



**HAL**  
open science

# Microscopie électrochimique pour l'élaboration et la caractérisation de bio-assemblages sur électrode : application aux biopuces

Elodie Fortin

► **To cite this version:**

Elodie Fortin. Microscopie électrochimique pour l'élaboration et la caractérisation de bio-assemblages sur électrode : application aux biopuces. Autre. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT: . tel-00011491

**HAL Id: tel-00011491**

**<https://theses.hal.science/tel-00011491>**

Submitted on 30 Jan 2006

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

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

**THESE**

Présentée par

**Elodie FORTIN**

Pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER GRENOBLE I**

Dans le cadre de l'Ecole Doctorale " Chimie et Sciences du Vivant "

---

**MICROSCOPIE ELECTROCHIMIQUE POUR L'ELABORATION ET LA  
CARACTERISATION DE BIO-ASSEMBLAGES SUR ELECTRODE :  
APPLICATION AUX BIOPUCES**

---

Soutenue le 14 novembre 2005 devant la Commission d'examen :

<b>M. Pierre FABRY</b>	Président
<b>M. Guy DENUAULT</b>	Rapporteur
<b>M. Benoît LIMOGES</b>	Rapporteur
<b>M. Eric VIEIL</b>	Examineur
<b>M. Pascal MAILLEY</b>	Directeur de thèse
<b>M<sup>elle</sup> Sabine SZUNERITS</b>	Co-directeur de thèse

Thèse préparée au **groupe Chimie pour la Reconnaissance et l'Etude  
d'Assemblages Biologiques (CREAB)**

Service des Structures et Propriétés d'Architectures Moléculaires (SPrAM)

Département de Recherche Fondamentale sur la Matière Condensée, CEA-Grenoble



A Laurent,

A mes parents,



Ce travail a été réalisé au Département de Recherche Fondamentale de la Matière Condensée du Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA) de Grenoble, au sein du groupe de la Chimie pour la Reconnaissance et l'Étude d'Assemblages Biologiques dirigé par Monsieur T. Livache, Ingénieur de Recherche au CEA. Je le remercie de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, mais également pour ses conseils et discussions en biologie.

Je remercie vivement Monsieur P. Mailley, Maître de Conférence à l'Université Joseph Fourier à Grenoble, d'avoir été mon directeur de thèse et de m'avoir initié à la recherche et conseillé durant ces trois années.

Je tiens à témoigner toute mon amitié et ma reconnaissance à Mademoiselle S. Szunerits, Professeur à l'Université Joseph Fourier à Grenoble, pour avoir dirigé mes recherches avec tant d'intérêt, de disponibilité et de dynamisme.

J'adresse mes remerciements à Messieurs G. Denuault, Lecteur à l'Université de Southampton en Angleterre, et B. Limoges, Chargé de Recherche au CNRS et directeur du laboratoire d'Electrochimie Moléculaire à l'Université de Paris 7, qui ont accepté de juger ce travail. J'exprime ma reconnaissance à Monsieur P. Fabry, Professeur à l'Université Joseph Fourier à Grenoble, pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury d'examen.

Je remercie sincèrement Monsieur E. Vieil, directeur du LEPMI et ingénieur de Recherche au CEA, pour ses conseils avisés et les nombreuses discussions tant au niveau scientifique qu'humain, l'intérêt manifesté pour ce travail et son aide précieuse concernant l'explication des phénomènes d'adsorption des nucléosides sur diamant dopé bore.

Je tiens à remercier tous les chercheurs des laboratoires CREAB et GEM pour leur sympathie ou leur conseils, ainsi que Madame C. Pascal pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Je remercie également J. Chane-Tune, A. Dominget, Y. Defontaine et L. Lacroix, avec qui j'ai collaboré quelques temps, pour leur bonne humeur.

Je tiens également à remercier Madame B. Marcus et Monsieur M. Mermoux du LEPMI pour la synthèse et la caractérisation par spectroscopie Raman des échantillons de diamant dopé au bore.

Je remercie vivement Monsieur J.-L. Thomassin du CEA Grenoble pour sa disponibilité pour la réalisation des dépôts d'or sur les lames de verre, ainsi que P.

Montmayeul pour la fabrication de cellules, supports, ou autres objets, toujours avec bonne humeur et rapidité.

Enfin, j'adresse un grand merci à toute l'équipe POE du LEPMI qui m'ont accueillie avec sympathie et gentillesse, et m'ont permis de réaliser une partie des expériences de microscopie électrochimique.

Je n'oublie pas les thésards, post docs et techniciens que j'ai eu le plaisir de côtoyer au laboratoire pendant ces trois années et qui ont contribué, à leur manière, à la réalisation de ce projet, et plus particulièrement, Solenn Berson, Karen Brengel, Maria Calvo–Munoz, Nicolas Charvet, Bruno Corso, Emeline Descamps, Jean–Bernard Fiche, Bruno Jousset, Yann Kervella, Jérôme Kieffer, Hwanuk Kim, Frédéric Lafolet, Sébastien Laurent, Emilie Mercey, Mike Robitzer, Emmanuel Suraniti, Alex Thaumoux et Philippe Weber.

Merci également à Eirini, Violaine, Christophe et Aurélien pour leurs encouragements et les nombreuses discussions partagées lors des pauses café.

Je tiens également à remercier et à témoigner toute ma reconnaissance à mes parents qui m'ont permis de réaliser mes études et m'ont toujours encouragé et soutenu. Je remercie vivement mon frère et sa petite famille pour leur appui moral au cours de ces trois années.

Je pense également à mes amis (et plus particulièrement Nathalie) qui m'ont soutenu pendant ces années de thèse.

Je dédie tout ce travail à mon Lolo (mon futur époux !) qui a su m'écouter, m'encourager et supporter mes moments de doute et de stress durant ces trois années, particulièrement lors des dernières expériences et de la rédaction de ce manuscrit : c'est ton tour maintenant de rédiger ! J'essaierai d'être autant à la hauteur...

## Liste des abréviations et symboles



**LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES**

$\Delta E_p$	Ecart des potentiels de pics ( $E_p = E_{\text{pic anodique}} - E_{\text{pic cathodique}}$ )
$\alpha$	Coefficient de transfert de charge
$\tau$	Temps de polymérisation (en s)
$\delta$	Taux de dopage du polymère
$R$	Constante des gaz parfaits ( $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )
$\lambda$	Longueur d'onde (en nm)
$\theta$	Angle
$\tau_D$	Temps caractéristique du transport de matière (en s)
$l$	Epaisseur de la couche de transport (en cm)
$\hat{m}$	Opérateur de transport de matière (en $\text{cm s}^{-1}$ )
$a$	Rayon de la microélectrode (en $\mu\text{m}$ )
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFM	“ Atomic Force Microscopy ”, microscopie à force atomique
BDD	“ Boron Doped Diamond ”, diamant dopé au bore
BSA	“ Bovine Serum Albumin ”, albumine de sérum bovin
$c$	Concentration
$c^*$	Concentration initiale et en solution
$C_{dc}$	Capacité de double couche
CEA	“ CarcinoEmbryonic Antigen ”, antigène carcino-embryonnaire
CLSM	“ Confocal Laser-Scanning Microscopy ”, microscopie confocale à balayage laser
CP*	Oligonucléotide complémentaire de séquence 5'-biotin-CGG-AAC-TGC-TAT-GTC-3'
CV	“ Cyclic Voltammetry ”, voltampérométrie cyclique
CVD	“ Chemical Vapor Deposition ”, technologie de dépôt chimique en phase vapeur
$d$	Distance entre la microélectrode et le substrat, ou distance de travail
$D$	Coefficient de diffusion (en $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ )
DFM	“ Dynamic Force Microscopy ”, microscopie à force dynamique
DPV	“ Differential Pulse Voltammetry ”, voltamétrie impulsionnelle différentielle
$e$	Epaisseur des films électrodéposés
$E$	Potentiel
$E_{app}$	Potentiel de polymérisation appliqué
$E^\circ$	Potentiel standard d'un couple redox

## Liste des abréviations et symboles

---

$\bar{E}$	Potentiel imposé au système
$E_S$	Potentiel du substrat
$E_T$	Potentiel de la microélectrode ou sonde
ECS	Electrode au Calomel Saturé (0,241 V <i>vs.</i> ESH à 25°C)
ESH	Electrode Standard à Hydrogène
F	Nombre de Faraday (96500 C mol <sup>-1</sup> )
Fc	Ferrocène carboxylique
FIA	“ Flow Injection Analysis ”, analyse en flux
FMA	Ferrocène méthanol (ou hydroxyméthyl ferrocène)
G/C	Mode Génération/Collection en SECM
GDH	Glucose déshydrogénase
GOx	Glucose oxydase
hCG	Hormone gonadotrophine chorionique humaine
HLP	Hormone Lactogène Placentaire
HRP	“ Horseradish Peroxidase ”, peroxydase du raifort
HRP–biot	peroxydase biotinylée
HUVEC	“ Human Umbilical Vein Endothelial Cell ”, cellule humaine endothéliale isolée de veine ombilicale foetale
$i$	Intensité
$i_{AB}$	Courant d'irréversibilité totale
$i_\ell$	Courant d'échelle
$i_T$	Courant mesuré à la sonde (en nA)
$I_T^N$	Courant à la sonde normalisé par son courant à l'infini
$i_{T,\infty}$	Courant à la sonde à l'infini (en nA)
IF	Intensité de fluorescence
ISE	“ Ion–Selective Electrode ”, électrode sélective ionique
ISME	“ Ion–Selective MicroElectrode ”, micro–électrode sélective ionique
ITO	“ Indium Tin Oxide ”, oxyde d'étain et d'indium
$J$	Densité de flux
$k^\circ$	Constante standard de vitesse de transfert de charge (en cm s <sup>-1</sup> )
$k_{eff}$	Constante de vitesse hétérogène apparente
L	Distance de travail normée ( $L=d/\alpha$ )
LMH	Largeur à mi–hauteur de pic
MEB	Microscope Electronique à Balayage
MPCVD	“ Microwave Plasma Chemical Vapor Deposition ”, technologie de dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma micro–ondes
n	Nombre d'électrons

## Liste des abréviations et symboles

---

NADH	Forme réduite de la nicotinamide adénine dinucléotide
NE	“ Nuclear Enveloppe ”, enveloppe nucléaire
NPE	“ Nuclear Pore Complex ”, complexe poreux nucléaire
ODN	Oligonucléotide (ou OligoDésoxyriboNucléique)
ODNc	Oligonucléotide complémentaire
PAP	para-aminophénol
PBS	“ Phosphate Buffered Saline ”, tampon phosphate
PCE	Polymère Conducteur Electronique
Ppy	Polypyrrole
PSA	“ Potentiometric Stripping Analysis ”, analyse potentiométrique par redissolution anodique ou cathodique
pyr	Pyrrole
Pyr-ODN	Monomère pyrrole fonctionnalisé par un oligonucléotide
pyr-CP	Pyr-ODN de séquence 5'-Pyr-(T)10-GCC-TTG-ACG-ATA-CAG-3'
pyr-M5	Pyr-ODN de séquence 5'-Pyr-(T)10-TGG-AGC-TGC-TGG-CGT-3'
Q/HQ	Couple quinone/hydroquinone
R	Intensité de fluorescence moyenne des spots normalisée par l'intensité de fluorescence du fond de l'image (bruit)
$R_{\Omega}$	Résistance à l'interface électrode/produits adsorbés/solution (en $\Omega \text{ cm}^{-2}$ )
Rg	Pour une microélectrode, rapport entre le diamètre de l'isolant (gaine en verre) et celui du conducteur (disque de platine)
S	Surface de l'électrode (en $\text{cm}^2$ )
SAM	“ Self-Assembled Monolayer ”, monocouche auto-assemblée
SAPE	Streptavidine-R-phycoérythrine
SCLM	“ Scanning ChemiLuminescence Microscopy ”
SECM	“ Scanning electrochemical microscopy ”, microscopie électrochimique à balayage
SG/TC	“ Substrate Generation/Tip Collection ”, mode génération au substrat/collection à la sonde
SNOM	“ Scanning Near-field Optical Microscopy ”, microscopie optique en champ proche
SPR	“ Surface Plasmon Resonance ”, Résonance Plasmonique de Surface
SPRi	“ Surface Plasmon Resonance imaging ”, imagerie de Résonance Plasmonique de Surface
SWV	“ Square Wave Voltammetry ”, voltamétrie à signaux carrés
STM	“ Scanning Tunneling Microscopy ”, microscopie à effet tunnel
T	Température (en K)

## Liste des abréviations et symboles

---

TG/SC	“ Tip Generation/Substrate Collection ”, mode génération à la sonde/collection au substrat
$t_{dc}$	Constante de temps de charge de la double couche
$t_{pola}$	Temps de polarisation (en s)
UME	Ultramicroélectrode
V	Vitesse de balayage

# Sommaire



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

## CHAPITRE I : LA MICROSCOPIE ELECTROCHIMIQUE A BALAYAGE (SECM)..... 4

I. PRINCIPE DE LA SECM .....	5
I.A. Généralités.....	5
I.B. Les différents modes d'exploitation.....	6
I.B.1. Propriétés particulières des microélectrodes .....	6
I.B.1.a. Les ultramicroélectrodes ampérométriques.....	7
I.B.1.b. Les micro-pipettes potentiométriques.....	9
I.B.2. Le mode feedback .....	9
I.B.3. Le mode Génération/Collection.....	11
I.B.3.a. Substrat générateur/sonde collectrice (SG/TC) .....	11
I.B.3.b. Sonde génératrice/substrat collecteur (TG/SC) .....	11
I.B.4. Le mode direct.....	12
II. FONCTIONNALISATION DE SURFACES PAR SECM.....	12
II.A. Les deux modes de fonctionnalisation par SECM .....	13
II.B. Modification de surfaces par mode direct.....	13
II.B.1. Modification de surface des semi-conducteurs et métaux .....	14
II.B.2. Dépôt de polymères conducteurs .....	15
II.B.3. Fonctionnalisation par des molécules organiques et biologiques .....	17
II.C. Modification de surfaces par mode feedback .....	19
II.C.1. Modification de surfaces des semi-conducteurs et métaux.....	19
II.C.1.a. Dépôt et gravure des métaux.....	19
II.C.1.b. Gravure des semi-conducteurs.....	22
II.C.2. Dépôt et dissolution des matériaux inorganiques.....	24
II.C.3. Dépôt de polymères conducteurs .....	26
II.C.4. Fonctionnalisation par des molécules organiques et biologiques .....	27
II.D. La SECM : un bon outil de micro-fabrication de surfaces ?.....	31
III. DETECTION D'ELEMENTS BIOLOGIQUES PAR SECM.....	32
III.A. Les modes d'exploitation pour la détection de systèmes biologiques.....	33
III.A.1. Le mode génération/collection .....	33
III.A.2. Le mode feedback .....	34
III.A.3. Le mode feedback avec catalyse enzymatique .....	34
III.B. Quelques applications.....	36
III.B.1. La détection de l'activité enzymatique .....	37
III.B.1.a. Sur substrats isolants .....	37
III.B.1.b. Sur substrats conducteurs .....	42
III.B.2. Vers l'imagerie d'autres systèmes biologiques .....	51
III.B.2.a. Les anticorps et antigènes .....	51
III.B.2.b. Les autres protéines.....	52
III.B.2.c. Les tissus ou membranes.....	54
III.B.2.d. Les cellules .....	55
III.B.2.e. L'ADN.....	60
III.C. Conclusion sur la détection de systèmes biologiques par SECM .....	63

## CHAPITRE II : OPTIMISATION DE L'ELECTROGENERATION PAR SECM DE SPOTS DE POLYPYRROLE-OLIGONUCLEOTIDE PAR L'ETUDE DE LEUR HYBRIDATION PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE ..... 72

I. LE POLYPYRROLE EN TANT QUE SYSTEME D'IMMOBILISATION DE SONDAS POUR LES BIOPUCES... 72	72
I.A. Généralités.....	73
I.A.1. Principe .....	73
I.A.2. Techniques d'immobilisation des oligonucléotides.....	74
I.B. La technologie polypyrrole.....	76
I.B.1. Le polypyrrole .....	76
I.B.2. Immobilisation des oligonucléotides <i>via</i> le polypyrrole.....	77
I.C. Différentes techniques d'immobilisation du polypyrrole-oligonucléotide.....	78
I.C.1. La puce MICAM <sup>TM</sup> .....	78
I.C.2. L'électrospotting.....	79
I.C.3. La microscopie électrochimique (SECM) .....	79

<b>II. PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>80</b>
II.A. Dépôt localisé de polypyrrole–oligonucléotide par SECM.....	80
II.A.1. Détermination de la distance de travail (courbe feedback positif) .....	80
II.A.2. Génération de spots de polypyrrole–oligonucléotide .....	82
II.B. Détection de l'hybridation par microscopie de fluorescence .....	83
II.B.1. Hybridation des spots de polypyrrole–oligonucléotide pour la détection par microscopie de fluorescence.....	84
II.B.2. Principe de la détection par microscopie de fluorescence.....	84
<b>III. ETUDE DES PARAMETRES EXPERIMENTAUX D'ELECTROGENERATION DES SPOTS PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE APRES HYBRIDATION.....</b>	<b>85</b>
III.A. Faisabilité du concept et problèmes rencontrés .....	85
III.A.1. Premiers dépôts réalisés par SECM .....	85
III.A.2. Dépôt d'une couche de polypyrrole avant l'électrogénération du spot.....	88
III.A.3. Conclusion sur ces premiers dépôts réalisés.....	89
III.B. Distance microélectrode–substrat, potentiel et temps de polymérisation.....	90
III.B.1. Temps de polymérisation de 200 ms.....	90
III.B.1.a. Influence du potentiel de polymérisation .....	90
III.B.1.b. Influence de la distance entre la microélectrode et le substrat .....	91
III.B.2. Temps de polymérisation plus courts (10 ms).....	94
III.B.2.a. Influence de la diminution du temps de polymérisation.....	94
III.B.2.b. Influence du potentiel pour la polymérisation .....	95
III.B.2.c. Influence de la distance entre la microélectrode et le substrat .....	97
III.C. Influence du rapport entre pyrrole et pyrrole–oligonucléotide dans la solution de copolymérisation.....	99
III.D. Géométrie de la microélectrode.....	101
<b>IV. ETUDE DE L'HYBRIDATION PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE.....</b>	<b>104</b>
IV.A. Reproductibilité des spots électrogénérés .....	104
IV.B. Etude de la sélectivité des spots obtenus .....	105
IV.B.1. Sélectivité de l'hybridation .....	105
IV.B.2. Sélectivité en fonction de la séquence de l'oligonucléotide.....	106
<b>V. CONCLUSION .....</b>	<b>107</b>
<b>CHAPITRE III : FORMATION ET CARACTERISATION DE GRADIENTS DE SURFACE DE POLYPYRROLE–OLIGONUCLEOTIDE PAR COUPLAGE SECM–SPRI.....</b>	<b>111</b>
<b>I. COUPLAGE DES DEUX TECHNIQUES : SECM ET SPRI.....</b>	<b>112</b>
I.A. Principe de la résonance plasmonique de surface (SPR) .....	112
I.A.1. Principe .....	113
I.A.2. L'imagerie de résonance plasmonique de surface (SPRi).....	115
I.B. Principe du couplage SECM–SPRI .....	115
<b>II. ETUDES PRELIMINAIRES A L'AIDE DU COUPLAGE SECM–SPRI.....</b>	<b>116</b>
II.A. Etude de spots de polypyrrole .....	116
II.A.1. Génération des spots de polypyrrole.....	116
II.A.1.a. Principe.....	116
II.A.1.b. Premiers dépôts de polypyrrole réalisés.....	117
II.A.2. Influence de la concentration en pyrrole.....	120
II.B. Etude de spots de polypyrrole–oligonucléotide.....	121
II.B.1. Génération.....	121
II.B.2. Détection de l'hybridation de spots de polypyrrole–oligonucléotide.....	122
<b>III. ETUDE DE GRADIENTS DE BIOMOLECULES.....</b>	<b>123</b>
III.A. Etude de la faisabilité par la formation de gradients de polypyrrole.....	123
III.A.1. Influence de l'intervalle de temps entre deux sauts de potentiel.....	123
III.A.2. Formation de gradients de polypyrrole par variation de la vitesse de déplacement de la microélectrode.....	124
III.B. Gradients de polypyrrole–oligonucléotide .....	125
III.B.1. Faisabilité .....	126
III.B.2. Formation de lignes et gradients de polypyrrole–ODN par variation de la vitesse de balayage.....	128

IV. CONCLUSION .....	131
<b>CHAPITRE IV : CARACTERISATION DE SPOTS DE POLYPYRROLE-OLIGONUCLEOTIDE ELECTROGENERES ET DETECTION DE LEUR HYBRIDATION PAR SECM.....</b>	
<b>I. DETECTION DES SPOTS DE POLYPYRROLE-OLIGONUCLEOTIDE PAR SECM.....</b>	<b>135</b>
I.A. Principe.....	135
I.B. Etude préliminaire d'un dépôt macroscopique .....	137
I.B.1. Calcul de l'épaisseur du dépôt .....	137
I.B.2. Courbes d'approche .....	138
I.C. Etude de spots de polypyrrole-oligonucléotide.....	139
I.C.1. Courbes d'approche .....	139
I.C.2. Balayage 2D de la microélectrode.....	141
I.C.2.a. Image d'un spot en mode feedback .....	141
I.C.2.b. Influence des paramètres expérimentaux de détection .....	141
I.C.3. Conclusion.....	145
<b>II. DETECTION DE L'HYBRIDATION DES SPOTS DE POLYPYRROLE-OLIGONUCLEOTIDE PAR SECM</b>	<b>146</b>
II.A. Les différents modes de détection .....	146
II.A.1. Détection indirecte .....	146
II.A.1.a. Détection par marquage radioactif.....	146
II.A.1.b. Détection électrochimique avec intercalants électroactifs.....	146
II.A.1.c. Détection optique .....	147
II.A.2. Détection directe .....	147
II.A.2.a. Détection électrochimique.....	147
II.A.2.b. Transduction gravimétrique .....	147
II.A.2.c. Transduction optique .....	148
II.B. Principe utilisé de la détection par SECM .....	148
II.C. Etude de la réaction de précipitation sur un dépôt macroscopique .....	150
II.C.1. Etude de la réaction par résonance plasmonique de surface (SPR) .....	150
II.C.2. Influence de la précipitation sur la réponse en SECM.....	151
II.D. Etude de l'hybridation des spots de polypyrrole-oligonucléotide.....	152
II.D.1. Etude de l'assemblage biologique .....	152
II.D.1.a. Mise au point de la procédure d'assemblage par microscopie de fluorescence.....	152
II.D.1.b. Etude de l'assemblage par SECM.....	155
II.D.2. Détection de l'hybridation des spots par SECM.....	156
II.D.2.a. Détection par analyse des courbes d'approche .....	156
II.D.2.b. Détection par analyse des courbes de balayage 2D.....	157
II.D.2.c. Etude de la spécificité de la méthode de détection de l'hybridation .....	159
II.D.3. Conclusion.....	160
<b>III. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>161</b>
<b>CHAPITRE V : PRESENTATION DU DIAMANT DOPE BORE (BDD).....</b>	
<b>I. PRESENTATION DU DIAMANT DOPE AU BORE .....</b>	<b>164</b>
I.A. Des propriétés électrochimiques remarquables.....	165
I.B. Quelques applications.....	167
I.B.1. Traitement des eaux.....	167
I.B.2. Electrosynthèse .....	167
I.B.3. Electroanalyse.....	168
I.B.4. Etude de l'ADN et de ses constituants.....	169
<b>II. DETERMINATION DE LA PROCEDURE D'ACTIVATION DE LA SURFACE DE DIAMANT DOPE BORE...</b>	<b>170</b>
II.A. Les procédures d'activation de la surface décrites dans la littérature.....	171
II.B. La procédure d'activation de la surface retenue.....	172
<b>III. ETUDE DES PROPRIETES ELECTROCHIMIQUES DU DIAMANT DOPE AU BORE .....</b>	<b>174</b>
III.A. Etude de la fenêtre de potentiel électrochimique .....	174
III.A.1. Influence de l'activation .....	174
III.A.2. Comparaison avec une électrode de carbone vitreux .....	176
III.B. Etude de la réversibilité électrochimique du diamant dopé au bore.....	177
III.B.1. Etude du couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ : influence de l'activation .....	177

III.B.2. Etude du couple $\text{IrCl}_6^{3-/4-}$ : influence de la vitesse de balayage .....	178
<b>IV. CONCLUSION .....</b>	<b>180</b>
<b>CHAPITRE VI : ELECTROCHIMIE DES NUCLEOSIDES SUR UNE ELECTRODE DE DIAMANT DOPE BORE (BDD).....</b>	<b>185</b>
<b>I. ETAT DE L'ART .....</b>	<b>185</b>
I.A. Quelques rappels sur l'ADN.....	185
I.B. Les réactions d'oxydation des nucléosides.....	186
I.B.1. L'électrochimie des nucléosides .....	187
I.B.2. Les mécanismes d'oxydation des nucléosides .....	188
I.B.2.a. Oxydation de la guanosine.....	188
I.B.2.b. Oxydation de l'adénosine .....	188
<b>II. LES REACTIONS D'OXYDATION DES NUCLEOSIDES SUR DIAMANT DOPE BORE.....</b>	<b>191</b>
II.A. La technique utilisée : la voltamétrie impulsionnelle différentielle .....	191
II.B. Etude de l'oxydation électrochimique des nucléosides sur diamant dopé bore .....	191
II.B.1. Choix du pH de travail .....	191
II.B.2. Réponse électrochimique en voltamétrie impulsionnelle différentielle.....	192
II.B.2.a. Oxydation de la 2'-désoxyguanosine .....	192
II.B.2.b. Oxydation de la 2'-désoxyadénosine.....	194
II.B.2.c. Oxydation de la 2'-désoxyguanosine et de la 2'-désoxyadénosine .....	195
II.B.3. Réponse électrochimique en fonction de la concentration de nucléoside.....	196
II.B.4. Conclusion sur l'étude de l'oxydation des nucléosides sur diamant dopé bore.....	198
II.C. Extension de l'étude à la détection de nucléotides, oligonucléotides et ADN.....	199
II.C.1. Les réactions d'oxydation des nucléotides .....	199
II.C.1.a. Les nucléotides à base de guanosine .....	199
II.C.1.b. Les nucléotides à base d'adénosine.....	200
II.C.1.c. Conclusion sur l'étude de l'oxydation des nucléotides sur diamant dopé bore.....	201
II.C.2. Détection d'oligonucléotides sur diamant dopé bore.....	202
II.C.3. Détection de l'ADN sur diamant dopé bore.....	203
II.C.4. Conclusion sur la détection des nucléotides, oligonucléotides et ADN.....	204
<b>III. CONCLUSION .....</b>	<b>204</b>
<b>CHAPITRE VII : ETUDE DE L'ADSORPTION DES PRODUITS DES REACTIONS D'OXYDATION DES NUCLEOSIDES SUR DIAMANT DOPE AU BORE (BDD) .....</b>	<b>206</b>
<b>I. ADSORPTION DES PRODUITS DES REACTIONS D'OXYDATION DES NUCLEOSIDES.....</b>	<b>207</b>
I.A. Mise en évidence d'un phénomène d'adsorption.....	207
I.A.1. Profils de concentration pour chaque nucléoside .....	207
I.A.2. Réponse électrochimique dans une solution contenant les deux nucléosides.....	207
I.A.3. Conclusion sur le phénomène d'adsorption.....	208
I.B. Adsorption des produits de l'oxydation des nucléosides .....	208
I.B.1. Influence de l'adsorption sur la détection électrochimique du nucléoside.....	209
I.B.1.a. Procédure.....	209
I.B.1.b. Résultats.....	209
I.B.2. Conclusion : trois mécanismes d'adsorption envisagés .....	210
<b>II. CARACTERISATION MACROSCOPIQUE DE L'ADSORPTION.....</b>	<b>211</b>
II.A. Etude de l'adsorption à l'aide d'une sonde redox : le ferrocène méthanol.....	212
II.A.1. Procédure .....	212
II.A.2. Résultats .....	212
II.B. Détermination du mécanisme d'adsorption sur la surface .....	213
II.B.1. Principe .....	213
II.B.2. Théorie .....	214
II.B.2.a. Etablissement de l'expression du courant .....	214
II.B.2.b. Etablissement d'un premier modèle d'étude .....	217
II.B.2.c. Etablissement d'un second modèle en incluant l'influence de la résistance .....	219
II.B.3. Résultats .....	219
II.B.3.a. Courbes de voltamétrie cyclique .....	219
II.B.3.b. Diffusion semi-infinie .....	220

## Sommaire

---

II.B.3.c.	Détermination des coefficients de transfert $\alpha$ .....	- 221 -
II.B.3.d.	Etude du premier modèle.....	- 222 -
II.B.3.e.	Etude du second modèle.....	- 223 -
II.B.3.f.	Etude du troisième modèle .....	- 224 -
II.B.4.	Conclusion sur le mécanisme d'adsorption .....	- 227 -
<b>III.</b>	<b>CARACTERISATION MICROSCOPIQUE DE L'ADSORPTION A L'AIDE DE LA SECM.....</b>	<b>- 227 -</b>
III.A.	Procédure.....	- 227 -
III.B.	Courbes d'approche.....	- 228 -
III.C.	Courbes de balayage 2D.....	- 229 -
<b>IV.</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>- 230 -</b>
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>		<b>- 232 -</b>
<b>ANNEXES .....</b>		<b>- 236 -</b>
<b>I.</b>	<b>ANNEXE 1 : LA FABRICATION DES SUBSTRATS UTILISES .....</b>	<b>- 236 -</b>
I.A.	Substrats de diamant dopé bore.....	- 236 -
I.A.1.	Synthèse des films de diamant.....	- 236 -
I.A.2.	Caractérisation des films de diamant après synthèse .....	- 237 -
I.B.	Substrats d'or.....	- 237 -
<b>II.</b>	<b>ANNEXE 2 : LA FABRICATION DE MICROELECTRODES .....</b>	<b>- 238 -</b>
II.A.	L'étirage du capillaire .....	- 238 -
II.B.	La fermeture de la pointe.....	- 239 -
II.C.	L'insertion du fil de platine.....	- 240 -
II.D.	Le polissage de la microélectrode.....	- 240 -
II.E.	Observation au microscope optique.....	- 241 -
II.F.	Mesures électrochimiques.....	- 242 -
<b>III.</b>	<b>ANNEXE 3 : MODELISATION DES COURBES D'APPROCHE EN SECM .....</b>	<b>- 243 -</b>



# Introduction générale



Les biopuces, nées du couplage entre les microtechnologies et la chimie des biomolécules, constituent un domaine en plein développement. En effet, elles permettent d'identifier de façon spécifique des biomolécules telles que des brins d'ADN, des hormones, des anticorps ou antigènes, ou encore des protéines. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux puces à ADN.

Au cours de ces dernières années, les puces à ADN, capables d'analyser simultanément une quantité élevée de fragments d'ADN, ont fait l'objet d'un nombre important de recherches et projets aussi bien fondamentaux qu'appliqués. L'activité de reconnaissance d'une biopuce à ADN est basée sur le principe de l'hybridation d'une sonde oligonucléotidique immobilisée sur un support. Aujourd'hui, les technologies mises en œuvre par les biopuces se diversifient, et leur efficacité est fonction principalement de deux étapes que sont la fixation des sondes oligonucléotidiques de séquence connue sur le support, et la détection du phénomène d'hybridation en présence des oligonucléotides cibles de séquence complémentaire.

C'est précisément dans ce contexte que se placent ces travaux de thèse que l'on peut résumer selon deux aspects.

Tout d'abord, nous avons utilisé un outil récent, la microscopie électrochimique à balayage (SECM), afin de réaliser et de lire des puces à ADN. Ensuite, le second aspect concerne l'étude du diamant dopé bore (BDD) en vue de son utilisation en tant que substrat pour les biopuces. Pour cela, nous nous sommes intéressés à la détection électrochimique directe de l'ADN, ou plus particulièrement de ses constituants, sur une telle électrode.

L'objectif de ce travail a donc été double: **(i)** l'utilisation d'un nouvel outil, la **microscopie électrochimique à balayage** (SECM), afin de fonctionnaliser des surfaces avec des sondes oligonucléotidiques et de détecter le phénomène d'hybridation, et, **(ii)** la détection électrochimique de l'oxydation des nucléosides sur un nouveau matériau carboné d'électrode, le **diamant dopé bore** (BDD).

Ce manuscrit est composé de sept chapitres et présente les résultats obtenus durant ces trois années de recherche.

Le premier chapitre constitue une revue bibliographique sur la microscopie électrochimique. Après avoir décrit quelques généralités et les principaux modes de fonctionnement, nous montrerons la dualité d'utilisation de ce nouvel outil de microscopie à sonde locale qui permet à la fois la fonctionnalisation de surfaces par différents types de

matériaux mais aussi leur caractérisation, et ce plus particulièrement dans le cas de surfaces biologiques.

Les chapitres II, III et IV portent sur l'utilisation de la microscopie électrochimique afin de concevoir des puces à ADN.

Le chapitre II concernera la technique développée d'électrogénération de spots de polypyrrole-oligonucléotide par mode direct de la microscopie électrochimique. Ces spots seront élaborés sur une surface d'or, le pyrrole ne polymérisant pas sur les électrodes de diamant dopé bore.

Le chapitre III sera consacré à la formation de gradients d'oligonucléotides par microscopie électrochimique. Nous montrerons alors l'intérêt de coupler cette technique électrochimique à une méthode optique, l'imagerie de résonance plasmonique de surface (SPRi), afin de visualiser en temps réel l'étape d'élaboration.

La caractérisation des spots de polypyrrole-oligonucléotide électrogénérés sur la surface d'or par SECM fera l'objet du chapitre IV. La présence de ces spots sur la surface sera observée par mode feedback de la microscopie électrochimique. Puis nous nous intéresserons à la détection du phénomène d'hybridation de ces spots, c'est-à-dire d'appariement spécifique des deux brins d'ADN, en mode feedback de la SECM. La méthode développée sera basée sur la formation d'un assemblage biologique et la précipitation d'un produit spécifiquement sur ces spots hybridés.

Les chapitres V, VI et VII présentent l'étude électrochimique de l'ADN, et plus particulièrement des nucléosides (hétéroside résultant de l'union d'un pentose avec une base purique ou pyrimidique), sur une électrode de diamant dopé bore.

Le chapitre V sera consacré à une présentation des propriétés électrochimiques particulières, ainsi que des principales applications, de ce nouveau matériau d'électrode.

Au cours du chapitre VI, nous montrerons l'intérêt du diamant dopé bore pour l'étude des réactions d'oxydation par voltamétrie impulsionnelle différentielle des deux nucléosides électroactifs, la 2'-désoxyguanosine et la 2'-désoxyadénosine, notamment par sa large fenêtre d'électroinactivité en milieu aqueux et son faible courant de fond.

Le chapitre VII mettra en évidence un phénomène d'adsorption des produits de ces réactions d'oxydation sur la surface du diamant dopé bore. Nous construirons des réseaux théoriques de courbes courant–potentiel, à l'aide de calculs analytiques et de différents modèles, correspondant aux courbes de voltamétrie cyclique obtenues en présence d'une sonde redox et en fonction de la quantité de produits oxydés formés et donc susceptibles de se déposer sur la surface de l'électrode. Cette comparaison entre courbes expérimentales et courbes théoriques nous permettra de déterminer le mécanisme d'adsorption sur la surface. Enfin, nous étudierons ce phénomène d'adsorption sur l'électrode de diamant à une échelle microscopique à l'aide du microscope électrochimique à balayage.



# Chapitre I :

La microscopie électrochimique à balayage

(SECM)



Jusqu'aux années 1980, une expérience électrochimique classique impliquait l'application d'une perturbation en terme de courant ou de potentiel à une électrode métallique de taille millimétrique. L'apparition des ultramicroélectrodes (UMEs) à la fin des années 1970, alliée à la résolution spatiale de la microscopie à effet tunnel (STM, "Scanning Tunneling Microscopy"), ont conduit au développement par l'équipe du Professeur A. J. Bard en 1986 d'une nouvelle technique, la microscopie électrochimique à balayage (SECM, "Scanning Electrochemical Ultramicroelectrode Microscopy", puis "Scanning Electrochemical Microscopy")<sup>1</sup>. La SECM est une méthode de microscopie à sonde locale<sup>2,3</sup> basée sur le déplacement d'une microélectrode au voisinage d'une interface.

La microscopie électrochimique est rapidement devenue davantage qu'une simple technique électrochimique, mais constitue plutôt un nouveau concept de l'analyse électrochimique<sup>4</sup>. En effet, la plupart des techniques de mesure électrochimique comme, par exemple, la voltamétrie cyclique ou la chronoampérométrie, peuvent être réalisées à l'aide d'un dispositif SECM. De plus, la résolution spatiale permet d'augmenter fortement les capacités des techniques électrochimiques pour la caractérisation d'interfaces ou la mesure de cinétiques par exemple.

La SECM permet la caractérisation de surfaces par imagerie des zones électroactives comme électroinactives<sup>5,6</sup>, mais également d'obtenir des informations concernant la nature chimique et électrochimique des espèces en investiguant les réactions se produisant à la surface de l'échantillon<sup>7</sup>. Elle permet aussi la modification au niveau local des échantillons *via* l'électrodissolution<sup>8</sup> ou l'électrodéposition<sup>9,10</sup>. Ainsi, les progrès dans la miniaturisation et dans la diversification des microélectrodes offrent un champ d'application de plus en plus vaste dans de nombreux domaines tels que la corrosion<sup>11</sup>, la biologie<sup>12,13</sup> ou encore la science des matériaux<sup>14</sup>.

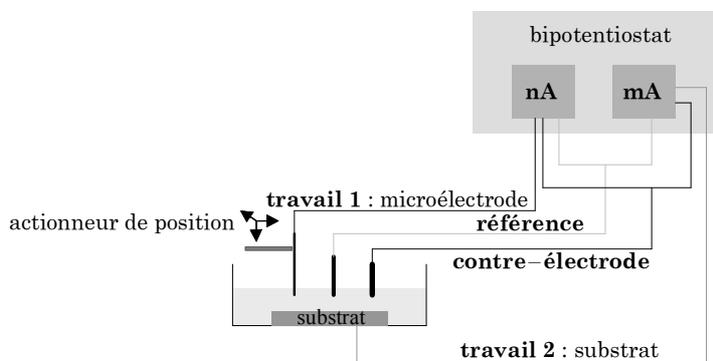
Ce chapitre, constitué de trois parties, sera consacré à la présentation de ce nouvel outil et de ses potentialités. Dans une première partie, les principes de la microscopie électrochimique et ses différents modes d'exploitation seront présentés. Puis, nous verrons dans une seconde partie qu'elle peut être utilisée afin de fonctionnaliser différentes surfaces. Enfin, nous nous intéresserons à l'imagerie de surfaces par SECM, et, plus particulièrement, à la détection d'éléments biologiques à l'aide de cette technique.

## I. Principe de la SECM

Dans cette première partie, nous présenterons le principe fondamental de la microscopie électrochimique, puis nous étudierons plus précisément les différents modes d'utilisation de cette technique.

### I.A. Généralités

Le principe de la microscopie électrochimique<sup>1,15</sup> repose sur la mesure du courant (cas des microélectrodes ampérométriques), ou du potentiel (cas des microélectrodes potentiométriques), lorsque la microélectrode, ou sonde, est maintenue ou déplacée dans une solution à proximité d'un substrat conducteur, semi-conducteur ou isolant. La présence de ce substrat va perturber la réponse électrochimique à la sonde, fournissant ainsi des informations sur la nature et les propriétés du substrat. Le dispositif de microscopie électrochimique est constitué d'un système à 4 électrodes : deux électrodes de travail (substrat et microélectrode), une électrode de référence et une contre-électrode, ainsi que d'un système de positionnement (micro-positionneurs) permettant le déplacement relatif de la microélectrode par rapport au substrat, et d'un bipotentiostat afin de contrôler ou mesurer le potentiel et le courant à la fois au substrat et à la sonde (**Fig. I.1**).



**Figure I.1** Schéma de principe du microscope électrochimique à balayage.

Il existe trois modes principaux d'exploitation de la SECM : feedback, génération/collection et direct.

Dans le mode feedback<sup>16</sup>, qui est le plus utilisé, le courant mesuré à la microélectrode est perturbé par la présence du substrat, conducteur ou isolant, qui va soit régénérer des espèces redox, soit bloquer la diffusion des espèces. Ce mode permet de réaliser de l'imagerie de surfaces et de réactions se produisant au substrat<sup>17</sup>. Afin de simplifier le classement des

différents modes de fonctionnement de la SECM, nous étudierons également dans cette partie un mode légèrement différent, le mode microréactif (“microreagent”).

Le mode génération/collection<sup>18</sup> existe sous deux formes : TG/SC (“Tip Generation/Substrate Collection”) et SG/TC (“Substrate Generation/Tip Collection”). Dans le premier cas, la microélectrode génère des espèces redox qui seront détectées au niveau du substrat ; ce mode est typiquement utilisé pour l’étude de réactions chimiques homogènes. Le mode SG/TC peut être utilisé pour l’étude de profils de concentration près d’une surface<sup>19,20,21</sup>.

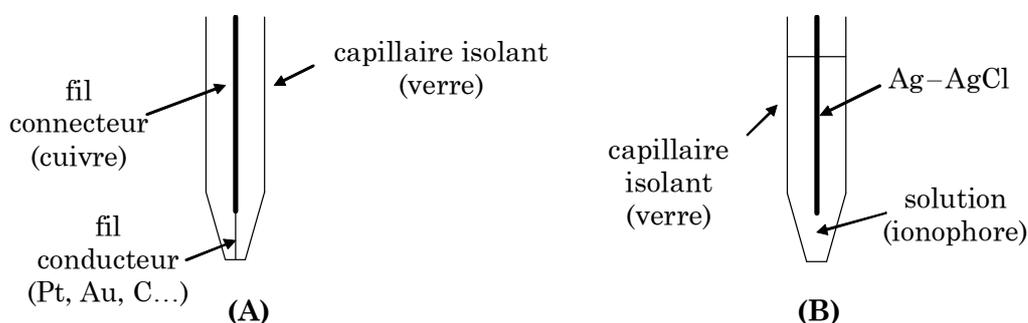
Enfin, le mode direct permet de fonctionnaliser localement des surfaces en utilisant la microélectrode en tant que contre-électrode<sup>22</sup>.

### **I.B. Les différents modes d’exploitation**

La microélectrode représente l’élément central de la transduction d’un mécanisme interfacial ou de la modification localisée d’une interface, et a donc un rôle essentiel dans la SECM. Avant d’étudier les trois principaux modes d’utilisation de la SECM, nous allons tout d’abord rappeler les caractéristiques d’une microélectrode.

#### **I.B.1. Propriétés particulières des microélectrodes**

Les sondes utilisées en SECM sont des électrodes de petite taille inspirées de celles des biologistes et biochimistes. Il existe deux types de microélectrodes en SECM : les ultramicroélectrodes (UME, “UltraMicroElectrode”), ou les micro-pipettes (**Fig. I.2**).



**Figure I.2** Schéma des deux types de microélectrodes utilisées en SECM : (A) ultramicroélectrode, (B) micro-pipette.

### I.B.1.a. Les ultramicroélectrodes ampérométriques

Les ultramicroélectrodes (UMEs) sont constituées d'un fil conducteur, de diamètre compris entre l'épaisseur de la double couche, soit quelques nanomètres, et 25 micromètres, inséré dans une gaine isolante en verre. Ce type de sondes est le plus utilisé en microscopie électrochimique, et permet de réaliser des mesures ampérométriques. Leurs faibles dimensions permettent des mesures électrochimiques dans des petits volumes, des études *in vivo* ou encore d'accéder à des zones localisées. De plus, ces microélectrodes présentent plusieurs propriétés intrinsèques, qu'il est important de détailler ici afin de comprendre le fonctionnement de la microscopie électrochimique.

Dans la suite, nous considérerons une ultramicroélectrode ayant une géométrie de disque, constitué d'un fil conducteur de rayon  $a$  et présentant un rapport du diamètre de l'isolant sur le diamètre du conducteur noté  $R_g$ .

#### I.B.1.a.i. Première propriété : un courant stationnaire

Considérons une solution contenant la forme réduite notée R d'une espèce redox, appelée médiateur, à la concentration  $c$  dans un électrolyte support permettant de diminuer la résistance de la solution et de négliger le transport de l'espèce électroactive par migration. Un potentiel est appliqué à la sonde tel que l'espèce R soit oxydée pour donner une espèce notée O. Le courant peut alors atteindre une valeur limite qui est totalement contrôlée par la vitesse de transfert de masse par diffusion de l'espèce R depuis le cœur de la solution jusqu'à la surface de la microélectrode. Ce courant stationnaire, dit courant à l'infini, obtenu lorsque la microélectrode est loin de toute surface, est donné par la formule suivante (l'indice T représente "tip", sonde) :

$$i_{T,\infty} = 4nFDca \quad (\text{I.1})$$

avec :  $n$  le nombre d'électrons échangés lors de la réaction redox,

$F$  la constante de Faraday,

$D$  le coefficient de diffusion des espèces R,

$c$  la concentration de l'espèce R présente en solution,

$a$  le rayon de l'ultramicroélectrode.

Ce régime, appelé régime de diffusion stationnaire, est atteint en un temps très court ( $\sim a^2/D$ ). Ainsi, une microélectrode–disque de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre en solution aqueuse contenant pour médiateur l'hexamine ruthénium ( $D[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}] = 6,3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ), atteindra ce régime en un temps inférieur à 0,03 seconde.

**I.B.1.a.ii. Seconde propriété : une faible constante de temps**

La constante de temps de charge de la double couche ( $t_{dc}$ ) s'exprime par :

$$t_{dc} = R_s C_{dc} \quad (I.2)$$

avec :  $R_s$  la résistance de la solution,

$C_{dc}$  la capacité de double couche.

La microélectrode, utilisée en tant qu'électrode de travail, a une petite taille en comparaison avec la contre-électrode. La résistance ( $R_s$ ) est donc essentiellement localisée au voisinage de l'électrode et est alors proportionnelle à la résistivité de la solution et inversement proportionnelle au rayon de l'UME :

$$R_s \approx \rho/a \quad (I.3)$$

avec :  $\rho$  la résistivité de l'électrolyte,

$a$  le rayon de l'ultramicroélectrode.

L'épaisseur de la double couche est en général de l'ordre de quelques dizaines d'angströms et est donc très inférieure au rayon de l'ultramicroélectrode. La capacité de double couche notée  $C_{dc}$  est alors proportionnelle au carré du rayon de la microélectrode.

Ainsi, la constante de temps de charge de la double couche est proportionnelle au rayon  $a$  de la microélectrode et reste relativement faible. Les courants de charge de la double couche sont donc rapidement négligeables par rapport au courant faradique.

**I.B.1.a.iii. Troisième propriété : une faible chute ohmique**

La chute ohmique est définie comme le produit de la résistance de la solution et du courant faradique.

Le transport des molécules se produit dans une couche, appelée couche de diffusion, dont l'épaisseur notée  $\delta$  peut être exprimée par :

$$\delta \approx (D\theta)^{1/2} \quad (I.4)$$

avec :  $D$  le coefficient de diffusion de l'espèce,

$\theta$  le temps d'électrolyse.

On peut distinguer deux situations.

- En régime transitoire (diffusion plane,  $\delta < a$ ), le courant faradique est proportionnel à la surface de la sonde et à l'inverse de l'épaisseur  $\delta$  de la couche de diffusion. Ainsi, la chute ohmique est proportionnelle à  $a$  et reste donc très faible.
- En régime stationnaire (diffusion hémisphérique,  $\delta \approx a$ ), les variations de concentrations sont limitées à des distances de l'ordre de  $a$  et ne sont plus fonctions du temps d'électrolyse  $\theta$ . Ainsi, la chute ohmique a une valeur très faible.

Dans tous les cas, la chute ohmique reste très faible, ce qui permet de travailler dans des milieux résistifs tels que les solvants visqueux (polymères<sup>23</sup>) ou de constante diélectrique faible (toluène<sup>24</sup>, huiles et lubrifiants<sup>25</sup>), ou encore dans des solutions électrolytiques non miscibles<sup>26</sup>.

### **I.B.1.b. Les micro-pipettes potentiométriques**

Parmi les micro-pipettes, la catégorie la plus utilisée est la microélectrode sélective ionique (ou ISME, “Ion-Selective Micro-Electrode”) à membrane liquide<sup>27</sup>. Elle a été développée, dès les années 1950, dans l’objectif de miniaturiser les électrodes sélectives ioniques (ISE, “Ion-Selective Electrode”) en réduisant la taille de la membrane et de l’isolant. Ces électrodes potentiométriques sont des sondes passives, c’est-à-dire qu’il n’y a pas de réaction avec l’analyte. Leur réponse en potentiel varie linéairement avec le logarithme de la concentration du principal ion cible déterminant le potentiel (à la manière d’une macro-pipette).

### **I.B.2. Le mode feedback**

Le mode feedback<sup>28,29,30,31,32</sup>, couramment utilisé en microscopie électrochimique, est basé sur des variations du courant faradique qui traverse la sonde durant une réaction redox. La sonde est déplacée au-dessus d’un substrat immergé dans une solution contenant une espèce redox, à l’état oxydé ou réduit, jouant le rôle de médiateur.

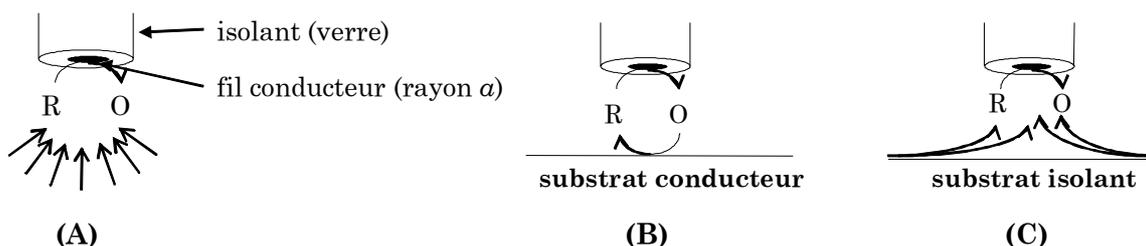
Lorsqu’un potentiel suffisamment positif est appliqué à la microélectrode, la forme réduite notée R de l’espèce redox présente en solution est oxydée. On distingue trois cas limites (**Fig. I.3**).

Tout d’abord, si la microélectrode est éloignée de la surface du substrat, c’est-à-dire à une distance d’au moins 7 fois le rayon  $a$  de la microélectrode, un courant faradique stationnaire noté  $i_{T,\infty}$  au niveau de la sonde est atteint (régime contrôlé par la diffusion) (**Fig. I.3A**).

Lorsque la microélectrode est approchée de la surface d’un substrat conducteur (platine, cuivre...) polarisé tel que la régénération des espèces puisse se produire, la forme oxydée O générée au cours de la réaction précédente diffuse jusqu’au substrat où elle est réduite. Nous verrons dans la suite de ce manuscrit, lors de la description des expériences réalisées, le cas particulier de l’or ne nécessitant pas de polarisation. Cette réaction redox produit une augmentation du flux de l’espèce R vers la sonde et, par un effet de confinement, va augmenter le courant mesuré au niveau de cette dernière ( $i_T > i_{T,\infty}$ ). Ce phénomène est

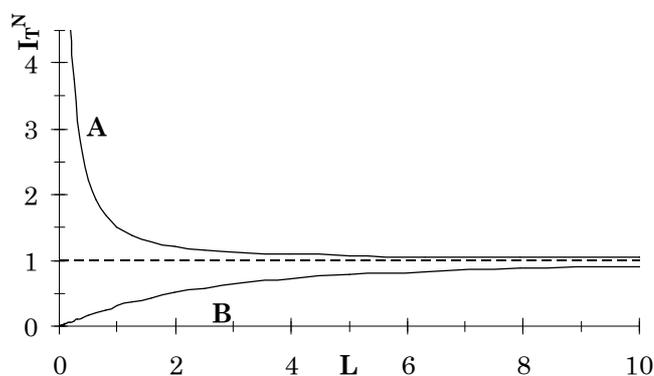
appelé le mode **feedback positif**, ou effet d'amplification localisée, qui sera d'autant plus important que la distance entre la sonde et la surface ( $d$ ) est faible (**Fig. I.3B**).

Par contre, si le substrat est isolant (verre, plastique...) ou non polarisé, l'espèce O générée au niveau de la sonde ne peut subir, après avoir diffusé en solution, de transfert de charge au niveau du substrat. Le courant mesuré à la microélectrode devient donc inférieur au courant stationnaire  $i_{T,\infty}$  car le substrat bloque la diffusion latérale de l'espèce O. Ce mode de fonctionnement résultant d'un phénomène de confinement est appelé le mode **feedback négatif** (**Fig. I.3C**).



