusion	cm ² .s ⁻¹
E	potentiel	V
E_{eq}	potentiel d'équilibre	V
E_i	potentiel de départ	V
$E_{(i=0)}$	potentiel à intensité nulle	V
E_p	potentiel de pic d'intensité	V

$E_{1/2}$	potentiel de demi-vague	V
E°	potentiel standard	V
$E^{\circ'}$	potentiel standard apparent	V
I	intensité	A
I_c	Courant capacitif	A
I_f	Courant faradique	A
I_{lim}	intensité limite	A
I_p	intensité du pic	A
I_0	courant d'échange	A
\dot{j}_i	densité de flux de l'espèce i	$\text{mol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$
k	constante cinétique	cm.s^{-1}

k^0	constante intrinsèque de vitesse de transfert électronique hétérogène	cm.s^{-1}
N	nombre de moles d'espèces formées ou réduites	mol
n	nombre d'électrons échangés	<i>sans unité</i>
Q	quantité de charge électrique	C
r	rayon de l'électrode	Ω
R_s	résistance de cellule	cm
S	surface de l'électrode	cm^2
T	température	K
t	temps	s

v	vitesse de balayage des potentiels	$V.s^{-1}$
z	nombre d'électrode	<i>sans unité</i>

Symbole	Signification	Unité
α	coefficient de transfert anodique	<i>sans unité</i>
β	coefficient de transfert cathodique	<i>sans unité</i>
δ	épaisseur de la couche de diffusion	cm
γ_i	coefficient d'activité de l'espèce \bar{i}	$cm^3.mol^{-1}$
η	surtension	V
ν_i	coefficient stœchiométrique correspondant à l'espèce \bar{i}	<i>sans unité</i>
ρ	résistivité	$\Omega^{-1}.cm$

Indices

Symbole	Signification
a	anodique
c	cathodique
el	à l'électrode
Ox	oxydant
Red	réducteur
sol	en solution

Constantes physiques

Symbole	Signification	Valeur
e	Charge élémentaire	$1,60218.10^{-19} C$
F	Constante de Faraday	$96\ 485 C.mol^{-1}$
R	Constante molaire des gaz parfaits	$8,314 J.mol^{-1}.K^{-1}$

Abréviations

Abréviation	Signification
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ALS	<i>Amyotrophic Lateral Sclerosis</i> (sclérose latérale amyotrophique)
AO	Amplificateur Opérationnel
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i> (syndrome de détresse respiratoire aiguë)
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i> (électrophorèse capillaire)
CVD	<i>Chemical Vapor Deposition</i> (dépôt chimique en phase vapeur)
E_A ou E_{aux}	Electrode auxiliaire
E_{ref}	Electrode de référence
E_W	Electrode de travail
ECS	Electrode au Calomel Saturée
ESH	Electrode Standard à Hydrogène
FRAP	<i>Ferric Reducing Ability of Plasma</i> (capacité de réduction des ions ferriques)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (chromatographie liquide haute performance)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (chromatographie gazeuse)
GSH	Glutathion
IRC	Insuffisance Rénale Chronique
LMWA	<i>Low Molecular Weight Antioxidant</i> (antioxydant à faible poids moléculaire)
MDA	MalonDiAldéhyde
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (spectrométrie de masse)
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (capacité d'adsorption des radicaux oxygénés)
PCL	Photo-ChimiLuminescence
PTR	<i>Proton Transfer Reaction</i> (réaction de transfert de proton)
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
PVD	<i>Physical Vapor Deposition</i> (dépôt physique en phase vapeur)
RIE	<i>Reactive Ion Etching</i> (Gravure ionique réactive)
ROO°	Radical peroxyde
ROOH	Hydroperoxydes
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (espèces réactives de l'oxygène)
SOD	SuperOxyde Dismutase
TBA	<i>ThioBarbituric Acid</i> (acide thiobarbiturique)
TBARS	<i>ThioBarbituric Acid Reactant Substances</i> (produits réactifs à l'acide thiobarbiturique)
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> (capacité antioxydante équivalente au Trolox)

<i>TOSC</i>	<i>Total Oxidant Scavenging Capacity</i> (capacité totale à piéger les oxydants)
<i>TRAP</i>	<i>Total Radical-trapping Antioxidant Parameter</i> (pouvoir antioxydant total)
<i>UPE</i>	<i>Ultraweak Photon Emission</i> (Emission de photons de très faible intensité)
<i>UV</i>	Ultra-Violet

Integration of electrochemical microsensors in “Silicon & Polymers” microtechnologies for the study of oxidative stress Application to cutaneous bio-chemistry

Summary:

Electrochemical sensors present a growing interest for analytical control in various application fields. These devices tend to be miniaturized to answer current issues - low volumes, reduced analysis time, portability - and to take advantage of the potentiality of microelectrodes: sensitivity, detection limit improvement, ability to measure in resistive media. This work has consisted in integrating, thanks to "Silicon & Polymers" microtechnologies, generic and reproducible electrochemical cells comprising three electrodes and in characterizing all of the materials used. The structures thus obtained have been adapted to the study oxidative stress on the surface of the skin. The devices have been used to detect ascorbic and uric acids, molecules involved in the defense system against oxidative stress. Their performances have been evaluated in model solutions, by comparison to results obtained with traditional hand-made microelectrodes and directly to the skin surface.

Keywords :

Electrochemistry, antioxidant molecules, microtechnologies, miniaturization, integration, microsensors, skin analysis

Intégration de microcapteurs électrochimiques en technologies « Silicium et Polymères » pour l'étude du stress oxydant Application à la biochimie cutanée

Céline CHRISTOPHE

Thèse soutenue le 14 Octobre 2010 au LAAS-CNRS, Toulouse

Directeurs de thèse : Pierre GROS et Jérôme LAUNAY

Résumé :

L'essor des biocapteurs électrochimiques n'est plus à démontrer. Véritables outils d'analyse, ces dispositifs tendent à se miniaturiser afin de répondre aux spécifications actuelles: faibles volumes, temps d'analyse réduit, portabilité, et profitent des potentialités des microélectrodes: sensibilité accrue, capacité de mesure en milieux résistifs. Ce travail de thèse a été d'intégrer, à partir des techniques issues des microtechnologies "Silicium & Polymères", des dispositifs électrochimiques génériques et reproductibles à trois électrodes et de caractériser l'ensemble des matériaux utilisés. Les structures ainsi obtenues ont été conditionnées en vue de l'étude du stress oxydant à la surface de la peau. Elles ont été utilisées pour détecter l'acide ascorbique et l'acide urique, molécules impliquées dans le mécanisme de défense contre le stress oxydant. Les performances de ces dispositifs ont été évaluées dans des solutions modèles, par comparaison aux résultats obtenus avec des microélectrodes de fabrication manuelle traditionnelle et directement à la surface de la peau.

Mots-Clés :

Electrochimie, molécules antioxydantes, microtechnologies, miniaturisation, intégration, microcapteurs, analyse de la peau

Discipline :

Génie des Procédés et de l'Environnement

Laboratoire de Génie Chimique UMR 5503
Université Paul Sabatier

31062 TOULOUSE Cedex 9