**Figure I.3** Principe du mode feedback en SECM (A) loin du substrat :  $i_T = i_{T,\infty}$ ; (B) mode feedback positif :  $i_T > i_{T,\infty}$ ; (C) mode feedback négatif :  $i_T < i_{T,\infty}$

La **figure I.4** présente les courbes théoriques d'approche en mode feedback, en fonction de la nature du substrat, c'est-à-dire l'évolution du courant normé  $I_T^N$  en fonction de la distance normée notée  $L$ . Le courant normé  $I_T^N$  est défini comme étant le rapport entre le courant mesuré à la sonde ( $i_T$ ) à une distance donnée et son courant stationnaire à l'infini ( $i_{T,\infty}$ ). On appelle distance normée  $L$  le rapport entre la distance entre la microélectrode et le substrat ( $d$ ) et le rayon de la sonde ( $a$ ). Ces courbes sont données avec des variables adimensionnées, et ne sont donc pas fonctions de la concentration ou du coefficient de diffusion des espèces.



**Figure I.4** Courbes d'approche théoriques des modes feedback (A) positif, (B) négatif.

### **I.B.3. Le mode Génération/Collection**

Dans le mode génération/collection, une électrode de travail génère des espèces qui sont collectées par une seconde électrode. Il existe deux modes de ce type : soit l'espèce est générée au substrat puis collectée à la sonde (mode SG/TC), soit elle est générée à la microélectrode et collectée au substrat (mode TG/SC).

#### **I.B.3.a. Substrat générateur/sonde collectrice (SG/TC)**

Lorsque le substrat génère un profil de concentration, la microélectrode va collecter des informations sur les concentrations locales instantanées de chaque espèce. Il s'agit du mode **substrat générateur/sonde collectrice (SG/TC)**<sup>33</sup>. Les deux paramètres importants de ce mode sont le rapport entre la taille du substrat et celle de la sonde (noté  $h$ ), et la distance de travail, c'est-à-dire la distance entre la microélectrode et le substrat (notée  $d$ ).

Ce mode est très utilisé pour déterminer des profils de concentration et de flux d'espèces électrochimiquement inactives (ions métalliques alcalins) ou subissant une réaction d'oxydo-réduction. Comme dans le mode feedback, le processus électrochimique est principalement confiné dans la faible zone entre la microélectrode et le substrat.

Si la sonde utilisée est ampérométrique, la réaction redox se produisant à la surface peut perturber fortement la couche de diffusion du substrat, ce qui limite l'efficacité de ce mode. Ceci peut être évité en utilisant des sondes potentiométriques ou sondes passives qui ne modifient pas les profils de concentration des espèces électroactives.

Ce mode est utilisé pour l'étude de la corrosion, de réactions enzymatiques et autres processus se produisant à la surface du substrat<sup>34</sup>. Ainsi, R. C. Engstrom et *al.* ont montré que le mode génération/collection de la SECM permettait d'obtenir des informations sur les cinétiques de réactions électrochimiques sur des surfaces hétérogènes<sup>35</sup>. Des résultats sont obtenus même lorsque l'espèce électrogénérée est instable, la sonde pouvant détecter ces espèces avant leur décomposition. Ceci permet d'obtenir des résolutions spatiales de l'ordre de la taille de la microélectrode ( $\mu\text{m}$ ). Cependant, l'utilisation d'espèces chimiques à courte durée de vie devrait permettre d'améliorer cette résolution.

#### **I.B.3.b. Sonde génératrice/substrat collecteur (TG/SC)**

Dans ce mode, la microélectrode génère des perturbations de concentration, par électrolyse à potentiel contrôlé ou par création de gradients de concentrations, en certains points de la surface étudiée, et le substrat collecte les informations. Ce mode, appelé mode **sonde génératrice/substrat collecteur (TG/SC)**, est proche du mode feedback, à l'exception que, dans ce cas, le courant à la sonde mais également celui au substrat sont

mesurés. De plus, il n'y a pas forcément de phénomène de "cyclage" des réactions entre la microélectrode et le substrat afin de régénérer l'espèce.

Dans la plupart des cas, le substrat est beaucoup plus grand que la sonde, donc l'efficacité de collection, qui est définie comme étant le rapport entre le courant au substrat  $i_s$  et le courant à la sonde  $i_T$ , est proche de 1 (ou 100%) pour des espèces stables générées à la sonde. Si ces espèces réagissent dans la zone entre la sonde et le substrat, ce rapport entre les deux courants diminue, et sa variation en fonction de la distance entre la sonde et le substrat permet de déterminer la constante de vitesse de réaction homogène. L'équipe de A. J. Bard a utilisé le mode TG/SC pour déterminer les constantes de vitesse hétérogène de la réaction de réduction de l'oxygène sur platine en milieu acide<sup>36</sup>.

#### **I.B.4. Le mode direct**

Le mode direct de la SECM est utilisé afin de fonctionnaliser des surfaces. Il consiste à utiliser la microélectrode en tant que contre-électrode, permettant ainsi la localisation des lignes de champ électrique (**Fig. II.1A**). Ce mode sera développé plus précisément au cours de la partie suivante consacrée à la micro-structuration de surfaces par SECM.

Après avoir étudié les principes du fonctionnement du microscope électrochimique, nous allons montrer ici qu'il peut être utilisé afin de micro-fonctionnaliser diverses surfaces.

## **II. Fonctionnalisation de surfaces par SECM**

La micro-modification de surfaces, telle que les processus de dépôt ou de gravure, implique des changements localisés des propriétés physiques et chimiques du substrat. Le dépôt et la gravure de surface à haute résolution possèdent des implications technologiques importantes, notamment dans la fabrication d'outils en microélectronique.

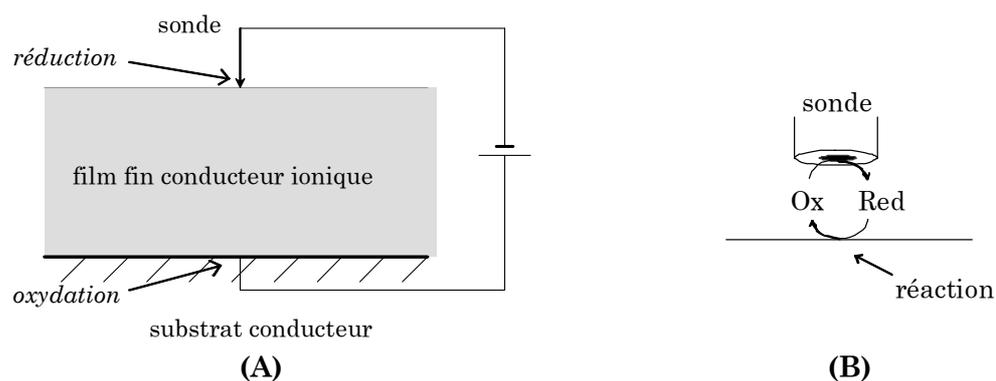
La fonctionnalisation de surfaces peut être réalisée suivant différentes approches telles que les méthodes photochimiques, les méthodes de chimisorption, physisorption ou de chimie covalente, les méthodes électrochimiques ou encore les méthodes mécaniques. Selon le cas, la technique de modification de surfaces peut être apportée par des technologies de photolithographie<sup>37</sup>, photoimmobilisation<sup>38</sup>, ablation laser<sup>39</sup>, jet d'encre<sup>40,41</sup>, lithographie "dip-pen"<sup>42</sup>, électrodépôt<sup>43</sup>, électrospotting<sup>44</sup>, microscopie électrochimique<sup>45</sup>, impression par microcontact<sup>46</sup>, dépôt de goutte par contact. Les microscopies à sonde locale, telles que la microscopie à effet tunnel (STM, "Scanning Tunneling Microscopy")<sup>47,48</sup> ou la microscopie à force atomique (AFM, "Atomic Force Microscopy")<sup>49,50</sup>, se sont également beaucoup

développées afin de micro-fabriquer des motifs sur une surface à l'échelle micrométrique, voire nanométrique. Bien qu'étant la méthode de structuration de surfaces la plus couramment utilisée, la photolithographie pose parfois des problèmes de compatibilité avec les substances biologiques (vide, solvants organiques, acides forts et bases fortes). Ainsi, les recherches de fonctionnalisation de surfaces par des éléments biologiques se sont développées autour des monocouches auto-assemblées (SAMs), en vue de construire des réseaux à deux dimensions moléculaires. Afin d'augmenter la résolution latérale de telles modifications, les microscopies à sonde locale, telles que la microscopie électrochimique à balayage (SECM), permettent de modifier des surfaces à l'échelle micrométrique ou nanométrique, et se présentent donc particulièrement adaptées.

### II.A. Les deux modes de fonctionnalisation par SECM

Peu de temps après le développement du microscope électrochimique, les équipes de recherche se sont intéressées à son utilisation en tant qu'outil de modification de surfaces. Les domaines d'application étudiés sont très variés et concernent aussi bien le dépôt métallique ou polymère que la gravure sur semi-conducteur. De plus, ces équipes cherchent actuellement à augmenter la résolution des motifs fabriqués, en étendant la capacité de la SECM à l'échelle nanométrique.

La micro-fabrication par SECM peut être réalisée suivant deux modes différents : le mode direct et le mode feedback. Dans le mode direct, la microélectrode joue le rôle de contre-électrode, alors que le mode feedback utilise un médiateur redox qui assure le relais entre la microélectrode et le substrat (**Fig. II.1**).



**Figure II.1** Schéma de principe du mode direct (A) et feedback (B) de la SECM.

### II.B. Modification de surfaces par mode direct

Développé par l'équipe de A. J. Bard<sup>51</sup>, le mode direct consiste à approcher une microélectrode d'un substrat conducteur, avec application d'une différence de potentiel entre

ces deux électrodes. La taille micrométrique de la sonde, ainsi que la faible distance entre les deux électrodes, vont confiner le courant au substrat dans une petite zone, ce qui permet la localisation de cette modification de surfaces. La résolution des motifs ainsi créés dépend essentiellement de la distance entre la microélectrode et le substrat, ainsi que de la taille et la forme de la microélectrode.

### **II.B.1. Modification de surface des semi-conducteurs et métaux**

C. W. Lin *et al.* ont réalisé la gravure sur semi-conducteurs, et notamment sur l'arséniure de gallium dopé n (n-GaAs)<sup>51</sup> à l'aide d'un microscope à effet tunnel en utilisant une méthode très proche du mode direct. Nous pouvons donc considérer ces travaux comme précurseurs pour la fonctionnalisation par microscopie électrochimique. La sonde (diamètre de 0,1  $\mu\text{m}$ ) est placée à 1  $\mu\text{m}$  de la surface du semi-conducteur, dans une solution aqueuse de soude. Une différence de potentiel (4 V) est appliquée entre la sonde et le semi-conducteur, sous irradiation simultanée par une lampe tungstène-halogène. Les trous d'électrons ainsi photogénérés à l'interface semi-conducteur/solution permettent la dissolution photoanodique de l'arséniure. Des études microscopiques montrent que la gravure est uniforme et bien confinée dans la zone dans laquelle la sonde est déplacée. La dimension des lignes obtenues est très variable (0,3–2  $\mu\text{m}$ ), ce qui s'explique principalement par une différence de taille de la sonde utilisée. Cependant, quelques gravures ont été observées en d'autres points de la surface du semi-conducteur. Il apparaît donc très important de pouvoir limiter l'irradiation à la zone située en dessous de la sonde.

L'une des principales difficultés dans toute technique de microscopie à champ proche est le contrôle de la distance entre la sonde et le substrat. Celle-ci était déterminée en étudiant la topographie de l'échantillon avant toute gravure par microscopie à effet tunnel (STM). L'équipe de A. J. Bard a mis au point une nouvelle méthode qui consistait à approcher une pointe de STM modifiée et polarisée négativement d'un substrat conducteur recouvert d'un film conducteur ionique de faible épaisseur contenant un ion métallique (argent, cuivre)<sup>52</sup>. Lorsque le point de contact entre la sonde et la surface du conducteur ionique est atteint, un courant faradique apparaît, dont l'amplitude dépend de la distance de pénétration de la pointe dans le polymère, et les ions métalliques du film sont réduits à l'interface sonde-conducteur ionique. En maintenant ce courant constant, la distance de pénétration dans le polymère, et donc la distance entre la pointe et la surface, peuvent être contrôlées précisément. Ainsi, il est possible de créer des structures métalliques en déplaçant la sonde le long de la surface du substrat.

D. H. Craston *et al.* ont utilisé cette technique pour déposer de l'argent dans des films de Nafion<sup>52</sup>.

De plus, O. E. Hüsser *et al.* ont réalisé des dépôts de cuivre, or, argent et palladium sur plusieurs polymères conducteurs ioniques, ainsi que des gravures de cuivre, or et argent de tailles submicrométriques<sup>53</sup>.

En utilisant le même concept de contrôle de la distance entre le substrat et la microélectrode par la profondeur de pénétration de cette dernière dans un polymère conducteur ionique, F. Forouzan et A. J. Bard ont déposé des nano-structures sur des surfaces non conductrices<sup>54</sup>. Pour réaliser des dépôts sur de telles surfaces, le principe est d'utiliser une couche très fine d'eau (10–15 Å) à la place du film de polymère. La réduction d'ions d'argent présents dans la solution aqueuse, et la formation de motifs rectangulaires submicrométriques sont générées par la polarisation négative de la sonde de type STM par rapport à un contact en or situé sur la surface de mica.

Plus récemment, E. M. El-Giar *et al.* ont déposé électrochimiquement des structures de cuivre par microscopie électrochimique en appliquant une différence de potentiel entre la microélectrode et le substrat métallique en présence d'ions  $\text{Cu}^{2+}$ , et ont étudié l'influence sur ces dépôts (structure, porosité, taux de dépôt...) de différents facteurs tels que le potentiel appliqué entre la microélectrode et le substrat métallique, la concentration en ions cuivriques, et l'addition d'agents organiques<sup>55</sup>.

### **II.B.2. Dépôt de polymères conducteurs**

Depuis quelques années, les polymères conducteurs<sup>56</sup>, tels que la polyaniline (PANI), le polythiophène (PT) ou le polypyrrole (Ppy), représentent un intérêt considérable dans l'industrie microélectronique. En effet, ils sont rapidement devenus des composés prometteurs en science des matériaux, comme, par exemple, pour la fabrication de diodes, capteurs et guides d'ondes. L'un des aspects les plus intéressants de tels polymères est leur capacité à passer d'un état électronique isolant à un état conducteur, ce qui est accompagné d'importants changements de leurs propriétés optiques. De plus, ils sont aisément formés par électropolymérisation, ce qui conduit à des films polymères bien adhérents sur la surface de l'électrode. La micro-structuration de ces polymères est possible selon plusieurs procédés tels que, par exemple, l'utilisation du laser (dépôt de polythiophène sur du silicium) ou le microscope à effet tunnel (dépôt de polypyrrole sur de l'or)<sup>57</sup>. La microscopie électrochimique et ses possibilités de polymérisation localisée ont permis une nouvelle approche des applications microtechnologiques des polymères conducteurs, en particulier concernant les capteurs et outils microélectroniques.

La première étude de micro-fabrication de polymères conducteurs par mode direct a été menée par l'équipe de A. J. Bard en 1989<sup>10</sup>. La microélectrode et un substrat de platine sont séparés par un film fin de polymère conducteur ionique, le Nafion, qui contient des cations anilinium libres de se déplacer à l'intérieur de la matrice polymère. Ils utilisent de l'aniline protonée car la polyaniline ne polymérise dans l'eau qu'en milieu acide. Le substrat de platine est polarisé positivement, ce qui entraîne l'électropolymérisation de l'aniline. En déplaçant la sonde polarisée négativement le long du film, les protons sont simultanément réduits à la microélectrode, ce qui permet le dépôt de motifs de taille submicrométrique de polyaniline. La résolution de ces dépôts dépend de la taille de la sonde, la distance de pénétration et l'épaisseur de la couche de Nafion.

Le dépôt de lignes de polymères conducteurs a fait l'objet de nombreuses recherches, en particulier par l'équipe de W. Schuhmann<sup>58</sup>. Ce dernier a mis en évidence l'importance de maintenir une forte concentration de monomères dans l'espace entre la microélectrode et le substrat. Or, l'application d'un potentiel constant au substrat conduit à une disparition rapide du monomère dans cette zone, ce qui réduit la probabilité de propagation de la chaîne, et peut éventuellement entraîner la formation d'un dépôt du polymère sur la surface entière du substrat. Afin d'éviter ce phénomène, W. Schuhmann a alors proposé une technique qui consiste à appliquer une série d'impulsions au substrat, et non plus un potentiel constant, la microélectrode jouant le rôle de contre-électrode. La première impulsion (1,2 V *vs.* Ag/AgCl pendant 2 secondes) correspond à l'oxydation de la quasi-totalité des monomères de pyrrole présents dans la zone entre la microélectrode et le substrat d'or ; la seconde impulsion (0,85 V pendant 1 seconde) a pour effet d'oxyder les oligomères solubles. Enfin, la dernière impulsion (0,35 V pendant 2 secondes) est une période de relaxation qui permet au système de revenir à son état initial. Au cours de cette série d'impulsions, la microélectrode est déplacée à une vitesse de quelques microns par seconde. W. Schuhmann *et al.* ont ainsi obtenu des lignes de polypyrrole d'une largeur comprise entre 50 et 60  $\mu\text{m}$ , ce qui peut être corrélé à la taille totale de la microélectrode (fil de platine et verre isolant). Aucune trace de polymère en dehors de ces lignes n'a été observée. D'autres polymères conducteurs, tels que le polythiophène, ont été déposés suivant le même procédé.

Par cette méthode de dépôt microstructuré de lignes de polypyrrole, C. Kranz *et al.* ont réalisé la connexion d'électrodes d'or séparées par un intervalle isolant de 100  $\mu\text{m}$ , dans le but de développer des transistors microélectrochimiques<sup>59</sup>. En utilisant la microélectrode en tant que contre-électrode et en appliquant une série de trois impulsions galvanostatiques au substrat, un spot de polypyrrole est déposé dans l'intervalle entre les deux électrodes d'or.

En combinant cette technique de série d'impulsions galvanostatiques et le mode feedback de topographie, l'équipe de W. Schuhmann a montré la possibilité de déposer des structures à trois dimensions de polypyrrole<sup>22</sup>. Ces "tours" ont une hauteur d'environ 140  $\mu\text{m}$  et un diamètre de 40  $\mu\text{m}$ . La reproductibilité de la fabrication de telles structures dépend fortement de la géométrie de la microélectrode et de la distance entre la sonde et le substrat.

En appliquant le même concept, l'équipe de W. Schuhmann s'est ensuite intéressée au dépôt de lignes de poly-N-( $\omega$ -amino-alkyl)pyrrole<sup>6</sup>. Comme précédemment, les largeurs des lignes obtenues sont reliées à la taille de la microélectrode. Cependant, le processus de dépôt électrochimique et la croissance du film sont limités par la faible conductivité de ces films de polypyrrole fonctionnalisés. Une enzyme modifiée, la glucose oxydase, est ensuite liée de manière covalente à ces motifs, et par cette post-fonctionnalisation, le microscope électrochimique peut ensuite contrôler la formation des motifs, et également l'activité enzymatique, comme nous le verrons dans la partie suivante de ce chapitre.

W. Schuhmann *et al.* ont montré que cette méthode de série d'impulsions permet de déposer localement des lignes de polypyrrole, de polypyrrole N-substitué, de polythiophène, et de polythiophène substitué en 3<sup>60</sup>.

Selon la méthode de W. Schuhmann, S. A. G. Evans *et al.* ont déposé sur un substrat de platine des spots de polypyrrole biotinylé d'un diamètre de 50 à 75  $\mu\text{m}$  en utilisant une microélectrode de platine (5  $\mu\text{m}$  de diamètre) en tant que contre-électrode<sup>61</sup>. En accord avec les résultats de l'équipe de W. Schuhmann, la taille des micro-dépôts obtenus par mode direct est comparable au diamètre total de la microélectrode (50  $\mu\text{m}$ ), c'est-à-dire de la partie conductrice et du verre isolant. Par l'intermédiaire de l'avidine, ils ont ensuite fixé une enzyme sur ces spots, la glucose oxydase biotinylée. Afin de cartographier son activité enzymatique, cette équipe a ensuite utilisé la SECM en mode génération/collection qui consiste ici à détecter des espèces électroactives à la microélectrode, le peroxyde d'hydrogène, générées par les molécules immobilisées au substrat. La microscopie électrochimique est ainsi utilisée pour ses deux fonctionnalités que sont la structuration et la caractérisation de surfaces.

### **II.B.3. Fonctionnalisation par des molécules organiques et biologiques**

Comme nous l'avons vu précédemment, l'intérêt des techniques de microscopie à sonde locale est particulièrement important dans le cas des molécules biologiques et organiques, la photolithographie étant peu adaptée à ce type de matériaux. Ainsi, de

nombreuses équipes se sont intéressées au développement de la microscopie électrochimique pour la micro- ou nano-structuration par des molécules organiques ou biologiques.

Par le mode direct de la SECM, l'équipe de H. Masuhara a montré la possibilité de micro-fabriquer des motifs fluorescents de rhodamine 6G (R-6G), dans un film polymère conducteur ionique par la décomposition locale du méthyl viologène<sup>62</sup>. Un film polymère conducteur ionique contenant la rhodamine 6G et le méthyl viologène est déposé sur un substrat de platine. La fluorescence de la rhodamine 6G dans le film est complètement inhibée par  $MV^{2+}$ . En déplaçant la microélectrode (tungstène) polarisée à  $-4$  V par rapport au substrat de platine, le méthyl viologène est décomposé à l'interface sonde/film polymère par réaction avec les ions hydroxydes générés à la sonde, ce qui entraîne le rétablissement de la fluorescence de la rhodamine et la formation des motifs.

L'équipe de W. Schuhmann s'est ensuite intéressée à la désorption localisée de monocouches d'alcanethiol pour la formation de motifs enzymatiques de glucose oxydase<sup>45</sup>. Par désorption électrochimique localisée des alcanethiolates sur une monocouche auto-assemblée constituée de longues chaînes d'alcanethiolates sur or, une zone microscopique d'or nu est formée, sur laquelle la cystamine pourra ensuite être chimisorbée. Une enzyme, la glucose oxydase (modifiée par une fonction périodate oxydée), est liée de manière covalente aux groupes aminos de la cystamine. L'activité enzymatique a ensuite été caractérisée en utilisant le mode génération/collection de la SECM. L'avantage d'utiliser le mode direct par SECM pour la micro-fabrication réside dans la possibilité de répéter cette procédure en différentes localisations. Ainsi, en utilisant des enzymes différentes, des structures multi-enzymatiques peuvent être produites.

Le principal avantage du mode direct est la distance micrométrique entre la sonde et le substrat, ce qui permet de concentrer le champ électrique. Ainsi, il est possible d'obtenir des motifs avec une résolution submicronique.

Cependant, le mode direct comporte certaines limitations. En effet, la réaction inverse au niveau du substrat ou de la sonde peut parfois détériorer le motif formé. De plus, les propriétés d'adhérence du motif obtenu sont parfois faibles. Enfin, la résolution dépend également de la géométrie de l'électrode. Les sondes en forme d'aiguille permettent de concentrer le champ électrique et ainsi d'obtenir une haute résolution, mais de telles électrodes peuvent être endommagées par leur mouvement latéral ou par contact avec le substrat.

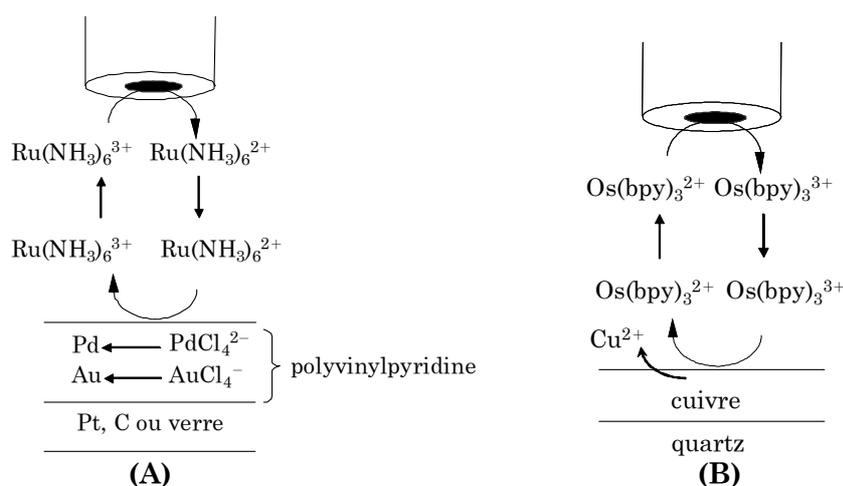
## II.C. Modification de surfaces par mode feedback

En mode feedback, une microélectrode est placée au-dessus du substrat dans une solution contenant l'une des formes, oxydée ou réduite, d'une espèce électroactive, ayant le rôle de médiateur. Cette configuration permet à la fois de contrôler la distance entre la sonde et le substrat, et de conduire le processus microélectrochimique sur la surface. La réaction électrochimique doit être confinée à la surface, c'est-à-dire que les espèces électroactives générées à la microélectrode réagissent avec la surface ou avec des espèces liées à la surface. Le couple redox doit présenter une réversibilité électrochimique afin d'être régénéré à la fois au substrat et à la microélectrode. Enfin, le choix du couple redox utilisé dépend des propriétés thermodynamiques et cinétiques du processus électrochimique à la surface.

### II.C.1. Modification de surfaces des semi-conducteurs et métaux

#### II.C.1.a. Dépôt et gravure des métaux

D. Mandler et A. J. Bard ont utilisé le mode feedback afin de déposer électrochimiquement de l'or et du palladium sur un film de polymère<sup>63</sup>. Des anions métalliques,  $\text{AuCl}_4^-$  ou  $\text{PdCl}_4^{2-}$ , sont incorporés dans la matrice polymère (polyvinylpyridine). Le médiateur redox, l'hexaamine ruthénium (III) ( $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ ), est réduit à la microélectrode, puis diffuse jusqu'à la surface (platine, carbone ou verre) recouverte du film de polymère, ce qui entraîne la réduction de l'anion  $\text{AuCl}_4^-$  ou  $\text{PdCl}_4^{2-}$  en métal, et donc le dépôt métallique (respectivement Au ou Pd). Un transfert d'électron rapide entre le médiateur généré et l'espèce électroactive à la surface est nécessaire pour obtenir des modifications de surfaces à haute résolution (**Fig. II.2A**).

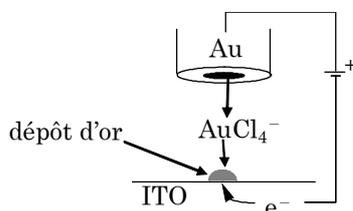


**Figure II.2** Principes du mode feedback par SECM pour (A) le dépôt d'or ou de palladium<sup>63</sup>, (B) la gravure de cuivre<sup>64</sup>.

Cette équipe a appliqué le même procédé afin de réaliser la gravure de cuivre en utilisant les espèces redox  $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+}$  ou  $\text{Os}(\text{bpy})_3^{2+}$  (phen=1,10-phénanthroline, bpy=2,2'-bipyridyl)<sup>64</sup>. Lorsque la microélectrode est approchée de la surface de cuivre, un courant de feedback positif est observé, ce qui correspond à la régénération des espèces réduites par transfert d'électrons avec la surface. Ceci entraîne la dissolution du cuivre, strictement limitée à la zone diffusionnelle du médiateur oxydé (**Fig. II.2B**).

J. W. Still et D. O. Wipf ont montré que le mode feedback peut être utilisé pour produire une corrosion localisée<sup>65</sup>. En effet, la génération d'ions chlorures à la microélectrode va former une couche de passivation sur un substrat de fer.

L'équipe de D. Mandler a ensuite développé une nouvelle technique de dépôt par mode feedback, appelée "microwriting", basée sur la dissolution de la microélectrode<sup>66</sup>. En maintenant un potentiel négatif constant au substrat (ITO, "indium-tin-oxide", oxyde d'étain et d'indium), la microélectrode (or) sert de réservoir de matière et est dissoute en présence de chlorures, ce qui va générer des espèces  $\text{AuCl}_4^-$ . Ces espèces vont diffuser jusqu'au substrat où elles seront réduites pour former un dépôt de structures microcristallines d'or (**Fig. II.3**). La résolution dépend fortement de la taille de la microélectrode.



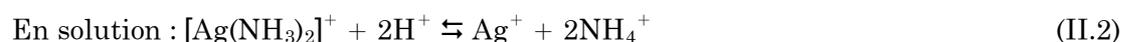
**Figure II.3** Schéma du mode dit "microwriting" de micro-fabrication de dépôts d'or<sup>66</sup>.

Quelques années plus tard, cette équipe a réalisé des dépôts localisés d'or sur du silicium selon le même procédé de dissolution anodique de la microélectrode en présence d'ions chlorures<sup>67</sup>. Des monocouches de cystamine ont ensuite été assemblées sur ces motifs d'or, puis soit un fluorophore (fluorescéine isothiocyanate), soit une enzyme (glucose oxydase), afin de caractériser ces monocouches par fluorescence et par SECM respectivement. Ceci constitue donc également une méthode indirecte pour déposer localement des éléments biologiques par l'intermédiaire de microdépôts d'or.

En 1997, J. Heinze et ses collègues ont étudié le dépôt de métaux sur des surfaces non conductrices<sup>68</sup>. Le substrat (téflon) est recouvert d'une couche de composé précurseur, le chlorure d'argent, et plongé dans une solution organique contenant l'espèce électroactive, la

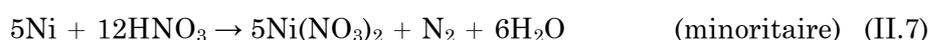
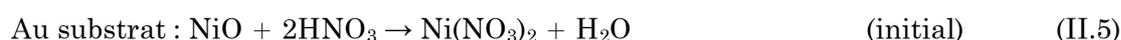
*p*-benzoquinone. L'hydroquinone est formée par réduction à la microélectrode, puis diffuse jusqu'au substrat où elle va générer la réduction du chlorure d'argent sur la surface. Ceci va entraîner la formation de cristaux d'argent bien ordonnés *via* un processus chimique. Après une période d'induction, ces nucléis vont croître à travers un processus physique et vont s'assembler pour former de fins motifs d'argent. Ceci entraîne donc une propagation à deux dimensions de l'argent jusqu'à ce que la limite d'extension latérale soit atteinte. La croissance se poursuit ensuite dans la direction verticale.

Cette équipe a également réalisé sur une surface d'or des dépôts d'argent de tailles plus faibles que la microélectrode en développant une technique dite de “*chemical lens*” qui consiste à ajouter une entité qui va réagir avec les espèces générées à la sonde, ce qui produit un effet significatif de focalisation du champ de diffusion<sup>69</sup>. Dans la solution électrolytique, les cations d'argent sont complexés par un excès d'ammoniac, ce qui évite un dépôt d'argent initial sur la surface d'or. Une diminution locale du pH est réalisée au niveau de la sonde en oxydant les ions nitrites en ions nitrates (**Eq. II.1**). Ces protons générés vont favoriser la dissociation du complexe  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$  pour donner des ions  $\text{Ag}^+$  (**Eq. II.2**) qui seront ensuite réduits au substrat (**Eq. II.3**).

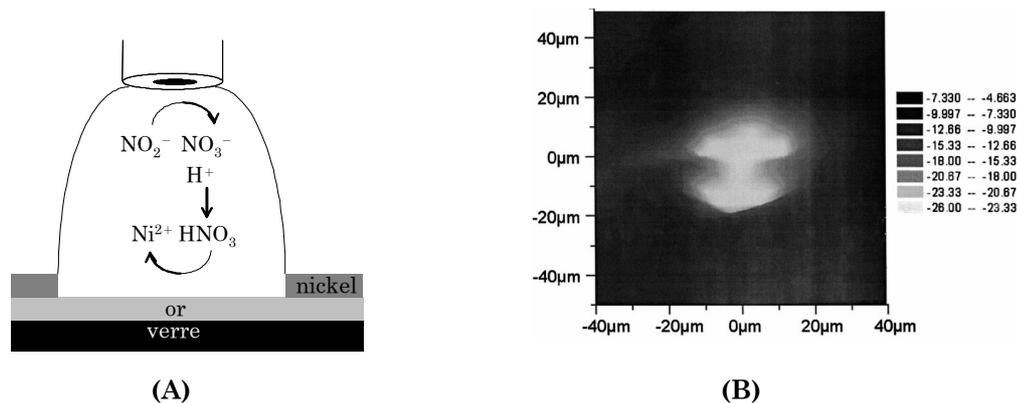


La présence de l'ammoniac permet de complexer l'argent qui diffuse hors de la zone réactionnelle, ce qui a pour effet de réduire la taille des motifs obtenus dépendant alors de la distance entre la sonde et le substrat.

Quelques années plus tard, la même équipe a exploité cette technique de “*chemical lens*” pour réaliser la gravure de masques dans des couches uniformes de nickel sur des substrats d'or, afin d'obtenir des sites d'adsorption pour des couches auto-assemblées<sup>70</sup>. La microélectrode est utilisée en mode feedback pour générer des protons en milieu aqueux par oxydation des ions nitrites en nitrates (**Eq. II.4**). Après diffusion jusqu'au substrat, l'acide nitrique généré va graver la couche de nickel selon les **équations II. 5, 6, et 7**.

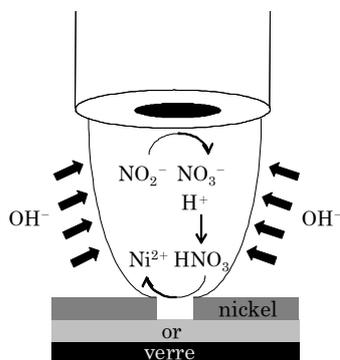


La **figure II.4** représente le principe et l'imagerie d'un masque gravé dans la couche uniforme de nickel recouvrant l'or en mode imagerie de la SECM (mode feedback).



**Figure II.4** (A) Principe et (B) Image SECM en mode feedback obtenue en réduisant l'hexamine ruthénium (III) sur une microélectrode de platine (diamètre de 10 µm) et en balayant la surface du substrat d'or recouvert d'une couche de nickel sacrificielle à une vitesse de 10 µm s<sup>-1</sup>. Les niveaux de gris indiquent le courant mesuré à la sonde en nA<sup>70</sup>.

La cinétique de la gravure de nickel en milieu acide est relativement lente, ce qui peut élargir le champ de diffusion des espèces générées à la microélectrode et donc conduire à une résolution latérale réduite. Afin d'éviter ce phénomène, cette équipe a utilisé le concept de “chemical lens” en ajoutant de l'hydroxyde de potassium, ce qui permet de graver des surfaces de tailles inférieures à celle de la sonde (**Fig. II.5**).

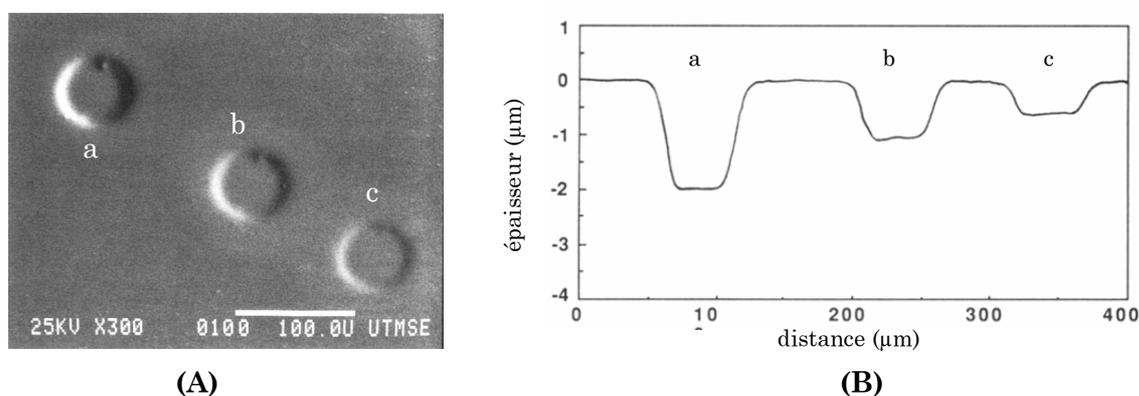


**Figure II.5** Principe de la technique de “chemical lens” utilisée par J. Ufheil et al. pour réaliser la gravure sur des couches uniformes de nickel sur or<sup>70</sup>.

### II.C.1.b. Gravure des semi-conducteurs

La gravure sur semi-conducteur est une étape technologique très importante dans la fabrication de circuits haute densité et de dispositifs ultra rapides en microélectronique, et est souvent réalisée par photolithographie.

La première gravure sur semi-conducteur (arséniure de gallium, GaAs) par mode feedback a été réalisée par D. Mandler et A. J. Bard en générant le dibrome à la microélectrode<sup>71</sup>. Ce dernier sert à la fois d'oxydant fort et de médiateur redox pour le contrôle de la distance de travail. Les paramètres déterminant la forme et les dimensions de la gravure sont la taille de la microélectrode, la distance entre la sonde et le substrat, et le temps d'électrolyse. Ils ont ensuite étudié le courant de feedback et sa variation en fonction du pH afin d'obtenir des informations concernant les processus de surface impliqués lors de la gravure de l'arséniure de gallium<sup>72</sup>. Enfin, ils ont utilisé différents couples redox ( $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ ,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ,  $\text{Fe}(\text{phen})_3^{3+/2+}$  ...), en tant qu'agents de gravure, dont la forme oxydée est générée à la microélectrode et diffuse jusqu'à la surface de l'arséniure de gallium (**Fig. II.6**). La gravure par mode feedback a été réalisée sur d'autres semi-conducteurs tels que CdTe,  $\text{Hg}_{1-x}\text{Cd}_x\text{Te}$  et GaP.



**Figure II.6** (A) Image MEB et (B) profil d'épaisseur de 3 gravures dans du n-GaAs réalisées pendant différents temps : (a) 5, (b) 10, (c) 20 min avec une microélectrode de platine (diamètre de 50 µm) placée à une distance de 10 µm de la surface dans une solution de  $\text{Fe}(\text{phen})_3^{2+}$  (5,4 mM / HCl 0,1 M) et polarisée à 0,1 V vs. SCE<sup>72</sup>.

La gravure sur silicium a également été réalisée en milieu fluorure par électrogénération du dibrome à la microélectrode<sup>73</sup>. S. Meltzer et D. Mandler ont observé que seul le dibrome permet la gravure du silicium en raison de la formation de liaisons Si-Br, ce qui va piéger les charges injectées à la surface et permettre la gravure. Les autres oxydants n'ont aucun effet sur la surface du matériau, les trous injectés ne restant pas à la surface. La présence d'ions fluorures est essentielle pour la gravure et permet de dissoudre la couche d'oxydes formée en surface.

Afin d'améliorer la résolution de la gravure, Z. Tian et son équipe ont développé une technique appelée "Confined Etchant Layer Technique" (CELT)<sup>74</sup>. Celle-ci est légèrement similaire aux méthodes de "chemical lens" pour les métaux, mais concerne les semi-conducteurs. Elle consiste à introduire dans la solution une espèce soluble qui va réagir avec

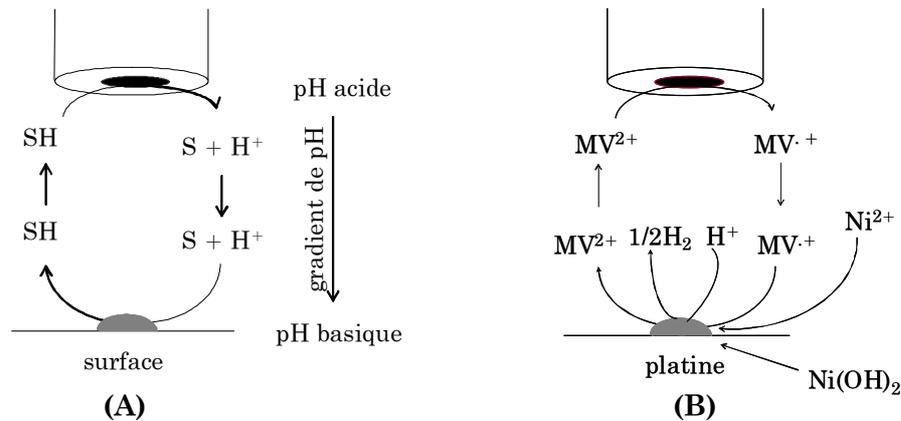
l'espèce électrogénérée à la microélectrode et limiter sa couche de diffusion. La gravure de surfaces se produit uniquement dans la fine couche de diffusion, et les motifs gravés auront donc une meilleure résolution. Cependant, la technique de CELT et celle de "chemical lens" ont une différence importante. En effet, dans cette dernière méthode, les espèces ajoutées, comme par exemple les ions hydroxyles, sont inactifs électrochimiquement, et donc, leur concentration n'est pas affectée par la réaction se produisant à la microélectrode. Ainsi, cette espèce additive ne va réagir qu'avec les espèces électrogénérées et son flux très focalisé pourra permettre d'obtenir des motifs de taille inférieure à celle de la sonde. Par contre, dans la méthode CELT, l'espèce additive est électroactive, et elle est consommée à la microélectrode. Ceci limite donc l'effet de focalisation, si bien que les dimensions des gravures obtenues sont de taille comparable à la microélectrode.

### **II.C.2. Dépôt et dissolution des matériaux inorganiques**

L'équipe de P. R. Unwin s'est particulièrement intéressée à l'utilisation de la microscopie électrochimique dans le but d'étudier le mécanisme et la cinétique de dissolution des cristaux inorganiques tels que le sulfate de cuivre pentahydrate<sup>75,76</sup>, le chlorure d'argent<sup>8</sup>, le ferrocyanure de potassium trihydrate<sup>77</sup>. Le principe de leur méthode est d'induire la dissolution d'un cristal ionique en réduisant localement la concentration des ions dans la zone entre la microélectrode et le cristal par électrolyse. Lorsque le cristal se dissout, le flux d'ions résultant peut être détecté électrochimiquement à la microélectrode, ce qui fournit des données quantitatives sur la cinétique de dissolution. De plus, en combinant la SECM et la microscopie à force atomique (AFM), ils ont réalisé les images des surfaces dissoutes en temps réel du ferrocyanure de potassium trihydrate<sup>78</sup> et du bromure de potassium<sup>79</sup>.

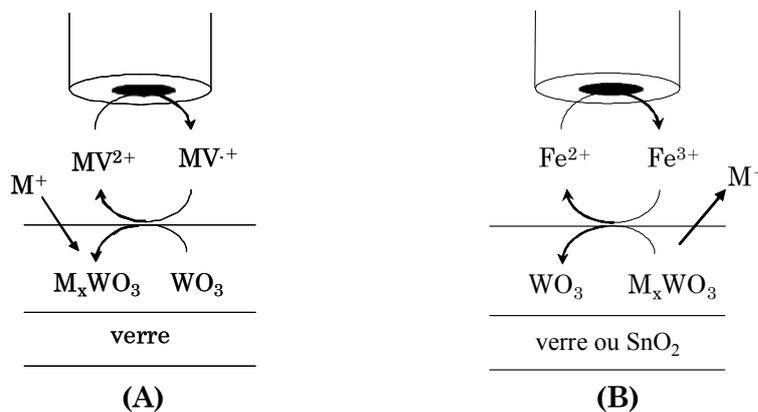
I. Shohat et D. Mandler ont utilisé le microscope électrochimique afin de déposer des motifs d'hydroxyde de nickel sur des substrats de platine en créant un gradient de pH entre la sonde et la surface<sup>80</sup>. Ils ont utilisé une réaction électrochimique sur la surface couplée à une consommation de protons (**Fig. II.7A**), ce qui crée un gradient de pH entre la surface et la microélectrode. Cependant, une diffusion rapide des protons de la microélectrode jusqu'à la surface pourrait générer seulement un faible gradient de pH ; c'est pourquoi cette équipe a développé une nouvelle approche qui consiste à réduire les protons uniquement sur la surface *via* une réaction électrochimique catalysée par le substrat de platine. L'augmentation du pH est alors générée par un processus d'oxydo-réduction : le N,N'-diméthyl-4,4'-bipyridinium,  $MV^{2+}$ , est réduit à la microélectrode (mercure) puis diffuse jusqu'au substrat

où il est régénéré par la réduction des protons, entraînant ainsi une augmentation locale du pH et donc le dépôt irréversible et localisé de  $\text{Ni}(\text{OH})_2$  (**Fig. II.7B**).



**Figure II.7** Principe de : (A) une réaction électrochimique sur la surface couplée à une consommation de protons, (B) un dépôt de  $\text{Ni}(\text{OH})_2$  par modification locale du  $\text{pH}^{60}$ .

D. Mandler et ses collègues ont étudié la réduction et l'oxydation localisée d'un matériau électrochrome, l'oxyde de tungstène ( $\text{WO}_3$ )<sup>81</sup>. Ce système est particulièrement intéressant car l'injection localisée de charges peut être suivie d'un changement de couleur simultané observable en microscopie optique. En effet, la réduction de ce matériau conduit à un composé bleu et plus conducteur, le bronze de tungstène.



**Figure II.8** Schéma du système "writing - reading - erasing" de l'oxyde de tungstène : (A) "écriture" et (B) "effacement" localisés du bronze de tungstène<sup>81</sup>.

Cette équipe a développé un système appelé "écriture - lecture - effacement" ("writing - reading - erasing") basé sur ces changements de couleur (**Fig. II.8**). Ainsi, les spots de bronze de tungstène sont formés par électrogénération localisée du radical cation de méthyl viologène  $\text{MV}^{\cdot+}$  proche de la surface d'oxyde de tungstène déposé sur du verre. En déplaçant la microélectrode le long du film de  $\text{WO}_3$ , il est possible d'"écrire" des motifs de

bronze de tungstène. En raison de leur différence de conductivité par rapport à la surface initiale, ces motifs peuvent ensuite être “lus” par SECM en mesurant le courant à la microélectrode en présence d’un médiateur redox, comme par exemple  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$ . Enfin, ces motifs peuvent être “effacés” soit localement par SECM, soit sur toute la surface, par réduction de  $\text{IrCl}_6^{2-}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$  à proximité des spots.

### **II.C.3. Dépôt de polymères conducteurs**

La difficulté principale de l’utilisation du mode feedback pour fabriquer des motifs de polymère est le fait que le monomère doit être lié à la surface, afin d’éviter sa polymérisation à la sonde. L’équipe de J. Heinze est parvenue à déposer des polymères conducteurs par le mode feedback de la SECM dès 1995<sup>82</sup>. Leur méthode repose sur les différences de solubilité entre le monomère et le polymère obtenu dans différents solvants : le monomère ne doit pas être soluble dans le solvant où se produit la polymérisation, mais il doit être soluble dans un autre solvant dans lequel le polymère obtenu ne l’est pas. Ainsi, le monomère utilisé par J. Heinze *et al.*, le 2,5-bis(1-méthyl-pyrrol-2yl)-thiophène (NSN), est très soluble en milieu organique mais insoluble en milieu aqueux, contrairement au pyrrole et au thiophène. Par contre, le polymère qui en résulte est insoluble aussi bien dans les solvants aqueux que non aqueux. Ainsi, un film fin de monomère est déposé sur le substrat (ITO, polyméthylmétacrylate) par évaporation thermique, et la micro-fabrication peut être réalisée en présence de la forme réduite du couple redox choisi ( $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ,  $\text{IrCl}_6^{3-}$ ). L’oxydant formé électrochimiquement à la microélectrode va ensuite générer la polymérisation du monomère, formant des motifs de poly-NSN. Le monomère qui n’a pas réagi peut alors être évacué en milieu organique, sans altérer le polymère.

Des motifs microscopiques de polyaniline ont été déposés sur des électrodes de platine, carbone et or en utilisant le mode feedback de la SECM par J. Zhou et D. O. Wipf<sup>83</sup>. Leur méthode, appelée mode “micro-réactif” (“microreagent”), est basée sur l’influence sur l’oxydation de l’aniline de la concentration en protons. Une augmentation locale du pH au niveau de la microélectrode est générée par réduction des protons et/ou de l’eau à la microélectrode, ce qui déplace le potentiel d’oxydation de l’aniline vers les potentiels plus négatifs. Ainsi, en polarisant le substrat positivement tel que l’oxydation de l’aniline ait lieu dans de telles conditions de pH, il est possible de déposer électrochimiquement le polymère.

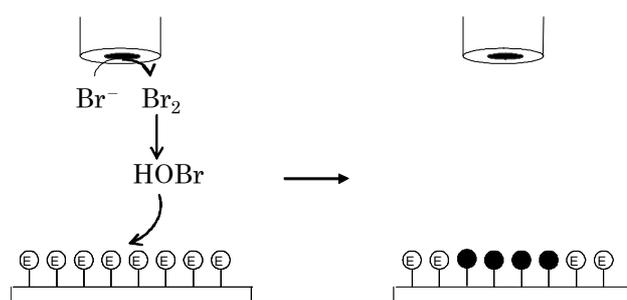
Plus récemment, l’équipe de J. Heinze a présenté un nouveau concept de micro-fabrication de polymères conducteurs dont les monomères possèdent de fortes solubilités dans l’eau<sup>9</sup>. Le principe est basé sur la génération locale de protons par oxydation des ions

$\text{NO}_2^-$  à la microélectrode. Au niveau de la surface, le thiophène en solution va réagir avec l'oxyde de manganèse en milieu acide pour former le radical cation  $\text{Th}^{\cdot+}$ . Ces radicaux vont se coupler pour former des dimères, et ainsi de suite. A partir de l'octomère, l'oligomère n'est plus soluble et va donc se déposer sur la surface. De plus, cette équipe a ensuite appliqué la technique de "chemical lens" en ajoutant du bicarbonate de sodium, ce qui réduit fortement la taille des microstructures formées (de 75 à 15  $\mu\text{m}$ ).

#### II.C.4. Fonctionnalisation par des molécules organiques et biologiques

L'utilisation du mode feedback pour la micro-fabrication de structures organiques et biologiques par SECM est assez récente. En effet, les biomolécules ont une spécificité de comportement donc il est important de ne pas les dégrader ; c'est pourquoi ces molécules ne sont pas utilisées directement en tant que médiateur, mais *via* un intermédiaire ou un bras espaceur. Ainsi, créer des motifs biologiques ou organiques par mode feedback consiste à les immobiliser tout d'abord sur la surface, puis à les activer ou désactiver localement par la réaction électrochimique d'un médiateur. La première étape est possible à l'aide de nombreuses méthodes bien connues ; la seconde consistant à altérer leur réactivité par un médiateur redox a fait l'objet de nombreuses recherches.

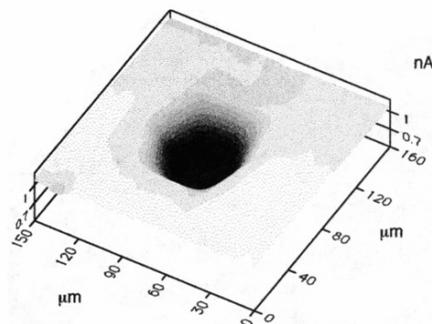
La première étude a été menée par l'équipe de T. Matsue, et a consisté en la micro-fabrication de motifs enzymatiques sur un substrat de verre<sup>84</sup>. L'oxydation d'ions bromures ou chlorures à la microélectrode génère des espèces qui désactivent localement une flavo-enzyme, la diaphorase, immobilisée sur le substrat, en formant des motifs non réactifs (**Fig. II.9**).



**Figure II.9** Schéma de micro-fabrication de surfaces de verre, où est immobilisée la diaphorase, par électrogénération de bromures<sup>84</sup>.

Ces motifs ont ensuite été caractérisés par SECM en détectant le courant catalytique d'un médiateur redox (**Fig. II.10**). En effet, la diaphorase catalyse l'oxydation d'un coenzyme, le NADH, par un médiateur, le ferrocénylméthanol. La taille des zones désactivées dépend de

la distance de diffusion des espèces électrogénérées. Des motifs plus petits sont formés en utilisant les ions chlorures plutôt que les bromures.



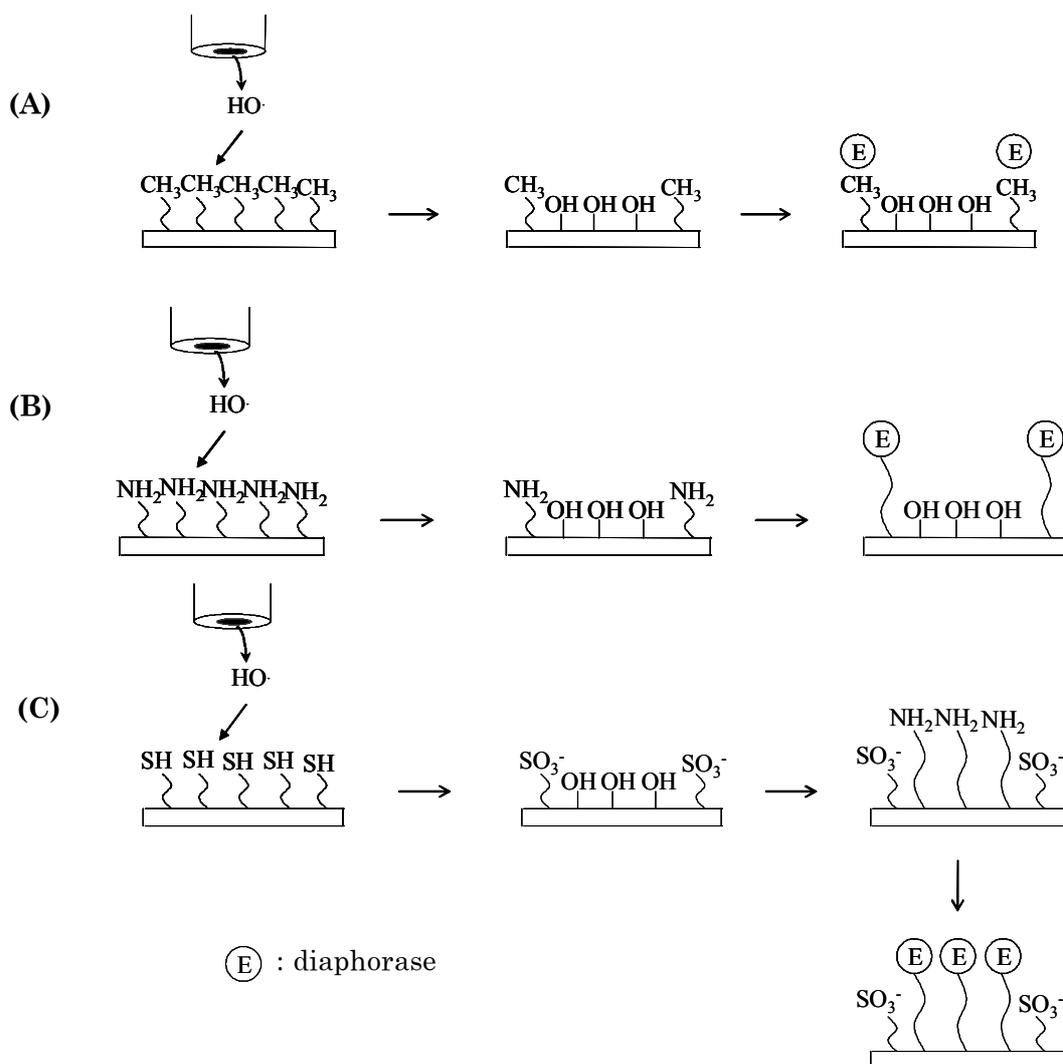
**Figure II.10** Image SECM d'un substrat sur lequel est immobilisée de la diaphorase. Le cercle sombre correspond à une zone désactivée<sup>84</sup>.

Conditions de formation de motifs non réactifs : 0,5 mM FMA / 1 M KCl, 0,1 M tampon phosphate pH 7,5,  $E_T=1,9$  V vs. Ag/AgCl,  $\tau=5$  min.

Conditions de détection : 0,5 mM FMA, 5 mM NADH / 1 M KCl, 0,1 M tampon phosphate pH 7,5,  $E_T=0,4$  V vs. Ag/AgCl.

Quelques années plus tard, la même équipe a créé des motifs de diaphorase sur des substrats de verre où sont immobilisées des couches auto-assemblées de silane<sup>85</sup>. Des radicaux hydroxyles sont générés électrochimiquement par la réaction de Fenton, pendant laquelle les ions  $Fe^{3+}$  présents en solution sont réduits à la microélectrode en présence de peroxyde d'hydrogène,  $H_2O_2$ . Ces radicaux vont ensuite réagir avec les monocouches, ce qui va modifier localement leurs propriétés chimiques. Trois approches ont ensuite été étudiées par T. Matsue et ses collègues (**Fig. II.11**).

Dans la première (**Fig. II.11A**), les radicaux hydroxyles vont dégrader localement les chaînes de silane en les rendant hydrophiles. Or, l'enzyme s'adsorbe uniquement sur des zones hydrophobes, et ne pourra donc pas s'adsorber en ces endroits. Dans le second cas (**Fig. II.11B**), la surface va également présenter des zones libres d'enzymes. En effet, les chaînes de silane sont modifiées tel que l'enzyme ne puisse pas s'y attacher par liaison covalente. Les espèces  $Fe^{2+}$  et  $H_2O_2$  vont toutes deux réagir avec les radicaux hydroxyles, ce qui va réduire la couche de diffusion de ces derniers ("chemical lens"). La troisième approche (**Fig. II.11C**) présente le cas où la diaphorase va se lier sélectivement en des zones localisées de la surface. Les radicaux hydroxyles vont transformer les terminaisons  $-SH$  de la monocouche en groupes hydroxyles. Les terminaisons  $-SH$  non exposées aux radicaux vont être transformées en groupements  $-SO_3^-$  par une oxydation en présence de  $Fe^{2+}$  et  $H_2O_2$ . Ainsi, la diaphorase pourra être immobilisée sur les sites hydroxylés.

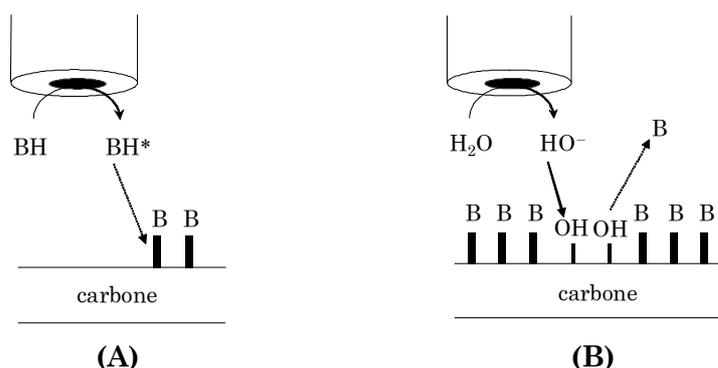


**Figure II.11** Micro-fabrication de motifs de diaphorase sur des monocouches auto-assemblées immobilisées sur verre par génération de radicaux hydroxyles<sup>85</sup> : (A) la diaphorase est physiquement adsorbée sur les zones hydrophobes ; (B) la diaphorase est chimiquement liée sur les zones sans radicaux hydroxyles (motif “négatif”) ; (C) la diaphorase est chimiquement liée aux zones avec radicaux hydroxyles (motif “positif”).

Enfin, D. O. Wipf et ses collègues ont modifié localement une surface de carbone vitreux avec de la biotine<sup>86</sup>. La forte affinité entre la biotine et l'avidine est très utilisée comme technique de structuration de surfaces pour l'immobilisation de protéines.

D'une part, la biotine a été déposée en lignes de taille micrométrique sur ces substrats en utilisant la sonde comme “crayon” électrochimique et en la déplaçant le long de la surface. Une espèce active de la biotine hydrazide est formée à la microélectrode par oxydation, et va, après diffusion jusqu'au substrat, se lier à la surface de carbone (**Fig. II.12A**). D'autre part, cette sonde joue le rôle d'une “gomme” électrochimique en détachant les molécules liées à la surface. Des ions hydroxydes sont formés à la microélectrode et vont

déplacer localement ces molécules, ce qui crée une image négative des motifs de biotine sur la surface (**Fig. II.12B**). Cette méthode permet donc à la fois la liaison et le détachement dans des zones localisées de tailles micrométriques de biomolécules sur la surface.



**Figure II.12** Schémas de liaison et de détachement de manière localisée de biotine (notée B) par SECM<sup>86</sup>; (A) génération de la forme réactive de la biotine hydrazide (notée BH) à la microélectrode; (B) génération d'ions hydroxydes à la microélectrode qui vont déplacer localement les groupes de surface.

La **figure II.13** montre deux images obtenues en microscopie de fluorescence du mode “crayon” et du mode “gomme”. Sur la **figure II.13A**, le motif formé de biotine apparaît en blanc et sur la **figure II.13B**, les régions modifiées, c'est-à-dire les régions où le complexe biotine-avidine a été détaché, apparaissent en sombre.



**Figure II.13** Utilisation de la SECM pour : (A) l'écriture de motifs de biotine sur un substrat de carbone, (B) le détachement de régions localisées de complexe biotinelavidine sur la surface<sup>86</sup>.

Conditions du mode “crayon”: microélectrode de Pt/Ir,  $E_T=0,85$  V vs. Ag/AgCl,  $E_S=-0,1$  V vs. Ag/AgCl,  $V=1 \mu\text{m s}^{-1}$ ,  $d=0,5 \mu\text{m}$ , solution de biotine hydrazide à  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  dans du tampon borate pH 9.

Puis ajout d'avidine pour obtenir la fluorescence.

Conditions du mode “gomme”: microélectrode d'or,  $E_T=-1,1$  V vs. Ag/AgCl,  $E_S=OCP$ ,  $V=1 \mu\text{m s}^{-1}$ ,  $d=0,5 \mu\text{m}$ , solution de 1 M KCl.

Le principal avantage du mode feedback est que le substrat n'est pas nécessairement conducteur. Cependant, la taille des motifs déposés est souvent supérieure à celle obtenue en mode direct.

#### **II.D. La SECM : un bon outil de micro-fabrication de surfaces ?**

Comme dans toute technique de microscopie à sonde locale, la vitesse de micro-fabrication est limitée par le mouvement de la sonde le long du substrat et par la cinétique de la réaction au substrat. Lorsque cette cinétique est rapide (contrôle diffusionnel au substrat), la microélectrode peut se déplacer à des vitesses élevées de l'ordre de quelques micromètres par seconde. Cependant, dans certains cas, la réaction chimique ou électrochimique sur la surface est le processus limitant. Actuellement, les modes utilisés en SECM (direct et feedback) ne peuvent rivaliser avec les méthodes conventionnelles telles que la photolithographie. Certains développements du microscope électrochimique, comme par exemple la configuration multi-sondes, devraient améliorer fortement ses capacités en terme de vitesse de modification de surfaces.

La résolution des motifs obtenus par SECM dépend de la taille et de la géométrie de la microélectrode, et de la distance à laquelle est placée la sonde au-dessus du substrat. En mode direct, la résolution est fonction principalement de la distribution du champ électrique, ce qui impose que la sonde soit très proche de la surface du substrat. Quant au mode feedback, le paramètre déterminant est la taille de la microélectrode. L'équipe de M. V. Mirkin a ainsi développé et caractérisé des nanoélectrodes utilisables en SECM, ce qui permettrait d'augmenter la résolution des motifs, et, plus particulièrement, dans le cas du mode feedback<sup>87</sup>.

Le principal avantage de la SECM en tant qu'outil de micro-modification de surfaces est sa capacité à induire une vaste gamme de réactions chimiques et électrochimiques sur des matériaux très variés. De plus, les conditions expérimentales sont relativement douces en terme de potentiel appliqué et de nature des électrolytes, ce qui représente un atout majeur par rapport aux techniques plus conventionnelles telles que la photolithographie ou l'impression par micro-contact. De plus, en mode feedback, le principal avantage réside dans le fait que le substrat n'est pas nécessairement conducteur, ce qui élargit nettement le champ d'application de la micro-fabrication par SECM.

Ainsi, la microscopie électrochimique à balayage est une technique de micro-modification de surfaces très prometteuse, dont la quantité d'applications, déjà relativement importante, sera accrue avec la miniaturisation des sondes.

L'avantage majeur de la microscopie électrochimique est sa dualité dans son utilisation afin de fonctionnaliser divers substrats et de réaliser également de l'imagerie de surfaces. La dernière partie de ce chapitre sera consacrée à l'imagerie de surfaces par SECM, et, plus particulièrement, à la détection d'éléments biologiques.

### **III. Détection d'éléments biologiques par SECM**

L'hétérogénéité des systèmes biologiques nécessite, dans de nombreux cas, une mesure localisée d'analytes spécifiques, comme, par exemple, pour mieux comprendre les fonctions des organes vivants étudiés ou encore pour la détection de l'ADN. Cette localisation de mesure doit être accompagnée d'une haute résolution temporelle et d'un minimum de perturbation du micro-environnement par la technique analytique. Ces considérations ont mené au développement de sondes analytiques miniaturisées, et, plus particulièrement, de microcapteurs électrochimiques. Le développement des ultramicroélectrodes, et de la microscopie électrochimique, ont amené une nouvelle voie d'étude des systèmes d'intérêt biologique. Dès 1989, J. Wang et ses collègues ont montré que la microscopie électrochimique pouvait fournir des informations concernant les variations spatiales des régions bioactives et les vitesses des processus biologiques<sup>88</sup>. En effet, l'imagerie par SECM peut être réalisée dans des solutions tamponnées, milieu privilégié pour la plupart des échantillons biologiques, en balayant une microélectrode, sans toucher le substrat biologique, et en interférant moins avec l'échantillon que les sondes utilisées dans d'autres techniques à sonde locale, telles que la microscopie à effet tunnel (STM) et la microscopie à force atomique (AFM). Cependant, ils ont également précisé que quelques sources d'erreur étaient à améliorer avant de pouvoir utiliser la SECM en tant que technique de routine quotidienne telles que la stabilité de la réponse de l'électrode, ou encore la reproductibilité du positionnement de la sonde au-dessus de l'échantillon biologique.

Avant de discuter de quelques applications d'imagerie par SECM sur différentes surfaces d'intérêt biologique, nous allons tout d'abord présenter les modes de la SECM utilisés pour la détection de molécules biologiques.

### III.A. Les modes d'exploitation pour la détection de systèmes biologiques

#### III.A.1. Le mode génération/collection

Ce mode est le même que celui présenté dans la première partie de ce chapitre, à l'exception que l'espèce est générée non pas par une autre électrode, mais, par une réaction biochimique (enzymatique par exemple), puis collectée à la sonde.

Deux cas peuvent être distingués selon la taille de la sonde par rapport à l'échantillon biologique. Lorsque la microélectrode a un diamètre supérieur à celui de l'échantillon, l'efficacité de la détection des espèces générées au substrat est proche de 100%. Ce mode est intéressant lorsque la concentration de l'analyte est faible. La situation la plus courante est celle dans laquelle la sonde a un faible diamètre, ce qui permet de réaliser une cartographie de la concentration locale d'une molécule générée ou consommée au niveau du substrat.

Le **tableau III.1** présente quelques exemples d'utilisation du mode génération/collection en SECM pour la détection de systèmes biologiques.

<b>échantillon biologique</b>	<b>espèce détectée</b>	<b>référence</b>
glucose déshydrogénase (GDH)	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$	98
$\beta$ -galactosidase	<i>p</i> -aminophénol	99
glucose oxydase (GOx)	$\text{H}_2\text{O}_2$	45
peroxydase (HRP)	$\text{FMA}^+$	110
uréase	$\text{NH}_4^+$	107
assemblage anticorps anti-digoxine et enzyme alcaline phosphatase	4-aminophénol	116
assemblage antigène carcino-embryonnaire et enzyme peroxydase	$\text{FMA}^+$	118
cellule neuronale (PC12)	$\text{O}_2$	13

**Tableau III.1** Quelques exemples d'utilisation du mode génération/collection pour l'imagerie de systèmes biologiques. FMA est le ferrocène méthanol.

L'utilisation d'une sonde ampérométrique en mode génération/collection entraîne la présence d'une composante de feedback dans le courant dans le cas où la réaction électrochimique au substrat est réversible et la distance entre la microélectrode et l'échantillon biologique est inférieure à 5 fois le rayon de la sonde. En se plaçant à des distances supérieures, ou en utilisant une sonde potentiométrique qui aura le rôle d'un capteur passif, les concentrations locales ne seront pas perturbées. De plus, le processus électrochimique peut se produire simultanément sur la surface entière. Cependant, le signal mesuré à la sonde ne permet pas de déterminer la distance entre la microélectrode et le substrat ; il est donc nécessaire d'utiliser d'autres méthodes telles que la modélisation du profil de concentration stationnaire<sup>89</sup> ou la calibration par une réaction électrochimique. Par

exemple, A. J. Bard et ses collègues ont utilisé la réduction de l'oxygène afin de déterminer cette distance sonde–substrat<sup>90</sup>. Ceci permet de ne pas ajouter de couple redox supplémentaire dans la solution afin de ne pas interférer avec les mesures de pH réalisées. Enfin, le processus à la sonde et la réaction biochimique étant deux phénomènes parfaitement indépendants, une vaste gamme de microcapteurs peut être utilisée en tant que sonde, comme, par exemple, les ISME décrites en I.B.1.b.

### **III.A.2. Le mode feedback**

Le mode feedback décrit dans la première partie de ce chapitre peut permettre également de réaliser de l'imagerie de systèmes biologiques. En effet, une couche de biomolécules immobilisée sur une surface conductrice limite le transfert d'électrons. Le courant de feedback positif obtenu au-dessus de ces zones sera donc différent de celui sur le substrat nu. Cependant, ce mode d'imagerie peut localiser des molécules biologiques immobilisées, mais ne fournit pas d'information concernant l'activité ou la fonction biochimique. De plus, il n'existe pas de relation mathématique entre le taux de recouvrement des biomolécules et le degré d'inhibition des réactions faradiques sur le substrat conducteur. En effet, ce degré est fonction de nombreux paramètres, tels que le taux de recouvrement, mais aussi la structure moléculaire de la couche immobilisée, le potentiel de l'électrode, la taille et l'hydrophobicité du médiateur utilisé, la nature et la densité de défauts de la couche de biomolécules.

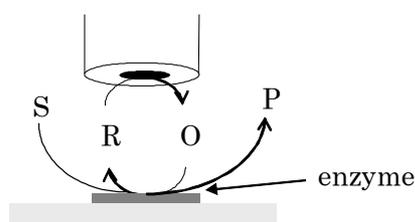
### **III.A.3. Le mode feedback avec catalyse enzymatique**

Chaque enzyme, protéine ou complexe de protéines, reconnaît spécifiquement une ou plusieurs molécules selon un principe de complémentarité, grâce à des sites de reconnaissance et de fixation situés à sa surface. Les molécules sur lesquelles agit une enzyme sont définies comme les substrats enzymatiques, en présence d'un co-facteur dans le cas des oxydases, réductases et déshydrogénases. Il est important ici d'insister sur la signification des termes employés dans ce manuscrit : nous définissons par substrat en SECM le support ou échantillon, à distinguer du substrat enzymatique qui désigne la molécule avec laquelle réagit l'enzyme.

Les enzymes agissent à faible concentration et se retrouvent intactes en fin de réaction : ce sont des catalyseurs biologiques. La vitesse de réaction enzymatique est mesurée à partir de la quantité de produit formée en un temps donné. L'affinité de l'enzyme pour son substrat est donnée par sa constante de Michaelis ou  $K_M$ . Celle-ci est spécifique à

chaque enzyme, et est définie comme la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de réaction enzymatique est la moitié de la vitesse de réaction maximale.

La **figure III.1** présente le principe de l'imagerie par mode feedback avec catalyse enzymatique. Le médiateur redox (R) est oxydé à la sonde pour donner une espèce O qui va diffuser jusqu'à l'enzyme immobilisée sur la surface. Cette dernière va catalyser l'oxydation du substrat enzymatique (noté S) pour régénérer le médiateur R qui diffuse ensuite jusqu'à la sonde où il sera de nouveau oxydé. Ce phénomène de "cyclage" entre la microélectrode et la surface va ainsi augmenter le courant d'oxydation du médiateur R. Le médiateur R est choisi tel que l'espèce O soit un co-facteur actif de l'enzyme, c'est-à-dire qu'il joue le rôle de donneur/accepteur d'électrons. Le phénomène de feedback dépend de la concentration du médiateur en solution, du diamètre de la sonde, et de la distance entre la sonde et le substrat.



**Figure III.1** Schéma du mode feedback avec catalyse enzymatique. S et P sont respectivement le substrat enzymatique et le produit de la réaction enzymatique. R est le médiateur redox présent en solution ; O est sa forme oxydée qui est générée électrochimiquement à la sonde.

Le **tableau III.2** présente quelques exemples d'enzymes dont l'activité peut être cartographiée par mode feedback avec catalyse enzymatique de la SECM selon le schéma présenté dans la **figure III.1**.

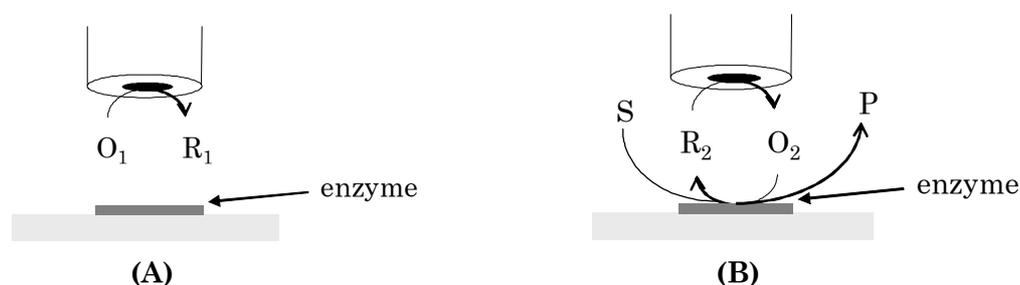
enzyme	substrat de l'enzyme	médiateur	référence
peroxydase (HRP)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Q/HQ	92
diaphorase (Dp)	NADH	FMA/FMA <sup>•+</sup>	85,94,95
glucose oxydase (GOx)	β-D-glucose	Fc/Fc <sup>•+</sup>	97
		Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>4-/3-</sup>	97
		Q/HQ	97
glucose déshydrogénase (GDH)	glucose	FMA/FMA <sup>•+</sup>	98
		Fc/Fc <sup>•+</sup>	98

**Tableau III.2 :** Quelques exemples d'imagerie d'activité enzymatique par mode feedback avec catalyse enzymatique de la SECM. Le produit formé à partir du médiateur à la sonde va réagir avec l'enzyme.

FMA est le ferrocène méthanol, Fc le ferrocène carboxylique, HQ l'hydroquinone et Q la quinone.

Trois conditions sont indispensables afin de réaliser de l'imagerie de l'activité enzymatique selon ce mode. Tout d'abord, il est nécessaire que les produits ou substrats de l'enzyme n'inhibent pas la réaction électrochimique du médiateur à la sonde. Ensuite, les espèces dissoutes ne doivent pas non plus interférer avec la réaction enzymatique. Enfin, cette réaction enzymatique doit produire un taux de régénération du médiateur R suffisant pour rivaliser avec son transport de masse du cœur de la solution jusqu'à la sonde. La distance entre la microélectrode et le substrat est donc un paramètre très important. La limitation de ce système repose dans la détermination de la part de la topographie et de celle de la réactivité de la surface sur la réponse en terme de courant mesuré à la microélectrode.

Afin de s'affranchir de cette limitation, une autre procédure consiste à utiliser deux médiateurs redox<sup>91</sup> : le premier (noté  $O_1$ ) est choisi tel qu'il n'interfère pas avec la réaction enzymatique, et le second (noté  $R_2$ ) est un co-facteur de l'enzyme immobilisée (**Fig. III.2**). En appliquant un premier potentiel à la sonde, le médiateur  $O_1$  est réduit à la microélectrode, et fournit une image en feedback négatif représentant la topographie de la surface. Puis un second potentiel est appliqué à la microélectrode tel que  $O_1$  ne réagisse pas à la sonde. Par contre, l'accepteur d'électrons de l'enzyme  $O_2$  est formé à partir du second médiateur  $R_2$ . Ces images en feedback positif sont ainsi comparées aux images précédentes, représentant la topographie de l'échantillon, afin d'obtenir une cartographie de l'activité enzymatique.



**Figure III.2** Schéma de la procédure utilisant deux médiateurs redox : (A) Feedback négatif en utilisant le médiateur  $O_1$  pour obtenir une image de la topographie de la surface, (B) Feedback positif avec catalyse enzymatique afin d'obtenir une cartographie de l'activité de l'enzyme en utilisant le médiateur  $R_2$  qui est oxydé à la sonde en  $O_2$ , accepteur d'électrons pour l'enzyme.

### III.B. Quelques applications

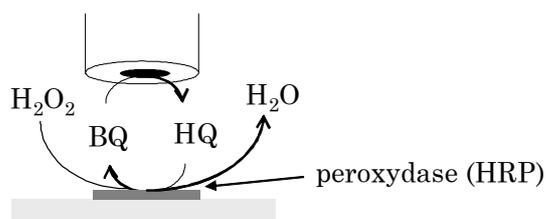
Dans cette partie, nous citerons quelques applications de l'imagerie de systèmes biologiques par SECM. Ces études sont classées selon la nature de l'élément biologique. Une partie d'entre elles figurent également dans les tableaux récapitulatifs de l'utilisation de chacun des modes d'exploitation dans la partie précédente (**tableaux III.1 et 2**).

### III.B.1. La détection de l'activité enzymatique

L'imagerie par SECM de l'activité enzymatique sur des substrats isolants ou conducteurs peut être réalisée par le mode feedback ou le mode génération/collection.

#### III.B.1.a. Sur substrats isolants

L'équipe de A. J. Bard a utilisé le mode feedback avec catalyse enzymatique de la microscopie électrochimique afin d'étudier une enzyme, la peroxydase (HRP), immobilisée avec des copolymères sur des substrats isolants (verre ou membrane polycarbonate)<sup>92</sup>. La benzoquinone présente en solution est réduite en hydroquinone à la microélectrode polarisée négativement (fibre de carbone ou platine). L'hydroquinone diffuse jusqu'au substrat où elle va être oxydée par le peroxyde d'hydrogène,  $H_2O_2$ , présent en solution dans une réaction catalysée par la peroxydase sur le substrat (**Fig. III.3**). Le courant de feedback positif obtenu est produit par la réaction d'oxydation de l'hydroquinone par catalyse de l'enzyme, ce qui est confirmé par l'obtention d'un courant de feedback négatif loin des spots où l'enzyme est immobilisée, et sur des spots de copolymère dépourvus d'enzyme.

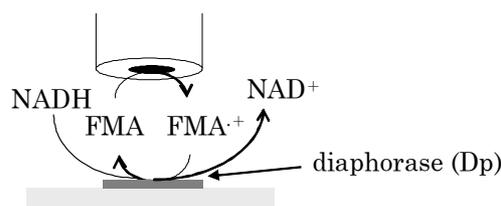


**Figure III.3** Schéma de la réaction de feedback avec catalyse enzymatique<sup>92</sup>. Q représente la quinone présente en solution qui est réduite en HQ, hydroquinone.

T. Matsue et ses collègues se sont également intéressés à l'imagerie de l'activité enzymatique de la peroxydase (HRP), et ont développé une nouvelle technique basée sur le couplage entre la microscopie électrochimique et la chimiluminescence (SCLM, "Scanning ChemiLuminescence Microscopy")<sup>93</sup>. En effet, l'un des inconvénients de la SECM est que des mesures simultanées de réactivité et de topographie sont très difficiles puisque ces deux grandeurs ne peuvent pas être séparées. Le couplage des deux techniques proposé par cette équipe permet d'obtenir, d'une part, des informations topographiques à partir des images basées sur les courants redox, et, d'autre part, des données concernant l'activité de la peroxydase immobilisée par l'étude des images en chimiluminescence. La microélectrode utilisée est constituée d'une fibre de carbone insérée dans un capillaire de verre étiré. Lorsque la microélectrode est déplacée au-dessus d'un spot où est immobilisée l'enzyme dans une solution aqueuse contenant le luminol, la peroxydase va catalyser l'oxydation du luminol pour émettre de la chimiluminescence, qui est détectée par le photomultiplicateur.

L'intensité collectée est représentée en fonction du positionnement de la sonde, ce qui donne une cartographie de l'activité de l'enzyme. Une image de la topographie du substrat peut également être obtenue par SECM en représentant le courant de réduction de l'oxygène en fonction du positionnement de la microélectrode au-dessus du substrat.

L'équipe de T. Matsue a étudié par SECM l'activité d'une autre enzyme, la diaphorase<sup>84,85,94,95</sup>. La micro-fabrication de motifs enzymatiques sur un substrat de verre a été réalisée par mode feedback de la SECM<sup>84</sup> (partie II.C.4 et figure II.9 de ce chapitre). Ces motifs enzymatiques ont été caractérisés par SECM en utilisant le mode feedback avec catalyse enzymatique.

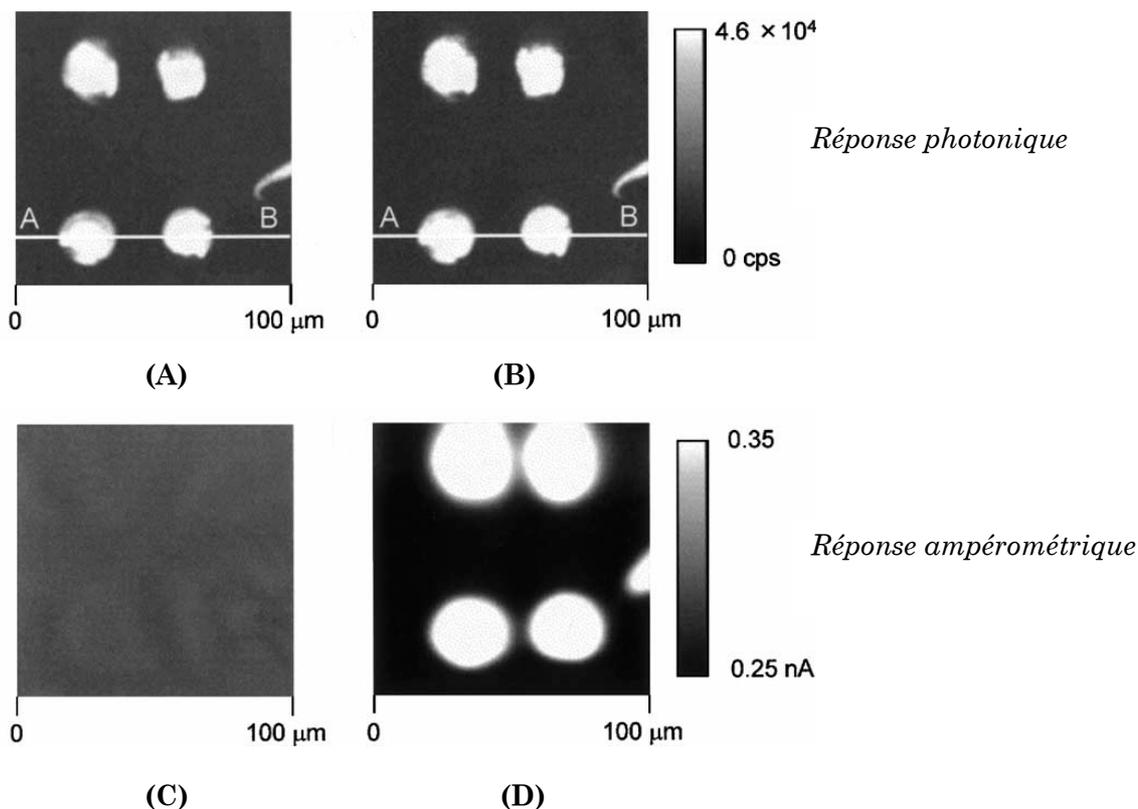


**Figure III.4** Schéma de la réaction de feedback avec catalyse enzymatique utilisée dans le cas de la diaphorase<sup>84</sup>. FMA est le ferrocène méthanol et NADH la nicotinamide.

La microélectrode est déplacée le long du substrat dans une solution contenant le ferrocène méthanol (FMA) et la nicotinamide (NADH). Le médiateur FMA est oxydé à la microélectrode polarisée positivement pour donner FMA<sup>+</sup> qui va diffuser jusqu'au substrat. La diaphorase va catalyser l'oxydation de NADH pour régénérer FMA qui sera de nouveau oxydé à la sonde (**Fig. III.4**). Ainsi, la représentation du courant d'oxydation de FMA à la microélectrode permet d'obtenir des images de la surface.

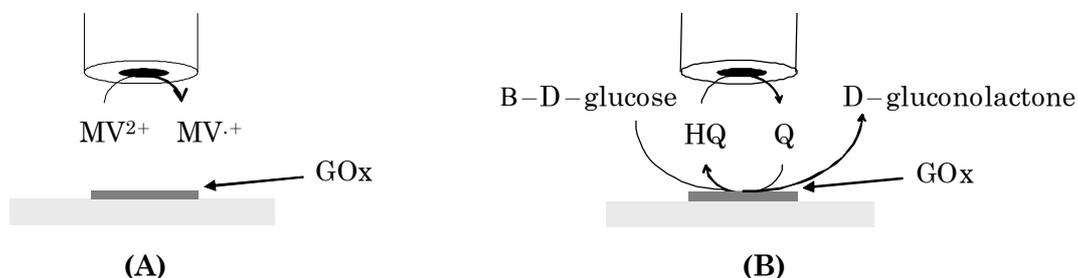
La même équipe a ensuite modifié ce protocole en développant un système couplant la microscopie électrochimique et la microscopie confocale à balayage (SCFM, "scanning confocal microscopy")<sup>96</sup>. Le principe est le même que celui expliqué dans la **figure III.4**. De plus, dans ce cas, le centre actif de la diaphorase va émettre une intensité de fluorescence qui sera détectée par le système SCFM (excitation à  $\lambda=473$  nm). Ainsi, la SECM va fournir des informations concernant la réaction enzymatique, alors que la SCFM apporte des données sur la localisation de l'enzyme active. La **figure III.5** présente les images des spots de diaphorase. Les 4 spots émettent une forte intensité de fluorescence en présence ou en absence de NADH (**Fig. III.5A et B**), mais l'addition de NADH réduit la diaphorase et diminue légèrement l'émission de fluorescence à partir des spots. À l'inverse, les images SECM diffèrent fortement en fonction de la présence ou non de NADH (**Fig. III.5C et D**). Aucun courant n'est observé en absence de NADH, alors que les quatre spots apparaissent

après son addition. Cette augmentation du courant d'oxydation de FMA mesuré à la sonde est causée par l'oxydation de NADH catalysée par la diaphorase.



**Figure III.5** (A) et (B) Images SCFM des spots de diaphorase (A) avant, et (B) après ajout de NADH, (C) et (D) images SECM correspondant respectivement aux images (A) et (B)<sup>96</sup>.  $V=10 \mu\text{m s}^{-1}$ ,  $E_T=0,5 \text{ V}$  vs. Ag/AgCl.

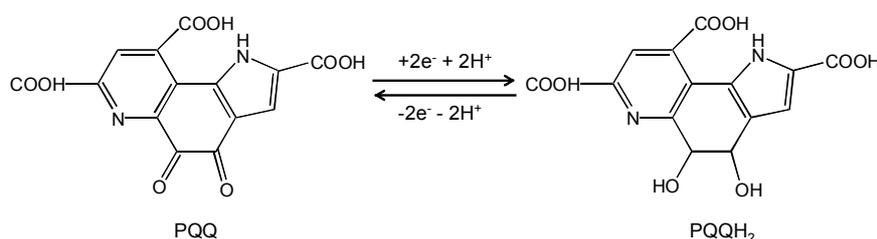
L'équipe de A. J. Bard a utilisé la SECM afin d'étudier les réactions de transfert d'électrons d'espèces électrogénérées à la sonde se produisant sur des surfaces non conductrices contenant une enzyme redox, la glucose oxydase<sup>97</sup>. Ils ont utilisé une solution contenant deux médiateurs redox et le substrat de l'enzyme, le  $\beta$ -D-glucose (**Fig. III.6**).



**Figure III.6** Méthode développée par D. T. Pierce et al. pour l'étude de l'activité enzymatique de la glucose oxydase ( $\text{GOx}$ )<sup>97</sup> : (A) feedback négatif en utilisant pour médiateur le méthyl viologène  $\text{MV}^{2+}$ , (B) feedback positif avec catalyse enzymatique en utilisant l'hydroquinone (HQ) en tant que médiateur, qui va être oxydée en quinone (Q) à la sonde, jouant le rôle d'accepteur d'électron pour la glucose oxydase.

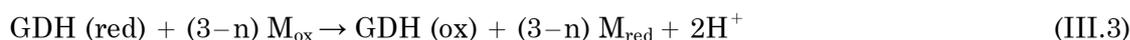
Le premier médiateur, le couple  $MV^{2+/+}$  permet de déterminer la distance microélectrode–substrat, sans interférer avec la catalyse de l'enzyme. Le second médiateur (ferrocène carboxylique  $^{0/+}$ , ferrocyanure  $^{4-/3-}$  ou Q/HQ) joue le rôle d'accepteur d'électrons pour la glucose oxydase.

Plus récemment, l'équipe de G. Wittstock a étudié l'activité de la glucose déshydrogénase (GDH) par les modes feedback et génération/collection de la SECM dont les principes respectifs sont présentés dans la **figure III.8**<sup>98</sup>. La quinone pyrroloquinoline (PQQ) est un co–facteur redox du mécanisme catalytique de la glucose déshydrogénase. La quinone à l'état oxydé peut être transformée en sa forme réduite, la quinole (PQQH<sub>2</sub>) par le transfert de deux électrons et de deux protons (**Fig. III.7**).



**Figure III.7** Réaction de réduction de la quinone à l'état oxydé (PQQ) pour donner la forme réduite quinole (PQQH<sub>2</sub>).

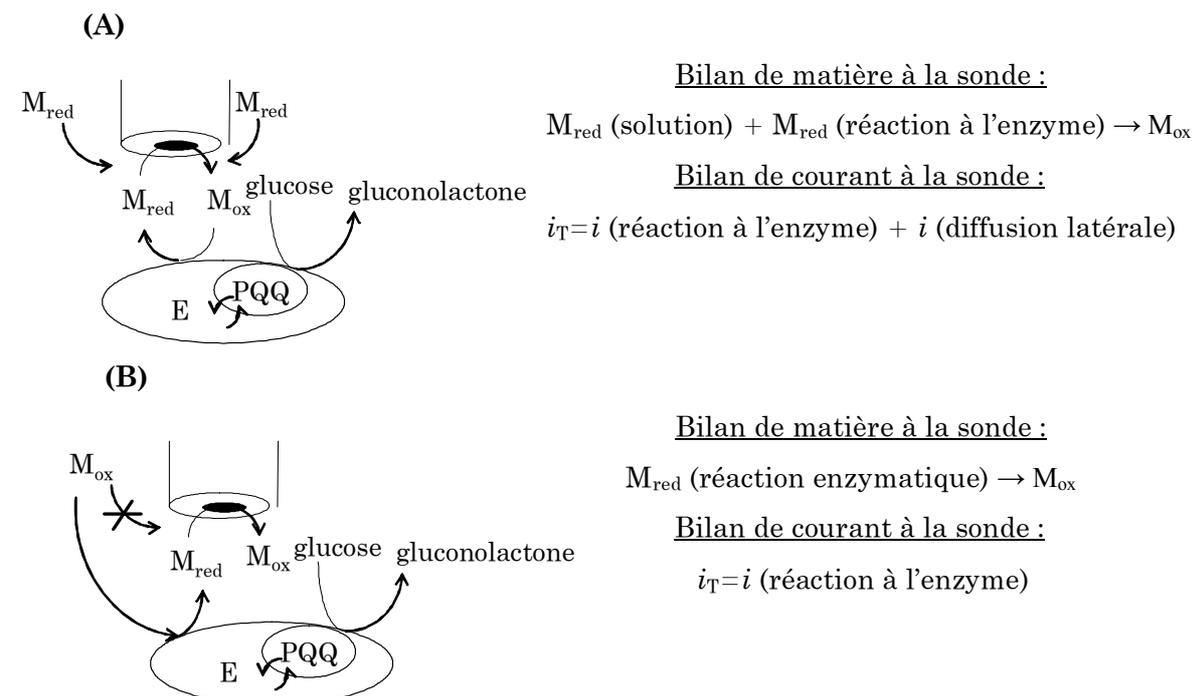
Le mécanisme catalytique de la glucose déshydrogénase a fait l'objet de nombreuses études, et plusieurs mécanismes peuvent être proposés. Nous n'en retiendrons qu'un pour la clarté de l'explication :



où  $M_{\text{ox}}$  et  $M_{\text{red}}$  sont respectivement les formes oxydée et réduite du médiateur redox.

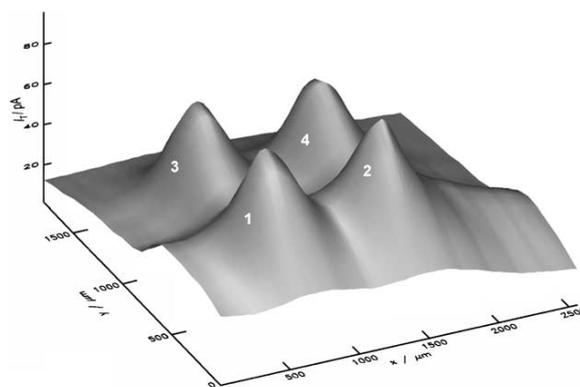
L'enzyme est liée à des billes paramagnétiques déposées en des sites microscopiques d'une surface de verre par l'intermédiaire de la forte affinité streptavidine–biotine. En mode feedback, trois médiateurs ont été utilisés : le ferrocène méthanol, le ferrocène carboxylique, le *p*-aminophénol (PAP). Parmi eux, le *p*-aminophénol présente la plus forte sensibilité, mais celle-ci reste cependant inférieure à celle obtenue en mode génération/collection. De plus, le mode génération/collection est peu sensible aux variations de la distance de travail, ce qui permet de travailler à des distances plus élevées et donc de limiter les risques de collision de la sonde avec la surface. La glucose déshydrogénase montre une activité catalytique plus importante que la glucose oxydase, et se présente ainsi comme un

substituant prometteur pour son utilisation dans les capteurs à glucose et dans le marquage enzymatique des puces.



**Figure III.8** Principe des modes (A) feedback avec catalyse enzymatique et (B) génération/collection utilisés<sup>98</sup>. E représente l'enzyme, la glucose déshydrogénase (GDH) ; PQQ est la quinone pyrroloquinoline et est utilisée en tant que co-facteur de l'enzyme ;  $M_{ox}$  et  $M_{red}$  sont respectivement les formes oxydée et réduite du médiateur.

Cette équipe s'est également intéressée à l'activité enzymatique de la  $\beta$ -galactosidase immobilisée sur des billes paramagnétiques<sup>99</sup>. Le mode génération/collection de la SECM a été utilisé afin de contrôler l'oxydation du *p*-aminophénol (PAP) formé par l'hydrolyse catalysée par l'enzyme du *p*-aminophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside (PAPG) à la surface des billes. La formation de ces spots enzymatiques ouvre une nouvelle voie de construction de capteurs enzymatiques multiparamétriques (**Fig. III.9**).



**Figure III.9** Image en mode génération/collection par SECM de micro-dépôts de  $\beta$ -galactosidase,  $E_T=0,35 \text{ V}$ ,  $V=10 \mu\text{m s}^{-1}$ , microélectrode de platine de  $25 \mu\text{m}$  de diamètre<sup>99</sup>.

C. Zhao et G. Wittstock ont très récemment montré que le mode feedback était particulièrement adapté à l'imagerie de réseaux avec de fortes densités de motifs enzymatiques<sup>100</sup>. Le mode génération/collection est préconisé lorsqu'une forte sensibilité de détection est recherchée.

H. Yamada *et al.* ont réalisé l'imagerie de diaphorase et d'albumine co-immobilisées sur un substrat de verre par microscopie électrochimique<sup>101</sup>. Ils utilisent deux types de méthodes de balayage afin d'obtenir des données concernant l'activité électrochimique et la topographie simultanément *via* l'utilisation d'une microélectrode vibrante (piézoélectrique). Le premier mode consiste à déplacer la sonde verticalement au cours de son balayage de la surface afin de conserver une force de cisaillement constante. Ceci permet de placer la microélectrode très près de la surface (typiquement entre 10 et 30 nm) sans risque de destruction de la morphologie de la couche enzymatique. Cependant, une grande partie de la diaphorase immobilisée sur le verre est déplacée, ce qui peut être dû à une collision entre la microélectrode et la surface lors du déplacement latéral de la sonde. Le second mode utilisé ("standing mode"), proposé par l'équipe de A. J. Bard<sup>102</sup>, consiste à répéter une approche suivie d'une rétractation de la sonde en chaque point de mesure du courant. La rétractation de la sonde (environ 2  $\mu\text{m}$ ) permet d'éviter le contact avec la surface lors de son mouvement latéral.

### III.B.1.b. Sur substrats conducteurs

Différentes enzymes ont été étudiées sur substrat conducteur par SECM afin d'obtenir une cartographie de leur activité.

#### III.B.1.b.i. Intérêt du mode génération/collection

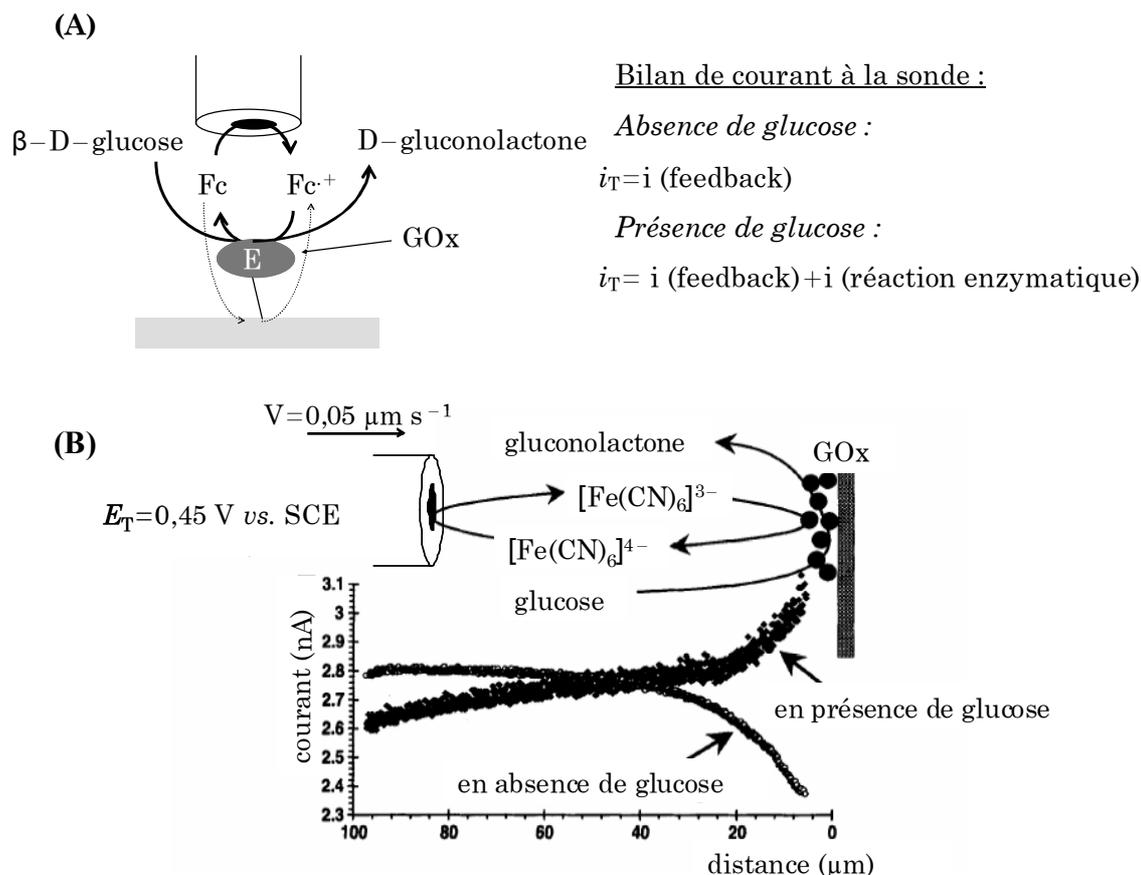
L'équipe de W. Schuhmann a étudié l'activité enzymatique de la glucose oxydase, liée de manière covalente à des lignes de poly-N-( $\omega$ -amino-alkyl)pyrrole formées par mode direct de la SECM (partie II.B.2)<sup>6</sup>.

En présence du médiateur redox, un courant de feedback positif est obtenu en déplaçant la microélectrode au-dessus d'une ligne de polypyrrole fonctionnalisé par l'enzyme et en absence du substrat enzymatique, le  $\beta$ -D-glucose. Le courant de feedback est moins important au-dessus des lignes de polymère que sur la surface d'or car le polymère représente une barrière de diffusion additionnelle entre la sonde et la surface d'or.

En présence du substrat enzymatique (glucose), la glucose oxydase est impliquée dans la réaction de régénération du médiateur, et le courant de feedback obtenu correspond à la

somme du courant de feedback positif conventionnel et du courant de feedback avec catalyse enzymatique. Le courant de feedback dû uniquement à la catalyse enzymatique est donc égal à la différence entre le courant obtenu en présence de glucose et celui obtenu en son absence (Fig. III.10A).

En raison de la superposition des deux courants en présence du substrat enzymatique, l'obtention d'une cinétique enzymatique est plus difficile que dans le cas d'enzymes immobilisées sur un substrat isolant ou non polarisé (Fig. III.10B).

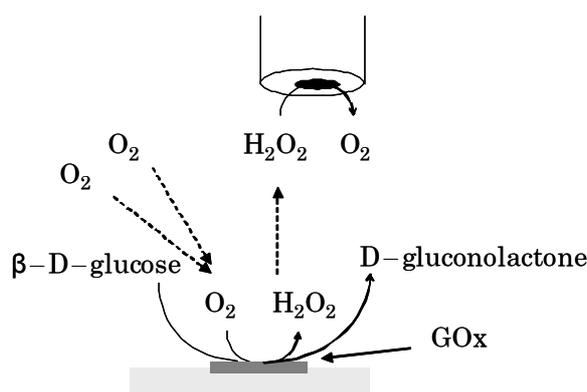


**Figure III.10** *Activité enzymatique de la glucose oxydase (GOx) par mode feedback avec catalyse enzymatique de la SECM : différences entre substrat isolant et substrat conducteur<sup>6</sup>. (A) Schéma du principe utilisé sur substrat conducteur. Fc est le ferrocène carboxylique ; (B) Représentation schématique du mode feedback avec catalyse enzymatique et des courbes d'approche en présence d'un médiateur redox et du glucose (feedback positif), et en présence du médiateur redox uniquement (feedback négatif) dans le cas d'un spot macroscopique enzymatique sur substrat isolant.*

G. Wittstock et W. Schuhmann ont ensuite étudié l'activité enzymatique de la glucose oxydase par SECM sur d'autres substrats<sup>45</sup>. Par désorption localisée des motifs d'alcanethiolates sur une monocouche auto-assemblée par mode direct de la SECM (partie II.B.3), ils ont formé des zones microscopiques d'or nu, sur lesquelles la cystamine puis la

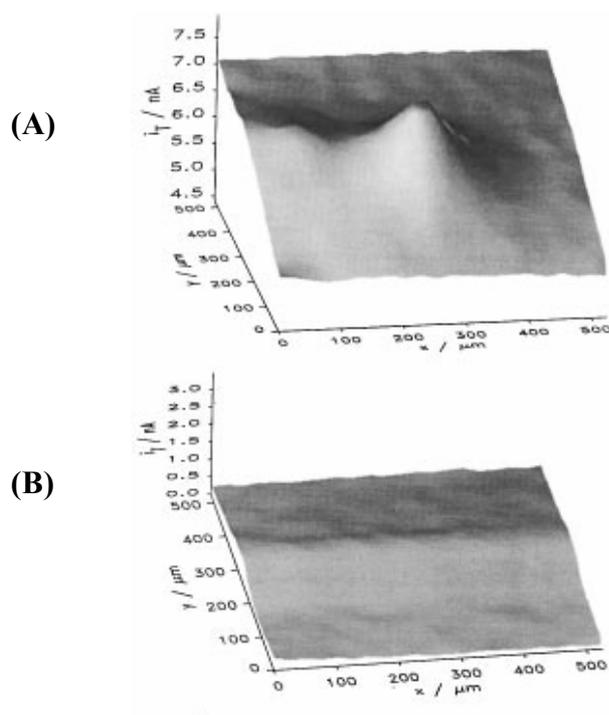
glucose oxydase sont liées. Le mode feedback n'est pas adapté ici en raison de l'interférence entre le courant de feedback positif dû à la réaction enzymatique et celui du transfert d'électrons hétérogène à la surface d'or. En effet, cette équipe a d'abord utilisé la procédure citée précédemment qui consiste à estimer la contribution due à l'activité enzymatique par différence entre les courants de feedback obtenus en présence et en absence de glucose. Cependant, dans ce cas, la contribution due au transfert d'électrons hétérogène n'est pas uniforme sur la zone balayée. L'enzyme immobilisée est moins efficace en tant que barrière de diffusion que la monocouche auto-assemblée, et des courants de feedback très importants sont mesurés au-dessus de la zone modifiée, même sans activité enzymatique.

Cette équipe s'est affranchie de ce problème en utilisant le mode génération/collection de la SECM (**Fig. III.11**). Celui-ci consiste à détecter la production de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) à la sonde ampérométrique (diamètre de  $25\ \mu\text{m}$ ) polarisée positivement dans une solution contenant le substrat de l'enzyme (glucose). En présence de glucose, la réaction enzymatique se produit, et le gluconolactone et le peroxyde d'hydrogène sont formés.



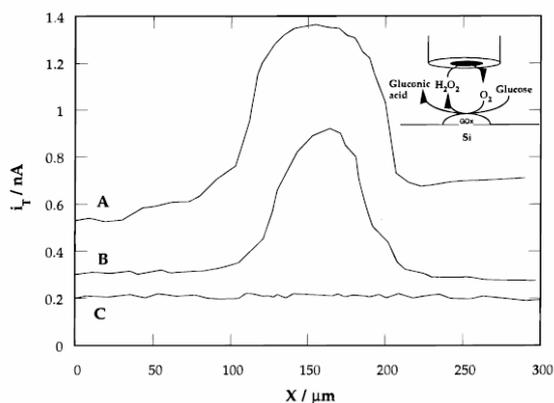
**Figure III.11** Principe du mode génération/collection pour l'imagerie de l'activité enzymatique de la glucose oxydase<sup>45</sup>.

De forts courants sont mesurés à la sonde au-dessus d'une zone de production de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ce qui permet d'obtenir une cartographie de l'activité enzymatique de la glucose oxydase (**Fig. III.12A**). Si la solution ne contient pas de glucose, aucun courant d'oxydation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  n'est mesuré à la sonde. De faibles courants sont obtenus (**Fig. III.12B**), ce qui confirme que le signal observé dans le cas de la **figure III.12A** est dû à l'oxydation de l'espèce  $\text{H}_2\text{O}_2$  générée par l'enzyme.



**Figure III.12** Images SECM en mode génération/collection de la glucose oxydase liée à la surface<sup>45</sup> (A) présence de glucose (50 mM), (B) absence de glucose dans la solution.  $E_T=0,4$  V,  $V=15 \mu\text{m s}^{-1}$ .

Ainsi, le mode feedback pour la détection de l'activité enzymatique apparaît problématique sur substrats conducteurs. Le mode génération/collection est plus adapté, mais entraîne une perte dans la résolution latérale et une analyse cinétique difficile en raison des profils de concentration non stationnaires. Sous d'importantes concentrations de glucose en solution, le peroxyde d'hydrogène est formé de manière continue au substrat, ce qui augmente la valeur des courants de fond lors de l'acquisition des images en SECM. G. Wittstock et W. Schuhmann ont alors utilisé le concept de "chemical lens"<sup>45</sup> pour résoudre ces difficultés qui consiste à introduire une réaction chimique homogène qui va rivaliser avec la réaction de détection à la sonde. Cette seconde réaction enzymatique va catalyser la décomposition des espèces générées au substrat ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et donc diminuer leur durée de vie. En ajoutant une autre enzyme, la catalase, en faible quantité dans la solution de travail, la distance de diffusion de  $\text{H}_2\text{O}_2$  est limitée, ce qui permet d'augmenter la résolution latérale et de diminuer les courants de fond. Afin d'obtenir les conditions optimales pour réaliser de l'imagerie, il est nécessaire que la catalase soit présente en solution à une concentration suffisante pour que la durée de vie de l'espèce  $\text{H}_2\text{O}_2$  lui permette de diffuser dans l'espace entre la sonde et le substrat, mais insuffisante pour que cette espèce s'accumule en solution.



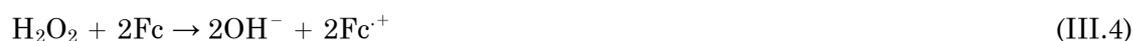
**Figure III.13** Lignes obtenues en déplaçant la microélectrode (or – 25  $\mu\text{m}$  de diamètre) polarisée à 0,4 V à  $V=5 \mu\text{m s}^{-1}$  au-dessus d'un micro-dépôt d'or fonctionnalisé par la glucose oxydase<sup>67</sup>: (A) en présence de glucose (50 mM dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4), (B) en présence de glucose et de catalase, (C) dans le tampon phosphate seul.

Selon le même procédé, l'équipe de D. Mandler a cartographié, en mode génération/collection associé au "chemical lens", l'activité enzymatique de la glucose oxydase immobilisée, par l'intermédiaire de monocouches de cystamine, sur des micro-dépôts d'or obtenus sur un substrat de silicium par mode feedback de la SECM (partie II.C.1a)<sup>67</sup>.

La **figure III.13** montre l'intérêt d'utiliser le concept de "chemical lens". En effet, la surface d'activité enzymatique est supérieure à celle réellement occupée par la glucose oxydase, ce qui indique une perte de la résolution latérale en utilisant le mode génération/collection (**Fig. III.13A**). Le principe de "chemical lens" qui consiste ici à ajouter une seconde enzyme, la catalase, permet d'augmenter cette résolution latérale (**Fig. III.13B**). En absence de glucose, l'activité de l'enzyme n'est pas détectée (**Fig. III.13C**).

### III.B.1.b.ii. Détection de l'activité d'une enzyme

Quelques années plus tard, T. Wilhelm et G. Wittstock ont utilisé le mode génération/collection afin de détecter la peroxydase immobilisée sur des monocouches auto-assemblées (SAMs) par détection à la microélectrode de l'ion  $\text{Fc}^+$  formé au substrat selon la réaction ci-dessous<sup>103</sup>.



L'équipe de G. Nagy s'est intéressée aux réactions biocatalytiques à l'intérieur de la couche enzymatique (glucose oxydase) d'un biocapteur<sup>104</sup>. Les concentrations instantanées de l'oxygène dissout et du peroxyde d'hydrogène sont étudiées par mesure du courant à une

microélectrode ampérométrique, alors que des sondes miniaturisées potentiométriques permettent de mesurer les variations locales de pH. En traçant des courbes d'approche, ils ont observé qu'un maximum local de peroxyde d'hydrogène et un minimum d'oxygène sont obtenus à une distance de 200  $\mu\text{m}$  de la frontière substrat/couche enzymatique. Ces résultats expérimentaux ont été corrélés à une modélisation des profils de concentration par la méthode des différences finies.

L'équipe de A. J. Bard a montré l'intérêt d'utiliser des biocapteurs ampérométriques en tant que sonde en microscopie électrochimique<sup>105</sup>. Ces sondes sont constituées d'une enzyme, la peroxydase (HRP), immobilisée sur une microélectrode de carbone par l'intermédiaire d'un polymère redox. Ces microélectrodes ont été utilisées par cette équipe afin de mesurer le peroxyde d'hydrogène dans la couche de diffusion pendant la réduction électrochimique de l'oxygène sur des substrats d'or et de carbone. Ces biocapteurs permettent également de détecter la glucose oxydase immobilisée sur un substrat de carbone vitreux à travers la production de peroxyde d'hydrogène pendant la réaction enzymatique du glucose. En effet, la glucose oxydase va générer le peroxyde d'hydrogène suivant les réactions 5 et 6, et, après quelques minutes, un profil de concentration quasi-stationnaire du peroxyde d'hydrogène est développé sur la surface de carbone.

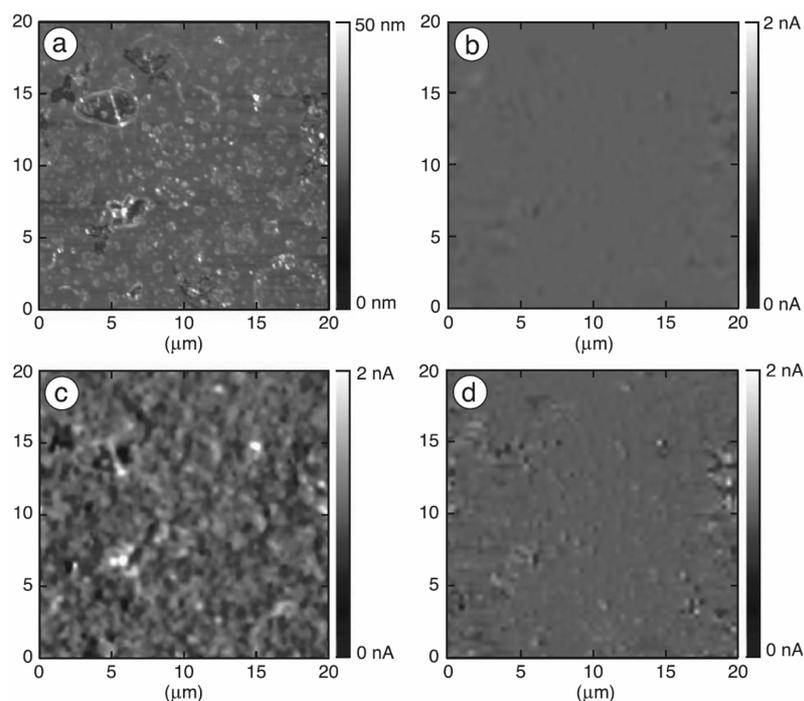


L'équipe de G. Denuault a ensuite montré que l'utilisation d'électrodes micro-disques mésoporeuses améliore la détection ampérométrique du peroxyde d'hydrogène produit par la glucose oxydase immobilisée, en raison de la combinaison d'une diffusion quasi-hémisphérique et d'une grande surface électroactive<sup>106</sup>. La réponse stationnaire est très stable et présente une dépendance linéaire sur une large gamme de concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ce qui permet de relier plus facilement la réponse de la sonde à l'activité enzymatique, en comparaison aux sondes conventionnelles de forme disque.

Le mode génération/collection associé à une sonde potentiométrique a été utilisé par B. R. Horrocks et M. V. Mirkin pour l'étude de l'activité enzymatique de l'uréase<sup>107</sup>. Cette enzyme en solution aqueuse s'adsorbe spontanément sur l'or, et catalyse l'hydrolyse de l'urée en ions ammonium et bicarbonate. L'activité de cette enzyme immobilisée sur une microélectrode d'or de 100  $\mu\text{m}$  de diamètre a été observée à l'aide d'une sonde potentiométrique à ions sélectifs en détectant le produit  $\text{NH}_4^+$  de la réaction enzymatique.



Récemment, Y. Hirata *et al.* ont couplé la microscopie électrochimique avec des sondes (cantilever) de microscopie à force atomique<sup>108</sup>. Pour un maintien constant et précis de la distance entre la sonde et le substrat, la sonde SECM–AFM résultante est contrôlée par la technique de microscopie à force dynamique (DFM, “Dynamic Force Microscopy”) avec une excitation en champ magnétique. La figure III.14A présente l’image topographique de la couche complexe contenant l’enzyme, tandis que les figures III.14B et C montrent les images SECM obtenues avant et après ajout du glucose. En absence de glucose, le courant mesuré à la sonde SECM–AFM est négligeable, alors qu’en présence de glucose, une augmentation du courant d’oxydation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est observée. La résolution de l’image représentant la valeur du courant à la sonde en fonction de son positionnement est élevée, ce qui permet de distinguer un grain d’un agrégat ou d’un défaut par comparaison avec l’image topographique. Lorsque le substrat est polarisé à 0,9 V, le peroxyde d’hydrogène généré au cours de la réaction enzymatique est consommé au substrat, ce qui diminue le courant mesuré à la sonde (Fig. III.14D).



**Figure III.14** Topographie et images SECM enregistrées simultanément d’une couche complexe de polyélectrolytes contenant la glucose oxydase en utilisant le mode de microscopie à force dynamique (DFM) de la SECM–AFM<sup>108</sup>. (a) image topographique, (b) image SECM du courant à la sonde polarisée à 0,9 V en absence de glucose, (c) mêmes conditions que B, mais en présence de glucose (10 mM), (d) mêmes conditions que C avec  $E_S=0,9$  V.

En utilisant également des sondes SECM–AFM<sup>109</sup>, C. Kranz et ses collègues ont étudié l’activité enzymatique de la peroxydase par mode génération/collection de la SECM<sup>110</sup>.

Il consiste ici en la détection ampérométrique de l'ion ferrocinium  $\text{FMA}^+$  généré au cours de la réaction 8 catalysée par la peroxydase.



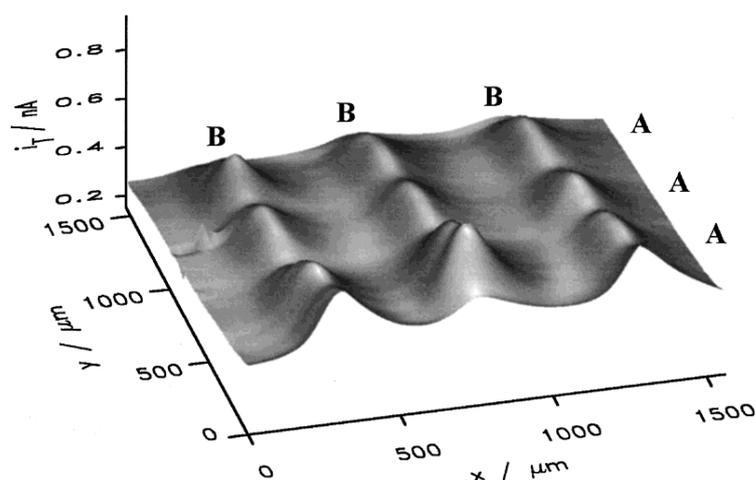
L'un des principaux intérêts d'un tel système est de pouvoir diminuer la distance entre la sonde et le substrat, ce qui permet d'augmenter la résolution latérale en mode génération/collection.

Après l'étude de l'activité enzymatique de la peroxydase sur substrat isolant par couplage entre la microscopie électrochimique (SECM) et la microscopie de chimiluminescence (SCLM)<sup>93</sup>, T. Matsue et ses collègues se sont intéressés à son utilisation pour la détection du glucose et de l'acide urique<sup>111</sup>. D'une part, le peroxyde d'hydrogène généré par des spots de glucose oxydase et/ou uricase est oxydé à la microélectrode dans une solution contenant le glucose et/ou l'acide urique (imagerie SECM). D'autre part, un capillaire de verre effilé rempli d'une solution de luminol et de peroxydase (HRP) est utilisé comme sonde pour générer la chimiluminescence (imagerie SCLM). Les cartographies à deux dimensions représentant le courant d'oxydation et l'intensité du photomultiplicateur en fonction du positionnement de la sonde montrent des contrastes qui reflètent l'activité de la glucose oxydase immobilisée et de l'uricase. Ainsi, les activités des enzymes peuvent être mesurées selon deux procédés différents, ce qui fiabilise la détection.

L'équipe de T. Matsue a étudié l'activité enzymatique de la diaphorase immobilisée sur des réseaux d'électrodes d'or<sup>112</sup>, en utilisant le même principe que celui présenté dans la **figure III.4**. La distance entre la microélectrode et la surface est un paramètre essentiel pour la sensibilité et la qualité de l'image SECM obtenue. C'est pourquoi cette équipe a utilisé un système de microscopie électrochimique équipé d'un contrôle de la distance en mesurant les forces de cisaillement exercées entre l'échantillon et la sonde. Ce système permet de déplacer la microélectrode très près de la surface (50 nm), sans la heurter. Les augmentations de la sensibilité et du contraste de l'image obtenue en SECM peuvent être très intéressantes pour la caractérisation d'enzymes et de cellules vivantes.

### III.B.1.b.iii. *Détection de systèmes multi-enzymes*

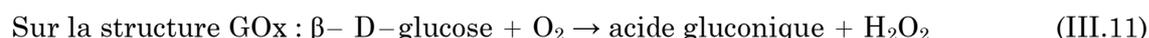
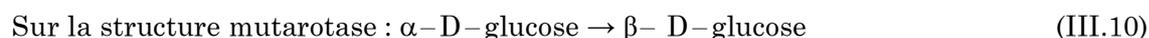
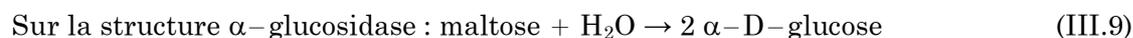
L'équipe de W. Schuhmann a construit des systèmes multi-enzymes<sup>113</sup> constitués de lignes entrecroisées de différentes enzymes (système glucose oxydase et catalase, ou système  $\alpha$ -glucosidase, mutarotase, et glucose oxydase)<sup>114</sup>.



**Figure III.15** Image SECM en mode génération/collection d'une microstructure multi-enzymes<sup>114</sup> :  $\alpha$ -glucosidase et mutarotase (ligne A) et glucose oxydase (ligne B).

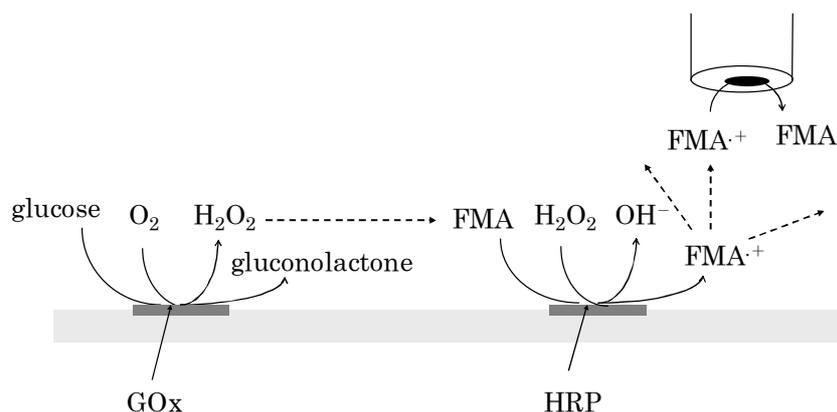
Ces systèmes ont ensuite été caractérisés par le mode génération/collection de la SECM. Considérons la première enzyme A qui va générer un produit  $P_A$  à partir de son substrat  $S_A$ . Il existe alors de nombreuses possibilités d'interactions de ce produit  $P_A$  avec la seconde ou la troisième enzyme. Par exemple, ce produit peut être consommé par l'enzyme B, ce qui correspond à un courant important sur la ligne de l'enzyme A et un courant faible pour celle de B. Une autre possibilité est que le substrat  $S_A$  soit le produit  $P_B$  de la réaction catalysée par l'enzyme B. Dans ce cas, la sonde ne détectera un courant correspondant à  $P_A$  qu'à l'intersection des deux lignes des enzymes A et B. En ce point, la proximité des deux enzymes permet la formation du produit  $P_A$  par la génération localisée du substrat  $S_A$  généré par B.

La **figure III.15** présente l'image obtenue en mode G/C d'un système multi-enzymes constitué de  $\alpha$ -glucosidase et mutarotase sur la ligne A, et glucose oxydase (GOx) sur la ligne B. Plusieurs réactions peuvent se produire :



Un courant est observé uniquement aux intersections entre les deux lignes, ce qui indique que le maltose a réagi selon la réaction catalysée par la  $\alpha$ -glucosidase, ce qui conduit à l'oxydation du glucose par la glucose oxydase, et donc à un courant d'oxydation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  détecté à la sonde.

T. Wilhelm et G. Wittstock ont étudié les interactions d'une microstructure multi-enzymatique constituée de spots de peroxydase (HRP) et de glucose oxydase (GOx)<sup>115</sup>.



**Figure III.16** Schéma du mode génération/collection pour la détection simultanée de l'activité des deux enzymes immobilisées (HRP et GOx)<sup>115</sup>.

Ils ont montré que le mode génération/collection de la SECM permettait de détecter les activités de ces deux enzymes collectivement (**Fig. III.16**) ou individuellement. En effet, d'une part, en présence de glucose, dioxygène (O<sub>2</sub>) et hydroxyméthyl ferrocène (FMA), la réaction enzymatique au niveau du spot de la glucose oxydase va former le gluconolactone et le peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est un substrat de la peroxydase et va être réduit au niveau des spots de cette seconde enzyme, l'espèce FMA jouant le rôle de donneur d'électrons. Ainsi, l'espèce formée FMA<sup>•+</sup> pourra être détectée à la sonde ( $E_T=0$  V). Les images SECM obtenues montrent la dépendance sur la conversion de la couche de peroxydase de la distance séparant ces deux enzymes. D'autre part, les activités de ces enzymes peuvent être étudiées séparément. En présence de glucose et dioxygène (sans FMA), la formation du peroxyde d'hydrogène peut être détectée à la microélectrode polarisée à 750 mV, alors qu'en présence de peroxyde d'hydrogène et d'hydroxyméthyl ferrocène (sans glucose), la réduction de l'espèce FMA<sup>•+</sup> à la sonde ( $E_T=0$  V) indiquera les régions de peroxydase, indépendamment de la localisation de la glucose oxydase.

### III.B.2. Vers l'imagerie d'autres systèmes biologiques

#### III.B.2.a. Les anticorps et antigènes

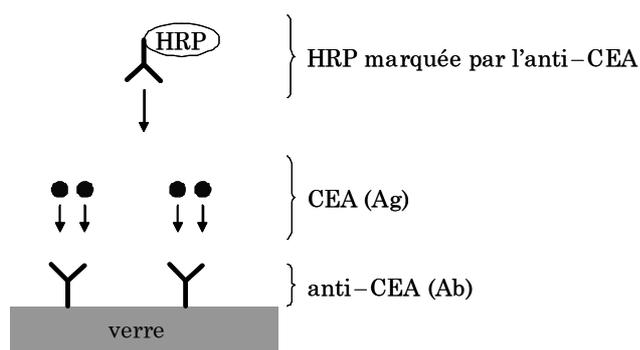
Les équipes de G. Wittstock et T. Matsue ont détecté divers anticorps ou antigènes en mode génération/collection de la SECM, servant alors de capteur immunologique.

La première détection par SECM d'anticorps immobilisés sur une surface a été réalisée par G. Wittstock *et al.* en 1995<sup>116</sup>. Des anticorps (Ab) anti-digoxine ont été immobilisés sur une surface de verre. Ils sont ensuite mis en contact avec l'antigène correspondant marqué avec une enzyme, l'alkaline phosphatase (Ag-E) pour former le complexe Ab:Ag-E par saturation des sites de liaison accessibles de l'anticorps. Cette

enzyme va catalyser l'hydrolyse du composé redox inactif, le 4-aminophénylphosphate pour donner une espèce redox active, le 4-aminophénol. Ce dernier pourra ensuite être détecté à l'aide d'une microélectrode ampérométrique en mode génération/collection de la SECM, seul mode utilisable dans ce cas, l'alcaline phosphatase n'étant pas une enzyme redox. Le courant mesuré à la sonde correspond donc à la densité de sites de liaison actifs dans la couche d'anticorps immobilisés.

G. Wittstock et son équipe ont ensuite étudié la détection d'anticorps anti-souris immobilisés sur des micro-structures paramagnétiques en utilisant une procédure similaire à celle décrite précédemment<sup>117</sup>.

L'équipe de T. Matsue s'est intéressée à la détection par SECM d'antigènes carcino-embryonnaires (CEA, "CarcinoEmbryonic Antigen") immobilisés selon une méthode "sandwich"<sup>118</sup>. Des anticorps anti-CEA, puis les antigènes CEA sont immobilisés sur une surface de verre. Enfin, de la peroxydase (HRP) marquée par les anticorps anti-CEA est déposée sur la surface modifiée (**Fig. III.17**). Cette enzyme va catalyser l'oxydation du ferrocène méthanol (FMA) pour donner l'espèce  $\text{FMA}^+$  qui sera détectée à la sonde.



**Figure III.17** Principe de la structure "sandwich" utilisée pour la détection<sup>118</sup>. L'Ag-CEA est l'antigène carcino-embryonnaire et Ab est l'anticorps correspondant.

Selon la même procédure de structure "sandwich" et de détection de l'espèce  $\text{FMA}^+$  générée par la réaction enzymatique de la peroxydase, l'équipe de T. Matsue a également étudié l'hormone lactogène placentaire (HLP), l'hormone gonadotrophile chorionique humaine (hCG)<sup>119</sup> et une protéine toxique, la leucocidine<sup>120</sup>.

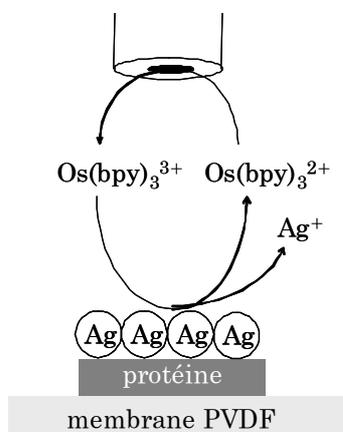
### III.B.2.b. Les autres protéines

La microscopie électrochimique permet la détection de protéines autres que les enzymes.

W. B. Nowall *et al.* ont montré, dès 1998, qu'il était possible de réaliser l'imagerie d'électrodes modifiées par de l'avidine en mode génération/collection de la microscopie électrochimique en détectant l'oxydation d'ions ferrocyanures à la microélectrode<sup>121</sup>. Il ont montré par voltamétrie cyclique que la réduction des ions ferricyanures en ions ferrocyanures est beaucoup plus lente et se produit à des surpotentiels plus importants sur l'électrode modifiée par l'avidine que sur l'électrode de carbone nue. Puis ils ont utilisé la SECM pour détecter les zones modifiées par l'avidine par l'étude de la cinétique de réduction des ions ferricyanures. Le substrat et la sonde sont polarisés tels que les ions ferrocyanures soient produits au substrat, puis, après diffusion jusqu'à la microélectrode, ré-oxydés à la sonde. Les images SECM montrent des régions à fort courant mesuré à la sonde et d'autres où celui-ci est moins important. Ils ont vérifié que le courant mesuré était dépendant du potentiel appliqué au substrat, ce qui montre que les différences de courant étaient causées par une différence du transfert d'électrons, et non pas par la topographie de la surface.

M. Ciobanu *et al.* ont caractérisé un complexe de protéines, PSI (Photosystème D), adsorbé sur des monocouches auto-assemblées sur or<sup>122</sup>. Cette couche isolante va bloquer le transfert d'électrons du médiateur redox, le ferrocénylméthyl-triméthylammonium (FcTMA), ce qui réduit le courant de feedback mesuré à la sonde.

L'équipe de H. H. Girault a réalisé l'imagerie de protéines adsorbées sur des membranes de polyfluorure de vinylidène (PVDF)<sup>123</sup>. Les protéines utilisées comme modèles (BSA, "Bovine Serum Albumin") sont marquées avec des nano-particules d'argent (**Fig. III.18**). Lorsque la microélectrode est déplacée à proximité du substrat polarisé positivement ( $E_S=0,7$  V *vs.* Ag/AgCl), la forme oxydée du médiateur redox ( $\text{Os}(\text{bpy})_3^{3+}$ ) réagit avec les nano-particules pour former l'ion  $\text{Ag}^+$  ( $E^\circ \text{Ag}^+/\text{Ag} < E^\circ [\text{Os}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$ ). Ainsi, un courant de feedback positif sera observé au-dessus des nano-particules, indiquant la présence de protéines, alors qu'un courant de feedback négatif sera observé sur le reste de la surface.

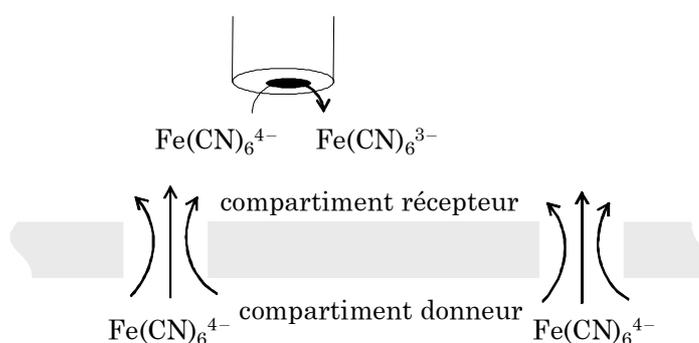


**Figure III.18** Schéma du principe électrochimique utilisé pour la détection de protéines par SECM par l'équipe de H. H. Girault<sup>123</sup>.

### III.B.2.c. Les tissus ou membranes

Des études ont été menées concernant le transport moléculaire à travers des membranes poreuses par microscopie électrochimique. Les études des transports convectif et diffusif dans des biomatériaux poreux sont très intéressantes pour le domaine biomédical et en biophysique.

La première étude par SECM concernant le transport moléculaire à travers la peau a été menée par E. R. Scott *et al.*<sup>124</sup> L'espèce électroactive ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ) est placée dans le compartiment donneur et sa diffusion à travers un échantillon de peau de souris est imposée par un courant iontophorétique. Le courant mesuré à la microélectrode polarisée correspond alors à l'oxydation de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  au-dessus de la surface de la peau dans le compartiment récepteur (**Fig. III.19**).



**Figure III.19** Schéma du principe de la mesure du flux moléculaire localisé par SECM à travers une membrane poreuse de peau de souris<sup>124</sup>.

La dentine est un tissu dur, vivant contenant des millions de canaux arrivant directement dans la pulpe dentaire. P. R. Unwin et son équipe ont étudié le flux convectif à l'intérieur des tubules (1 à 2  $\mu\text{m}$  de diamètre) par SECM, qui est associé à l'hypersensibilité dentinaire<sup>125</sup>. Puis ils se sont intéressés à l'influence d'agents chimiques bloquants sur le transport moléculaire à travers les tubules de dentine<sup>126</sup>. Enfin, S. Nugues et G. Denuault ont utilisé un mode combiné de collection à la sonde associée à l'imagerie en feedback négatif par SECM pour l'étude du transport diffusionnel dans les pores de la dentine<sup>127</sup>.

L'équipe de P. R. Unwin a également réalisé de l'imagerie de la perméabilité d'un cation sonde, le méthyl viologène ( $\text{MV}^{2+}$ ), dans des cartilages articulaires bovins<sup>128</sup>.

Dans les cellules eucaryotes, le transport moléculaire entre le cytoplasme et le nucleus est réalisé par l'intermédiaire du complexe poreux nucléaire (NPE, "Nuclear Pore Complex"), qui perfore l'enveloppe nucléaire (NE, "Nuclear Enveloppe"). La perméabilité locale de cette enveloppe a été étudiée par SECM par J. Guo et S. Amemiya<sup>129</sup>.

### III.B.2.d. Les cellules

Une détection sensible et fiable des cellules est nécessaire au développement et aux études dans de nombreux domaines tels que la biochimie, la biologie cellulaire, la neurobiologie, la médecine ou encore la pathologie. Les techniques de microscopies telles que la microscopie à fluorescence, la microscopie confocale à balayage laser (CLSM, “Confocal Laser–Scanning Microscopy”), la microscopie optique en champ proche (SNOM, “Scanning Near–field Optical Microscopy”), la microscopie à force atomique (AFM, “Atomic Force Microscopy”) ou encore la microscopie électrochimique (SECM), sont des outils performants pour l'étude des changements de configuration des cellules et de leurs caractéristiques<sup>130</sup>.

L'imagerie de cellules par SECM est un processus délicat car ce sont des systèmes qui ne sont pas plats et qui sont donc facilement endommageables par la sonde. Le nombre de médiateurs pouvant être utilisés dans ce cas est limité en raison de la toxicité présentée par de nombreux couples redox. Comme nous allons l'observer dans les quelques exemples d'études de cellules par SECM cités ci-dessous, l'oxygène est fréquemment employé en tant que médiateur car il est naturellement produit ou consommé à la surface des cellules vivantes, ce qui évite d'ajouter une espèce redox supplémentaire à la solution qui pourrait influencer la réponse de la cellule.

#### III.B.2.d.i. *Etude de cellules cancéreuses*

L'équipe de T. Matsue a étudié l'activité respiratoire de cellules cancéreuses de côlon humain (SW–480) par SECM en utilisant le courant de réduction de l'oxygène mesuré à la microélectrode (platine), caractéristique de l'activité cellulaire<sup>131</sup>. Selon le même procédé, cette équipe a également détecté par mode feedback de la microscopie électrochimique l'activité respiratoire de cellules vivantes cancéreuses de souche HeLa<sup>132,133,134</sup> et de cellules humaines cancéreuses érythroleucémiennes (K562)<sup>135</sup>. Cette équipe a ensuite combiné la microscopie électrochimique avec une stimulation locale du substrat afin de mesurer simultanément les espèces électroactives autour de cellules HeLa stimulées et non stimulées<sup>136</sup>. Très récemment, T. Matsue et ses collègues ont développé un nouveau système de culture de cellule cancéreuse de poitrine humaine en 3 dimensions pour des tests de sensibilité des drogues anti-cancéreuses, et ont ensuite évalué l'activité respiratoire de ces cellules par SECM en utilisant le courant de réduction de l'oxygène<sup>137</sup>. Ainsi, une diminution de la concentration d'oxygène indique un changement de l'activité respiratoire des cellules.

### III.B.2.d.ii. *Etude des protoplastes*

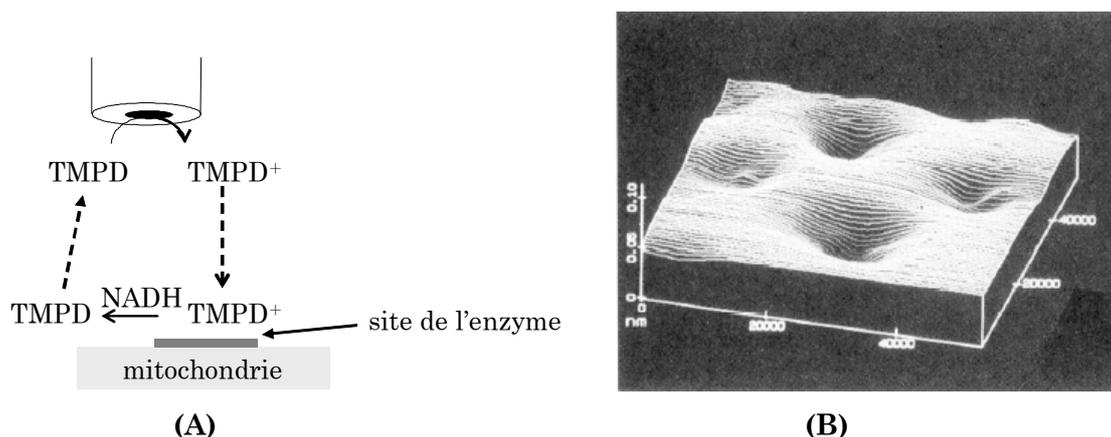
L'équipe de T. Matsue s'est intéressée à l'imagerie des activités photosynthétiques et respiratoires de protoplastes (cellules végétales ou bactériennes dont la paroi a disparu) d'algues par microscopie électrochimique basée sur la mesure du courant de réduction de l'oxygène<sup>138</sup>. Ainsi, dans l'obscurité, l'image du protoplaste obtenue présente une faible concentration d'oxygène en raison de sa consommation par respiration. Sous irradiation lumineuse, l'image est opposée en raison de la génération d'oxygène par photosynthèse.

Cette même équipe a ensuite réalisé l'imagerie de topographie et d'activité photosynthétique de protoplastes en utilisant des microélectrodes constituées de deux disques de platine<sup>139</sup>. Ces sondes sont capables de détecter simultanément deux espèces électroactives. Ainsi, ils ont réalisé des profils de topographie des protoplastes par détection au premier disque de la microélectrode du courant d'oxydation d'un médiateur redox ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ) présent en solution. L'activité photosynthétique du protoplaste est également détectée en mesurant le courant de réduction de l'oxygène à l'autre disque de la sonde.

Quelques années plus tard, cette équipe a caractérisé par SECM l'activité de la peroxydase dans un protoplaste d'algue<sup>140</sup>. La génération d'ions ferricinium méthanol ( $\text{FMA}^+$ ) sur la surface du protoplaste par une réaction catalysée par l'enzyme est détectée à la microélectrode dans une solution contenant le ferrocène méthanol (FMA) et le peroxyde d'hydrogène, qui sont le médiateur redox et le substrat de l'enzyme respectivement.

### III.B.2.d.iii. *Etude des sites enzymatiques de mitochondries*

D. T. Pierce et A. J. Bard ont utilisé le mode feedback de la microscopie électrochimique pour réaliser l'imagerie de l'activité de la réductase de mitochondries individuelles<sup>91</sup>. Lorsque la microélectrode de carbone est approchée à proximité de la surface de verre, sur laquelle est immobilisée la mitochondrie, l'accepteur (ou substrat) de l'enzyme, le  $\text{TMPD}^+$ , est constamment produit par application d'un potentiel positif à la sonde (**Fig. III.20A**). Si la sonde est placée juste au-dessus de la mitochondrie, en présence de NADH en solution, l'accepteur à l'état neutre, ou produit, ( $\text{TMPD}^0$ ), est régénéré par un transfert catalysé par la réductase, ce qui va augmenter le courant mesuré à la microélectrode. A l'inverse, si la mitochondrie est inactive ou que NADH n'est pas présent en solution, l'espèce  $\text{TMPD}^0$  n'est pas régénérée. Le blocage par la mitochondrie de la diffusion du coeur de la solution jusqu'à la microélectrode produit alors un courant de feedback négatif (**Fig. III.20B**).



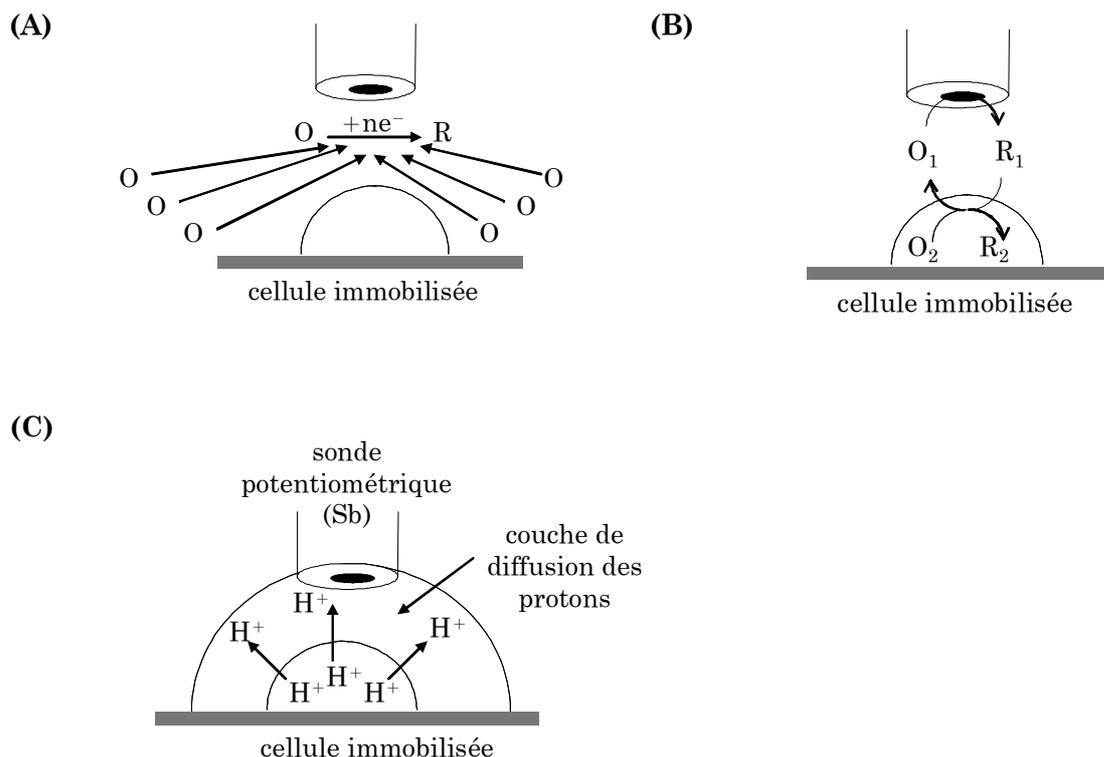
**Figure III.20** (A) Principe de l'imagerie SECM de sites enzymatiques de mitochondries immobilisées sur une surface de verre, (B) image SECM de mitochondries immobilisées sur du verre, microélectrode de carbone ( $\alpha=4 \mu\text{m}$ ,  $R_g=10$ ),  $V=10 \mu\text{m s}^{-1}$ ,  $E_T=0,2 \text{ V vs. SCE}$  dans une solution contenant NADH et TPMD<sup>91</sup>.

#### III.B.2.d.iv. Etude des cellules mammaires

M. V. Mirkin et ses collègues ont utilisé la microscopie électrochimique en mode feedback pour l'étude de plusieurs cellules mammaires<sup>141</sup>.

Des médiateurs redox hydrophiles (ferrocyanure, ferrocène carboxylate), ne pouvant pénétrer dans la membrane de la cellule, permettent d'obtenir des images topographiques des cellules (**Fig. III.21A**). L'utilisation d'un médiateur redox hydrophobe (ménadione, 1,2-naphtoquinone) permet de cartographier la réactivité redox des cellules, avec une résolution micrométrique ou submicrométrique (**Fig. III.21B**). Enfin, le flux d'acides produit par la cellule immobilisée, ainsi que les profils de pH autour de la cellule, peuvent être mesurés en mode potentiométrique, ce qui permet l'accès aux phénomènes énergétiques de la cellule (**Fig. III.21C**).

Ils ont ensuite étendu cette approche consistant à utiliser deux médiateurs redox (l'un hydrophile et l'autre hydrophobe) à l'étude du transfert de charge transmembranaire dans une bactérie<sup>142</sup>. Ils ont également étudié l'évolution de différents facteurs (taux de perméation de la membrane par les espèces redox, concentration intracellulaire de centres redox...) qui déterminent la vitesse de régénération du médiateur redox pour l'étude de cellules mammaires humaines<sup>143</sup>. Enfin, ils ont utilisé cette technique pour l'étude de populations de cellules de haute densité, et non plus de cellules individuelles séparées<sup>144</sup>. Ainsi, il est possible de distinguer par leurs activités redox en SECM entre des cellules mammaires humaines épithéliales non transformées et des cellules mammaires métastatiques.



**Figure III.21** Principe des modes ampérométrique (A–B) et potentiométrique (C) utilisé par l'équipe de M. V. Mirkin<sup>141</sup> pour l'étude de cellules vivantes : (A) la membrane de la cellule est imperméable au médiateur redox hydrophile  $O$  : feedback négatif ; (B) le médiateur redox  $O_1/R_1$  hydrophobe est régénéré,  $O_2/R_2$  étant lié à la cellule ; (C) le profil de concentration de protons autour de la cellule immobilisée est réalisé à l'aide d'une sonde potentiométrique (Sb).

### III.B.2.d.v. Etude des cellules endothéliales de cordon ombilical (HUVEC)

A. Pailleret *et al.* ont utilisé la microscopie électrochimique afin de détecter l'oxyde nitrique (NO) libéré par des cellules humaines endothéliales isolées de veine ombilicale foetale (HUVEC)<sup>145</sup>. Cette approche comporte trois étapes. La première consiste à positionner la microélectrode de platine à une distance donnée de la surface de la cellule (10  $\mu\text{m}$ ) à l'aide de courbes d'approche en utilisant l'oxygène en tant que médiateur. La seconde étape est la modification électrochimique *in-situ* de cette sonde avec un électrocatalyseur de l'oxydation de l'oxyde nitrique (NiTSPc). Un stimulant, la bradykinine, est nécessaire à l'activité de la synthèse endothéliale de l'acide nitrique. Au cours de la dernière étape, l'oxyde nitrique NO libéré par la population de cellules après stimulation est détecté ampérométriquement à la microélectrode.

L'équipe de W. Schuhmann a amélioré la technique précédente en utilisant une microélectrode constituée de deux disques de platine : le premier de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre permet le contrôle de la distance par mesure du courant de feedback négatif lié à la réduction de l'oxygène, et le second de 50  $\mu\text{m}$  de diamètre est modifié chimiquement avec de la porphyrine afin de constituer le capteur de l'oxyde nitrique libéré par les cellules HUVEC stimulées par la bradykinine<sup>146</sup>. L'utilisation du premier disque de platine permet de préserver l'intégrité des cellules, ainsi que du second disque de platine modifié, pendant l'étape d'ajustement de la distance.

#### III.B.2.d.vi. *Détection des cellules neuronales (PC12)*

Un autre type de cellules a particulièrement intéressé les équipes de recherche : les cellules PC12, cellules modèles pour l'étude des fonctions neuronales. Le neurone, unité fonctionnelle du système nerveux, est responsable de l'émission et de la propagation du message nerveux. Le neurotransmetteur (ou neuromédiateur) est une substance chimique qui transmet l'information d'un neurone à l'autre, en traversant l'espace situé entre deux neurones consécutifs, la synapse. Libéré à l'extrémité d'un neurone lors de la propagation de l'influx nerveux, un neurotransmetteur agit sur le neurone suivant en se fixant à des endroits bien précis de la membrane de cet autre neurone.

La première étude a été menée par l'équipe de W. Schuhmann en 2001 qui a visualisé la topographie de cellules PC12 en croissance en plaçant une microélectrode de fibre de carbone à une distance constante de la surface des cellules en mode dit "shear-force based constant-distance"<sup>147</sup>. Ce mode est une adaptation de la technique de contrôle de la distance des microscopies optiques à champ proche, et consiste à faire vibrer la microélectrode à l'aide d'un oscillateur piézoélectrique à sa fréquence de résonance avec des amplitudes de quelques nanomètres. Lorsque la microélectrode approche une surface, l'amortissement de la fréquence de la sonde par les forces de cisaillement de la solution est détecté par un second piézoélectrique ou par déviation d'un faisceau laser. Ainsi, il est possible de conserver une distance constante en maintenant une valeur pré-définie d'amortissement de l'amplitude des vibrations de la sonde.

Quelques années plus tard, l'équipe de T. Matsue a étudié la distribution spatiale de l'activité respiratoire dans une cellule neuronale par SECM, en mesurant le courant de réduction de l'oxygène à l'aide d'une microélectrode de platine polarisée à  $-0,5\text{ V vs. Ag/AgCl}$ <sup>13</sup>.

J. M. Liebetrau *et al.* ont réalisé l'imagerie de cellules PC12 avant et après exposition au NGF ("Nerve Growth Factor"), principe actif responsable de l'effet neurotrophique, en mode feedback négatif de la SECM<sup>148</sup>. Ils ont ainsi montré que plusieurs médiateurs redox pouvaient être utilisés (tels que  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$ , l'acide ascorbique ou encore 1-4 benzoquinone), et qu'un changement rapide de morphologie des cellules d'un micron ou moins pouvait être détecté en temps réel par mesure du courant à la sonde placée à proximité de la cellule. Cependant, ces résultats ont été obtenus par un mode à hauteur constante de la microélectrode en SECM. Celui-ci est délicat lorsque les substrats présentent un fort relief, ce qui est le cas des cellules PC12, en raison du risque de collision de la microélectrode avec la surface. C'est pourquoi, récemment, R. T. Kurulugama *et al.* ont utilisé un mode à distance constante de la SECM afin de réaliser l'imagerie topographique de ces cellules neuronales<sup>149</sup>. Dans ce mode de fonctionnement, la microélectrode peut être déplacée verticalement tel que la distance entre la microélectrode et la surface soit toujours identique, quel que soient les irrégularités de relief de la surface. Deux types de modes ont été utilisés : le mode à courant constant (avec pour médiateur  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ ), et le mode à impédance constante. La meilleure résolution (micrométrique) a été obtenue avec le mode à courant constant mais le mode à impédance constante, plus simple au niveau instrumentation que le mode basé sur les forces de cisaillement, permet de mesurer simultanément la topographie et le courant faradique en absence de médiateur.

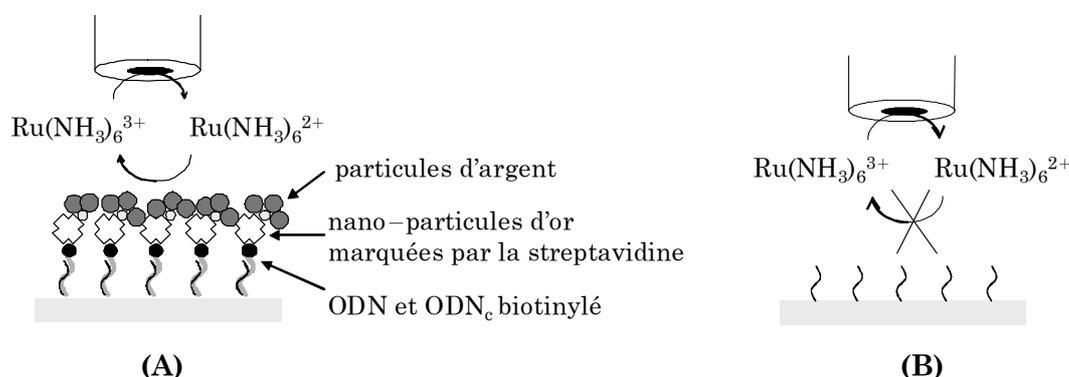
### III.B.2.e. L'ADN

Quelques équipes se sont intéressées récemment à la détection par SECM de brins d'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) immobilisés, et/ou du phénomène d'hybridation, c'est-à-dire d'appariement spécifique de deux brins complémentaires d'ADN.

S. Takenaka et ses collègues ont réalisé l'imagerie de réseaux d'ADN de thymus de veau<sup>5</sup>. Celle-ci est basée sur la détection d'un courant électrique, mesuré à la sonde polarisée ( $E_T=0,7$  V *vs.* Ag/AgCl) et placée à une distance de 5  $\mu\text{m}$  de la surface. Ce courant est généré par un intercalant de type "threading agent" qui donne une spécificité au double brin, le ferrocényl naphthalène diimide<sup>150</sup>, concentré dans la région du double brin d'ADN de thymus de veau immobilisé sur une surface de verre.

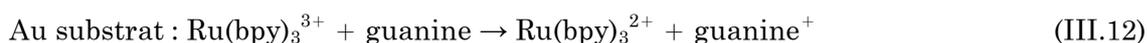
L'équipe de F. Zhou a utilisé la microscopie électrochimique afin de détecter le phénomène d'hybridation d'oligonucléotides (ODN)<sup>151</sup>. Les oligonucléotides immobilisés sont hybridés en présence d'ODN complémentaires biotinylés. Des nano-particules d'or marquées par la streptavidine sont couplées sur ces spots hybridés, puis des particules d'argent

précipitent à leur surface (**Fig. III.22**). Ces particules d'argent ont pour effet d'augmenter la conductivité de surface et donc le courant de feedback mesuré en présence d'un médiateur, l'hexaamine ruthénium (III), sur les spots hybridés.



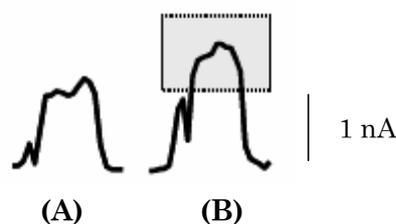
**Figure III.22** Schéma du principe utilisé par l'équipe de F. Zhou pour la détection de l'hybridation de l'ADN basé sur une augmentation de la conductivité causée par la présence de particules d'argent sur les spots hybridés<sup>151</sup> : (A) cas des spots hybridés, (B) cas des spots non hybridés.

Cette équipe a également réalisé l'imagerie de polynucléotides et d'oligonucléotides simple brin (Poly[G] et ADN de thymus de veau), immobilisés sur des surfaces de verre modifiées, par SECM à travers l'oxydation de la guanine, l'une des quatre bases nucléiques de l'ADN<sup>152</sup>. Le médiateur redox,  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ , est oxydé à la sonde pour donner  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  qui, après avoir diffusé jusqu'au substrat, va oxyder les guanines dans les molécules d'ADN immobilisées (**Eq. III.11** et **Eq. III.12**).



De plus, l'hybridation de l'ADN a été mise en évidence en réalisant l'imagerie de Poly[C] après avoir été en contact avec Poly[G], ces deux polynucléotides étant complémentaires. Enfin, la spécificité de l'hybridation d'oligonucléotides a été vérifiée par imagerie en SECM. Cette technique présente deux inconvénients majeurs : le polynucléotide ou l'oligonucléotide étudié doit contenir de la guanine pour être détecté, et cette méthode est destructive. Cependant, la détection de l'ADN et du phénomène d'hybridation par l'oxydation des guanines par SECM constitue une approche simple (absence de marquage ou de traitement après hybridation) et sensible.

L'équipe de W. Schuhmann a réalisé l'imagerie de simples brins d'ADN immobilisés sur une surface conductrice d'or, et a détecté l'hybridation des spots par mode feedback de la SECM en utilisant un électrolyte contenant un couple redox chargé négativement ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ )<sup>153</sup>.



**Figure III.23** Détection de l'hybridation d'oligonucléotides par SECM réalisée par l'équipe de W. Schuhmann<sup>153</sup>. Images SECM d'un spot d'oligonucléotide (A) témoin non hybridé, (B) hybridé.

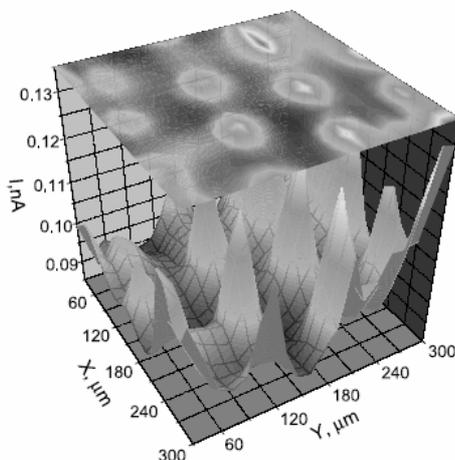
Conditions de détection: microélectrode de platine (10  $\mu\text{m}$  de diamètre),  $V=10 \mu\text{m s}^{-1}$ , solution de tampon phosphate 0,1 M pH 5,7 et NaCl 3 M contenant 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ .

Des diminutions importantes du courant de feedback positif sont observées sur les microstructures d'ADN en raison de la répulsion localisée entre les groupements phosphates déprotonés des brins d'ADN immobilisés et l'anion  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ . Une charge négative additionnelle est introduite par l'hybridation, ce qui augmente l'effet d'interaction coulombienne sur le flux diffusionnel des espèces électroactives. Le courant de feedback positif observé sera donc encore plus faible après hybridation (**Fig. III.23**).

L'équipe de A. J. Bard s'est intéressée très récemment au transfert d'électrons dans des monocouches auto-assemblées d'ADN en présence et en absence d'ions métalliques<sup>154</sup>. En effet, une nouvelle structure, notée M-ADN, a été mise en évidence en 1993, et correspond à l'association d'ions métalliques divalents avec les bases du duplex d'ADN. Cette équipe a mesuré les vitesses de transfert d'électrons dans des monocouches de double brin d'ADN et de M-ADN par analyse des courbes d'approche théoriques et expérimentales en mode feedback de la SECM. Une étude avec différents médiateurs a montré que la réponse électrochimique était bloquée uniquement avec les espèces anioniques, ce qui indique l'influence des forces de répulsion électrostatique entre le médiateur et les groupements phosphates chargés négativement de l'ADN. Enfin, ils ont observé qu'avec l'addition de l'ion  $\text{Zn}^{2+}$  afin d'obtenir une structure de la forme M-ADN, la constante de vitesse de transfert d'électrons augmente. Cette variation peut être attribuée à une augmentation intrinsèque de la conductivité électrique de M-ADN. Le changement de la charge de surface des monocouches d'ADN en raison de la liaison des ions métalliques avec les molécules biologiques joue également un rôle important dans l'augmentation du courant observée pour les structures M-ADN.

R. E. Gyuresanyi *et al.* ont détecté le phénomène d'hybridation de l'ADN en utilisant un marquage enzymatique<sup>12</sup>. Des brins d'oligonucléotides 18-mer sont déposés sur une électrode, puis hybridés en présence d'ODN complémentaires marqués par une enzyme, la

glucose oxydase. Le mode génération/collection de la SECM est utilisé afin de détecter à la sonde le peroxyde d'hydrogène généré en présence de D-glucose par la réaction catalysée par la glucose oxydase. Cette réaction enzymatique ne se produit donc que sur les spots hybridés (Fig. III.24).



**Figure III.24** Détection de l'hybridation d'oligonucléotides par marquage enzymatique (glucose oxydase)<sup>12</sup>.

Conditions de détection: microélectrode de platine (12,5  $\mu\text{m}$  de diamètre) dans une solution de D-glucose 130 mM dans du tampon phosphate pH 5,8.

S. Bi *et al.* ont utilisé le mode génération/collection de la microscopie électrochimique afin d'étudier les intermédiaires à faible durée de vie de l'un des nucléosides de l'ADN, la guanosine (Gs)<sup>155</sup>. Celle-ci a un rôle très important car son oxydation en radical cation est impliquée dans les transferts de charge et dans les dommages de l'ADN. Leur objectif est de détecter le radical cation  $\text{Gs}^{\cdot+}$  qui est généré dans un premier temps lors de l'oxydation de la guanosine, avant de subir rapidement une déprotonation, suivie d'une perte d'un second électron, afin d'obtenir le produit final de cette réaction, la 8-oxo-guanosine<sup>156,157</sup> (cf chapitres VI et VII). La guanosine est oxydée au niveau de la sonde et détectée au niveau du substrat qui doit être de faible taille afin de limiter le courant de fond. De plus, il est nécessaire de placer la microélectrode à une distance du substrat inférieure à 2  $\mu\text{m}$  afin de permettre à l'espèce intermédiaire  $\text{Gs}^{\cdot+}$  de diffuser jusqu'à la seconde électrode où elle sera détectée avant qu'elle ne subisse de déprotonation. L'épaisseur de la couche réactionnelle de cet intermédiaire est inférieure à 0,2  $\mu\text{m}$ , et sa durée de vie est estimée à moins de 40  $\mu\text{s}$ .

### III.C. Conclusion sur la détection de systèmes biologiques par SECM

La microscopie électrochimique permet de réaliser de l'imagerie à la fois de la réactivité locale et de la topographie des surfaces biologiques étudiées. L'avantage majeur de

l'utilisation du mode feedback pour étudier la topographie de surface réside dans le fait qu'il n'y a pas de contact entre la sonde et l'échantillon biologique.

Ainsi, il existe deux types d'utilisation de la SECM pour l'étude des systèmes biologiques. D'une part, la microélectrode peut convertir un médiateur en un cofacteur redox actif d'une enzyme au niveau de la surface biologique, puis va détecter la régénération du médiateur au cours de la réaction enzymatique (mode feedback). D'autre part, la sonde peut suivre de manière ampérométrique ou potentiométrique le flux de diffusion causé par la réaction d'un métabolisme (mode génération-collection).

L'un des domaines d'application les plus prometteurs de la SECM est la biotechnologie, avec, par exemple, l'optimisation de systèmes comportant des enzymes immobilisées, ou encore la lecture séquentielle de capteurs matriciels. De plus, l'utilisation de la microscopie électrochimique pour l'étude des cellules vivantes constitue une méthode sensible, non destructrice et quantitative.

Des recherches sont actuellement menées afin d'étendre la gamme de réactions enzymatiques accessibles et d'appliquer cette technique en tant qu'outil de recherche de routine en laboratoire pour des études biochimiques et physiologiques.

Les microélectrodes utilisées étant typiquement de taille micrométrique, la résolution latérale des images en mode feedback est de l'ordre du micromètre. La résolution spatiale verticale des systèmes de positionnement est bien inférieure au micron et n'est donc pas le facteur limitant. La résolution de l'appareil étant liée à la taille de la sonde, les recherches actuelles visant à diminuer la dimension des microélectrodes devraient permettre d'étudier des objets possédant une hétérogénéité sub-micrométrique. C'est pourquoi un intérêt grandissant est observé envers certaines techniques telles que l'AFM électrochimique.

L'une des limitations de la microscopie électrochimique, comme pour toutes les techniques de balayage de sonde locale, est le temps d'acquisition, souvent trop long pour étudier l'évolution de l'activité biologique en fonction du temps. La limite de la vitesse latérale est imposée par le temps d'établissement d'une réponse stationnaire en chaque point pour les sondes ampérométriques en mode feedback, ou par l'obtention d'un potentiel d'équilibre pour les sondes potentiométriques. Ce temps caractéristique diminue lorsque la taille de la sonde active et la distance entre la microélectrode et le substrat diminuent. La surface des échantillons biologiques présentant un certain relief, un mécanisme de contrôle de la distance sera nécessaire pour l'utilisation de microélectrodes de tailles inférieures à un micromètre. Ce système de contrôle permettra de diminuer davantage la vitesse d'acquisition.

**Références bibliographiques du chapitre I**

- <sup>1</sup> A. J. Bard, F.-R. F. Fan, J. Kwak, O. Lev, *Anal. Chem.* **1989**, 61, 132–138.
- <sup>2</sup> P. T. Lillehei, L. A. Bottomley, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 189R–196R.
- <sup>3</sup> M. A. Poggi, L. A. Bottomley, P. T. Lillehei, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 2851–2862.
- <sup>4</sup> M. V. Mirkin, B. R. Horrocks, *Anal. Chim. Acta* **2000**, 406, 119–146.
- <sup>5</sup> K. Yamashita, M. Takagi, K. Uchida, H. Kondo, S. Takenaka, *Analyst* **2001**, 126, 1210–1211.
- <sup>6</sup> C. Kranz, G. Wittstock, H. Wohlschläger, W. Schuhmann, *Electrochim. Acta.* **1997**, 42, 3105–3111.
- <sup>7</sup> C. Kranz, T. Lötzbeyer, H.-L. Schmidt, W. Schuhmann, *Biosensors & Bioelectronics* **1997**, 12, 257–266.
- <sup>8</sup> J. V. Macpherson, P. R. Unwin, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 19475–19483.
- <sup>9</sup> C. Marck, K. Borgwarth, J. Heinze, *Chem. Mater.* **2001**, 13, 747–752.
- <sup>10</sup> Y.-M. Wu, F.-R. F. Fan, A. J. Bard, *J. Electrochem. Soc.* **1989**, 136, 885–886.
- <sup>11</sup> N. Casillas, S. Charlebois, W.-H. Smyrl, H.-S. White, *J. Electrochem. Soc.* **1994**, 141, 636–642.
- <sup>12</sup> R. E. Gyurcsanyi, G. Jagerszki, G. Kiss, K. Toth, *Bioelectrochem.* **2004**, 63, 207–215.
- <sup>13</sup> Y. Takii, K. Takoh, M. Nishizawa, T. Matsue, *Electrochim. Acta* **2003**, 48, 3381–3385.
- <sup>14</sup> S. B. Basame, H. S. White, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3166–3170.
- <sup>15</sup> M. V. Mirkin, *Mikrochim. Acta* **1999**, 130, 127–153.
- <sup>16</sup> J. Kwak, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **1989**, 61, 1221–1227.
- <sup>17</sup> J. Kwak, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **1989**, 61, 1794–1799.
- <sup>18</sup> P. Liljeroth, C. Johans, C. J. Slevin, B. M. Quinn, K. Kontturi, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 1972–1978.
- <sup>19</sup> R. C. Engstrom, M. Weber, D. J. Wunder, R. Burgess, S. Winqvist, *Anal. Chem.* **1986**, 58, 844–848.
- <sup>20</sup> R. C. Engstrom, T. Meaney, R. Tople, R. M. Wightman, *Anal. Chem.* **1987**, 59, 2005–2010.
- <sup>21</sup> R. C. Engstrom, R. M. Wightman, E. W. Kristensen, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 652–656.
- <sup>22</sup> C. Kranz, H. E. Gaub, W. Schuhmann, *Adv. Mater.* **1996**, 8, 634–637.
- <sup>23</sup> J. F. Parcher, C. J. Barbour, R. W. Murray, *Anal. Chem.* **1989**, 61, 584–589.
- <sup>24</sup> C. Amatore, F. Pfluger, *Organometallics* **1990**, 9, 2276–2282.
- <sup>25</sup> S. S. Wang, *J. Electrochem. Soc.* **1989**, 136, 713–715.

- <sup>26</sup> Z. Samec, E. Samcova, H. H. Girault, *Talanta* **2004**, 63, 21–32.
- <sup>27</sup> C. Wei, A. J. Bard, G. Nagy, K. Toth, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 1346–1356.
- <sup>28</sup> Y. Selzer, D. Mandler, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 2383–2390.
- <sup>29</sup> L. Rajendran, S. P. Ananthi, *J. Electroanal. Chem.* **2004**, 561, 113–118.
- <sup>30</sup> A. J. Bard, G. Denuault, R. A. Friesner, B. C. Dornblaser, L. S. Tuckerman, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1282–1288.
- <sup>31</sup> A. J. Bard, M. V. Mirkin, P. R. Unwin, D. O. Wipf, *J. Phys. Chem.* **1992**, 96, 1861–1868.
- <sup>32</sup> P. R. Unwin, A. J. Bard, *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 7814–7824.
- <sup>33</sup> R. D. Martin, P. R. Unwin, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 276–284.
- <sup>34</sup> R. D. Martin, P. R. Unwin, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1998**, 94, 753–759.
- <sup>35</sup> R. C. Engstrom, B. Small, L. Kattan, *Anal. Chem.* **1992**, 64, 241–244.
- <sup>36</sup> J. L. Fernandez, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 2281–2289.
- <sup>37</sup> N. Dontha, W. B. Nowall, W. G. Kuhr, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2619–2625.
- <sup>38</sup> E. Delamarche, G. Sundarababu, H. Biebuyck, B. Michel, Ch. Gerber, H. Sigrist, H. Wolf, H. Ringsdorf, N. Xanthopoulos, H. J. Mathieu, *Langmuir* **1996**, 12, 1997–2006.
- <sup>39</sup> A. Schwarz, J. S. Rossier, E. Roulet, N. Mermod, M. A. Roberts, H. H. Girault, *Langmuir* **1998**, 14, 5526–5531.
- <sup>40</sup> N. E. Sanjana, S. B. Fuller, *Journal of Neuroscience Methods* **2004**, 136, 151–163.
- <sup>41</sup> H. Ago, J. Qi, K. Tsukagoshi, K. Murata, S. Ohshima, Y. Aoyagi, M. Yumura, *J. Electroanal. Chem.* **2003**, 559, 25–30.
- <sup>42</sup> H. Zhou, Z. Li, A. Wu, G. Wei, Z. Liu, *Applied Surface Science* **2004**, 236, 18–24.
- <sup>43</sup> J. Feng, B. Cui, Y. Zhan, S. Y. Chou, *Electrochem. Comm.* **2002**, 4, 102–104.
- <sup>44</sup> T. Livache, P. Guedon, C. Brakha, A. Roget, Y. Levy, G. Bidan, *Synth. Metals* **2001**, 121, 1443–1444.
- <sup>45</sup> G. Wittstock, W. Schuhmann, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 5059–5066.
- <sup>46</sup> C. D. James, R. C. Davis, L. Kam, H. G. Craighead, M. Isaacson, J. N. Turner, W. Shain, *Langmuir* **1998**, 14, 741–744.
- <sup>47</sup> Y. Yagishita, Y. Toda, M. Hirai, H. I. Fujishiro, *Applied Surface Science* **2004**, 237, 581–586.
- <sup>48</sup> T. G. G. Maffei, G. T. Owen, M. Penny, H. S. Ferkel, S. P. Wilks, *Applied Surface Science* **2004**, 234, 2–10.
- <sup>49</sup> B. Klehn, U. Kunze, *Superlattices and Microstructures* **1998**, 23, 441–444.
- <sup>50</sup> Y. Tomita, Y. Hasegawa, K. Kobayashi, *Applied Surface Science* **2005**, 244, 107–110.

- <sup>51</sup> C. W. Lin, F.-R. F. Fan, A. J. Bard, *J. Electrochem. Soc.* **1987**, 134, 1038–1038.
- <sup>52</sup> D. H. Craston, C. W. Lin, A. J. Bard, *J. Electrochem. Soc.* **1988**, 135, 785–786.
- <sup>53</sup> O. E. Hüusser, D. H. Craston, A. J. Bard, *J. Electrochem. Soc.* **1989**, 136, 3222–3229.
- <sup>54</sup> F. Forouzan, A. J. Bard, *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 10876–10879.
- <sup>55</sup> E. M. El-Giar, R. A. Said, G. E. Bridges, D. J. Thomson, *J. Electrochem. Soc.* **2000**, 147, 586–591.
- <sup>56</sup> J. W. Schultzze, H. Karabulut, *Electrochim. Acta* **2005**, 50, 1739–1745.
- <sup>57</sup> J. W. Schultzze, T. Morgenstern, D. Schattka, S. Winkels, *Electrochim. Acta* **1999**, 44, 1847–1864.
- <sup>58</sup> C. Kranz, M. Ludwig, H. E. Gaub, W. Schuhmann, *Adv. Mater.* **1995**, 7, 38–40.
- <sup>59</sup> C. Kranz, M. Ludwig, H. E. Gaub, W. Schuhmann, *Adv. Mater.* **1995**, 7, 568–571.
- <sup>60</sup> W. Schuhmann, C. Kranz, H. Wohlschläger, J. Strohmeier, *Biosensors & Bioelectronics* **1997**, 12, 1157–1167.
- <sup>61</sup> S. A. G. Evans, K. Brakha, M. Billon, P. Mailley, G. Denuault, *Electrochem. Comm.* **2005**, 7, 135–140.
- <sup>62</sup> H. Sugimura, T. Uchida, N. Shimo, N. Kitamura, H. Masuhara, *Ultramicroscopy* **1992**, 42–44, 468–474.
- <sup>63</sup> D. Mandler, A. J. Bard, *J. Electrochem. Soc.* **1990**, 137, 1079–1086.
- <sup>64</sup> D. Mandler, A. J. Bard, *J. Electrochem. Soc.* **1989**, 136, 3143–3144.
- <sup>65</sup> J. W. Still, D. O. Wipf, *J. Electrochem. Soc.* **1997**, 144, 2657–2665.
- <sup>66</sup> S. Meltzer, D. Mandler, *J. Electrochem. Soc.* **1995**, 142, L82–L84.
- <sup>67</sup> I. Turyan, T. Matsue, D. Mandler, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3431–3435.
- <sup>68</sup> C. Heß, K. Borgwarth, C. Ricken, D. G. Ebling, J. Heinze, *Electrochim. Acta* **1997**, 42, 3065–3073.
- <sup>69</sup> K. Borgwarth, J. Heinze, *J. Electrochem. Soc.* **1999**, 146, 3285–3289.
- <sup>70</sup> J. Ufheil, F. M. Boldt, M. Börsch, K. Borgwarth, J. Heinze, *Bioelectrochem.* **2000**, 52, 103–110.
- <sup>71</sup> D. Mandler, A. J. Bard, *J. Electrochem. Soc.* **1990**, 137, 2468–2472.
- <sup>72</sup> D. Mandler, A. J. Bard, *Langmuir* **1990**, 6, 1489–1494.
- <sup>73</sup> S. Meltzer, D. Mandler, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1995**, 91, 1019–1024.
- <sup>74</sup> Y. Zu, L. Xie, B. Mao, Z. Tian, *Electrochim. Acta* **1998**, 43, 1683–1690.
- <sup>75</sup> J. V. Macpherson, P. R. Unwin, *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 1704–1713.

- <sup>76</sup> J. V. Macpherson, P. R. Unwin, *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 11764–11770.
- <sup>77</sup> J. V. Macpherson, P. R. Unwin, *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 3338–3351.
- <sup>78</sup> C. E. Jones, J. V. Macpherson, P. R. Unwin, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 2351–2359.
- <sup>79</sup> J. V. Macpherson, P. R. Unwin, A. C. Hillier, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 6445–6452.
- <sup>80</sup> I. Shohat, D. Mandler, *J. Electrochem. Soc.* **1994**, 141, 995–999.
- <sup>81</sup> I. Turyan, U. O. Krasovec, B. Orel, T. Saraidorov, R. Reisfeld, D. Mandler, *Adv. Mater.* **2000**, 12, 330–333.
- <sup>82</sup> K. Borgwarth, N. Rohde, C. Ricken, M. L. Hallensleben, D. Mandler, J. Heinze, *Adv. Mater.* **1999**, 11, 1221–1226.
- <sup>83</sup> J. Zhou, D. O. Wipf, *J. Electrochem. Soc.* **1997**, 144, 1202–1207.
- <sup>84</sup> H. Shiku, T. Takeda, H. Yamada, T. Matsue, I. Uchida, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 312–317.
- <sup>85</sup> H. Shiku, I. Uchida, T. Matsue, *Langmuir* **1997**, 13, 7239–7244.
- <sup>86</sup> W. B. Nowall, D. O. Wipf, W. G. Kuhr, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2601–2606.
- <sup>87</sup> Y. Shao, M. V. Mirkin, G. Fish, S. Kokotov, D. Palanker, A. Lewis, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 1627–1634.
- <sup>88</sup> J. Wang, L.-H. Wu, R. Li, *J. Electroanal. Chem.* **1989**, 272, 285–292.
- <sup>89</sup> E. Klusmann, J. W. Schultze, *Electrochim. Acta* **1997**, 42, 3123–3134.
- <sup>90</sup> B. R. Horrocks, M. V. Mirkin, D. T. Pierce, A. J. Bard, G. Nagy, K. Toth, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1213–1224.
- <sup>91</sup> D. T. Pierce, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 3598–3604.
- <sup>92</sup> J. Zhou, C. Campbell, A. Heller, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 4007–4010.
- <sup>93</sup> H. Zhou, S. Kasai, T. Matsue, *Anal. Biochem.* **2001**, 290, 83–88.
- <sup>94</sup> T. Yasukawa, N. Kanaya, D. Mandler, T. Matsue, *Chem. Let.* **2000**, 5, 458–459.
- <sup>95</sup> M. Suzuki, T. Yasukawa, Y. Mase, D. Oyamatsu, H. Shiku, T. Matsue, *Langmuir* **2004**, 20, 11005–11011.
- <sup>96</sup> D. Oyamatsu, N. Kanaya, H. Shiku, M. Nishizawa, T. Matsue, *Sensors and Actuators B* **2003**, 91, 199–204.
- <sup>97</sup> D. T. Pierce, P. R. Unwin, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **1992**, 64, 1795–1804.
- <sup>98</sup> C. Zhao, G. Wittstock, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 3145–3154.
- <sup>99</sup> C. Zhao, J. K. Sinha, C. A. Wijayawardhana, G. Wittstock, *J. Electroanal. Chem.* **2004**, 561, 83–91.

- <sup>100</sup> C. Zhao, G. Wittstock, *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, 20, 1277–1284.
- <sup>101</sup> H. Yamada, H. Fukumoto, T. Yokoyama, T. Koike, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 1785–1790.
- <sup>102</sup> Y. Lee, Z. Ding, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 3634–3643.
- <sup>103</sup> T. Wilhelm, G. Wittstock, *Electrochim. Acta* **2001**, 47, 275–281.
- <sup>104</sup> B. Csoka, B. Kovacs, G. Nagy, *Biosensors & Bioelectronics* **2003**, 18, 141–149.
- <sup>105</sup> B. R. Horrocks, D. Schmidtke, A. Heller, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 3605–3614.
- <sup>106</sup> S. A. G. Evans, J. M. Elliot, L. M. Andrews, P. N. Bartlett, P. J. Doyle, G. Denuault, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 1322–1326.
- <sup>107</sup> B. R. Horrocks, M. V. Mirkin, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1998**, 94, 1115–1118.
- <sup>108</sup> Y. Hirata, S. Yabuki, F. Mizutani, *Bioelectrochem.* **2004**, 63, 217–224.
- <sup>109</sup> A. Kueng, C. Kranz, A. Lugstein, E. Bertagnolli, B. Mizaikoff, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 3238–3240.
- <sup>110</sup> C. Kranz, A. Kueng, A. Lugstein, E. Bertagnolli, B. Mizaikoff, *Ultramicroscopy* **2004**, 100, 127–134.
- <sup>111</sup> S. Kasai, Y. Hirano, N. Motochi, H. Shiku, M. Nishizawa, T. Matsue, *Anal. Chim. Acta* **2002**, 458, 263–270.
- <sup>112</sup> D. Oyamatsu, Y. Hirano, N. Kanaya, Y. Mase, M. Nishizawa, T. Matsue, *Bioelectrochem.* **2003**, 60, 115–121.
- <sup>113</sup> M. Mosbach, H. Zimmermann, T. Laurell, J. Nilsson, E. Csöregi, W. Schuhmann, *Biosensors & Bioelectronics* **2001**, 16, 827–837.
- <sup>114</sup> S. Gaspar, M. Mosbach, L. Wallman, T. Laurell, E. Csöregi, W. Schuhmann, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 4254–4261.
- <sup>115</sup> T. Wilhelm, G. Wittstock, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2248–2250.
- <sup>116</sup> G. Wittstock, K.–J. Yu, H. B. Halsall, T. H. Ridgway, W. R. Heineman, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 3578–3582.
- <sup>117</sup> C. A. Wijayawardhana, G. Wittstock, H. B. Halsall, W. R. Heineman, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 333–338.
- <sup>118</sup> H. Shiku, T. Matsue, I. Uchida, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 1276–1278.
- <sup>119</sup> H. Shiku, Y. Hara, T. Matsue, I. Uchida, T. Yamauchi, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, 438, 187–190.
- <sup>120</sup> S. Kasai, A. Yokota, H. Zhou, M. Nishizawa, K. Niwa, T. Onouchi, T. Matsue, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 5761–5765.
- <sup>121</sup> W. B. Nowall, N. Dontha, W. G. Kuhr, *Biosensors & Bioelectronics* **1998**, 13, 1237–1244.

- <sup>122</sup> M. Ciobanu, H. A. Kincaid, G. K. Jennings, D. E. Cliffel, *Langmuir* **2005**, 21, 692–698.
- <sup>123</sup> M. Carano, N. Lion, J.–P. Abid, H. H. Girault, *Electrochem. Comm.* **2004**, 6, 1217–1221.
- <sup>124</sup> E. R. Scott, H. S. White, J. B. Phipps, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1537–1545.
- <sup>125</sup> J. V. Macpherson, M. A. Beeston, P. R. Unwin, N. P. Hughes, D. Littlewood, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1995**, 91, 1407–1410.
- <sup>126</sup> J. V. Macpherson, M. A. Beeston, P. R. Unwin, N. P. Hughes, D. Littlewood, *Langmuir* **1995**, 11, 3959–3963.
- <sup>127</sup> S. Nuges, G. Denuault, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, 408, 125–140.
- <sup>128</sup> M. Gonsalves, J. V. Macpherson, D. O'Hare, C. P. Winlove, P. R. Unwin, *Biochimica et Biophysica Acta* **2000**, 1524, 66–74.
- <sup>129</sup> J. Guo, S. Amemiya, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 2147–2156.
- <sup>130</sup> X. Lu, W.–H. Huang, Z.–L. Wang, J.–K. Cheng, *Anal. Chim. Acta* **2004**, 510, 127–138.
- <sup>131</sup> T. Yasukawa, Y. Kondo, I. Uchida, T. Matsue, *Chem. Let.* **1998**, 28, 767–768.
- <sup>132</sup> H. Shiku, T. Shiraishi, H. Ohya, T. Matsue, H. Abe, H. Hoshi, M. Kobayashi, *Electrochemistry* **2000**, 68, 890–892.
- <sup>133</sup> T. Kaya, Y.–S. Torisawa, D. Oyamatsu, M. Nishizawa, T. Matsue, *Biosensors & Bioelectronics* **2003**, 18, 1379–1383.
- <sup>134</sup> M. Nishizawa, K. Takoh, T. Matsue, *Langmuir* **2002**, 18, 3645–3649.
- <sup>135</sup> Y.–S. Torisawa, T. Kaya, Y. Takii, D. Oyamatsu, M. Nishizawa, T. Matsue, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 2154–2158.
- <sup>136</sup> K. Takoh, A. Takahashi, T. Matsue, M. Nishizawa, *Anal. Chim. Acta* **2004**, 522, 45–49.
- <sup>137</sup> Y.–S. Torisawa, H. Shiku, T. Yasukawa, M. Nishizawa, T. Matsue, *Biomaterials* **2005**, 26, 2165–2172.
- <sup>138</sup> T. Yasukawa, T. Kaya, T. Matsue, *Chem. Let.* **1999**, 9, 975–976.
- <sup>139</sup> T. Yasukawa, T. Kaya, T. Matsue, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 4637–4641.
- <sup>140</sup> H. Zhou, S. Kasai, H. Noda, H. Ohya–Nishiguchi, H. Shiku, T. Matsue, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2003**, 76, 1757–1762.
- <sup>141</sup> B. Liu, W. Cheng, S. A. Rotenberg, M. V. Mirkin, *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 500, 590–597.
- <sup>142</sup> C. Cai, B. Liu, M. V. Mirkin, H. A. Frank, J. F. Rusling, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 114–119.
- <sup>143</sup> B. Liu, S. A. Rotenberg, M. V. Mirkin, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 6430–6348.
- <sup>144</sup> W. Feng, S. A. Rotenberg, M. V. Mirkin, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 4148–4154.
- <sup>145</sup> A. Pailleret, J. Oni, S. Reiter, S. Isik, M. Etienne, F. Bedioui, W. Schuhmann, *Electrochem. Comm.* **2003**, 5, 847–852.

- <sup>146</sup> S. Isik, M. Etienne, J. Oni, A. Blöchl, S. Reiter, W. Schuhmann, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 6389–6394.
- <sup>147</sup> A. Hengstenberg, A. Blöchl, I. D. Dietzel, W. Schuhmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 905–908.
- <sup>148</sup> J. M. Liebetrau, H. M. Miller, J. E. Baur, S. A. Takacs, V. Anupunpisit, P. A. Garris, D. O. Wipf, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 563–571.
- <sup>149</sup> R. T. Kurulugama, D. O. Wipf, S. A. Takacs, S. Pongmayteegul, P. A. Garris, J. E. Baur, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 1111–1117.
- <sup>150</sup> K. Yamashita, M. Takagi, H. Kondo, S. Takenaka, *Anal. Biochem.* **2002**, 306, 188–196.
- <sup>151</sup> J. Wang, F. Song, F. Zhou, *Langmuir* **2002**, 18, 6653–6658.
- <sup>152</sup> J. Wang, F. Zhou, *J. Electroanal. Chem.* **2002**, 537, 95–102.
- <sup>153</sup> F. Turcu, A. Schulte, G. Hartwich, W. Schuhmann, *Biosensors & Bioelectronics* **2004**, 20, 925–932.
- <sup>154</sup> B. Liu, A. J. Bard, C.–Z. Li, H.–B. Kraatz, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 5193–5198.
- <sup>155</sup> S. Bi, B. Liu, F.–R. Fan, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 3690–3691.
- <sup>156</sup> P. Subramanian, G. Dryhurst, *J. Electroanal. Chem.* **1987**, 224, 137–162.
- <sup>157</sup> G. Dryhurst, *Anal. Chim. Acta* **1971**, 57, 137–149.

## **Chapitre II :**

Optimisation de l'électrogénération par  
SECM de spots de polypyrrole –  
oligonucléotide



L'objectif de notre étude est d'utiliser le microscope électrochimique à la fois pour l'élaboration de dépôts localisés de polypyrrole–oligonucléotide (Ppy–ODN), et pour la détection de leur hybridation. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'électrodéposition de tels spots par mode direct en SECM. Afin de déterminer les paramètres expérimentaux optimaux pour l'électropolymérisation, nous avons tout d'abord détecté l'hybridation de ces spots à l'aide de la microscopie de fluorescence, utilisée comme méthode de référence.

Ce chapitre, constitué de trois parties, est consacré à l'optimisation de la méthode d'élaboration par SECM afin d'obtenir des spots homogènes, de petite taille et reproductibles. Dans la première partie, nous rappellerons quelques généralités sur les biopuces, et nous expliquerons l'intérêt de la technologie du polypyrrole. Puis, dans une seconde partie, nous nous intéresserons aux techniques expérimentales ; nous expliquerons en quoi consiste la micro-fabrication de ces spots par mode direct de la SECM, et les principes de la détection de l'hybridation par microscopie de fluorescence. Dans la dernière partie, nous étudierons l'influence de divers paramètres (distance  $d$ , temps  $\tau$  et potentiel  $E_{app}$  de polymérisation, concentration des solutions de monomères, géométrie de la microélectrode...) sur l'image du spot hybridé en microscopie de fluorescence (taille, homogénéité, intensité de fluorescence obtenues). De plus, nous évaluerons la qualité des spots générés par cette voie de structuration en terme de reproductibilité et de spécificité.

### **I. Le polypyrrole en tant que système d'immobilisation de sondes pour les biopuces**

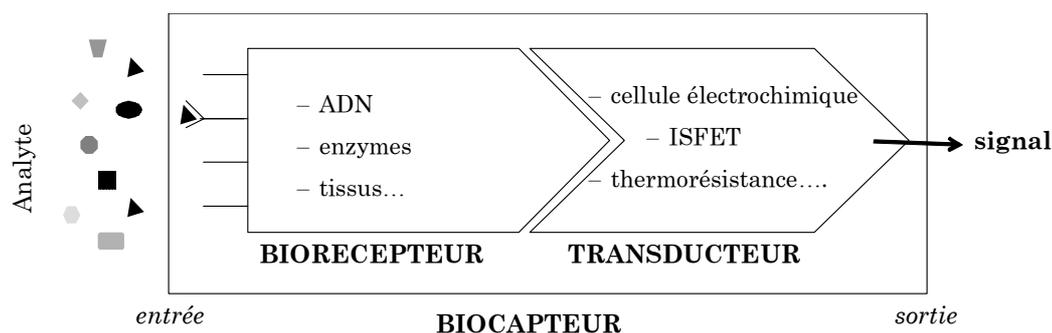
La première étape de cette étude est de déposer localement des spots d'oligonucléotides (ODN) de taille micrométrique sur un substrat d'or par microscopie électrochimique. Nous utiliserons la technologie polypyrrole développée au laboratoire. Avant d'étudier les principales caractéristiques du polypyrrole et son intérêt en tant que système d'ancrage des oligonucléotides sur une surface, nous allons tout d'abord rappeler les principes fondamentaux d'une biopuce, ainsi que les différentes techniques d'immobilisation de sondes oligonucléotidiques sur un support solide.

## I.A. Généralités

### I.A.1. Principe

Les progrès observés durant la dernière décennie dans les domaines des biotechnologies, de la microélectronique et des traitements de l'information ont permis de développer des capteurs miniaturisés performants et fiables. Le développement des biocapteurs connaît actuellement un essor considérable, et un accroissement de leurs champs d'application tels que, principalement, le domaine médical (diagnostic de maladies infectieuses, détection de virus ou mutations génétiques), l'industrie alimentaire (détection de bactéries productrices de ferments lactiques), l'environnement (détection d'agents infectieux dans l'air et dans l'eau) et le domaine militaire (détection d'agents biologiques et bactériologiques).

Un biocapteur est la combinaison intime d'un composant biologique, le "biorécepteur", et d'un "transducteur" qui représente le mode de détection afin d'assurer la transformation du phénomène biologique en un signal interprétable, généralement de type électrique (**Fig. I.1**).



**Figure I.1** Schéma du fonctionnement d'un biocapteur.

Le biorécepteur sert à identifier spécifiquement l'espèce à détecter, ou espèce cible, grâce à son site de reconnaissance moléculaire particulièrement sélectif. S'il y a compatibilité entre le biorécepteur et le transducteur, ce dernier va exploiter la modification physico-chimique résultant de la réaction de reconnaissance biologique, afin d'obtenir un signal sensible, fiable et facilement interprétable. Le transducteur conditionne ainsi la qualité du signal, mais c'est l'interface fonctionnalisée par des éléments biologiques qui détermine la spécificité, le temps de réponse et la durée de vie du biocapteur. Les éléments clés dont dépend le bon fonctionnement d'un biocapteur sont donc l'élaboration de la couche sensible et le choix judicieux du transducteur en fonction du système biologique étudié.

Le premier biocapteur, introduit sous le terme d'électrode enzymatique, a été réalisé en 1967 par S. J. Updike et G. P. Hicks et permettait le dosage du glucose<sup>1</sup>. Il a été

commercialisé au milieu des années 1970 par Yellow Spring Instrument. Actuellement, il existe une large variété d'éléments biologiques utilisés comme système de reconnaissance, dont les enzymes<sup>2,3,4</sup>, les protéines<sup>5</sup>, les tissus<sup>6</sup> ou encore les brins d'ADN<sup>7,8</sup>.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés aux biopuces. Breveté en 1988 par le britannique Edwin Southern, leur principe de fonctionnement repose sur la propriété d'hybridation de l'ADN, selon laquelle des brins complémentaires se reconnaissent et s'apparient pour former une double hélice par couplage deux à deux des bases nucléiques constitutives, adénine avec thymine et guanine avec cytosine.

Une biopuce est un composant sur lequel est déposée une matrice de molécules de reconnaissance dont on veut mesurer les interactions avec les espèces biologiques dans un échantillon. A la différence du biocapteur, la biopuce n'intègre pas le transducteur permettant de transformer l'évènement de reconnaissance biologique en un signal mesurable et interprétable. Les biopuces sont devenues un nouveau centre d'intérêt dans le domaine de la biotechnologie. En 2005, sept millions de biopuces sont utilisées dans le monde, contre seulement 100 000 en 1999. Par exemple, dans le cadre du diagnostic, les sondes caractéristiques de certaines pathologies peuvent être fixées sur une biopuce, et la connaissance de celles avec lesquelles l'ADN du patient s'hybrident permettra de dépister certaines maladies. Dans le cas de contrôle qualité, les sondes fixées sont des fragments d'ADN spécifiques de contaminants à détecter, alors que pour les organismes génétiquement modifiés (OGM), elles correspondront aux nouveaux gènes, les transgènes, introduits dans le génôme de tomates, maïs, colza, etc. Lors d'une enquête policière, des segments d'ADN de différents suspects pourront être déposés sur une biopuce, puis confrontés à ceux retrouvés sur la victime. Selon le type d'application envisagé, le nombre de sondes nécessaires sera plus ou moins élevé. En effet, dans le cas d'une enquête policière par exemple, les puces seront dites à haute complexité (nombre de sondes élevé), alors que pour le diagnostic, elles seront à basse complexité.

La première étape consiste donc à immobiliser le brin d'ADN sur un support solide. Nous allons citer rapidement différentes techniques permettant de fixer ces molécules biologiques sur une surface.

### **I.A.2. Techniques d'immobilisation des oligonucléotides**

Deux approches permettent d'immobiliser des sondes oligonucléotidiques en fonction du type d'utilisation recherchée du biocapteur.

La première est la synthèse *in situ* et consiste à synthétiser directement les molécules biologiques, base nucléique par base nucléique, sur le substrat. Cette technique permet d'immobiliser une grande quantité de divers oligonucléotides, et donc de créer des biopuces, dites de haute complexité, capables d'analyser simultanément des milliers de gènes différents. Affimetrix a ainsi commercialisé une puce, réalisée suivant cette approche, possédant 100 000 sondes différentes. Cependant, la longueur des séquences est, dans ce cas, limitée par le rendement des étapes de synthèse<sup>9</sup>.

La seconde approche comporte deux étapes et consiste à synthétiser les oligonucléotides à partir d'un synthétiseur par condensation d'unités nucléotidiques protégées, puis à immobiliser ces ODN sur le substrat. Cette technique présente deux avantages majeurs : les séquences obtenues sont plus longues et plus spécifiques, et les ODN sont purifiés avant d'être immobilisés. Cependant, cette méthode de synthèse est longue et ne s'adapte donc qu'aux puces de basse complexité. Il existe plusieurs voies d'immobilisation des oligonucléotides après leur synthèse.

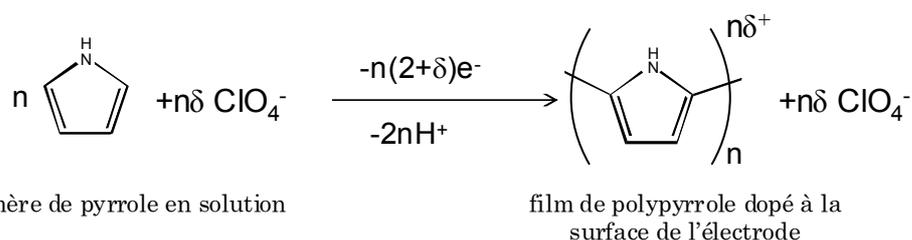
Tout d'abord, l'immobilisation peut être réalisée par adsorption physique qui conduit à des liaisons faiblement énergétiques (forces de Van Der Waals, liaisons hydrogènes, liaisons électrostatiques), ou par chimisorption par laquelle des liaisons quasi-covalentes sont obtenues. Ainsi, J. Wang *et al.* ont immobilisé des sondes oligonucléotidiques sur une surface de pâte de carbone pré-traitée au préalable en polarisant le substrat à 0,2 V *vs.* Ag/AgCl pendant 2 minutes<sup>10</sup>. K. Hashimoto *et al.* ont immobilisé par chimisorption des sondes d'ADN en plongeant le substrat d'or dans une solution contenant la sonde portant un groupement mercaptohexyl à 4°C pendant 12 heures<sup>11</sup>. L'immobilisation peut également être réalisée par création d'une liaison covalente entre un groupe fonctionnel de la biomolécule et celui du support. Ainsi, S. Liu et ses collègues ont immobilisé de manière covalente de l'ADN simple brin sur une électrode de graphite qu'ils ont préalablement fonctionnalisée par des groupements -NH<sub>2</sub><sup>12</sup>. Enfin, les oligonucléotides peuvent être immobilisés par piégeage dans un polymère. Les polymères conducteurs électroniques, et plus particulièrement le polypyrrole, peuvent être utilisés pour piéger les sondes oligonucléotidiques. Ainsi, J. Wang et son équipe ont développé une technique de fabrication d'un matériau génocomposite basé sur le piégeage d'oligonucléotides en tant que contre-ions dans du polypyrrole conducteur électronique<sup>13,14</sup>.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au polypyrrole, largement utilisé au laboratoire, en tant que support d'ancrage aux oligonucléotides. Cette technologie fait appel à l'immobilisation des sondes oligonucléotidiques par liaison covalente sur le polymère.

## I.B. La technologie polypyrrole

### I.B.1. Le polypyrrole

Comme tout polymère conducteur électronique (PCE), le polypyrrole (Ppy) est un semi-conducteur constitué de chaînes organiques conjuguées comportant une alternance de simples et doubles liaisons. Une conductivité importante apparaît lorsque des espèces chimiques, appelées dopants, sont insérées dans le polymère. Le dopage est une réaction d'oxydo-réduction réversible qui est à la base de la réaction charge-décharge du polymère. Ainsi, le polypyrrole est conducteur à l'état oxydé, c'est-à-dire lorsqu'il est dopé, et il est isolant à l'état neutre.



**Figure I.2** Réaction d'électropolymérisation du polypyrrole dopé par  $\text{ClO}_4^-$ ,  $n$  étant le nombre d'unités pyrrole, et  $\delta$  le taux de dopage qui est le nombre d'anions dopant pour  $n$  unités pyrrole.

La synthèse du polypyrrole par oxydation électrochimique des monomères de pyrrole conduit à la formation d'un film électroactif sur la surface de l'électrode (**Fig. I.2**). Plusieurs mécanismes ont été proposés et diffèrent par leur étape d'initiation qui peut être soit un transfert d'électrons, soit de protons ou encore la formation d'un radical<sup>15</sup>. De plus, d'autres facteurs tels que la nature de l'électrolyte, la température et le pH, peuvent avoir une influence sur le mécanisme de la réaction d'électropolymérisation du pyrrole. Le mécanisme le plus probable et le plus fréquemment rencontré dans la littérature est le mécanisme de Diaz<sup>16</sup>.

Selon le mécanisme proposé par l'équipe de A. F. Diaz<sup>16</sup>, le monomère de pyrrole est d'abord oxydé à la surface de l'électrode en un radical cation. Le couplage radicalaire, suivi de l'élimination de deux ions hydrogènes, va conduire au dimère du pyrrole. Ensuite, celui-ci va s'oxyder selon le même principe, entraînant l'élongation de la chaîne oligomérique de polypyrrole jusqu'à ce qu'elle atteigne une taille critique, devienne insoluble et précipite sur la surface de l'électrode sous forme d'un film. Cette technique d'élaboration du polypyrrole par électropolymérisation permet de contrôler l'épaisseur du polymère qui est fonction de la charge et du temps de polymérisation appliqués.

Le polypyrrole peut être utilisé en tant que système d'ancrage pour l'immobilisation de sondes biologiques car sa polymérisation est initiée en milieu aqueux et à pH neutre, ce qui est parfaitement compatible avec les molécules biologiques.

### **I.B.2. Immobilisation des oligonucléotides via le polypyrrole**

Plusieurs types d'immobilisation d'oligonucléotides liés de manière covalente au polypyrrole peuvent être réalisés.

La première approche est celle de B. Saoudi *et al.* et consiste à adsorber l'ADN dans des poudres de polypyrrole synthétisées par voie chimique<sup>17</sup>. Le polypyrrole chargé positivement établit des liaisons électrostatiques avec les oligonucléotides chargés négativement. Les sondes biologiques ont alors le rôle de dopant du polypyrrole oxydé.

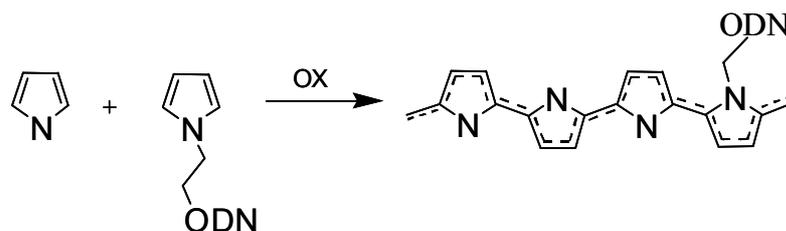
L'équipe de J. Wang a développé de nouveaux matériaux bio-composites basés sur l'incorporation de dopants, les acides nucléiques, dans du polypyrrole conducteur électronique lors de l'électropolymérisation<sup>13,14</sup>.

F. Garnier et ses collègues ont également utilisé le polypyrrole en tant que système d'ancrage<sup>18</sup>. Leur technique comporte deux étapes. Au cours de la première, un film de polypyrrole fonctionnalisé par des groupements N-hydroxyphthalimide est synthétisé électrochimiquement sur une électrode de platine. Les oligonucléotides fonctionnalisés par une amine pourront réagir, dans un second temps, avec ces groupements fonctionnels portés par le polypyrrole.

A. Dupont-Filliard *et al.* ont développé un nouveau type de biocapteur à ADN basé sur la forte affinité entre la biotine et l'avidine<sup>19</sup>. Ils ont tout d'abord déposé une couche de polypyrrole biotinylé sur un support par électropolymérisation de monomères pyrroles fonctionnalisés par la biotine. Dans un second temps, ces biotines permettent l'immobilisation de l'avidine. Cette dernière possédant quatre sites de reconnaissance de l'interaction biotine/avidine, trois sites restent encore disponibles après son immobilisation sur la surface pour interagir avec des biomolécules marquées, telles que des oligonucléotides biotinylés.

Enfin, la société CIS Biointernational et le CEA Grenoble ont développé une nouvelle technique d'immobilisation directe d'oligonucléotides dans le polypyrrole par électrocopolymérisation. Cette méthode consiste en l'électropolymérisation simultanée de monomères pyrroles et de monomères pyrroles fonctionnalisés par des oligonucléotides *via* un bras espaceur (**Fig. I.3**).

Cette technique présente certains avantages : elle est réalisée rapidement et en une seule étape, dans un électrolyte aqueux et à pH neutre, et elle permet d'adresser spécifiquement la zone d'élaboration du fait de la synthèse par voie électrochimique.



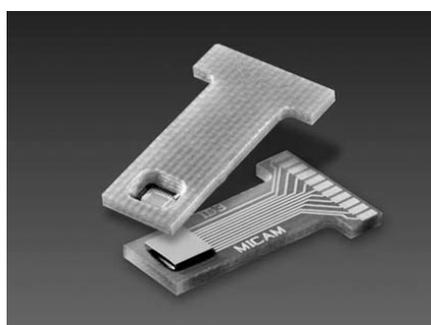
**Figure I.3** Copolymérisation électrochimique entre un pyrrole et un pyrrole fonctionnalisé par un oligonucléotide (ODN).

En utilisant ce principe, notre laboratoire a développé plusieurs techniques permettant d'immobiliser de façon localisée les oligonucléotides sur un substrat fonctionnel (cas des puces MICAM<sup>TM</sup>) ou bruts (cas de l'électrospotting).

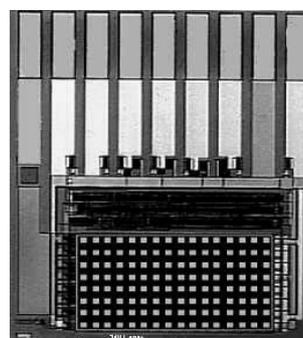
### I.C. Différentes techniques d'immobilisation du polypyrrole-oligonucléotide

#### I.C.1. La puce MICAM<sup>TM</sup>

La méthode d'immobilisation par électrocopolymérisation a permis le développement de la puce MICAM<sup>TM</sup> (Micro Capteurs pour l'Analyse Médicale). Cette puce est constituée d'un support en silicium dans lequel est intégré l'électronique permettant de contrôler 128 microélectrodes multiplexées en or, indépendantes, carrées, de 50  $\mu\text{m}$  de côté et séparées de 100  $\mu\text{m}$ , tout en limitant le nombre de connections électriques (**Fig. I.4**). Le potentiel de chacune des microélectrodes pouvant être géré individuellement, il est possible d'adresser sélectivement des sondes oligonucléotidiques par électropolymérisation du pyrrole. Ainsi, en changeant la solution de pyrrole-oligonucléotide, 128 plots distincts peuvent être obtenus sur une même puce, constituant alors un capteur multiparamétrique parallélisé.



(A)

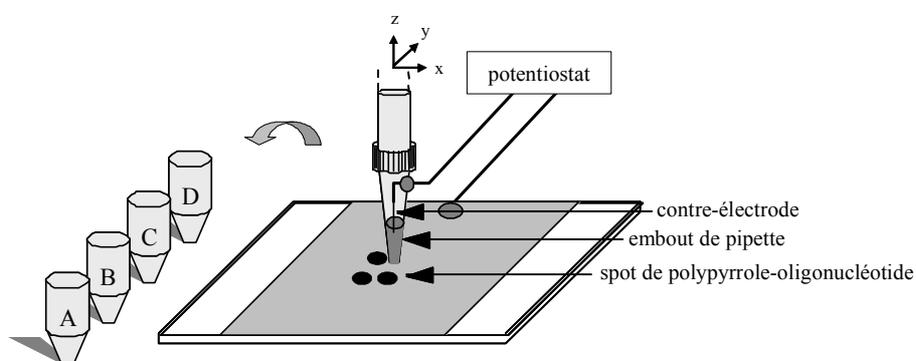


(B)

**Figure I.4** Puce MICAM<sup>TM</sup> : image (A) de la puce, (B) des connections électriques.

### I.C.2. L'électrospotting

T. Livache *et al.* ont développé au laboratoire une nouvelle voie de fonctionnalisation de substrats d'or bruts par des sondes biologiques par électrocopolymérisation de pyrrole et de pyrrole-oligonucléotide<sup>20,21</sup>. Cette méthode est basée sur l'utilisation d'une cellule mobile permettant la localisation mécanique de spots de polypyrrole biologiquement actifs (**Fig. I.5**). Cette cellule mobile est constituée d'un embout de pipette automatique dans lequel est inséré un fil de platine qui jouera le rôle de contre-électrode. Une différence de potentiel entre l'électrode de travail (le substrat d'or) et la contre-électrode est appliquée. L'électrosynthèse du film de polymère fonctionnalisé est alors réalisée par contact entre le substrat d'or et le ménisque de l'embout de pipette. Le diamètre des spots ainsi obtenus est déterminé par le diamètre du cône (300 à 600  $\mu\text{m}$ ).



**Figure I.5** Dispositif de l'électrospotting développé au laboratoire CREAB.

Afin de permettre une miniaturisation des biopuces au laboratoire, une optimisation de ce dispositif est en cours. Elle consiste en l'utilisation d'une aiguille, et non plus d'un embout de pipette, ce qui permet d'obtenir des spots de plus petite taille et de travailler dans un plus petit volume de solution (environ 30 nL). L'aiguille est constituée d'une partie en inox jouant le rôle de contre-électrode et d'une partie en inox recouverte de téflon qui permet d'isoler la contre-électrode du substrat d'or. Lors du contact entre l'aiguille et le substrat, la cavité formera la cellule électrochimique, et l'application d'un potentiel assurera la réaction de copolymérisation.

### I.C.3. La microscopie électrochimique (SECM)

Au cours de la partie bibliographique de ce manuscrit (chapitre I), nous avons vu que la microscopie électrochimique (SECM) permettait de déposer localement diverses espèces, et plus particulièrement différents polymères. Dans la première partie de ce chapitre, la technologie polypyrrole développée au laboratoire est présentée comme une technique rapide

afin de micro-structurer des substrats par des oligonucléotides en utilisant une réaction de copolymérisation de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé par la sonde biologique.

Nous avons donc combiné ces deux techniques afin d'élaborer localement des spots de polypyrrole-oligonucléotide sur des surfaces d'or par mode direct de la microscopie électrochimique. Ainsi, la microélectrode sera utilisée en tant que contre-électrode. Le substrat d'or sera l'électrode de travail à laquelle nous appliquerons une série d'impulsions afin de générer la copolymérisation du pyrrole et du pyrrole-oligonucléotide. La microscopie électrochimique permet ici une localisation des lignes de champ électrique, et non une localisation mécanique (cas de l'électrospotting).

Les parties suivantes seront consacrées à l'élaboration de spots de polypyrrole-oligonucléotide sur des surfaces d'or (annexe I). Une étude de l'influence des paramètres expérimentaux utilisés sur les spots obtenus sera réalisée, et, pour cela, nous utiliserons la microscopie de fluorescence, méthode de détection de référence couramment utilisée au laboratoire, après hybridation des spots électrogénérés.

## **II. Partie expérimentale**

Avant d'étudier l'influence des paramètres expérimentaux, il est important au préalable d'exposer la technique utilisée pour générer ces spots de taille micrométrique par SECM, ainsi que pour détecter l'hybridation de tels spots par microscopie de fluorescence.

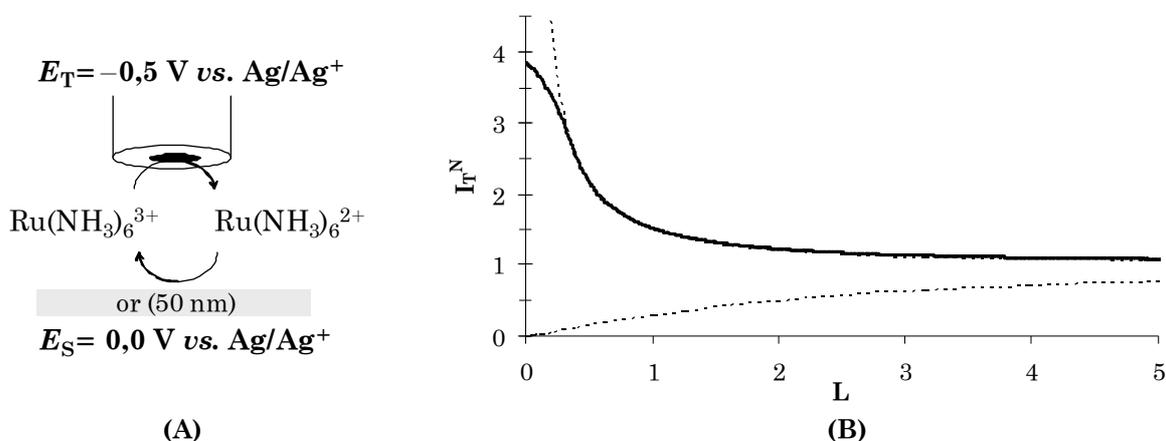
### **II.A. Dépôt localisé de polypyrrole-oligonucléotide par SECM**

Pour générer les spots de polypyrrole-oligonucléotide, nous utilisons le mode direct de la microscopie électrochimique, c'est-à-dire que la microélectrode est utilisée en tant que contre-électrode. Ainsi, en la plaçant suffisamment proche du substrat (lame d'or) polarisé, les lignes de champ électrique vont être localisées dans la zone entre le substrat et la microélectrode. La première étape consiste donc à déterminer précisément la distance de travail, c'est-à-dire la distance entre la microélectrode et le substrat.

#### **II.A.1. Détermination de la distance de travail (courbe feedback positif)**

Nous avons déterminé la distance entre la microélectrode et le substrat à l'aide du mode feedback de la microscopie électrochimique (**Fig. II.1A**).

Des courbes d'approche, consistant à suivre la variation du courant mesuré à la sonde en fonction de la distance de travail, ont été réalisées dans une solution aqueuse contenant un médiateur redox, l'hexaamine ruthénium  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$  (10 mM/KCl 0,1 M). La microélectrode est polarisée ( $E_T = -0,5 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ) tel que la réduction de  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$  soit contrôlée par la diffusion. L'espèce  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$  formée à la sonde va ensuite diffuser jusqu'au substrat conducteur (or) où elle va être oxydée ( $E_S = 0,0 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ). Par un effet de confinement, cette réaction va produire une augmentation du flux de  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$  vers la sonde, et donc un courant de feedback mesuré à la microélectrode plus important. Ce phénomène, le mode feedback positif, a été expliqué précédemment dans la partie bibliographique sur la microscopie électrochimique de ce manuscrit.



**Figure II.1** Détermination de la distance microélectrode-substrat : (A) principe du mode feedback positif utilisé, (B) courbes d'approche expérimentale sur or (traits continus) et théoriques des modes feedback positif et négatif (courbes en pointillés),  $E_T = -0,5 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $E_S = 0,0 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $a = 5 \mu\text{m}$ ,  $V = 1 \mu\text{m s}^{-1}$ , solution de 10 mM  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ /KCl 0,1 M.

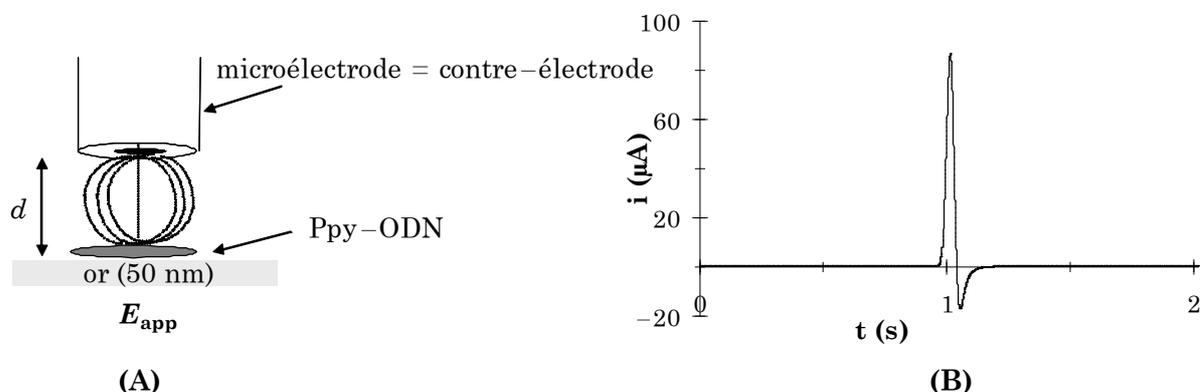
Ainsi, en traçant ces courbes d'approche normalisées et en les comparant aux courbes théoriques de feedback positif calculées selon le modèle de M. V. Mirkin<sup>22</sup> (annexe III), nous pouvons placer la microélectrode à une distance donnée du substrat (**Fig. II.1B**). La première étape pour la micro-structuration des lames d'or est de réaliser de telles courbes d'approche en différents points du substrat, proches de la zone où nous voulons réaliser un dépôt. En effet, nous avons remarqué qu'il est important de ne pas former le dépôt à l'endroit exact où une courbe d'approche a été réalisée précédemment. La surface d'or semble être légèrement modifiée, et le dépôt sera moins adhérent et moins bien défini.

Nous verrons, dans la partie suivante, l'influence de cette distance (variation entre 5 et 120  $\mu\text{m}$ ) sur l'image en fluorescence des spots hybridés.

### II.A.2. Génération de spots de polypyrrole-oligonucléotide

La seconde étape consiste à réaliser l'électrocopolymérisation entre un pyrrole et un pyrrole fonctionnalisé par un oligonucléotide (ODN) par mode direct de la microscopie électrochimique.

La microélectrode est utilisée en tant que contre-électrode, et une série d'impulsions est appliquée au substrat (surface d'or). Le mode direct permet de concentrer les lignes de champ électrique et de créer une électrocopolymérisation localisée en générant de fortes concentrations de radicaux cations de monomères pyrroles dans la zone entre la microélectrode et le substrat (**Fig. II.2A**). Le faible volume où se produit la réaction électrochimique est fonction de la taille de la microélectrode (en incluant la partie isolante en verre) et de la distance entre la sonde et le substrat.



**Figure II.2** Génération d'un spot de polypyrrole-oligonucléotide (Ppy-ODN) par mode direct de la SECM : (A) principe utilisé,  $d$  étant la distance de travail et  $E_{app}$  le potentiel appliqué au substrat ; (B) courbes  $i=f(t)$  de l'électrocopolymérisation localisée,  $E_{app}=0,7$  V vs. Ag/Ag<sup>+</sup>,  $\tau=20$  ms,  $d=60$   $\mu$ m,  $a=5$   $\mu$ m,  $c_{pyr}=200$  mM,  $c_{pyr-ODN}=10$   $\mu$ M dans LiClO<sub>4</sub> (0,1 M).

Nous avons appliqué une série d'impulsions au substrat : 0 V vs. Ag/Ag<sup>+</sup> pendant une seconde, puis  $E_{app}$  (variable entre 0,2 et 2,4 V vs. Ag/Ag<sup>+</sup>) pendant un certain temps (noté  $\tau$ ), puis 0 V vs. Ag/Ag<sup>+</sup> pendant une seconde. L'allure du chronoampérogramme obtenu est présentée en **figure II.2B** ( $E_{app}=0,7$  V vs. Ag/Ag<sup>+</sup>,  $\tau=20$  ms et  $d=60$   $\mu$ m). Nous pouvons observer la présence d'un courant cathodique lors du retour au potentiel initial ( $E_i=E_f=0$  V vs. Ag/Ag<sup>+</sup>) indiquant une réduction du polymère, le potentiel final étant inférieur à son potentiel thermodynamique.

La quantité de polymère sur la surface du substrat est déterminée principalement par la constante de vitesse hétérogène de l'oxydation, qui est liée au potentiel appliqué  $E_{app}$ , et par le transport diffusionnel du monomère du coeur de la solution jusqu'à la faible zone où se

produit la réaction d'électropolymérisation, délimitée par la microélectrode et le substrat. Si les potentiels redox du pyrrole et du pyrrole fonctionnalisé par un oligonucléotide diffèrent de manière significative, le rapport des concentrations des monomères à l'intérieur du film obtenu par copolymérisation ne pourra être relié à la proportion de pyrrole et pyrrole-oligonucléotide au cœur de la solution. La couche de polymère sera constituée majoritairement de l'un des monomères, alors que le second sera fortement dilué par rapport à sa concentration en solution. Ce phénomène peut être évité en utilisant une méthode de série d'impulsions électrochimiques. Le pyrrole et le pyrrole-ODN sont alors oxydés simultanément, entraînant la formation du copolymère. Dans ces conditions, le fait que le pyrrole fonctionnalisé ait un potentiel de polymérisation plus important est moins déterminant que la limitation de la diffusion des deux monomères du cœur de la solution jusqu'à la zone réactionnelle. La proportion dans le copolymère électrogénéré dépend donc des coefficients de diffusion respectifs du pyrrole et du pyrrole-oligonucléotide, plutôt que de leurs différences de potentiels redox<sup>23</sup>.

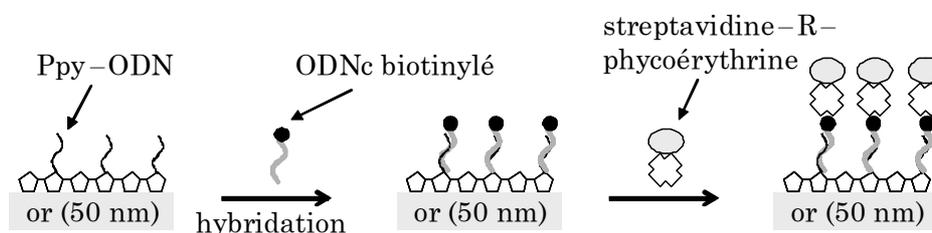
Nous avons choisi deux critères essentiels, l'homogénéité et la reproductibilité des spots en terme de taille, afin d'évaluer la technique d'élaboration par électrocopolymérisation par microscopie électrochimique. Nous avons étudié ces deux paramètres par une méthode sensible couramment utilisée au laboratoire, la microscopie de fluorescence.

### **II.B. Détection de l'hybridation par microscopie de fluorescence**

La détection optique par fluorescence est couramment utilisée au laboratoire<sup>24,25,26,27</sup> en tant que technique de routine afin de révéler l'hybridation, et est basée sur la détection d'un fluorophore couplé à la molécule biologique *via* la forte affinité entre la biotine et l'avidine. Cette technique nous permettra de valider la méthode d'électrogénération des spots par SECM. Elle est dite indirecte car elle implique une détection en plusieurs étapes. De plus, elle est réalisée en point final, ce qui empêche l'accès aux cinétiques d'hybridation. Enfin, la quantification des oligonucléotides immobilisés ou des oligonucléotides cibles est impossible en raison de l'instabilité des traceurs (perte de leur émission au bout d'un certain temps) et de la variabilité des sources de mesure (variation de l'intensité lumineuse générée). Bien qu'il s'agisse d'une méthode semi-quantitative, la microscopie de fluorescence permet néanmoins un suivi de l'évolution de la quantité d'éléments biologiques par comparaison. Elle est très utilisée en raison de sa facilité de mise en œuvre, sa grande sensibilité et sa forte résolution spatiale ( $\mu\text{m}$ ).

### **II.B.1. Hybridation des spots de polypyrrole-oligonucléotide pour la détection par microscopie de fluorescence**

Avant la réaction d'hybridation proprement dite, les spots de polypyrrole-oligonucléotide sont plongés dans une solution de tampon PBS ("Phosphate Buffered Saline", constitué de 0,01 M de tampon phosphate, 0,0027 M de KCl et de 0,137 M de NaCl) et de 1% de BSA ("Bovine Serum Albumin") afin de limiter les interactions non spécifiques par la suite (oligonucléotide complémentaire, streptavidine sur la surface d'or non modifiée). La réaction d'hybridation est ensuite réalisée pendant 20 minutes à une température de 45°C dans une solution d'oligonucléotides complémentaires biotinylés. Le pyrrole-ODN utilisé a pour séquence 5'-Pyr-(T)<sub>10</sub>-GCC-TTG-ACG-ATA-CAG-3' (noté pyr-CP) et son complémentaire (noté ODNc) 5'-biotin-CGG-AAC-TGC-TAT-GTC-3' (noté CP\*). Une fois le processus d'hybridation terminé, la lame d'or est rincée avec du tampon PBS.



**Figure II.3** Principe de la détection de l'hybridation des spots de polypyrrole-oligonucléotide (Ppy-ODN) par microscopie de fluorescence.

L'étape de révélation de la détection de l'hybridation consiste à ajouter une goutte de solution de streptavidine-R-phycoérythrine diluée à 10 % dans PBS. La lame est maintenue à l'abri de la lumière pendant 15 minutes. Cette étape est nécessaire afin que la streptavidine se lie à la biotine de l'oligonucléotide complémentaire, sans excitation du fluorophore à la lumière blanche et perte de son activité de photoémission. La haute affinité de la streptavidine et de la biotine a été exploitée pour la première fois en histochimie dans les années 70. Cette technique est maintenant communément utilisée afin de localiser des antigènes dans les cellules, de détecter des biomolécules dans les tests immunologiques, ou de détecter l'hybridation de l'ADN. Enfin, la lame est rincée avec la solution de PBS afin d'éliminer les molécules fluorescentes adsorbées à la surface, puis elle peut être analysée par microscopie de fluorescence (**Fig. II.3**).

### **II.B.2. Principe de la détection par microscopie de fluorescence**

L'intensité de fluorescence est enregistrée pendant une fraction de seconde à l'aide d'un microscope à épifluorescence (BX 60, Olympus) équipé d'une caméra CCD (Hamamatsu)

refroidie par effet Peltier, et d'un logiciel permettant le traitement des images (Imagepro plus, Media Cybernetics). La gamme de longueur d'onde excitatrice est située entre 520 et 550 nm (vert), et la lumière émise présente une longueur d'onde centrée sur 580 nm (orange-rouge). Les images obtenues sont représentées par des niveaux de gris sur une échelle de 256. Dans le cas d'une fluorescence élevée, l'image du spot se traduit par un niveau de gris important, et donc les spots apparaissent avec une plus grande clarté.

### **III. Etude des paramètres expérimentaux d'électrogénération des spots par microscopie de fluorescence après hybridation**

Nous allons maintenant étudier l'influence de paramètres expérimentaux (potentiel et temps de polymérisation, distance microélectrode-substrat...) afin de déterminer les conditions optimales de synthèse par SECM. Nous utiliserons la microscopie de fluorescence dont l'intensité résultant de l'hybridation entre les ODN immobilisés sur la surface par SECM et les ODN cibles reflétera l'état du polypyrrole servant de matrice d'immobilisation aux oligonucléotides. De plus, nous pouvons noter ici que les limites en terme d'encombrement stérique rencontrées lors de la détection par microscopie de fluorescence en raison de la taille importante du fluorophore seront similaires aux limites lors de la détection par SECM à l'aide d'un assemblage biologique constitué d'une enzyme (chapitre IV). Bien qu'étant une méthode de détection semi-quantitative, la microscopie de fluorescence nous permettra de valider la méthode d'élaboration des spots en terme de reproductibilité et d'homogénéité.

#### **III.A. Faisabilité du concept et problèmes rencontrés**

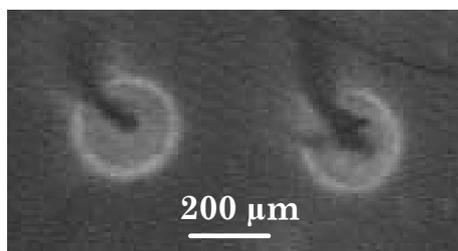
##### **III.A.1. Premiers dépôts réalisés par SECM**

La **figure III.1** présente les premiers dépôts de polypyrrole-oligonucléotide obtenus par mode direct de la SECM.

La copolymérisation est réalisée dans une solution de pyrrole à une concentration de 200 mM et de pyrrole-oligonucléotide à 10  $\mu$ M, soit un rapport de monomère pyrrole et monomère pyrrole fonctionnalisé de 1/20000. Au laboratoire, l'adressage des sondes oligonucléotidiques est couramment réalisé par électrospotting, en utilisant des solutions contenant du pyrrole à une concentration de l'ordre de 10 à 20 mM<sup>20,21,28</sup>. Cependant, lors d'une étude préliminaire, S. Szunerits *et al.* ont montré que la taille de spots de polypyrrole obtenus par mode direct de la microscopie électrochimique augmente lorsque la concentration en monomères diminue<sup>29</sup>. De plus, à une concentration en monomères pyrroles

inférieure à 100 mM, les spots apparaissent inhomogènes, sous forme d'anneaux en imagerie de résonance plasmonique de surface (SPRi). Afin de s'affranchir totalement de ce problème, nous avons choisi de travailler à une concentration en monomères pyrroles de 200 mM. Dans le but de conserver le rapport entre monomère pyrrole et monomère pyrrole fonctionnalisé ayant été optimisé au laboratoire par microscopie de fluorescence après hybridation<sup>24,30,31</sup>, nous avons utilisé une concentration de monomères pyrroles fonctionnalisés par les sondes oligonucléotidiques de 10  $\mu\text{M}$ .

Nous avons alors appliqué un potentiel au substrat de 0,7 V *vs.* Ag/Ag<sup>+</sup>, c'est-à-dire un potentiel proche du pied de la vague d'oxydation du pyrrole, pendant 200 ms, correspondant à l'ordre de grandeur du temps de polymérisation utilisé au laboratoire en électrospotting<sup>20</sup> et par les expériences préliminaires réalisées par S. Szunerits *et al.* en SECM<sup>29</sup>. Nous avons maintenu la microélectrode à une distance de 5  $\mu\text{m}$  de la surface d'or afin de localiser les lignes de champ électrique.



**Figure III.1** Détection par microscopie de fluorescence de spots de polypyrrole-oligonucléotide hybridés.

Conditions de dépôt :  $c_{\text{pyr}}=200 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pyr-CP}}=10 \mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $\tau=200 \text{ ms}$ ,  $d=5 \mu\text{m}$ ,  $a=5 \mu\text{m}$ .

Conditions d'hybridation :  $c_{\text{CP}^*}=0,1 \mu\text{M}$  dans PBS-BSA 1%.

Conditions de microscopie de fluorescence : temps d'exposition : 0,12 s, marqueur fluorescent : streptavidine-R-phycoérythrine.

Sur la **figure III.1**, nous pouvons observer que la zone en dehors du spot correspondant à la lame d'or apparaît sombre sur l'image, ce qui indique une fluorescence faible, voire nulle. Il n'y a donc pas ou peu de réaction d'adsorption non spécifique de l'oligonucléotide complémentaire ou de la streptavidine sur le substrat d'or. Sur les spots, les bords apparaissent avec une plus grande clarté qu'à l'intérieur, ce qui indique que la réaction spécifique entre l'ODN et l'ODN complémentaire se produit majoritairement en ces endroits. Le polypyrrole-oligonucléotide s'est donc principalement déposé sous la forme d'anneaux lors de la copolymérisation.

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées afin d'expliquer la distribution de polypyrrole-oligonucléotide non homogène dans la matrice polymère. Tout d'abord, ce phénomène peut être lié à une différence des coefficients de diffusion du pyrrole et du pyrrole-oligonucléotide. L'équipe de R. G. Compton<sup>32</sup> a évalué le coefficient de diffusion du pyrrole en solution aqueuse à  $1,25 (\pm 0,1) 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . Or, le coefficient de diffusion du pyrrole-oligonucléotide utilisé n'est pas connu, mais a certainement une valeur inférieure en raison de la taille importante de la molécule biologique. En effet, le coefficient de diffusion de l'ADN de thymus de veau<sup>33</sup> constitué de quelques milliers de paires de bases, est  $D=6,4 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , alors que ceux d'oligonucléotides<sup>34</sup> constitués de 7, 15, 22 et 30 bases sont respectivement de 2,61, 1,97, 1,64 et  $1,56 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . Ainsi, les monomères de pyrrole-oligonucléotide étant présents en plus faible concentration en solution, ils sont plus rapidement consommés que les monomères de pyrrole non fonctionnalisé. Or, l'apport en monomères pyrrole-ODN depuis le cœur de la solution vers la zone réactionnelle est plus difficile, en raison du faible coefficient de diffusion, ce qui peut expliquer la présence des oligonucléotides uniquement sur les bords du spot.

D'autre part, le potentiel d'oxydation du pyrrole-oligonucléotide, comme observé pour d'autres pyrroles n-substitués<sup>35</sup>, est légèrement plus important. Ainsi, à un potentiel donné, la formation de radicaux cations du pyrrole-oligonucléotide est plus difficile que celle des radicaux cations du pyrrole. De plus, possédant des groupements phosphates, le pyrrole fonctionnalisé par un oligonucléotide est plus soluble en solution aqueuse que le pyrrole. C'est pourquoi, les radicaux cations de pyrrole-ODN pourraient avoir tendance à diffuser avant la polymérisation en dehors de la zone entre la microélectrode et le substrat, mais, également les oligomères, puisque l'obtention de la taille critique permettant la précipitation du film sur la surface pourrait ainsi être retardée. Ceci peut expliquer la présence de fluorophore, donc de polypyrrole-oligonucléotide sur la périphérie extérieure des spots.

Une troisième hypothèse serait une sur-oxydation du polypyrrole au centre des spots due à une basification dans la faible zone réactionnelle en raison de la contre-réaction à la microélectrode.

Une autre possibilité serait l'oxydation des guanines au substrat. Pour cela, il pourrait être intéressant d'utiliser un poly-CTA, c'est-à-dire un oligonucléotide dont la séquence ne contient pas de guanine, afin d'étudier si cette répartition des sondes oligonucléotidiques sous forme d'anneaux se produit dans ce cas.

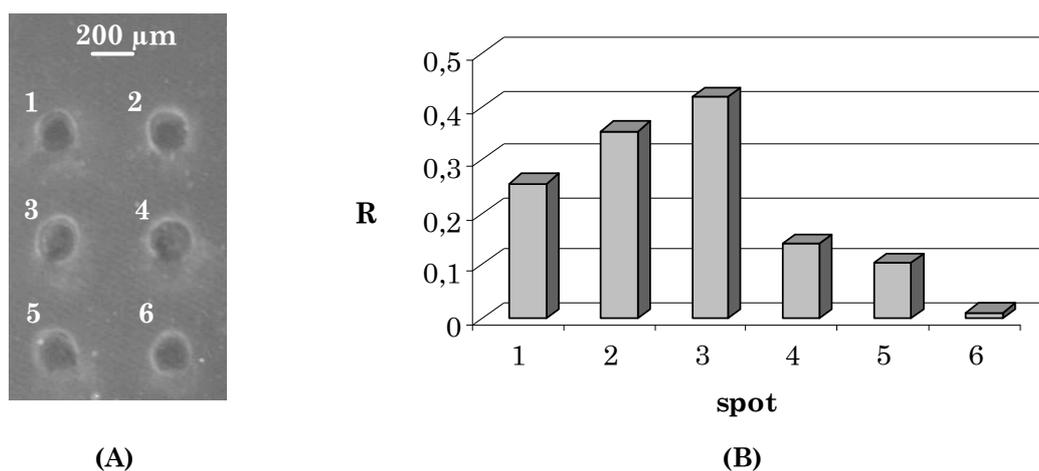
Enfin, une dernière hypothèse envisagée serait une désactivation par la réduction à la contre-électrode (microélectrode) des adénines et guanines. Pour valider ou non cette possibilité, il serait nécessaire de réaliser cette même expérience avec un ODN de type poly-CT.

Enfin, il est important de préciser que la zone sombre observée du centre à l'extérieur de chacun des deux spots n'est pas fonction des conditions de dépôt ni d'hybridation, mais est due à un problème mécanique, probablement lié à la géométrie de l'électrode, lors du dépôt.

Ainsi, cette première expérience montre la faisabilité de la micro-structuration de surfaces d'or par du polypyrrole-oligonucléotide par mode direct de la SECM.

### III.A.2. Dépôt d'une couche de polypyrrole avant l'électrogénération du spot

Dans le but d'obtenir des spots plus homogènes, nous avons déposé une fine couche de polypyrrole avant de réaliser la copolymérisation de pyrrole et pyrrole-ODN. Ce film a pour rôle de diminuer le potentiel d'oxydation du pyrrole-ODN et favoriser ainsi la formation de spots homogènes. De plus, étant polycationique, le polypyrrole devrait favoriser l'adsorption irréversible du pyrrole-ODN chargé négativement sur la surface.



**Figure III.2** Influence de la formation d'une pré-couche de polypyrrole avant l'électrogénération des spots sur : (A) l'image en microscopie de fluorescence de spots hybridés, (B) le rapport  $R$ , défini par  $R = (IF_{spot} - IF_{fond}) / IF_{fond}$ .

Conditions de dépôt :  $c_{pyr} = 200 \text{ mM}$ ,  $c_{pyr-CP} = 10 \text{ μM}$  dans  $LiClO_4$  (0,1 M),  $\tau = 200 \text{ ms}$ ,  $d = 5 \text{ μm}$ ,  $a = 5 \text{ μm}$ ,  $E_{app} = 0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ .

Spots 1, 2: pas de pré-dépôt de polypyrrole,

Spots 3, 4: pré-dépôt de polypyrrole,  $c_{pyr} = 200 \text{ mM}$ ,  $E_{app} = 0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $d = 5 \text{ μm}$ ,  $\tau = 200 \text{ ms}$ ,

Spots 5, 6: pré-dépôt de polypyrrole,  $c_{pyr} = 200 \text{ mM}$ ,  $E_{app} = 0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $d = 5 \text{ μm}$ ,  $\tau = 100 \text{ ms}$ .

Conditions d'hybridation :  $c_{CP^*} = 0,1 \text{ μM}$  dans PBS-BSA 1%.

Conditions de microscopie de fluorescence : temps d'exposition : 0,12 s, marqueur fluorescent : streptavidine-R-phycoérythrine.

La **figure III.2A** présente les images des spots obtenues en microscopie de fluorescence après hybridation pour des pré-dépôts de polypyrrole de différentes épaisseurs. Chacun des spots a été généré en appliquant un potentiel de 0,7 V *vs.* Ag/Ag<sup>+</sup> pendant 200 ms dans la solution de copolymérisation, la microélectrode ayant le rôle de contre-électrode et étant placée à une distance de 5 µm de la surface d'or. Dans le cas des spots 3 et 4, une pré-couche de polypyrrole est créée au préalable en appliquant un potentiel de 0,7 V *vs.* Ag/Ag<sup>+</sup> pendant 200 ms dans une solution de pyrrole à 200 mM en plaçant la microélectrode à la même distance ( $d=5\ \mu\text{m}$ ). Les spots 5 et 6 ont une pré-couche de polypyrrole plus fine ( $\tau=100\ \text{ms}$ ).

Les spots observés sur la **figure III.2A** ont une intensité de fluorescence et une taille comparables. Cette fluorescence est répartie sous la forme d'anneaux à la limite extérieure des spots dans chacun des trois cas. La présence d'un pré-dépôt de polypyrrole, quelle que soit son épaisseur, n'améliore pas l'homogénéité des films. La **figure III.2B** présente les valeurs du rapport R, pour chacun des spots, calculées selon la formule suivante,  $IF_{\text{spot}}$  représentant l'intensité de fluorescence moyenne sur l'ensemble du spot, et  $IF_{\text{fond}}$  celle sur la lame d'or :

$$R = \frac{IF_{\text{spot}} - IF_{\text{fond}}}{IF_{\text{fond}}} \quad (\text{III.1})$$

Ce rapport R est relativement faible, ce qui indique une intensité de fluorescence peu élevée et répartie essentiellement à la limite extérieure des spots, et il est très différent pour les deux spots électrogénérés dans les mêmes conditions dans chacun des trois cas.

Ainsi, la fluorescence observée sur les spots n'est pas homogène et est répartie en anneaux. Contrairement à nos hypothèses, cette pré-couche n'a donc pas d'effet significatif sur l'homogénéité des spots de polypyrrole-ODN.

### **III.A.3. Conclusion sur ces premiers dépôts réalisés**

Ces expériences préliminaires mettent en évidence la possibilité de réaliser des spots de taille micrométrique par localisation des lignes de champ électrique en mode direct de la microscopie électrochimique. Cependant, ces premiers dépôts ne sont ni homogènes, ni reproductibles d'après les images obtenues après hybridation en microscopie de fluorescence. C'est pourquoi nous allons modifier différents paramètres expérimentaux tels que la distance entre la microélectrode et la surface d'or ( $d$ ), le temps ( $\tau$ ) et le potentiel de polymérisation ( $E_{\text{app}}$ ) ou encore les concentrations en pyrrole ( $c_{\text{pyr}}$ ) et en pyrrole-oligonucléotide ( $c_{\text{pyr-ODN}}$ )

dans la solution de copolymérisation, et donc le rapport entre monomères pyrroles et pyrroles fonctionnalisés par des oligonucléotides (**tableau III.1**).

paramètre	gamme
distance microélectrode-substrat ( $d$ )	5 – 120 $\mu\text{m}$
potentiel de copolymérisation ( $E_{\text{app}}$ )	0,1 – 2,4 V
temps de copolymérisation ( $\tau$ )	10 – 200 ms
concentration en pyr-ODN ( $c_{\text{pyr-ODN}}$ )	1 – 10 $\mu\text{M}$
concentration en pyr ( $c_{\text{pyr}}$ )	20 – 200 mM

**Tableau III.1** Paramètres expérimentaux influant sur l'électrogénération de spots de polypyrrole-oligonucléotide par mode direct. L'influence de chacun de ces paramètres a été étudiée dans la gamme indiquée.

### **III.B. Distance microélectrode-substrat, potentiel et temps de polymérisation**

La distance entre la microélectrode et le substrat ( $d$ ), le potentiel appliqué ( $E_{\text{app}}$ ) et le temps de copolymérisation ( $\tau$ ) ne peuvent pas être étudiés séparément. En effet, nous avons observé une dépendance de ces trois paramètres les uns par rapport aux autres; c'est pourquoi nous avons réalisé une approche pas à pas afin d'obtenir des conditions d'élaboration optimales. Nous rappelons également que l'intensité de fluorescence de spots élaborés sur une lame d'or ne peut être comparée à celle de spots d'une autre lame d'or; cependant, il est possible de comparer les intensités obtenues sur chacun des spots d'une même lame.

#### **III.B.1. Temps de polymérisation de 200 ms**

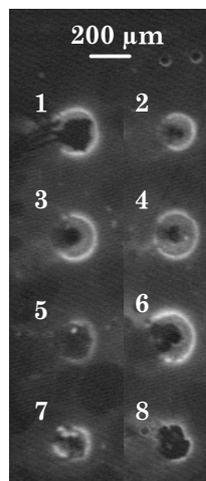
##### **III.B.1.a. Influence du potentiel de polymérisation**

En conservant les conditions initiales du temps de polymérisation et de la distance microélectrode-substrat ( $\tau=200$  ms et  $d=5$   $\mu\text{m}$ ), nous avons tout d'abord étudié l'effet de la variation du potentiel de polymérisation sur l'image des spots obtenue en microscopie de fluorescence après hybridation (**Fig. III.3**).

Nous observons, comme précédemment, une intensité de fluorescence sous forme d'anneaux en périphérie du spot, quelle que soit la valeur du potentiel de polymérisation. Le potentiel appliqué ( $E_{\text{app}}$ ) n'a donc pas d'influence sur l'homogénéité du spot et la formation d'anneaux observée en microscopie de fluorescence. Ceci réfute deux hypothèses proposées

précédemment concernant le dépôt des sondes oligonucléotiques sous forme d'anneaux : la sur-oxydation du polypyrrole et l'oxydation des guanines au substrat.

De plus, nous pouvons remarquer que l'application d'un potentiel inférieur à 0,4 V (spots 5, 7 et 8) conduit à des spots de forme mal définie et à une intensité de fluorescence très faible, ce qui est en accord avec la valeur du pied de la vague d'oxydation du pyrrole.



**Figure III.3** Influence du potentiel de polymérisation sur la détection par microscopie de fluorescence de spots hybridés.

Conditions de dépôt :  $c_{\text{pyr}}=200 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pyr-CP}}=10 \text{ }\mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),  $\tau=200 \text{ ms}$ ,  $d=5 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $a=5 \text{ }\mu\text{m}$ .

Spot 1 :  $E_{\text{app}}=0,7$ , spot 2 :  $E_{\text{app}}=0,8$ , spot 3 :  $E_{\text{app}}=0,5$ , spot 4 :  $E_{\text{app}}=0,6$ , spot 5 :  $E_{\text{app}}=0,3$ , spot 6 :  $E_{\text{app}}=0,4$ , spot 7 :  $E_{\text{app}}=0,1$ , spot 8 :  $E_{\text{app}}=0,2 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ .

Conditions d'hybridation :  $c_{\text{CP}^*}=0,1 \text{ }\mu\text{M}$  dans  $\text{PBS-BSA } 1\%$ .

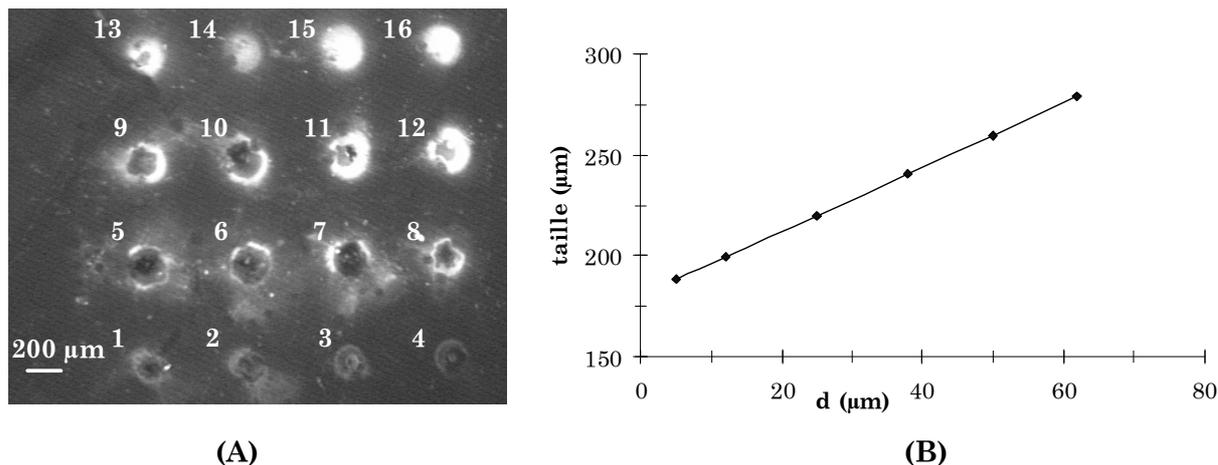
Conditions de microscopie de fluorescence : temps d'exposition : 0,2 s, marqueur fluorescent : streptavidine-R-phycoérythrine.

Quel que soit le potentiel appliqué  $E_{\text{app}}$ , le rapport R, calculé dans la zone sombre observée au centre des spots, a des valeurs très faibles ( $R=0,14\pm 0,29$ ) qui peuvent même être négatives, ce qui semble indiquer une très forte densité de courant localement susceptible de dégrader le film biologique et/ou la surface d'or. L'épaisseur de la couche d'or étant très fine (50 nm), cet échauffement local pourrait expliquer l'obtention de spots sous la forme d'anneaux en raison d'une destruction du film d'or par un phénomène de décollement.

### III.B.1.b. Influence de la distance entre la microélectrode et le substrat

Nous avons alors évalué l'influence du second paramètre : la distance microélectrode-substrat, sur l'homogénéité des spots obtenus (**Fig. III.4A**).

Le volume dans lequel peut se produire la réaction de polymérisation est fonction de la taille totale de la microélectrode et de la distance entre la sonde et le substrat. Nous avons utilisé une microélectrode constituée d'un fil de platine de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre inséré dans un capillaire de verre de 460  $\mu\text{m}$  (annexe II). Nous avons étudié l'influence de la distance de travail entre 5 et 62  $\mu\text{m}$  (**Fig. III.4**), ce qui correspond à un volume réactionnel pour la copolymérisation compris entre 0,8 et 10,3 nL, en considérant une microcellule confinée entre la microélectrode et le substrat.



**Figure III.4** Influence de la distance microélectrode-substrat sur (A) l'image en microscopie de fluorescence de spots hybridés, (B) la taille des spots obtenus.

Conditions de dépôt du polypyrrole:  $c_{\text{pyr}}=200 \text{ mM}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),  $\tau=200 \text{ ms}$ ,  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V}$  vs.  $\text{Ag}/\text{Ag}^+$ ,  $a=5 \mu\text{m}$ ,  $d=5 \mu\text{m}$  (spots 1 et 2).

Conditions de dépôt du polypyrrole-M5 (5'-Pyr-(T)10-TGG-AGC-TGC-TGG-CGT-3'):  $c_{\text{pyr}}=200 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pyr-M5}}=10 \mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),  $a=5 \mu\text{m}$ ,  $\tau=200 \text{ ms}$ ,  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V}$  vs.  $\text{Ag}/\text{Ag}^+$ ,  $d=5 \mu\text{m}$  (spots 3 et 4).

Conditions de dépôt du polypyrrole-CP:  $c_{\text{pyr}}=200 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pyr-CP}}=10 \mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),  $a=5 \mu\text{m}$ ,  $\tau=200 \text{ ms}$ ,  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V}$  vs.  $\text{Ag}/\text{Ag}^+$ . Spots 5, 6 :  $d=5 \mu\text{m}$ ; spots 7, 8 :  $d=12 \mu\text{m}$ ; spots 9, 10 :  $d=25 \mu\text{m}$ ; spots 11, 12 :  $d=37 \mu\text{m}$ ; spots 13, 14 :  $d=50 \mu\text{m}$ ; spots 15, 16 :  $d=62 \mu\text{m}$ .

Conditions d'hybridation:  $c_{\text{CP}^*}=0,1 \mu\text{M}$  dans  $\text{PBS-BSA } 1\%$ .

Conditions de microscopie de fluorescence: temps d'exposition : 0,2 s, marqueur fluorescent : streptavidine-R-phycoérythrine.

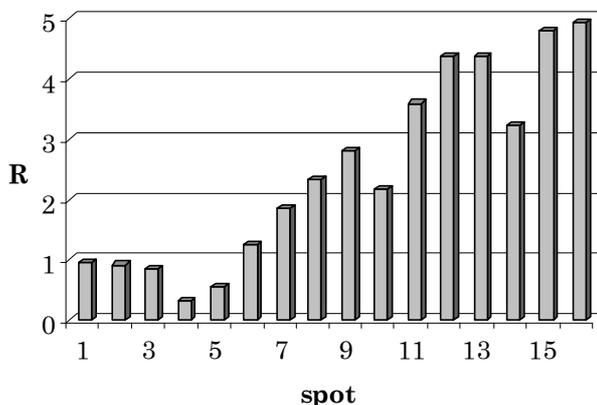
En observant la **figure III.4A**, il est important de noter que les dépôts de polypyrrole seul (spots 1 et 2), ainsi que les spots 3 et 4 de polypyrrole fonctionnalisé par un oligonucléotide de séquence différente (M5) et non complémentaire avec le brin d'ADN mis en solution lors de l'hybridation (CP\*), ne fluorescent pas. Ceci indique qu'il n'y a pas de réaction d'interaction non spécifique entre le polymère seul, ou fonctionnalisé par une

séquence différente. Nous pouvons donc bien interpréter les signaux de fluorescence obtenus pour les autres spots comme ayant été générés par l'interaction ODN-ODNc.

D'après la **figure III.4B**, une distance de travail plus importante entraîne une augmentation de la taille des spots. Ainsi, des spots de 190  $\mu\text{m}$  de diamètre sont formés à une distance de 5  $\mu\text{m}$  de la surface, alors qu'à 62  $\mu\text{m}$  de la surface d'or, nous obtenons des spots d'une taille de 280  $\mu\text{m}$ , soit une augmentation de près de 50%. Ceci indique que la limite de taille obtenue par cette voie de micro-fabrication dans de telles conditions ( $E_{\text{app}}=0,7$  V vs. Ag/Ag<sup>+</sup> et  $\tau=200$  ms) est de l'ordre de 190  $\mu\text{m}$ .

Il apparaît également que plus la distance microélectrode-substrat est importante, plus l'intensité de fluorescence est répartie de manière homogène sur les spots (**Fig. III.4A**). Dans le cas des spots 15 et 16 ( $d=62$   $\mu\text{m}$ ), elle est importante ( $R$  proche de 5, d'après la **figure III.5**, contre 4 au maximum dans le cas de l'électrospotting utilisé classiquement au laboratoire) et localisée sur l'ensemble du dépôt.

Ainsi, réaliser la copolymérisation avec une faible distance de travail permet de réduire la taille des dépôts obtenus mais les rend inhomogènes. Afin de diminuer les dimensions des spots, il pourrait être préférable d'utiliser une microélectrode de diamètre plus faible, voire une nanoélectrode, ou de modifier la forme de la microélectrode en augmentant les effets de pointe.



**Figure III.5** Influence de la distance microélectrode-substrat sur la valeur du rapport  $R$  exprimant l'intensité de fluorescence moyenne sur l'ensemble du spot. Les conditions expérimentales d'électrogénération des spots sont décrites dans la légende de la figure III.4.

Dans le but de détecter l'hybridation de tels spots par différentes méthodes (SECM, SPR), il est nécessaire d'obtenir de parfaites homogénéité et reproductibilité des dépôts. Nous avons alors mené des études de reproductibilité des spots 15 et 16 obtenus avec les

paramètres expérimentaux suivants :  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $\tau=200 \text{ ms}$  et  $d=62 \mu\text{m}$ . Nous n'obtenons pas les mêmes résultats d'un spot à l'autre après hybridation en microscopie de fluorescence. L'intensité sur ces spots est soit importante et homogène (comme c'est le cas pour les spots 15 et 16 de la **figure III.4A**), soit faible et sous forme d'anneaux.

Nous avons alors étudié l'influence du temps de polymérisation sur l'homogénéité et la reproductibilité des spots obtenus. Nous avons ainsi électrogénéré des spots de polypyrrole-ODN en diminuant considérablement le temps de polymérisation ( $\tau=10 \text{ ms}$  au lieu de  $200 \text{ ms}$ ).

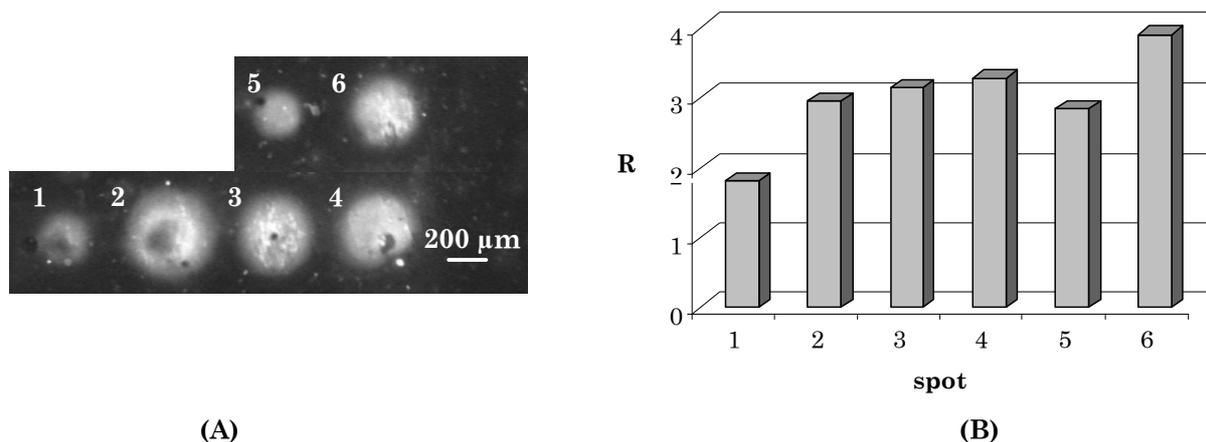
### **III.B.2. Temps de polymérisation plus courts (10 ms)**

#### **III.B.2.a. Influence de la diminution du temps de polymérisation**

L'application d'impulsions très courtes au substrat permet d'éviter des phénomènes d'appauvrissement en pyrrole-oligonucléotide, et un éventuel recouvrement du film de polypyrrole fonctionnalisé par du polypyrrole non fonctionnalisé, ce qui limite l'accessibilité des sondes oligonucléotidiques lors de l'hybridation. La durée des impulsions appliquée joue un rôle sur l'épaisseur des films, ce qui permet d'obtenir une meilleure sensibilité lors de la détection de l'hybridation.

La **figure III.6A** compare les images en microscopie de fluorescence de spots électrogénérés en appliquant un potentiel compris entre  $0,5$  et  $2,4 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$  pendant  $10 \text{ ms}$  avec celle d'un spot obtenu avec un potentiel de  $0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$  pendant  $200 \text{ ms}$  (spot 1). L'intensité de fluorescence pour un temps de polymérisation de  $10 \text{ ms}$  est homogène et plus importante. En effet, d'après la **figure III.6B**, le rapport R exprimant l'intensité moyenne de fluorescence est de l'ordre de 3 pour un temps de polymérisation de  $10 \text{ ms}$ , alors qu'il était égal à 1,8 dans le cas d'une copolymérisation en appliquant une durée plus longue ( $200 \text{ ms}$ ). Lorsque le potentiel de polymérisation varie entre  $0,5$  et  $2,4 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ , les spots hybridés ont des tailles comprises entre  $268$  et  $484 \mu\text{m}$ .

La réduction du temps de polymérisation de  $200$  à  $10 \text{ ms}$  permet d'obtenir une intensité de fluorescence parfaitement homogène et plus importante, offrant ainsi une meilleure sensibilité de mesure. Cependant, le potentiel appliqué a un effet important sur la taille des dépôts obtenus. Celui-ci ne doit donc pas avoir une valeur trop importante afin d'obtenir des spots homogènes, tout en ayant la plus petite taille possible.



**Figure III.6** Influence du potentiel de polymérisation sur : (A) l'image en microscopie de fluorescence de spots hybridés, (B) le rapport  $R$  exprimant l'intensité de fluorescence moyenne sur l'ensemble du spot.

Conditions de dépôt :  $c_{pyr}=200$  mM,  $c_{pyr-CP}=10$  μM dans  $LiClO_4$  (0,1 M),  $d=62$  μm,  $a=5$  μm.

Spot 1:  $E_{app}=0,7$  V vs.  $Ag/Ag^+$ ,  $\tau=200$  ms,

Spot 2:  $E_{app}=2,4$  V vs.  $Ag/Ag^+$ ,  $\tau=10$  ms,

Spot 3:  $E_{app}=2$  V vs.  $Ag/Ag^+$ ,  $\tau=10$  ms,

Spot 4:  $E_{app}=1,5$  V vs.  $Ag/Ag^+$ ,  $\tau=10$  ms,

Spot 5:  $E_{app}=0,5$  V vs.  $Ag/Ag^+$ ,  $\tau=10$  ms,

Spot 6:  $E_{app}=1$  V vs.  $Ag/Ag^+$ ,  $\tau=10$  ms.

Conditions d'hybridation :  $c_{CP^*}=0,1$  μM dans PBS-BSA 1%.

Conditions de microscopie de fluorescence : temps d'exposition : 0,32 s, marqueur fluorescent : streptavidine-R-phycoérythrine.

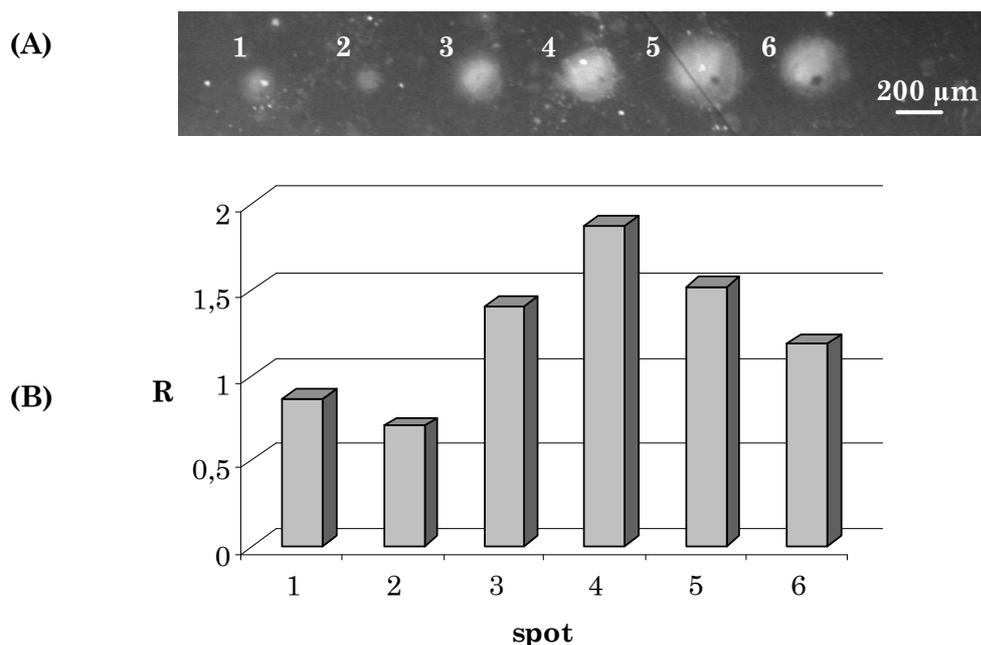
En utilisant des temps de polymérisation courts, nous avons ensuite cherché le potentiel minimal permettant d'obtenir des spots homogènes et ayant la plus petite taille possible, avec une intensité moyenne de fluorescence relativement élevée.

### III.B.2.b. Influence du potentiel pour la polymérisation

La **figure III.7** montre que l'application d'un potentiel de 0,4 V vs.  $Ag/Ag^+$  pendant 10 ms conduit à l'obtention de spots présentant une faible intensité de fluorescence. En effet, d'après la **figure III.7B**, le rapport  $R$ , exprimant l'intensité de fluorescence moyenne de chacun des spots normalisée par l'intensité de fluorescence du fond de l'image (bruit), a une valeur moyenne de 0,78 pour les spots 1 et 2. Ce potentiel entraîne une vitesse de génération des radicaux cations trop faible, ce qui conduit à une vitesse de croissance du film réduite. De plus, la formation de dépôts dans ces conditions n'est pas parfaitement reproductible, ce qui représente un inconvénient majeur pour la suite de notre étude.

Les spots 3, 4 et 5, 6 sont obtenus par polarisation à 0,5 et 0,7 V *vs.* Ag/Ag<sup>+</sup> respectivement. Leur intensité de fluorescence est homogène sur l'ensemble du spot et importante (**Fig. III.7A**). En effet, le rapport R a en moyenne une valeur de 1,5 mais cependant, les valeurs de R pour les spots 3 et 4, respectivement de 1,41 et 1,88, diffèrent. De la même manière, les spots 5 et 6, électrogénérés en appliquant un potentiel de 0,7 V *vs.* Ag/Ag<sup>+</sup> ont un rapport R égal à 1,51 et 1,19 respectivement.

Ces quatre spots (3 et 4, 5 et 6) ont une taille moyenne de 260 et 340  $\mu\text{m}$  respectivement, ce qui est en accord avec la **figure III.6**.



**Figure III.7** Influence du potentiel de polymérisation sur : (A) l'image en microscopie de fluorescence de spots hybridés, (B) la valeur du rapport R.

Conditions de dépôt :  $c_{\text{pyr}}=200 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pyr-CP}}=10 \mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),  $\tau=10 \text{ ms}$ ,  $d=60 \mu\text{m}$ ,  $a=5 \mu\text{m}$ .

Spot 1, 2:  $E_{\text{app}}=0,4 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,

Spot 3, 4:  $E_{\text{app}}=0,5 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,

Spot 5, 6:  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ .

Conditions d'hybridation :  $c_{\text{CP}^*}=0,1 \mu\text{M}$  dans PBS-BSA 1%.

Conditions de microscopie de fluorescence : temps d'exposition : 0,2 s, marqueur fluorescent : streptavidine-R-phycoérythrine.

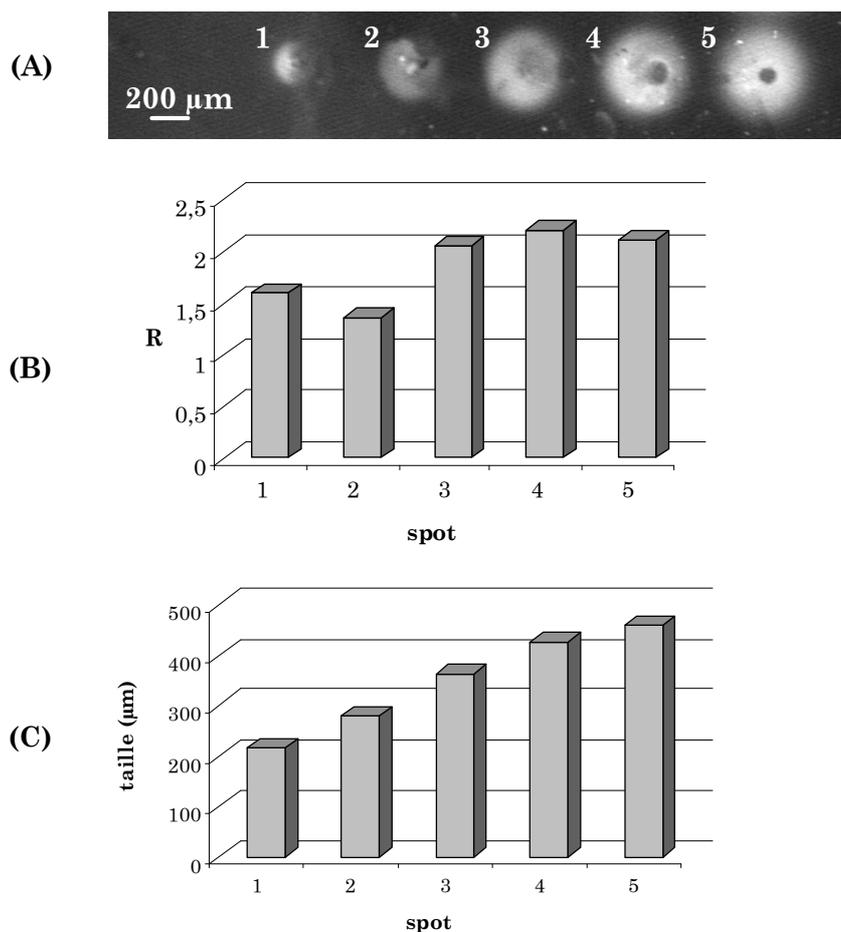
Ces deux conditions expérimentales ( $E_{\text{app}}=0,5$  et  $0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ) mènent à la formation de micro-dépôts dont l'intensité en fluorescence est élevée et répartie de manière homogène sur l'ensemble du spot. Cependant, lors d'études ultérieures, nous avons observé que la reproductibilité de spots obtenus à un potentiel de 0,7 V était supérieure à celle de spots électrogénérés à 0,5 V. Notre objectif est de développer une nouvelle technique de

détection de l'hybridation de spots ainsi électrogénérés par microscopie électrochimique. Dans ce contexte, il est préférable de privilégier le critère de reproductibilité des spots, plutôt qu'une minimisation de la taille des motifs qui pourrait entraîner des difficultés de détection et des problèmes de sensibilité de la mesure par la suite. C'est pourquoi nous avons retenu la valeur de 0,7 V *vs.* Ag/Ag<sup>+</sup> comme étant la condition d'élaboration optimale en terme de potentiel appliqué.

### III.B.2.c. Influence de la distance entre la microélectrode et le substrat

Après avoir déterminé les conditions optimales en terme de potentiel et temps de polymérisation ( $E_{app} = 0,7$  V *vs.* Ag/Ag<sup>+</sup> et  $\tau = 10$  ms), nous avons vérifié que la distance choisie au cours des premières expériences ( $d = 60$   $\mu\text{m}$ ) était encore la mieux adaptée. Des spots de polypyrrole-oligonucléotide ont été formés en appliquant un potentiel de 0,7 V pendant 10 ms en maintenant la microélectrode à des distances de 10, 20, 60, 80 et 120  $\mu\text{m}$  du substrat.

D'après la **figure III.8A**, le spot électrogénéré à 60  $\mu\text{m}$  (spot 3) hybridé présente une intensité de fluorescence répartie sur l'ensemble du spot. De plus, l'intensité moyenne est élevée puisque son rapport R a une valeur de 2,06 (**Fig. III.8B**). Les spots 4 et 5 ont une intensité maximale plus importante ( $IF_{max} = 200, 234, 236$  pour les spots 3, 4 et 5 respectivement), mais une intensité moyenne équivalente en raison d'une zone beaucoup plus sombre au centre des dépôts. Plus la zone réactionnelle délimitée par la microélectrode et le substrat est grande, plus il est difficile de localiser les lignes de champ électrique, et de générer de fortes concentrations en radicaux cations de pyrrole, sans diffusion en dehors de la zone réactionnelle ou phénomène d'échauffement local. Les spots 1 et 2 ont une intensité de fluorescence plus faible, ce qui s'explique par un appauvrissement trop rapide en pyrrole-ODN. La distance de travail est très faible, donc le volume réactionnel est petit. L'apport en pyrrole fonctionnalisé par diffusion latérale est très limité en raison de la faible concentration. Les monomères de pyrrole fonctionnalisé par un oligonucléotide sont donc rapidement consommés dans cette zone, ce qui va entraîner une baisse de l'intensité de fluorescence en raison d'une diminution de la densité surfacique de sondes biologiques et une diminution de l'accessibilité des oligonucléotides. En effet, il est alors possible de déposer du polypyrrole-oligonucléotide puis de le recouvrir partiellement, voire entièrement, par une couche de polypyrrole non fonctionnalisé dont l'apport est moins limité en raison d'une concentration en solution plus importante.



**Figure III.8** Influence de la distance microélectrode-substrat sur (A) l'image en microscopie de fluorescence de spots hybridés, (B) la valeur du rapport  $R$  exprimant l'intensité moyenne de fluorescence, (C) la taille des spots formés.

Conditions de dépôt:  $c_{pyr}=200$  mM,  $c_{pyr-CP}=10$  μM dans  $LiClO_4$  (0,1 M),  $E_{app}=0,7$  V vs.  $Ag/Ag^+$ ,  $\tau=10$  ms,  $a=5$  μm.

Spot 1:  $d=10$  μm; spot 2:  $d=20$  μm; spot 3:  $d=60$  μm; spot 4:  $d=80$  μm; spot 5:  $d=120$  μm.

Conditions d'hybridation:  $c_{CP^*}=0,1$  μM dans PBS-BSA 1%.

Conditions de microscopie de fluorescence: temps d'exposition: 0,32 s, marqueur fluorescent: streptavidine-R-phycoérythrine.

D'après la **figure III.8C**, nous pouvons observer que la taille des spots, déterminée à partir de l'image en microscopie de fluorescence, augmente avec la distance microélectrode-substrat de 217 à 460 μm de diamètre. En effet, plus la contre-électrode est éloignée du substrat, moins les lignes de champ électrique sont localisées lors de la copolymérisation, et donc plus le motif obtenu est grand.

Ainsi, les paramètres idéaux de potentiel ( $E_{app}$ ), temps de polarisation ( $\tau$ ) et distance microélectrode-substrat ( $d$ ) pour l'électrogénération de spots de polypyrrole-oligonucléotide par mode direct de la SECM sont respectivement  $E_{app}=0,7$  V *vs.* Ag/Ag<sup>+</sup>,  $\tau=10$  ms et  $d=60$   $\mu$ m.

### **III.C. Influence du rapport entre pyrrole et pyrrole-oligonucléotide dans la solution de copolymérisation**

La micro-fabrication par mode direct de la SECM permet non seulement la localisation des spots, mais aussi la possibilité de contrôler la densité d'oligonucléotides sur la surface en variant la proportion de pyrrole-oligonucléotide par rapport au pyrrole non fonctionnalisé dans la solution de polymérisation. Ce paramètre doit être optimisé afin, d'une part, d'éviter des phénomènes d'encombrement stérique, et d'obtenir un bon rapport signal sur bruit dans le but d'améliorer la sensibilité lors de la détection de l'hybridation. En effet, des problèmes d'encombrement stérique apparaissent lorsque la densité de surface est élevée, empêchant alors les brins d'oligonucléotides complémentaires d'atteindre les brins immobilisés pour s'apparier<sup>36</sup>. D'autre part, il est important d'utiliser une concentration en pyrrole fonctionnalisé la plus faible possible en raison de son coût important. Nous avons donc étudié l'influence du rapport entre monomère pyrrole et monomère pyrrole-oligonucléotide sur les images après hybridation en microscopie de fluorescence des spots électrogénérés par SECM.

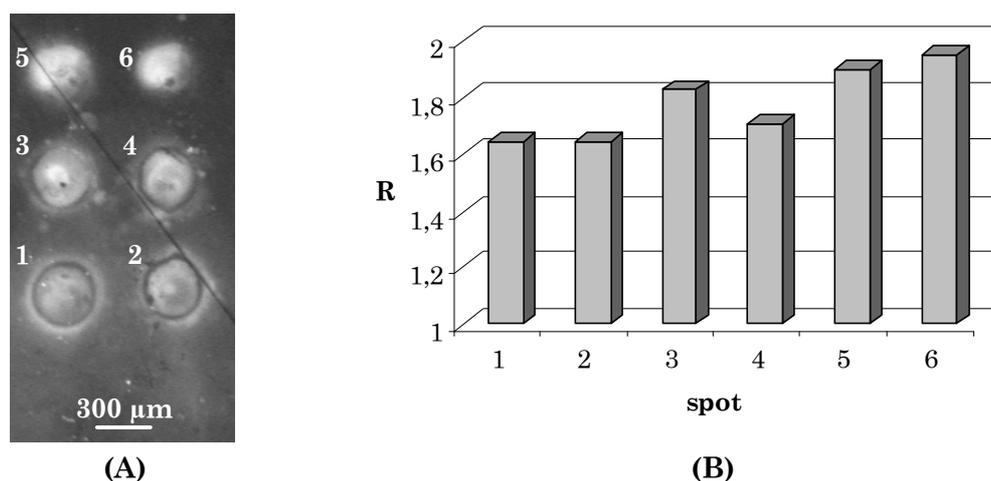
Dans un premier temps, nous avons observé l'effet d'une augmentation de ce rapport entre les deux monomères. Etant donné le coût plus élevé du pyrrole fonctionnalisé par des sondes biologiques, nous avons conservé une concentration de 10  $\mu$ M pour le pyr-ODN et nous avons réduit la concentration de monomères pyrroles à 20 mM, concentration couramment utilisée en électrospotting au laboratoire<sup>20,28</sup>, ce qui donne un rapport entre les monomères de 1/2000. Cependant, dans ces conditions, une destruction du copolymère est observée, en raison de limitations du transport diffusionnel du monomère du cœur de la solution jusqu'à la zone réactionnelle, où les radicaux cations de pyrrole sont rapidement consommés. Lorsque les monomères de pyrrole ne sont plus présents dans cette zone, l'oxydation de l'eau semble devenir le processus majoritaire. En effet, nous pouvons alors observer un phénomène de bullage à la surface du substrat, même s'il paraît difficile de réaliser l'électrolyse de l'eau dans ces conditions en terme de potentiel ( $E[O_2/H_2O]=E^{\circ}[O_2/H_2O]-0,06$  pH=0,81 V à pH 7).

Ce phénomène a également été mis en évidence lors de l'électrogénération de spots de polypyrrole non fonctionnalisé par SECM. L'imagerie de résonance plasmonique de surface

(SPRi) nous a permis d'observer de manière similaire une destruction mécanique de ces spots de polypyrrole inhomogènes élaborés avec une concentration inférieure à 100 mM. Ce phénomène avait été observé précédemment par S. Szunerits *et al*<sup>29</sup>.

Nous avons ensuite vérifié expérimentalement par des études après hybridation en microscopie de fluorescence que la concentration de 200 mM en monomère pyrrole était la concentration minimale requise pour éviter cette destruction des spots de copolymère électrogénérés, en conservant une concentration en pyrrole-oligonucléotide égale à 10  $\mu\text{M}$ . Ainsi, une augmentation du rapport entre les deux monomères pyrroles ne permet pas d'obtenir des spots homogènes, reproductibles et bien définis.

Dans un second temps, nous avons étudié l'influence d'une diminution du rapport entre les deux monomères pyrroles par variation de la concentration en pyrrole-oligonucléotide. Diminuer cette concentration représente un intérêt au niveau expérimental en terme de coût.



**Figure III.9** Influence de la concentration en pyrrole-oligonucléotide dans la solution de copolymérisation sur (A) l'image en microscopie de fluorescence de spots hybridés, (B) la valeur du rapport  $R$  correspondant à l'intensité moyenne de fluorescence calculée sur chacun des spots.

Conditions de dépôt :  $c_{\text{pyr}}=200 \text{ mM}$ ,  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $\tau=10 \text{ ms}$ ,  $d=60 \mu\text{m}$ ,  $a=5 \mu\text{m}$ .

Spots 1, 2 :  $c_{\text{pyr-CP}}=1 \mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),

Spots 3, 4 :  $c_{\text{pyr-CP}}=5 \mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),

Spots 5, 6 :  $c_{\text{pyr-CP}}=10 \mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M).

Conditions d'hybridation :  $c_{\text{CP}^*}=0,1 \mu\text{M}$  dans  $\text{PBS-BSA } 1\%$ .

Conditions de microscopie de fluorescence : temps d'exposition : 0,32 s, marqueur fluorescent : streptavidine-R-phycoérythrine.

La **figure III.9A** présente les images en microscopie de fluorescence obtenues après hybridation des spots pour différentes concentrations (1, 5 et 10  $\mu\text{M}$ ) de pyrrole-ODN et une

concentration de 200 mM en pyrrole non fonctionnalisé dans la solution de copolymérisation. Ces spots ont été obtenus dans les conditions optimales déterminées précédemment ( $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $\tau=10 \text{ ms}$ ,  $d=60 \text{ }\mu\text{m}$ ). Les spots ont une taille moyenne équivalente de l'ordre de  $320 \text{ }\mu\text{m}$ , ce qui montre que, comme attendu, la densité de sondes oligonucléotidiques n'influe pas de manière significative sur la taille des dépôts. Nous pouvons observer sur la **figure III.9B** que l'intensité moyenne de fluorescence, et donc le rapport  $R$  défini précédemment, augmentent avec la concentration en pyrrole-oligonucléotide. Les spots élaborés avec une concentration de  $10 \text{ }\mu\text{M}$  en solution (spots 5 et 6) ont une intensité de fluorescence normalisée moyenne de l'ordre de 1,9. L'utilisation d'un rapport entre les deux monomères pyrroles moins élevé par diminution de la concentration en pyrrole fonctionnalisé conduit donc à des spots homogènes mais présentant une intensité de fluorescence moins importante.

Afin d'obtenir la meilleure sensibilité de détection possible, nous utiliserons une concentration en pyrrole de 200 mM et en pyrrole-oligonucléotide de  $10 \text{ }\mu\text{M}$ , ce qui implique un rapport entre les deux monomères de  $1/20000$ . Ces conditions en terme de concentration sont en accord avec celles développées dans la technologie MICAM<sup>TM</sup>. De plus, la technique de détection par microscopie électrochimique qui sera utilisée dans la suite de notre étude (chapitre IV) est basée sur un marquage enzymatique, donc les problèmes d'encombrement stérique que nous rencontrerons seront similaires à ceux observés dans le cas du marquage avec la streptavidine-R-phycoérythrine.

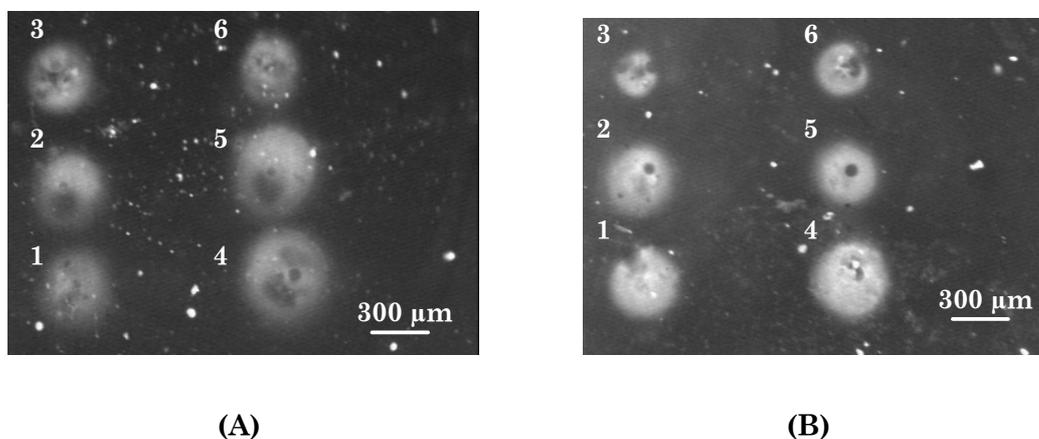
### III.D. Géométrie de la microélectrode

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence de la géométrie de la microélectrode sur la taille et l'homogénéité des spots obtenus.

Lors de la fabrication de microélectrodes (annexe II), le paramètre le plus délicat consiste en la reproductibilité de la taille totale de la sonde, c'est-à-dire du fil de platine et de la gaine isolante en verre. Le rapport entre le diamètre de l'isolant et celui du disque de platine, noté  $R_g$ , constitue un paramètre de caractérisation des microélectrodes très important. Le diamètre du fil de platine dans toutes les expériences réalisées est égal à  $10 \text{ }\mu\text{m}$ . Ainsi, deux microélectrodes pourront être caractérisées, dans notre cas, uniquement par un diamètre différent de l'isolant en verre.

Nous avons réalisé des dépôts de polypyrrole-ODN dans les mêmes conditions sur deux lames d'or à l'aide de deux microélectrodes de tailles différentes (diamètre total de  $863$

ou  $812 \mu\text{m}$ ). La **figure III.10** présente les images en microscopie de fluorescence obtenues sur chacune des deux lames d'or. Les spots obtenus ont globalement la même allure et présentent une intensité de fluorescence importante.



**Figure III.10** Comparaison des images obtenues après hybridation en microscopie de fluorescence de spots électrogénérés en utilisant deux microélectrodes de taille totale différente: (A)  $863 \mu\text{m}$  ( $R_g=86$ ), (B)  $812 \mu\text{m}$  ( $R_g=81$ ).

Conditions de dépôt :  $c_{\text{pyr}}=200 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pyr-CP}}=10 \mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  ( $0,1 \text{ M}$ ),  $\tau=10 \text{ ms}$ ,  $a=5 \mu\text{m}$ . Pour chaque lame :

Spot 1:  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $d=60 \mu\text{m}$ , spot 2:  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $d=80 \mu\text{m}$ ,

spot 3:  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $d=40 \mu\text{m}$ , spot 4:  $E_{\text{app}}=1 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $d=60 \mu\text{m}$ ,

spot 5:  $E_{\text{app}}=1 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $d=80 \mu\text{m}$ , spot 6:  $E_{\text{app}}=1 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $d=40 \mu\text{m}$ .

Conditions d'hybridation :  $c_{\text{CP*}}=0,1 \mu\text{M}$  dans  $\text{PBS-BSA } 1\%$ .

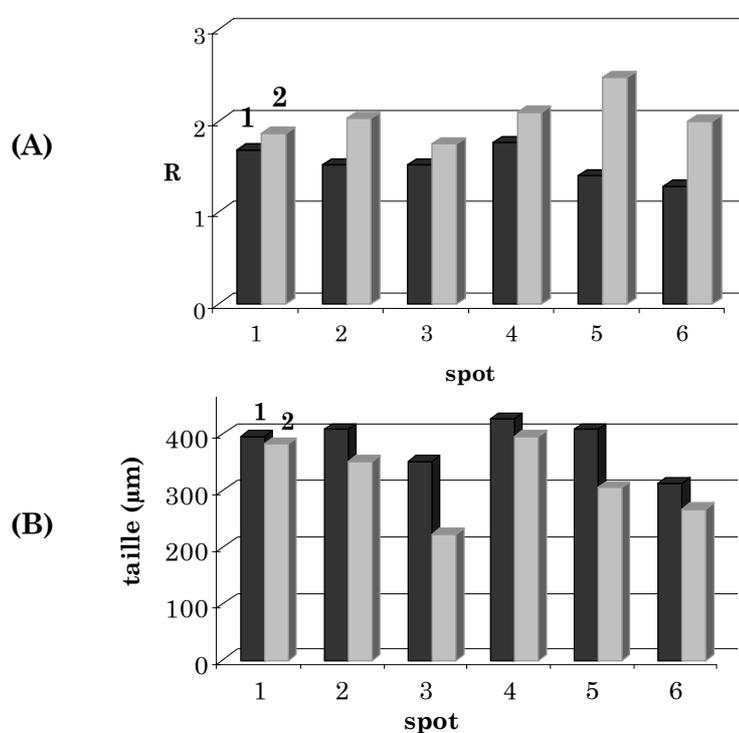
Conditions de microscopie de fluorescence : temps d'exposition :  $0,32 \text{ s}$ , marqueur fluorescent : streptavidine-R-phycoérythrine.

La **figure III.11A** montre les valeurs du rapport R représentant l'intensité moyenne de fluorescence pour chacun des spots. Nous pouvons observer que ce rapport est, quels que soient le potentiel et la distance appliqués lors de l'électrogénération, plus important dans le cas de la microélectrode ayant le plus petit diamètre d'isolant (cas 2). En effet, lorsque le rayon de la sonde diminue, la surface d'échange diminue moins vite que le volume. Le volume sera donc plus petit et l'apport d'espèces par diffusion latérale sera plus rapide. Ainsi, nous obtiendrons une intensité de fluorescence plus importante, et donc un rapport R plus grand. Cette évolution du rapport R avec le diamètre du capillaire de verre de la sonde a été confirmée lors d'expériences ultérieures sur plusieurs substrats d'or et différentes microélectrodes.

La **figure III.11B** compare la taille des spots électrogénérés à l'aide de chacune des microélectrodes. Plus le diamètre total de la microélectrode est grand (cas 1), plus la taille du

spot obtenu est importante. Ceci est cohérent avec la littérature puisque nous avons observé dans la partie bibliographique de ce manuscrit sur la microscopie électrochimique (chapitre I) que la taille des motifs créés était fortement liée au diamètre de la sonde utilisée. Cette observation confirme le fait que la meilleure méthode pour diminuer la taille des spots formés par mode direct de la SECM est de réduire les dimensions de la microélectrode, et par conséquent, la diffusion des oligomères et des radicaux cations à l'extérieur de la zone réactionnelle.

De plus, nous pouvons remarquer que la différence de taille observée en fonction de la sonde utilisée est moindre pour les spots 1 et 4, c'est-à-dire pour une distance microélectrode-substrat de 60  $\mu\text{m}$ . Ceci indique que l'utilisation d'une telle distance de travail permettra d'obtenir des spots relativement reproductibles quelles que soient les microélectrodes utilisées.



**Figure III.11** Comparaison des valeurs (A) du rapport R, (B) des tailles obtenues en microscopie de fluorescence de spots électrogénérés en utilisant deux microélectrodes de taille totale différente: (1) 863  $\mu\text{m}$  ( $R_g=86$ ), (2) 812  $\mu\text{m}$  ( $R_g=81$ ).

Les conditions de dépôt, d'hybridation et de microscopie sont identiques à celles décrites dans la figure III.10.

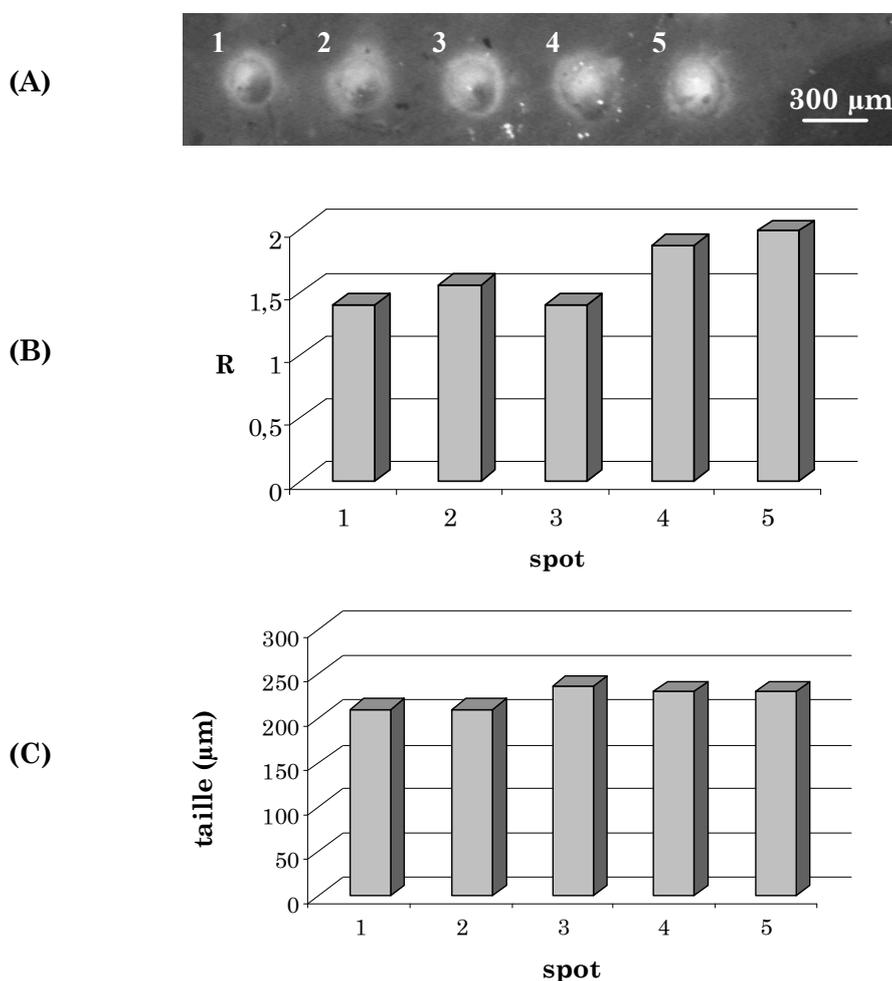
Ainsi, l'utilisation d'une microélectrode possédant un diamètre de gaine isolante de verre le plus faible possible permet d'obtenir une meilleure intensité de fluorescence et une taille plus petite de spots électrogénérés.

Après avoir décrit les conditions optimales de dépôt, ainsi que l'influence de chacun des paramètres expérimentaux, nous allons étudier la reproductibilité et la sélectivité des spots de polypyrrole-oligonucléotide électrochimiquement générés.

#### IV. Etude de l'hybridation par microscopie de fluorescence

##### IV.A. Reproductibilité des spots électrogénérés

Le premier paramètre essentiel dans le but d'utiliser cette voie de structuration pour réaliser des biopuces est la reproductibilité des spots électrogénérés.



**Figure IV.1** Reproductibilité des dépôts de polypyrrole-oligonucléotide observée sur (A) l'image en microscopie de fluorescence, (B) les valeurs du rapport R, (C) la taille des spots hybridés.

Conditions de dépôt:  $c_{\text{pyr}}=200 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pyr-CP}}=10 \text{ μM}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V}$  vs.  $\text{Ag/Ag}^+$ ,  $\tau=10 \text{ ms}$ ,  $d=60 \text{ μm}$ ,  $a=5 \text{ μm}$ .

Conditions d'hybridation:  $c_{\text{CP*}}=0,1 \text{ μM}$  dans  $\text{PBS-BSA } 1\%$ .

Conditions de microscopie de fluorescence: temps d'exposition: 0,32 s, marqueur fluorescent: streptavidine-R-phycoérythrine.

La **figure IV.1A** présente l'image obtenue en microscopie de fluorescence de cinq spots électrogénérés selon la même procédure en appliquant un potentiel de 0,7 V *vs.* Ag/Ag<sup>+</sup> pendant 10 ms à une distance de travail de 60 μm. Les cinq spots présentent une intensité de fluorescence du même ordre de grandeur, soit une moyenne d'intensité maximale de 216±30 pour un temps d'exposition de 0,32 s. D'après la **figure IV.1B**, le rapport R, exprimant l'intensité moyenne de fluorescence sur l'ensemble du spot, a une valeur moyenne pour les cinq spots de 1,65±0,33. Ce rapport diffère légèrement d'un spot à l'autre, mais il reste du même ordre de grandeur.

La **figure IV.1C** montre la taille déterminée en microscopie de fluorescence pour chacun de ces spots. Les cinq spots ont une taille similaire, soit en moyenne 226±10 μm.

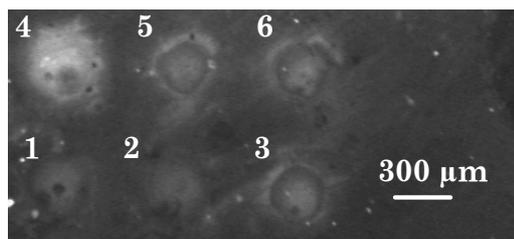
Ainsi, les spots électrogénérés par mode direct de la SECM dans les conditions optimisées ( $E_{app}=0,7$  V *vs.* Ag/Ag<sup>+</sup>,  $\tau=10$  ms,  $d=60$  μm) sont bien reproductibles après hybridation en terme de taille et d'intensité de fluorescence.

## **IV.B. Etude de la sélectivité des spots obtenus**

### **IV.B.1. Sélectivité de l'hybridation**

Le second paramètre important est la sélectivité des spots obtenus. Nous avons réalisé une puce constituée de deux spots de polypyrrole non fonctionnalisé, de trois spots de polypyrrole fonctionnalisé par l'oligonucléotide de séquence M5, et un spot de polypyrrole-CP. Ensuite, nous avons étudié l'hybridation par microscopie de fluorescence en présence de l'oligonucléotide complémentaire CP\*.

La **figure IV.2** montre que seul le spot 4 (polypyrrole-CP) apparaît clair sur l'image, alors que les autres spots apparaissent de couleur sombre. Le spot de Ppy-CP (spot 4) présente une intensité moyenne de fluorescence importante ( $R=1,75$ ) alors que sur les spots de Ppy-M5 (spots 3, 5 et 6), seul un effet de fluorescence sur les bords est observé avec une intensité plus faible. En effet, la valeur de l'intensité maximale sur les bords de ces spots est 140 (non spécifique), alors que celle observée sur le spot 4 est 210 pour un temps d'exposition de 0,32 s. Enfin, les spots de polypyrrole seul (spots 1 et 2) ne présentent aucun signal de fluorescence.



**Figure IV.2** Hybridation observée en microscopie de fluorescence de spots de polypyrrole-oligonucléotide en présence de l'oligonucléotide complémentaire CP\*.

Conditions de dépôt :  $E_{app}=0,7$  V vs. Ag/Ag<sup>+</sup>,  $\tau=10$  ms,  $d=60$   $\mu$ m,  $\alpha=5$   $\mu$ m.

Spots 1, 2 :  $c_{pyr}=200$  mM.

Spots 3, 5, 6 :  $c_{pyr}=200$  mM,  $c_{pyr-M5}=10$   $\mu$ M dans LiClO<sub>4</sub> (0,1 M), ODN : M5.

Spot 4 :  $c_{pyr}=200$  mM,  $c_{pyr-CP}=10$   $\mu$ M dans LiClO<sub>4</sub> (0,1 M), ODN : CP.

Conditions d'hybridation :  $c_{CP^*}=0,1$   $\mu$ M dans PBS-BSA 1%.

Conditions de microscopie de fluorescence : temps d'exposition : 0,32 s, marqueur fluorescent : streptavidine-R-phycoérythrine.

Ceci indique qu'il n'y a pas ou très peu de réaction d'interaction non spécifique entre le polymère ou le polymère fonctionnalisé par l'oligonucléotide M5 avec l'oligonucléotide complémentaire CP\*. Le signal de fluorescence est donc spécifique à l'interaction ODN-ODN complémentaire.

#### IV.B.2. Sélectivité en fonction de la séquence de l'oligonucléotide

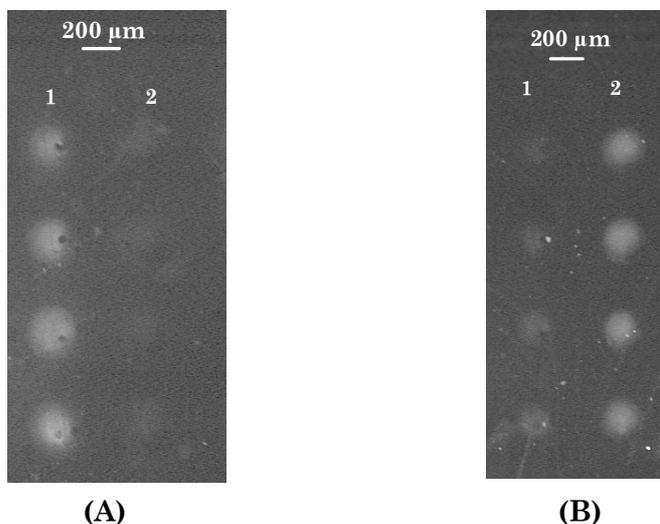
Nous avons ensuite étudié la sélectivité des puces réalisées en fonction de la séquence d'oligonucléotide.

Nous avons réalisé une puce constituée de deux lignes de 4 spots chacune. Sur la première ligne, nous avons déposé des micro-dépôts de polypyrrole fonctionnalisé par l'oligonucléotide de séquence M5, et sur la seconde, du polypyrrole-CP.

Dans un premier temps, nous avons réalisé l'hybridation en présence de l'oligonucléotide complémentaire M5\* : seule la première ligne fluoresce (**Fig. IV.3A**). Nous avons ensuite régénéré la lame, c'est-à-dire qu'en présence d'hydroxyde de sodium à 0,2 M, les deux brins complémentaires appariés se séparent par rupture de leurs liaisons faiblement énergétiques, sans altérer la structure primaire de chaque brin. Ce processus est appelé dénaturation et permet ensuite de réaliser une seconde hybridation.

Puis, la lame a été mise en contact avec l'oligonucléotide complémentaire CP\* en solution. Seuls les spots constitués de polypyrrole-CP peuvent être hybridés et donc fluorescer (**Fig. IV.3B**). Nous pouvons cependant observer un léger signal pour la première

ligne (ODN=M5), mais celui-ci présente une intensité très faible et négligeable devant celle de la seconde ligne (ODN=CP).



**Figure IV.3** Hybridation avec l'oligonucléotide complémentaire de spots de polypyrrole-oligonucléotide observée en microscopie de fluorescence: (A) ODNc : M5\*, (B) ODNc : CP\*

Conditions de dépôt:  $c_{pyr}=200\text{ mM}$ ,  $c_{pyr-ODN}=10\text{ }\mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),  $E_{app}=0,7\text{ V}$  vs.  $\text{Ag}/\text{Ag}^+$ ,  $\tau=10\text{ ms}$ ,  $d=60\text{ }\mu\text{m}$ ,  $a=5\text{ }\mu\text{m}$ .

Ligne 1 : ODN=M5, ligne 2 : ODN=CP.

Conditions d'hybridation:  $c_{ODNc}=0,1\text{ }\mu\text{M}$  dans PBS-BSA 1%.

Conditions de microscopie de fluorescence: temps d'exposition: 0,2 s, marqueur fluorescent: streptavidine-R-phycoérythrine.

Ainsi, les images en microscopie de fluorescence de la **figure IV.3** montrent que, quelle que soit la séquence de l'ODN, l'hybridation a lieu majoritairement sur les spots de polypyrrole fonctionnalisé par l'ODN dont le complémentaire est en solution, et qu'il n'y a pas ou très peu d'interaction non spécifique avec les spots de polypyrrole fonctionnalisé par un oligonucléotide d'une autre séquence.

## V. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons donc mis en évidence la possibilité d'électrogénérer des spots de polypyrrole fonctionnalisé par des oligonucléotides par mode direct de la microscopie électrochimique.

concentration en pyrrole ( $c_{\text{pyr}}$ )	<b>200 mM</b>
concentration en pyrrole-oligonucléotide ( $c_{\text{pyr-ODN}}$ )	<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>
potentiel appliqué ( $E_{\text{app}}$ )	<b>0,7 V vs. Ag/Ag<sup>+</sup></b>
temps de polymérisation ( $\tau$ )	<b>10 ms</b>
distance microélectrode-substrat ( $d$ )	<b>60 <math>\mu\text{m}</math></b>

**Tableau V.1** Paramètres optimisés pour la synthèse de films de Ppy-ODN par mode direct de la SECM.

A l'aide de la microscopie de fluorescence, nous avons déterminé les conditions de dépôt optimales afin d'obtenir des spots reproductibles, de petite taille (de l'ordre de 200  $\mu\text{m}$ ) et homogènes (**tableau V.1**). Par copolymérisation en mode direct de la SECM, il est possible de réaliser rapidement des puces constituées du nombre souhaité de spots, la limitation étant la taille du substrat. De plus, nous avons montré que l'hybridation des puces ainsi formées était un phénomène spécifique. Ceci garantit la fiabilité des dépôts pour l'immobilisation des oligonucléotides lors de l'élaboration de la couche sensible du biocapteur.

Par conséquent, nous pouvons envisager à présent l'étude d'une nouvelle voie de détection de l'hybridation de tels spots, la SECM.

Il serait très intéressant pour la suite de cette étude d'utiliser des microélectrodes de diamètre plus faible, voire des nanoélectrodes, ce qui permettrait de diminuer nettement la taille des spots électrogénérés.

**Références bibliographiques du chapitre II**

- <sup>1</sup> S. J. Updike, G. P. Hicks, *Nature* **1967**, 214, 986–988.
- <sup>2</sup> M. Albareda–Sirvent, A. Merkoçi, S. Alegret, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2000**, 69, 153–163.
- <sup>3</sup> A.–M. Gué, H. Tap, P. Gros, F. Maury, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2002**, 82, 227–232.
- <sup>4</sup> S. Cosnier, S. Szunerits, R. S. Marks, A. Novoa, L. Puech, E. Perez, I. Rico–Lattes, *Talanta* **2001**, 55, 889–897.
- <sup>5</sup> Z. Siwy, L. Trofin, P. Kohli, L. A. Baker, C. Trautmann, C. R. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 5000–5001.
- <sup>6</sup> B. Cheun, H. Endo, T. Hayashi, Y. Nagashima, E. Watanabe, *Biosensors & Bioelectronics* **1996**, 11, 1185–1191.
- <sup>7</sup> J. Wang, *Anal. Chim. Acta* **2002**, 469, 63–71.
- <sup>8</sup> J. Wang, G. Rivas, X. Cai, E. Palecek, P. Nielsen, H. Shiraishi, N. Dontha, D. Luo, C. Parrado, M. Chicharro, P. A. M. Farias, F. S. Valera, D. H. Grant, M. Ozsoz, M. N. Flair, *Anal. Chim. Acta* **1997**, 347, 1–8.
- <sup>9</sup> S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, 251, 767–773.
- <sup>10</sup> J. Wang, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi, P. A. M. Farias, N. Dontha, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2629–2634.
- <sup>11</sup> K. Hashimoto, K. Ito, Y. Ishimori, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 3830–3833.
- <sup>12</sup> S. Liu, J. Ye, P. He, Y. Fang, *Anal. Chim. Acta* **1996**, 335, 239–243.
- <sup>13</sup> J. Wang, M. Jiang, A. Fortes, B. Mukherjee, *Anal. Chim. Acta* **1999**, 402, 7–12.
- <sup>14</sup> J. Wang, M. Jiang, *Langmuir* **2000**, 16, 2269–2274.
- <sup>15</sup> S. Sadki, P. Schottland, N. Brodie, G. Sabouraud, *Chem. Soc. Rev.* **2000**, 29, 283–293.
- <sup>16</sup> E. M. Genies, G. Bidan, A. F. Diaz, *J. Electroanal. Chem.* **1983**, 149, 101–113.
- <sup>17</sup> B. Saoudi, N. Jammul, M.–L. Abel, M. M. Chehimi, G. Dodin, *Synth. Metals* **1997**, 87, 97–103.
- <sup>18</sup> F. Garnier, H. Korri–Yousoufi, P. Srivastava, B. Mandrand, T. Delair, *Synth. Metals* **1999**, 100, 89–94.
- <sup>19</sup> A. Dupont–Filliard, A. Roget, T. Livache, M. Billon, *Anal. Chim. Acta* **2001**, 449, 45–50.
- <sup>20</sup> T. Livache, P. Guedon, C. Brakha, A. Roget, Y. Levy, G. Bidan, *Synth. Metals* **2001**, 121, 1443–1444.
- <sup>21</sup> T. Livache, E. Maillart, N. Lassalle, P. Mailley, B. Corso, P. Guedon, A. Roget, Y. Levy, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2003**, 32, 687–696.

- <sup>22</sup> M. V. Mirkin, B. R. Horrocks, *Anal. Chim. Acta* **2000**, 406, 119–146.
- <sup>23</sup> W. Schuhmann, C. Kranz, H. Wohlschläger, J. Strohmeier, *Biosensors & Bioelectronics*, **1997**, 12, 1157–1167.
- <sup>24</sup> N. Lassalle, A. Roget, T. Livache, P. Mailley, E. Vieil, *Talanta* **2001**, 55, 993–1004.
- <sup>25</sup> T. Livache, E. Maillart, N. Lassalle, P. Mailley, B. Corso, P. Guedon, A. Roget, Y. Levy, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2003**, 32, 687–696.
- <sup>26</sup> G. Bidan, M. Billon, T. Livache, G. Mathis, A. Roget, L. M Torres-Rodriguez, *Synth. Metals* **1990**, 102, 1363–1365.
- <sup>27</sup> T. Livache, H. Bazin, G. Mathis, *Clinica Chimica Acta* **1998**, 278, 171–176.
- <sup>28</sup> T. Livache, B. Fouque, A. Roget, J. Marchand, G. Bidan, R. Téoule, G. Mathis, *Anal. Biochem.* **1998**, 255, 188–194.
- <sup>29</sup> S. Szunerits, N. Knorr, R. Calemczuk, T. Livache, *Langmuir* **2004**, 20, 9236–9241.
- <sup>30</sup> T. Livache, H. Bazin, G. Mathis, *Clinica Chimica Acta* **1998**, 278, 171–176.
- <sup>31</sup> T. Livache, H. Bazin, P. Caillat, A. Roget, *Biosensors & Bioelectronics* **1998**, 13, 629–634.
- <sup>32</sup> Q. Fulian, R. G. Compton, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 1830–1834.
- <sup>33</sup> N. Baden, M. Terazima, *Chemical Physics Letters* **2004**, 393, 539–545.
- <sup>34</sup> A.-K. Kontturi, K. Kontturi, A. Urtti, *European J. Pharmaceutical Sciences* **2002**, 15, 379–385.
- <sup>35</sup> A. F. Diaz, J. Castillo, K. K. Kanazawa, J. A. Logan, M. Salmon, O. Fajardo, *J. Electroanal. Chem.* **1982**, 133, 233–239.
- <sup>36</sup> D. Piscevic, R. Lawall, M. Veith, M. Liley, Y. Okahata, W. Knoll, *Appl. Surf. Sci.* **1995**, 90, 425–436.



## **Chapitre III :**

Formation et caractérisation de gradients de  
surface de polypyrrole–oligonucléotide par  
couplage SECM–SPRi



La formation de gradients de concentration de molécules adsorbées ou déposées sur une surface est un enjeu récent de la biologie motivé par les opportunités intéressantes qu'offrent de telles structures dans l'étude de processus biologiques ou chimiques. En effet, de nombreux phénomènes sont activés ou inhibés selon les différences de concentration du milieu considéré. Ainsi, la réalisation artificielle de tels gradients se révèle indispensable pour l'étude, par exemple, de la chimiotaxie<sup>1,2</sup>, qui est la capacité des cellules à se déplacer vers les plus fortes concentrations en nutriments et les plus faibles concentrations en poison, de la croissance des nerfs<sup>3</sup>, l'environnement cellulaire ayant un effet attractif ou répulsif sur celle-ci, ou encore de la nucléation et la croissance de cristaux<sup>4,5</sup>. L'étape essentielle dans la formation de gradients de molécules chimiques ou biologiques greffées sur une surface consiste en l'immobilisation covalente et irréversible des récepteurs sur la surface. Cinq types de techniques ont été utilisés pour réaliser cette étape : les réseaux microfluidiques<sup>6,7,8</sup>, les monocouches auto-assemblées<sup>9,10</sup>, les nanoparticules<sup>11,12</sup>, la photoactivation<sup>13,14,15,16</sup> ou encore des méthodes électrochimiques<sup>17,18,19,20</sup>.

Ce chapitre présente une nouvelle voie d'immobilisation de gradients de biomolécules sur une surface. La formation et la caractérisation de gradients d'oligonucléotides sur une surface d'or sont basées sur la combinaison d'une méthode électrochimique, la microscopie électrochimique à balayage (SECM), et d'une méthode optique, l'imagerie de résonance plasmonique de surface (SPRi). La microscopie électrochimique permet de micro-structurer la surface d'or par des gradients de densité d'oligonucléotides par variation de la vitesse de déplacement de la microélectrode, jouant le rôle de contre-électrode, en appliquant une impulsion en potentiel au substrat d'or. L'imagerie de résonance plasmonique de surface est utilisée afin de détecter et contrôler l'étape de micro-fabrication, et apporte ainsi une information essentielle concernant la formation des micro-motifs.

Ce chapitre est constitué de trois parties. Dans une première partie, nous présenterons le principe de l'imagerie de résonance plasmonique de surface (SPRi), ainsi que celui du couplage SECM-SPRi. La seconde partie sera consacrée aux études préliminaires à celle des gradients qui consistent en la réalisation de spots de polypyrrole, puis de polypyrrole-oligonucléotide. Nous verrons ici l'intérêt de l'imagerie de résonance plasmonique de surface qui permet de suivre l'étape de micro-fabrication des spots de polypyrrole-ODN, et également de détecter leur hybridation. Ainsi, la combinaison SECM-SPRi permet à la fois de micro-structurer des surfaces avec des spots de polypyrrole-oligonucléotide, de suivre cette étape en temps réel et de détecter l'hybridation des spots.

Enfin, dans une dernière partie, nous étudierons la réalisation de gradients de polypyrrole–oligonucléotide sur une surface d'or à l'aide du couplage de ces deux techniques.

## **I. Couplage des deux techniques : SECM et SPRi**

Avant d'étudier en quoi consiste le couplage de la microscopie électrochimique (SECM) et de l'imagerie de résonance de plasmon de surface (SPRi), nous allons tout d'abord nous intéresser au principe de la SPR.

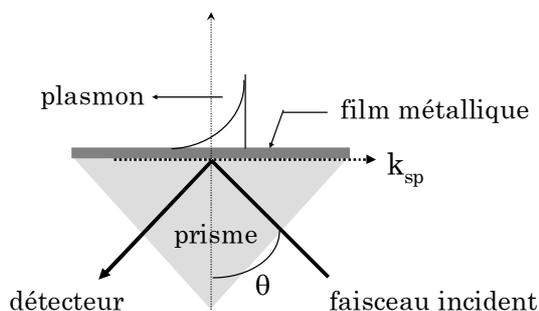
### **I.A. Principe de la résonance plasmonique de surface (SPR)**

La résonance plasmonique de surface est une méthode de détection optique de phénomènes interfaciaux, tels que la liaison "ligand–récepteur" sur une surface métallique, en temps réel et ne nécessitant pas de marquage. Cette technique a permis de nombreux progrès en matière de compréhension des interactions moléculaires et d'analyses biospécifiques.

En 1968, A. Otto *et al.*<sup>21</sup>, puis E. Kretschmann *et al.*<sup>22</sup> ont mis en évidence le phénomène de plasmons de surface à l'aide de deux dispositifs différents, utilisant chacun un prisme de couplage. Actuellement, la configuration de E. Kretschmann, dans laquelle une couche mince métallique est déposée sur le prisme de couplage, est utilisée. Suite à cette découverte, l'intérêt des plasmons de surface a considérablement augmenté dans le but de caractériser des films minces ou des processus se déroulant sur des interfaces métalliques. En 1983, l'équipe de B. Liedberg a appliqué pour la première fois cette configuration pour la détection de biomolécules<sup>23</sup>, et c'est en 1990 qu'est apparue la société Biacore International spécialisée dans la commercialisation d'appareils SPR ("Surface Plasmon Resonance", résonance de plasmons de surface). Cependant, le procédé Biacore® ne possède que 4 canaux de mesure. Afin d'accéder à une mesure multiparamétrique, un dispositif parallélisé d'analyses SPR a été mis au point en collaboration avec l'Institut d'Optique Théorique et Appliquée (IOTA) et la société Génoptics. Ce procédé peut être utilisé pour détecter l'hybridation d'ADN sans traceur ; chaque spot d'ADN va générer une courbe de SPR et les réponses des différentes analyses pourront être obtenues en une seule expérience.

### I.A.1. Principe

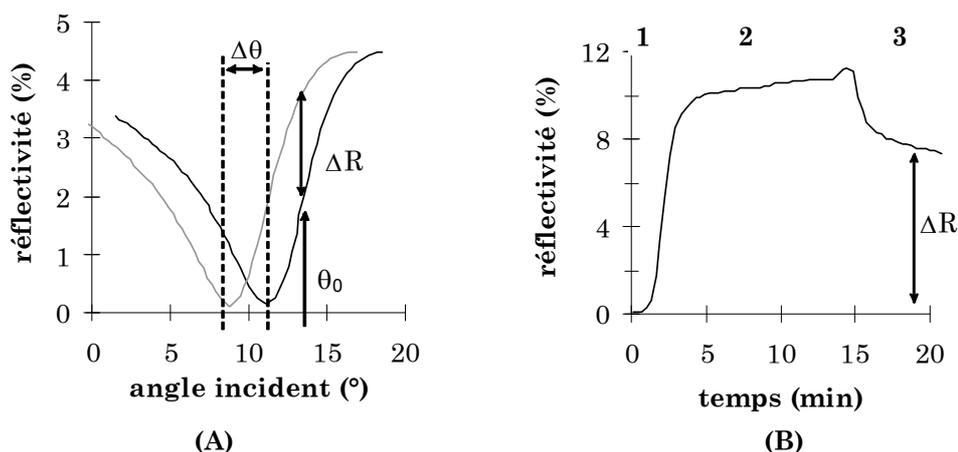
La résonance de plasmon de surface<sup>24</sup> est une méthode de détection optique basée sur l'excitation de plasmons à l'interface d'une couche mince de métal noble (le plus souvent, l'or, en raison de son excellente stabilité et de ses propriétés optiques) et d'un diélectrique (du verre de fort indice de réfraction et de forme prismatique). Le principe de la SPR est le suivant (**Fig. I.1**): lorsqu'un faisceau de lumière polarisée monochromatique (dans notre cas, il est émis par une diode électroluminescente émettant à 660 nm) illumine une interface entre deux milieux d'indices de réfraction différents (dans notre cas, le verre et l'eau), une partie de la lumière incidente est réfléchiée sur l'interface et l'autre partie de la lumière est réfractée à travers la surface. Selon la valeur de l'angle d'incidence du faisceau ( $\theta$ ), toute la lumière peut être réfléchiée (cas de la réflexion totale). Lorsqu'il n'y a pas de réfraction, la propagation d'une des composantes électromagnétiques de la lumière, l'onde évanescente, est sensible à toute perturbation située à une distance de l'interface inférieure à sa profondeur de pénétration dans le milieu, mais insensible à toute perturbation à des distances supérieures. Si une fine couche de métal (dans notre cas, de l'or), riche en électrons libres, est déposée à l'interface, ces derniers entrent en résonance avec les photons du faisceau incident. Ce phénomène est appelé résonance plasmonique de surface, le nuage électronique du métal étant le plasmon. L'onde plasmon se propage parallèlement à l'interface séparant le métal du milieu biologique, et joue le rôle de sonde dans le milieu où se situe la réaction biomoléculaire. L'intérêt de ce système optique basé sur la résonance des plasmons de surface est d'amplifier la variation du signal de réflectivité ( $\Delta R$ ) liée à la variation d'épaisseur optique produite en surface.



**Figure I.1** Schéma de principe du dispositif de la résonance plasmonique de surface (SPR).

La résonance de plasmon de surface se traduit par une chute de la réflectivité du métal due à un transfert d'énergie entre le faisceau incident et l'onde de surface qui se propage sur l'interface métal/diélectrique lorsque les conditions de résonance sont remplies. Ce pic de réflectivité minimale est obtenu à un angle  $\theta$  appelé angle de résonance (**Fig. I.2A**). La largeur à mi-hauteur de ce pic de réflectivité est d'environ  $5^\circ$  dans le cas d'un film mince d'or.

Les variations des propriétés de ce pic (décalage angulaire) de réflectivité minimale permettent de quantifier les perturbations se produisant près de l'interface métal/diélectrique. Ces dernières peuvent avoir plusieurs origines : variation de l'indice de réfraction du milieu, formation d'une couche biologique d'indice de réfraction différent dont l'épaisseur augmente au cours du temps, ou encore augmentation de la concentration en molécules cibles au voisinage de l'interface se traduisant par une augmentation de l'indice de réfraction dans la couche biologique (**Fig. I.2A**).



**Figure I.2** (A) Réflectivité entre un prisme et une couche d'or en contact avec un milieu liquide. L'ajout d'une couche biologique fait passer de la courbe grise à la courbe noire ; (B) Exemple de cinétique d'interaction en trois phases : injection du tampon référence (1), injection des cibles diluées dans le tampon, appelée association, jusqu'à saturation (2), rinçage en tampon ou dissociation (3).

La SPR permet de suivre l'évolution dans le temps de molécules biologiques ou de leurs interactions avec un substrat tel qu'un biocapteur. Ceci consiste à enregistrer en continu les variations de réflectivité en fonction du temps, pour un angle de travail  $\theta_0$  donné. La cinétique d'interaction, représentée sur le graphique de la **figure I.2B** appelé sensorgramme, est composée de trois parties.

La première zone correspond à la mise en contact du substrat avec la solution tampon afin de mesurer la réflectivité initiale (appelée ligne de base) qui servira de référence par la suite. La seconde étape, appelée étape d'association, consiste en l'injection des molécules cibles, diluées dans la même solution tampon. Celles-ci circulent à flux constant à la surface du biocapteur et vont interagir avec les molécules sondes immobilisées sur la surface. Enfin, au cours de la dernière étape, le tampon est de nouveau injecté. Cette phase, appelée étape de rinçage ou de dissociation, permet de mesurer la réflectivité finale dans les mêmes conditions que la réflectivité initiale. La différence entre ces deux réflectivités mesurées correspond au changement d'indice de réfraction causé par la fixation de la molécule cible sur les sondes immobilisées sur la surface. Il est ensuite possible de régénérer le substrat (par exemple avec de la soude dans le cas de l'hybridation d'oligonucléotides) : un retour à la ligne

de base initiale est alors observé. Classiquement, le cycle présenté sur la **figure I.2B** peut être réalisé 50 à 100 fois sur une même surface.

Ce sensorgramme permet de visualiser la cinétique d'interaction en temps réel et d'en dégager certaines caractéristiques telles que la mesure des vitesses d'association et de dissociation<sup>25,26,27</sup>, ou encore la détermination de constantes d'affinité<sup>28,29</sup>.

### **I.A.2. L'imagerie de résonance plasmonique de surface (SPRi)**

L'imagerie de résonance plasmonique de surface (SPRi) est une technique dérivée de la SPR dans laquelle les variations de réflectivité causées par les interactions biologiques sont visualisées par une caméra CCD. Cette technique permet ainsi le suivi en parallèle, et sans marquage, de multiples interactions biologiques. Elle a été utilisée, par exemple, pour la lecture de puces à ADN<sup>30,31,32</sup>.

L'appareil SPRi utilisé est monté selon la configuration décrite par E. Kretschmann en 1968. Le montage optique a été décrit en 2000 par P. Guedon *et al.*<sup>33</sup>

### **I.B. Principe du couplage SECM–SPRi**

Afin de former des gradients de polypyrrole–oligonucléotide, nous avons développé un système basé sur le couplage de la SPRi avec la microscopie électrochimique à balayage (SECM). La SECM est utilisée afin de micro–structurer la surface et la SPRi permet de suivre en temps réel cette modification. Le schéma du dispositif utilisé pour le couplage de ces deux méthodes, la première électrochimique, la seconde optique, est présenté dans la **figure I.3**.

Ces deux techniques ont en commun l'utilisation d'un substrat conducteur, l'or. Dans le cas de la SECM, celui-ci va être approché par une microélectrode, et dans celui de la SPRi, ce substrat va générer des ondes de résonance de plasmon de surface à un angle critique, l'angle de résonance. La microélectrode de platine (diamètre de 10  $\mu\text{m}$ ), ayant le rôle de contre–électrode (mode direct expliqué dans le chapitre précédent), est placée au–dessus de la surface d'or, alors que le plasmon de surface du film d'or est excité à travers le prisme par une source lumineuse située en dessous de l'échantillon. Cette configuration rend donc le couplage des deux techniques possible. Ainsi, les variations du courant faradique mesuré à la microélectrode permettent de positionner la sonde proche de la surface d'or. Le dispositif SECM va ensuite permettre la formation de ces dépôts, pendant que la caméra CCD de la SPRi enregistre les changements de l'épaisseur des dépôts sur l'échantillon ou de l'indice de réfraction à proximité de la lame d'or, à travers les variations de l'intensité du faisceau

lumineux réfléchi. Cette configuration permet donc un suivi du processus de micro-modification de la surface sans interférer avec la réaction électrochimique de micro-fabrication.

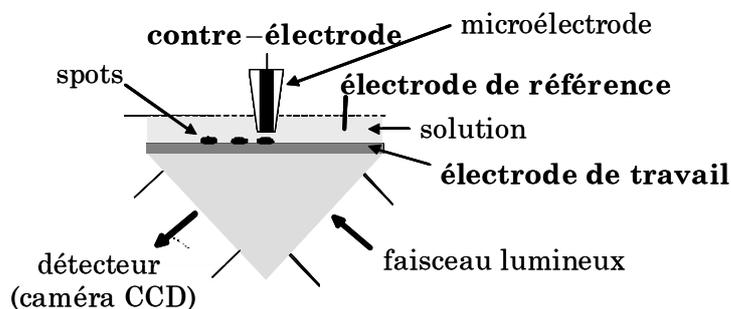


Figure I.3 Schéma de principe du dispositif de couplage SECM-SPRi.

## II. Etudes préliminaires à l'aide du couplage SECM-SPRi

Avant de former des gradients de concentration de polypyrrole-oligonucléotide, nous avons étudié l'électrogénération de spots de polypyrrole, puis de polypyrrole-ODN à l'aide du couplage SECM-SPRi.

### II.A. Etude de spots de polypyrrole

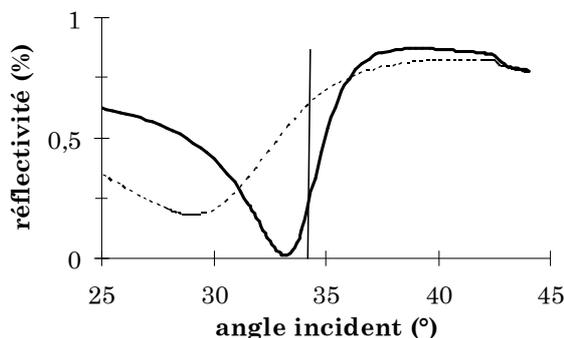
Nous avons tout d'abord validé la technique de couplage SECM-SPRi en étudiant la formation de spots de polypyrrole sur une surface d'or. Après avoir présenté le principe utilisé pour la formation de ces spots, nous étudierons les premiers résultats obtenus en imagerie. Nous insisterons sur l'importance de la concentration en pyrrole dans la solution de polymérisation et sur les conséquences sur les spots d'une concentration trop faible.

#### II.A.1. Génération des spots de polypyrrole

##### II.A.1.a. Principe

La méthode de micro-fabrication de spots de polypyrrole par mode direct de la microscopie électrochimique a été décrite dans le chapitre précédent. C'est pourquoi nous nous contenterons ici d'en rappeler les principales caractéristiques. La microélectrode est placée très proche de la surface (ici,  $d=10\ \mu\text{m}$ ), la distance microélectrode-substrat étant déterminée à l'aide de courbes d'approche en présence d'un médiateur redox ( $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ ). La formation des spots est réalisée par électropolymérisation en présence de monomères pyrroles en appliquant un potentiel de  $0,7\ \text{V vs. Ag/Ag}^+$  au substrat. La microélectrode joue

le rôle de contre-électrode, ce qui a pour effet de localiser les lignes de champ électrique et donc d'obtenir des motifs de taille micrométrique.

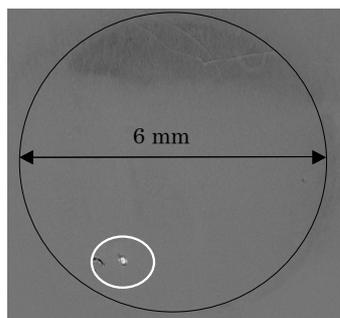


**Figure II.1** Réflectivité entre un prisme et une couche d'or (environ 50 nm d'épaisseur) nue (traits continus) ou recouverte d'un film de polypyrrole (traits pointillés), en contact avec la solution de monomères pyrroles.

La précipitation du polymère sur la surface de l'électrode modifie l'épaisseur optique à proximité du substrat, ce qui entraîne un changement caractéristique du signal de réflectivité du plasmon de surface. La **figure II.1** présente les courbes de réflectivité obtenues sur la surface d'or au contact avec la solution de monomères pyrroles (traits continus) et sur la surface modifiée par le polypyrrole dans la solution de monomères (traits en pointillés). Nous observons un décalage important de la valeur de l'angle de résonance lorsque le polypyrrole est déposé sur la surface. Afin de détecter la modification de surface par SPRi, l'angle du faisceau incident ( $\theta$ ) a été fixé à une valeur ( $34^\circ$ ) légèrement supérieure à l'angle de résonance obtenu dans le cas de l'or. Dans ces conditions, la sensibilité de la variation de réflectivité est augmentée. En travaillant à angle constant, la présence de polypyrrole sur la surface d'or se caractérisera par une augmentation de la réflectivité mesurée par le détecteur et donnera une image plus claire (images en niveaux de gris).

#### II.A.1.b. Premiers dépôts de polypyrrole réalisés

Le dispositif SPRi utilisé permet de réaliser l'imagerie d'une surface d'un diamètre de 6 mm. La **figure II.2** présente l'image SPRi d'une surface d'or sur laquelle un spot de polypyrrole, d'un diamètre de  $150\ \mu\text{m}$ , a été électrogénéré par SECM. Comme expliqué dans la partie précédente, la présence de ce spot entraîne une augmentation de la réflectivité correspondant à un déplacement de l'angle de résonance vers des angles plus faibles et une augmentation locale de l'épaisseur optique; c'est pourquoi ce spot apparaît plus clair que le reste de la lame d'or sur l'image enregistrée par la caméra CCD.



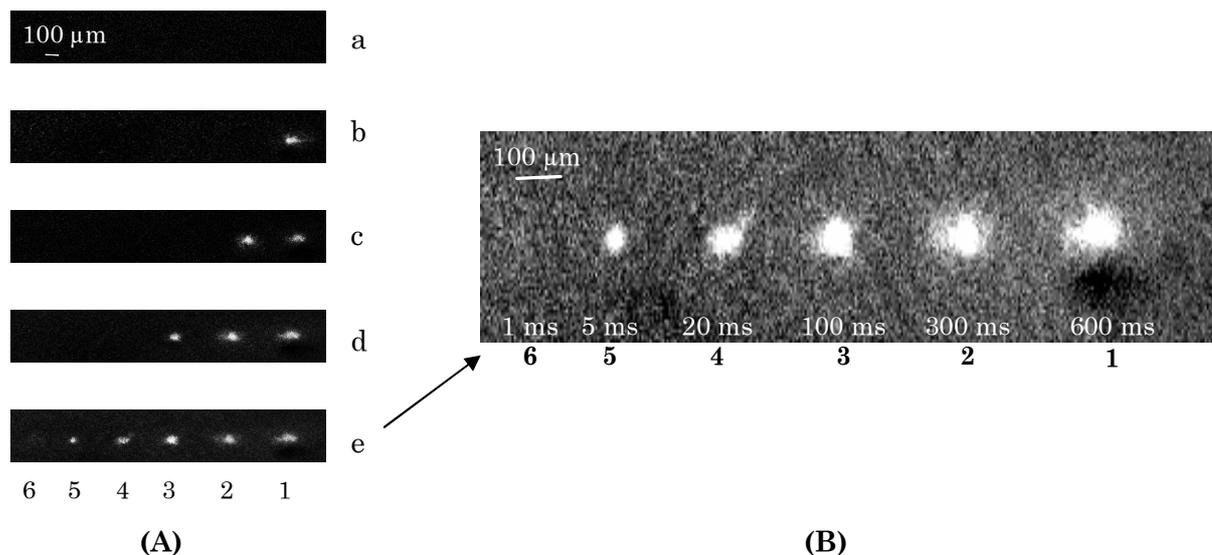
**Figure II.2** Image SPRi d'une surface d'or entière sur laquelle un spot de polypyrrole a été élaboré et apparaît en blanc.

Conditions de dépôt:  $c_{pyr}=100$  mM dans  $LiClO_4$  (0,1 M),  $E_{app}=0,7$  V vs.  $Ag/Ag^+$ ,  $\tau=600$  ms,  $a=5$   $\mu$ m,  $d=10$   $\mu$ m.

Nous avons ensuite réalisé des spots de polypyrrole pour différents temps de polymérisation ( $\tau=0$  à 600 ms), et observé l'influence de cette durée sur l'image du spot obtenue en SPRi (**Fig. II.3**). Il est important de préciser que l'ensemble des travaux concernant le couplage SECM–SPRi a été réalisé au cours de cette thèse avant l'optimisation des paramètres expérimentaux d'électrogénération décrite dans le chapitre précédent; c'est pourquoi les paramètres utilisés dans la suite de ce chapitre pour la polymérisation du pyrrole et du pyrrole–oligonucléotide sont différents des paramètres optimaux déterminés.

L'image de la **figure II.3A.a** confirme qu'en absence d'application de potentiel dans la solution de monomères pyrroles, la surface apparaît uniformément sombre sur l'image SPRi. Puis, nous pouvons observer que, plus le temps de polymérisation  $\tau$  est grand, plus la taille du spot est importante (**Fig. II.3A.b à e**). Ceci est encore plus visible sur le grossissement de l'image de la lame e (**Fig. III.3B**), et est résumé dans le **tableau II.1**. Dans le cas d'une durée de 1 ms, la quantité de polypyrrole déposée est insuffisante pour pouvoir observer le changement d'épaisseur optique et détecter un spot sur l'image SPRi.

De plus, d'après les images obtenues, les spots sont plus intenses et homogènes au centre dans la zone juste au-dessous de la microélectrode, et ils le sont moins sur les bords. Précisons ici qu'une étude supplémentaire de l'homogénéité des spots a été menée par S. Szunerits *et al.* en microscopie à force atomique (AFM)<sup>34</sup>.



**Figure II.3** Images SPRi de spots de polypyrrole sur une surface d'or électrogénérés avec différents temps de polymérisation (A), et grossissement de l'image du cas e (B).

Conditions de dépôt:  $c_{\text{pyr}}=100 \text{ mM}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $\alpha=5 \mu\text{m}$ ,  $d=10 \mu\text{m}$ .

(a) spot 1 :  $\tau=0 \text{ ms}$

(b) spot 1 :  $\tau=600 \text{ ms}$

(c) spot 1 :  $\tau=600 \text{ ms}$  ; spot 2 :  $\tau=300 \text{ ms}$

(d) spot 1 :  $\tau=600 \text{ ms}$  ; spot 2 :  $\tau=300 \text{ ms}$  ; spot 3 :  $\tau=100 \text{ ms}$

(e) spot 1 :  $\tau=600 \text{ ms}$  ; spot 2 :  $\tau=300 \text{ ms}$  ; spot 3 :  $\tau=100 \text{ ms}$  ; spot 4 :  $\tau=20 \text{ ms}$  ; spot 5 :  $\tau=5 \text{ ms}$  ; spot 6 :  $\tau=1 \text{ ms}$ .

L'épaisseur moyenne des spots a également été déterminée par imagerie de résonance de plasmon de surface (**tableau II.1**). Pour cela, nous déterminons l'intensité de la lumière réfléchie pour chaque angle afin de reconstruire les courbes de réflectivité pour chacun des spots électrogénérés. Les réponses obtenues sont comparées aux courbes théoriques. Précisons ici que les échantillons bruts utilisés sont constitués de verre recouvert d'un pré-dépôt de titane (5 nm d'épaisseur), puis d'un dépôt d'or d'une épaisseur de 50 nm (annexe I). Il est alors possible de déterminer l'épaisseur de chacun des spots de polypyrrole élaborés en utilisant les valeurs d'indice de réfraction suivantes :  $n_{\text{or}}=0,167 + i3,442$ ,  $n_{\text{verre}}=1,7717$ ,  $n_{\text{titane}}=2,75 + i3,52$ ,  $n_{\text{polypyrrole}}=1,7 - i0,3^{35}$ .

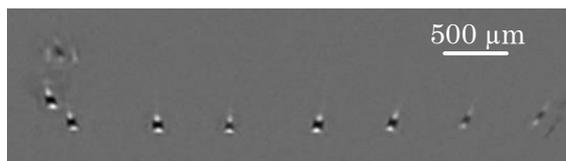
spot	5	4	3	2	1
temps de polymérisation (ms)	5	20	100	300	600
diamètre ( $\mu\text{m}$ )	35	85	100	120	145
épaisseur (nm)	5	5	10	35	50

**Tableau II.1** Taille et épaisseur déterminées en SPRi des spots de polypyrrole en fonction du temps de polymérisation ( $\tau$ ).

L'épaisseur du dépôt de polypyrrole varie entre 3 et 50 nm, ce qui prouve la sensibilité de la technique de SPRi. De plus, cette épaisseur reste toujours inférieure à la distance entre la microélectrode et le substrat utilisée ( $d=10\ \mu\text{m}$  ici) ; il n'y a donc jamais de contact entre les spots et la sonde.

### II.A.2. Influence de la concentration en pyrrole

Une étude approfondie des paramètres expérimentaux d'électrogénération par SECM (distance microélectrode–substrat, potentiel et temps de polymérisation, concentration dans la solution de polymérisation...) a été menée au cours du chapitre précédent. Nous avons simplement souhaité illustrer ici le phénomène particulier se produisant pour de faibles concentrations en pyrrole décrit dans la partie III.C du chapitre II. Nous avons observé par microscopie de fluorescence que l'utilisation d'une concentration en monomère pyrrole trop faible conduisait à une destruction des spots, accompagnée d'un phénomène de bullage à la surface du substrat.



**Figure II.4** Image SPRi de trous dans la couche d'or réalisés en polymérisant avec une concentration trop faible en monomères pyrroles.

*Conditions de dépôt* :  $c_{\text{pyr}}=50\ \mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),  $E_{\text{app}}=0,5$  à 1,1 V vs.  $\text{Ag}/\text{Ag}^+$ ,  $a=5\ \mu\text{m}$ ,  $d=10\ \mu\text{m}$ ,  $\tau=50$  à 500 ms.

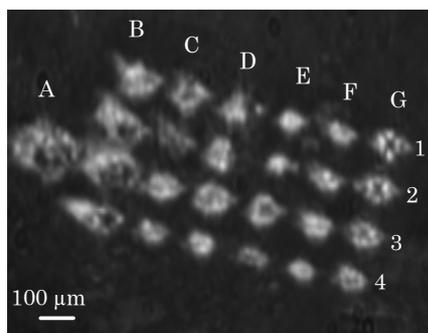
Ce phénomène peut être observé sur l'image SPRi de la **figure II.4** où les spots, quel que soit le potentiel appliqué ( $E_{\text{app}}$ ), apparaissent sous la forme d'une tache noire entourée de blanc, au lieu d'une tache blanche uniforme due à une augmentation de la réflectivité correspondant à un déplacement du minimum de la résonance de plasmon de surface vers des angles plus faibles et une augmentation locale de l'épaisseur optique (cas des spots de la **figure II.3**). Il y a ainsi formation de trous sur la surface d'or, ce qui confirme la nécessité d'utiliser des concentrations plus importantes en monomères pyrroles afin d'électrogénérer des spots homogènes de polypyrrole.

Après avoir mis au point le dispositif SECM–SPRi par l'étude de la formation de spots de polypyrrole, nous avons utilisé ce couplage pour l'électrogénération de spots de polypyrrole–oligonucléotide sur la surface d'or.

## II.B. Etude de spots de polypyrrole–oligonucléotide

### II.B.1. Génération

La **figure II.5** présente l'image SPRi d'une lame d'or sur laquelle des spots de polypyrrole–oligonucléotide ont été électrogénérés par SECM avec différentes conditions de copolymérisation.



**Figure II.5** Image SPRi d'une lame d'or sur laquelle sont électrogénérés des spots de polypyrrole–oligonucléotide.

*Conditions de dépôt* :  $c_{\text{pyr}}=200 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pyr-CP}}=10 \text{ }\mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $a=5 \text{ }\mu\text{m}$ .

*Spots A3, B3, B4, G1–G4* :  $\tau=200 \text{ ms}$ ,  $d=5 \text{ }\mu\text{m}$ , pyrrole seul,

*Spots B1, B2, C1–C4, E3, E4, F1–F4* :  $\tau=200 \text{ ms}$ ,  $d=5 \text{ }\mu\text{m}$ ,

*Spots D1, D2* :  $\tau=300 \text{ ms}$ ,  $d=5 \text{ }\mu\text{m}$ ,

*Spots D3, D4* :  $\tau=200 \text{ ms}$ ,  $d=12,5 \text{ }\mu\text{m}$ ,

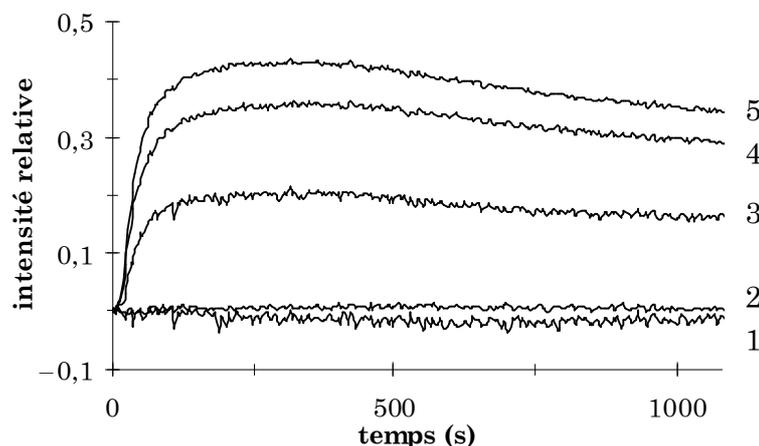
*Spots E1, E2* :  $\tau=100 \text{ ms}$ ,  $d=5 \text{ }\mu\text{m}$ .

Comme précédemment, la présence de ces spots sur la lame d'or entraîne une augmentation de la réflectivité, et donc de l'épaisseur optique ; c'est pourquoi ils apparaissent en blanc sur l'image. Nous n'étudierons pas ici l'influence des paramètres expérimentaux car cette étude était l'objet du chapitre précédent.

Après avoir électrogénéré ces spots par couplage SECM–SPRi, nous avons détecté leur hybridation par SPR en mesurant l'évolution de l'intensité lumineuse réfléchie en fonction du temps lorsqu'ils sont au contact d'une solution d'oligonucléotides complémentaires. L'objectif est de réaliser le dépôt, suivre en temps réel sa formation, et détecter l'hybridation des spots avec un seul dispositif, le couplage SECM–SPRi.

### II.B.2. Détection de l'hybridation de spots de polypyrrole–oligonucléotide

Nous avons étudié le phénomène d'hybridation sur une lame électrospottée en injectant l'oligonucléotide complémentaire directement en solution et en suivant les interactions biologiques que cela engendre. L'objectif ici n'est pas d'étudier l'hybridation en fonction des différents paramètres d'électrogénération des spots, mais de montrer la faisabilité du concept de détection de l'hybridation *via* la SPR.



**Figure II.6** Cinétique de l'hybridation par SPRi de spots électrogénérés par mode direct de la SECM.

Conditions de dépôt :  $E_{app} = 0,7$  V vs.  $Ag/Ag^+$ ,  $\tau = 200$  ms,  $d = 5$   $\mu$ m,  $a = 5$   $\mu$ m.

Spot 1:  $c_{pyr} = 20$  mM,

Spot 2:  $c_{pyr} = 20$  mM,  $c_{pyr-M5} = 10$   $\mu$ M dans  $LiClO_4$  (0,1 M),

Spot 3:  $c_{pyr} = 20$  mM,  $c_{pyr-CP} = 50$   $\mu$ M dans  $LiClO_4$  (0,1 M),

Spot 4:  $c_{pyr} = 20$  mM,  $c_{pyr-CP} = 2$   $\mu$ M dans  $LiClO_4$  (0,1 M),

Spot 5:  $c_{pyr} = 20$  mM,  $c_{pyr-CP} = 10$   $\mu$ M dans  $LiClO_4$  (0,1 M).

Conditions d'hybridation :  $c_{CP^*} = 0,25$   $\mu$ M dans PBS+NaCl (23 mg mL<sup>-1</sup>)

La **figure II.6** présente les cinétiques des réactions en présence d'oligonucléotides complémentaires CP\* du polypyrrole–CP (courbes 3 à 5), élaborés avec différentes concentrations en monomère de pyrrole fonctionnalisé en solution, du polypyrrole–M5 (courbe 2) et du polypyrrole non fonctionnalisé (courbe 1). Cette figure montre qu'il n'y a aucun signal, et donc aucune interaction biologique, dans le cas du spot non complémentaire ou non fonctionnalisé, ce qui prouve la spécificité du phénomène d'hybridation. En comparant les cinétiques obtenues avec les spots de polypyrrole–CP (spots 3 à 5), nous pouvons observer qu'un maximum d'amplitude est atteint dans le cas d'une concentration de 10  $\mu$ M en pyrrole–CP dans la solution de copolymérisation. Des concentrations moins élevées engendrent des signaux d'amplitudes plus faibles, les films obtenus étant moins homogènes. Au contraire, l'utilisation de plus fortes concentrations semble entraîner un problème d'encombrement stérique, ce qui a pour effet de diminuer le signal d'hybridation.

Nous avons également détecté l'hybridation des spots par SPR en utilisant la microfluidique ; la solution d'oligonucléotide complémentaire parvient alors à la surface modifiée avec un débit constant, ce qui limite les problèmes diffusionnels.

Ainsi, le couplage de la SECM avec la SPRi permet à la fois de micro-fabriquer des spots de polypyrrole fonctionnalisés par des oligonucléotides, de suivre cette modification de surface et de détecter l'hybridation des spots avec un même appareillage.

Après avoir validé le principe du couplage SECM-SPRi pour l'élaboration de spots de polypyrrole et polypyrrole-ODN, nous nous sommes intéressés à la réalisation de gradients de concentration de molécules.

### **III. Etude de gradients de biomolécules**

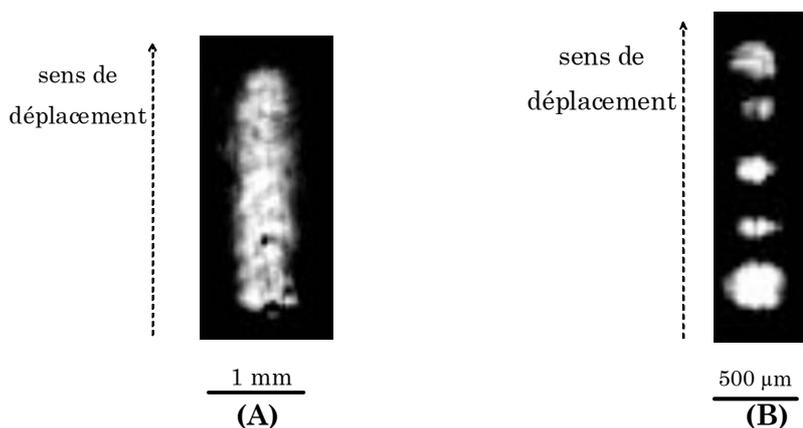
#### **III.A. Etude de la faisabilité par la formation de gradients de polypyrrole**

Nous avons étudié la formation de gradients de molécules par couplage SECM-SPRi. Comme précédemment dans le cas des spots, nous avons préalablement validé le principe de micro-fabrication par couplage SECM-SPRi en réalisant des gradients de polypyrrole.

##### **III.A.1. Influence de l'intervalle de temps entre deux sauts de potentiel**

Afin de réaliser des gradients de polypyrrole, nous avons, dans un premier temps, réalisé le dépôt du polymère sous forme de ligne. Pour cela, nous avons étudié l'influence de l'intervalle de temps entre deux sauts de potentiel au cours du déplacement de la microélectrode.

Ainsi, dans le cas de la **figure III.1A**, la microélectrode est déplacée à une vitesse constante de  $20 \mu\text{m s}^{-1}$  le long de la surface d'or à une distance de  $10 \mu\text{m}$  du substrat. Deux applications consécutives d'un potentiel de polymérisation ( $E_{\text{app}}$ ) de  $0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$  sont séparées par une durée de 10 s. Dans la **figure III.1B**, l'intervalle de temps entre ces deux sauts de potentiel est de 20 s. Ces deux images SPRi montrent que dans le cas d'un intervalle de temps élevé, les spots électrogénérés sont bien distincts. Par contre, lorsque cet intervalle de temps est suffisamment faible, les spots de polypyrrole se chevauchent et forment ainsi une ligne continue.

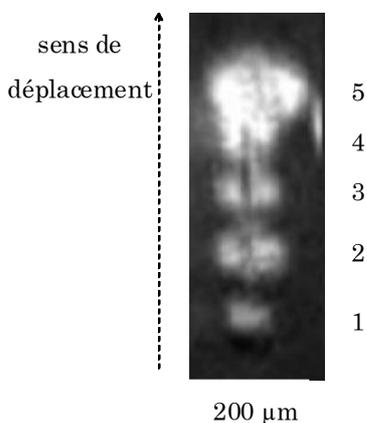


**Figure III.1** Images SPRi de lignes de polypyrrole par variation de l'intervalle de temps entre deux sauts de potentiel.

Conditions de dépôt:  $c_{pyr}=200$  mM dans  $LiClO_4$  (0,1 M),  $E_{app}=0,7$  V vs.  $Ag/Ag^+$ ,  $\tau=100$  ms,  $d=10$   $\mu m$ ,  $a=5$   $\mu m$ ,  $V=20$   $\mu m s^{-1}$ , intervalle de temps entre deux sauts de potentiel : (A) 10 s, (B) 20 s.

### III.A.2. Formation de gradients de polypyrrole par variation de la vitesse de déplacement de la microélectrode

Une fois le principe de formation de lignes de polymère par couplage SECM–SPRi validé, nous avons réalisé un gradient de polypyrrole par variation de la vitesse de déplacement de la microélectrode. En effet, cette vitesse a un effet sur la diffusion latérale, et donc la quantité de polymère électrodéposée.



**Figure III.2** Image SPRi d'un gradient de polypyrrole par variation de la vitesse de déplacement de la microélectrode.

Conditions de dépôt:  $c_{pyr}=200$  mM dans  $LiClO_4$  (0,1 M),  $E_{app}=0,7$  V vs.  $Ag/Ag^+$ ,  $\tau=100$  ms,  $a=5$   $\mu m$ ,  $d=10$   $\mu m$ , intervalle de temps entre deux sauts de potentiel : 10 s.

Spot 1 :  $V=40$   $\mu m s^{-1}$ , spot 2 :  $V=35$   $\mu m s^{-1}$ , spot 3 :  $V=30$   $\mu m s^{-1}$ , spot 4 :  $V=25$   $\mu m s^{-1}$ , spot 5 :  $V=20$   $\mu m s^{-1}$ .

La **figure III.2** présente l'image SPRi d'un gradient de polypyrrole constitué de cinq spots formés par l'application d'un saut de potentiel dans la solution de monomères. Entre chacun de ces spots, la vitesse de déplacement de la sonde est modifiée (de 40 à 20  $\mu\text{m s}^{-1}$ ). Nous avons utilisé l'intervalle de temps de 10 s qui permettait dans l'expérience précédente d'obtenir une ligne de polypyrrole. Lorsque la vitesse de balayage est élevée (cas des spots 1, 2 et 3), la distance entre les centres des motifs est plus importante. Les spots ne se chevauchent pas et apparaissent distinctement séparés sur l'image SPRi. En effet, la quantité de polypyrrole déposée en un endroit donné de la surface est plus faible lorsque la microélectrode se déplace plus rapidement. Par contre, lorsque cette vitesse est suffisamment lente, les spots forment une ligne continue et plus large (cas des spots 4 et 5).

Ainsi, le couplage de la SECM avec la SPRi apparaît parfaitement adapté à la réalisation de gradients de polypyrrole sur une surface d'or par variation de la vitesse de déplacement de la microélectrode.

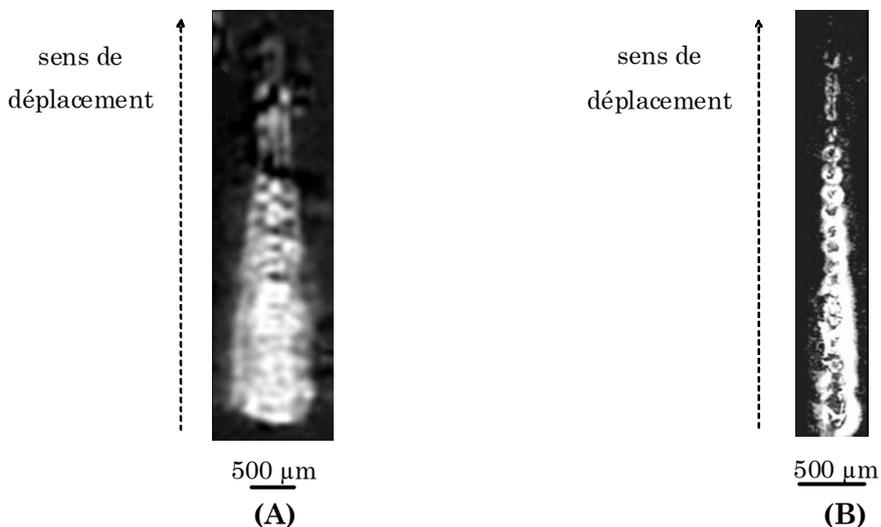
### **III.B. Gradients de polypyrrole–oligonucléotide**

Face aux résultats encourageants obtenus dans le cas de la formation de gradients de polypyrrole, nous avons utilisé les variations de la vitesse de déplacement de la microélectrode afin de générer un gradient de polypyrrole fonctionnalisé par des oligonucléotides.

Nous avons ensuite voulu déterminer le profil de concentration du polypyrrole–oligonucléotide dans le film polymère. Nous avons tout d'abord réalisé l'hybridation de ces gradients de biomolécules en présence d'oligonucléotides complémentaires et observé l'image SPRi obtenue après hybridation. La SPRi est une technique d'imagerie monopoint qui permet d'observer en temps réel l'étape de formation du film, mais elle n'est pas suffisamment sensible pour nous permettre de distinguer entre polypyrrole–oligonucléotide et polypyrrole non fonctionnalisé. C'est pourquoi nous avons également utilisé la microscopie de fluorescence afin d'observer la présence et la répartition du polypyrrole–oligonucléotide dans le film polymère. En effet, la microscopie de fluorescence après hybridation des oligonucléotides permet de différencier ces deux espèces car seul le polypyrrole fonctionnalisé sera hybridé et portera un groupement fluorophore. Ainsi, les spots qui apparaissent clairs sur l'image en microscopie de fluorescence sont ceux qui se sont appariés avec l'ODN complémentaire, ce qui indique qu'ils sont constitués de polypyrrole–oligonucléotide.

### III.B.1. Faisabilité

La **figure III.3** présente l'image SPRi (A) et l'image après hybridation en microscopie de fluorescence (B) de spots électrogénérés par mode direct de la SECM par variation de la vitesse (de 20 à 160  $\mu\text{m s}^{-1}$ ).



**Figure III.3** Gradients de concentration de polypyrrole-oligonucléotide par variation de la vitesse de déplacement de la microélectrode (utilisée en tant que contre-électrode) lors de l'électrogénération : (A) image SPRi lors de l'électrodéposition, (B) image en microscopie de fluorescence après hybridation.

Conditions de dépôt :  $c_{\text{pyr}}=200 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pyr-CP}}=10 \mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $\tau=50 \text{ ms}$ ,  $a=5 \mu\text{m}$ ,  $d=10 \mu\text{m}$ , intervalle de temps entre deux sauts de potentiel : 0,5 s.

$V=20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 \mu\text{m s}^{-1}$  (3 spots électrogénérés pour chacune des vitesses)

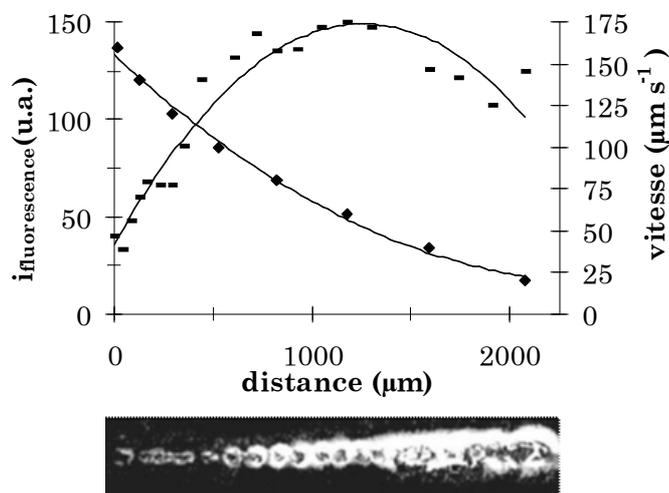
Conditions d'hybridation :  $c_{\text{CP*}}=0,1 \mu\text{M}$  dans PBS-BSA 1%.

Conditions de microscopie de fluorescence : temps d'exposition : 0,12 s, marqueur fluorescent : streptavidine-R-phycoérythrine.

D'après l'image SPRi (**Fig. III.3A**), nous obtenons une ligne continue dont la largeur est fonction de la vitesse. En effet, cette ligne sera d'autant plus large que la vitesse est faible car, dans ce cas, une quantité plus importante de polypyrrole-ODN va se déposer en une zone donnée.

Bien que l'imagerie de résonance de plasmon de surface (SPRi) fournisse des informations qualitatives concernant la réalisation des dépôts, elle ne permet pas de distinguer entre polypyrrole et polypyrrole-ODN. Cette méthode montre donc la façon dont les gradients se forment sur la surface, et apporte des données en terme de taille, mais elle ne donne aucune information permettant de conclure qu'un gradient de densité d'oligonucléotides, et non de polypyrrole non fonctionnalisé, est déposé. L'image en

microscopie de fluorescence (**Fig. III.3B**) présente donc la variation de concentration en polypyrrole–oligonucléotide.



**Figure III.4** Evolution de l'intensité de fluorescence (symbole : trait) et de la vitesse de déplacement de la microélectrode (symbole : losange) en fonction de la distance parcourue par la sonde le long de la surface. L'intensité de fluorescence est mesurée en différents points du gradient réalisé en fonction de la distance depuis le bord de la ligne de biomolécules déposées. La variation des vitesses correspond aux conditions décrites dans la figure III.3.

La **figure III.4** présente l'influence de la vitesse de déplacement de la microélectrode (symbole : losange) sur la valeur de l'intensité de fluorescence (symbole : trait) mesurée en différents points du gradient. Ainsi, cette intensité augmente considérablement (jusqu'à un facteur 5), et est maximale lorsqu'une vitesse de balayage de  $60 \mu\text{m s}^{-1}$  est utilisée. Dans le cas des vitesses de  $20 \mu\text{m s}^{-1}$  et  $40 \mu\text{m s}^{-1}$ , l'intensité de fluorescence décroît légèrement. Par exemple, l'intensité de fluorescence mesurée pour  $20 \mu\text{m s}^{-1}$  diminue de 15% par rapport à l'intensité maximale mesurée (à  $60 \mu\text{m s}^{-1}$ ). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en utilisant des vitesses de déplacement de la microélectrode trop faibles, la concentration surfacique de polypyrrole–ODN déposée est très importante, ce qui entraîne une gêne stérique et inhibe l'hybridation par la suite. Ce phénomène peut également être dû à une sur-oxydation du polypyrrole–oligonucléotide, ou encore à un dépôt de polymère non fonctionnalisé sur les spots de polypyrrole–ODN, ce qui entraînerait une diminution de l'intensité de fluorescence mesurée.

La formation de gradients de polypyrrole–ODN par variation de la vitesse de balayage à l'aide du couplage SECM–SPRi apparaît donc comme une voie adaptée de micro-fabrication de telles structures. Nous avons ensuite étudié plus précisément l'influence de

cette vitesse sur les lignes obtenues, puis nous avons réalisé des gradients de concentration symétriques.

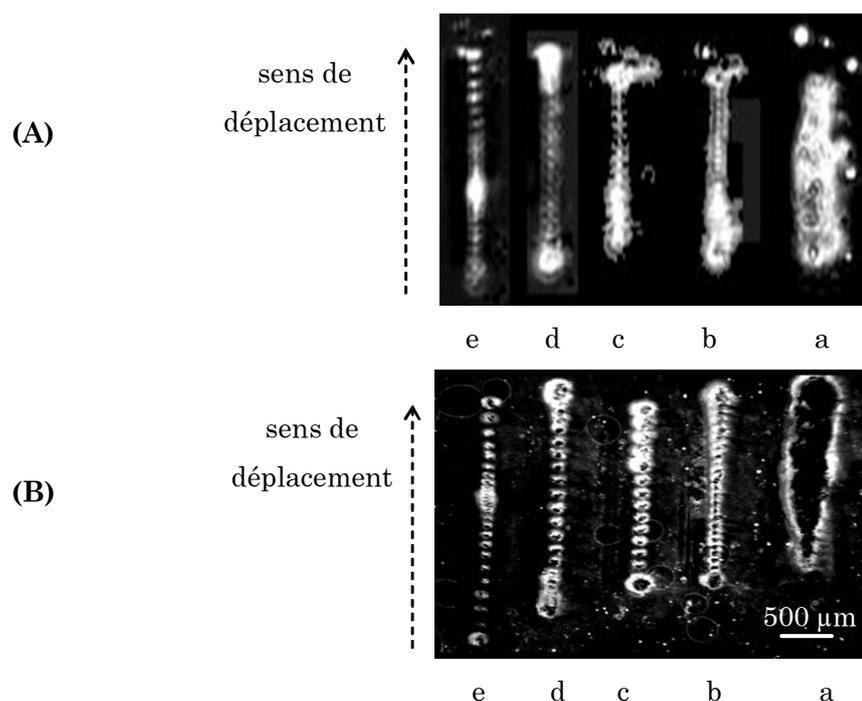
### **III.B.2. Formation de lignes et gradients de polypyrrole–ODN par variation de la vitesse de balayage**

Nous avons réalisé des lignes en déplaçant la microélectrode à une vitesse constante, et des gradients de polypyrrole–ODN en variant cette vitesse.

Nous avons utilisé un intervalle de temps entre deux sauts de potentiel de 2 s, ce qui favorise le retour du système vers son état initial, et est suffisamment long pour permettre à une nouvelle solution de monomères de remplir la zone entre la microélectrode et le substrat par transport de masse par diffusion depuis le cœur de la solution. De plus, les vitesses de déplacement de la sonde utilisées sont faibles (jusqu'à  $80 \mu\text{m s}^{-1}$ ). Ceci permet donc de négliger les phénomènes de convection.

Tout d'abord, des lignes de polypyrrole–oligonucléotide ont été formées en appliquant un potentiel de 0,7 V au substrat en présence de monomères et en déplaçant la microélectrode à une vitesse de 15, 40 et  $70 \mu\text{m s}^{-1}$  pour les lames a, b et c de la figure **III.5A** respectivement. Lorsque la vitesse est élevée, la concentration en polypyrrole–ODN déposée est moins importante en un point donné. C'est pourquoi la ligne formée par l'ensemble des spots est, dans ce cas, plus fine. Ceci est confirmé par l'image en microscopie de fluorescence après hybridation (**Fig. III.5B.a, b et c**) car, dans le cas d'une vitesse de  $70 \mu\text{m s}^{-1}$ , les spots apparaissent distincts et séparés. A l'inverse, une vitesse de déplacement de  $15 \mu\text{m s}^{-1}$  est trop lente, ce qui crée une concentration locale de polypyrrole–ODN trop importante, et inhibe l'hybridation. Nous observons un signal de fluorescence uniquement sur les bords de la ligne où la densité de sondes oligonucléotidiques déposée est moins importante (**Fig. III.5B.a**).

Nous avons ensuite formé des gradients symétriques de concentration sur la surface d'or (**Fig. III.5d et e**). Pour cela, la vitesse de déplacement de la microélectrode a été modifiée tous les 3 spots électrogénérés. Dans le cas de la lame d, celle-ci varie de 20 à  $80 \mu\text{m s}^{-1}$ , puis de  $80$  à  $20 \mu\text{m s}^{-1}$  et dans le cas de la lame e, à l'inverse, elle est modifiée dans l'autre sens de  $80$  à  $20 \mu\text{m s}^{-1}$ , puis de  $20$  à  $80 \mu\text{m s}^{-1}$ .



**Figure III.5** Lignes et gradients de concentration de polypyrrole-oligonucléotide par variation de la vitesse de déplacement de la microélectrode (utilisée en tant que contre-électrode) lors de l'électrogénération : (A) image SPRi lors de l'électrodéposition, (B) image en microscopie de fluorescence après hybridation.

Conditions de dépôt :  $c_{\text{pyr}}=200 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pyr-CP}}=10 \text{ }\mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $\tau=100 \text{ ms}$ ,  $a=5 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $d=10 \text{ }\mu\text{m}$ , intervalle de temps entre deux sauts de potentiel : 2 s.

Ligne a :  $V=15 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$

Ligne b :  $V=40 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$

Ligne c :  $V=70 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$

Ligne d :  $V=20, 40, 60, 80, 80, 60, 40, 20 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$  (3 spots pour chacune des vitesses)

Ligne e :  $V=80, 60, 40, 20, 20, 40, 60, 80, 100 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$  (3 spots pour chacune des vitesses)

Conditions d'hybridation :  $c_{\text{CP}^*}=0,1 \text{ }\mu\text{M}$  dans PBS-BSA 1%.

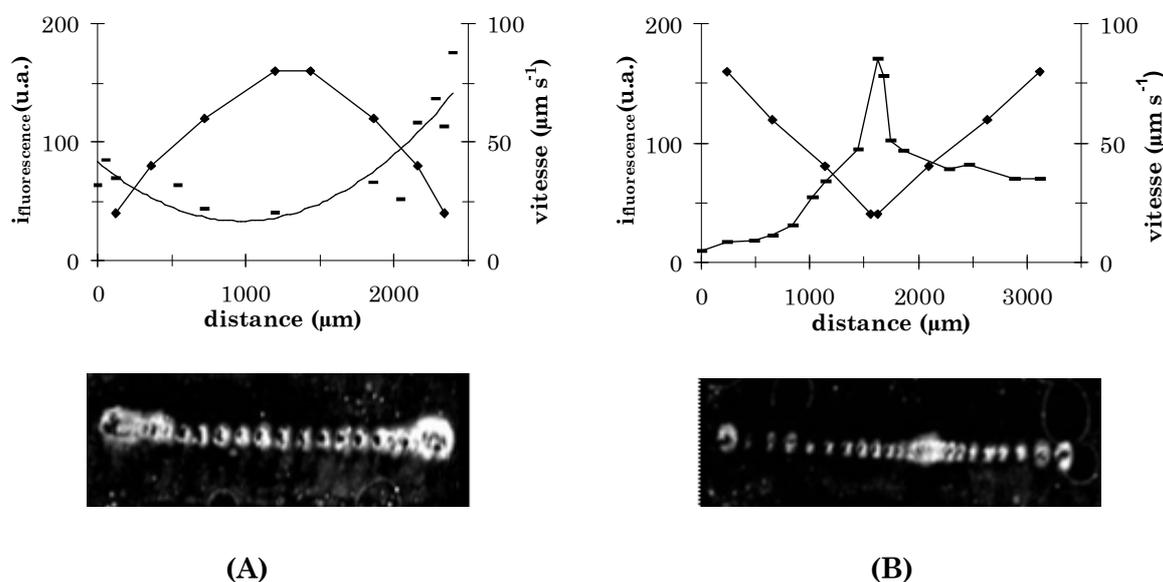
Conditions de microscopie de fluorescence : temps d'exposition : 0,12 s, marqueur fluorescent : streptavidine-R-phycoérythrine.

Les **figures III.6A et B** présentent l'intensité de fluorescence mesurée et la vitesse de déplacement en fonction de la distance parcourue par la sonde le long du gradient.

Sur la **figure III.6A** correspondant à la lame d, nous observons qu'un minimum de l'intensité de fluorescence est atteint lorsque la vitesse de déplacement de la sonde est maximale. En effet, plus la microélectrode est déplacée rapidement le long de la ligne, moins il y a de polypyrrole-oligonucléotide déposé en un point donné. Ces résultats sont en accord avec ceux de la **figure III.5B.a, b et c**.

Sur la **figure III.6B**, un maximum d'intensité de fluorescence est atteint lorsque la valeur de la vitesse est  $20 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$ . Pour cette valeur, nous avons observé dans la **figure III.4** une

diminution de l'intensité de fluorescence par rapport à sa valeur maximale qui était atteinte à  $V=60 \mu\text{m s}^{-1}$ . Il est important de préciser ici que ces deux résultats ne peuvent pas être comparés. En effet, l'intervalle de temps utilisé entre deux sauts de potentiel dans le cas de la **figure III.4** est de 0,5 s, alors qu'ici nous l'avons fixé à 2 s. Ainsi, une durée plus importante s'écoule ici entre deux applications du potentiel de polymérisation, ce qui implique que, en raison du déplacement de la microélectrode, la quantité de polypyrrole-oligonucléotide déposée est moins importante en une zone donnée, ce qui évite des problèmes de gêne stérique, de sur-oxydation ou encore de dépôt de polypyrrole sur le polypyrrole-ODN, et n'inhibe pas la fluorescence (cas présenté en III.B.1).



**Figure III.6** Evolution de l'intensité de fluorescence (symbole : trait) et de la vitesse de déplacement de la microélectrode (symbole : losange) en fonction de la distance parcourue par la sonde le long de la surface: (A) lame d, (B) lame e de la figure III.5.

L'intensité de fluorescence est mesurée en différents points du gradient réalisé en fonction de la distance depuis le bord de la ligne de biomolécules déposées. La variation des vitesses correspond aux conditions décrites dans la figure III.5.

Ainsi, le couplage SECM-SPRi permet de générer électrochimiquement des gradients de concentration de polypyrrole-oligonucléotide sur une surface d'or et de suivre cette étape de micro-fabrication en temps réel.

#### **IV. Conclusion**

Dans ce chapitre, nous avons présenté l'intérêt du couplage entre une méthode électrochimique, la microscopie électrochimique à balayage (SECM), et une méthode optique, l'imagerie de résonance plasmonique de surface (SPRi), par l'étude de différentes applications. L'objectif était de montrer les avantages de ce couplage et la faisabilité de la micro-structuration de surfaces par SECM-SPRi.

D'une part, le couplage SECM-SPRi permet de réaliser à la fois l'électrogénération de spots de polypyrrole fonctionnalisé par des oligonucléotides, de suivre cette micro-fabrication sur la surface métallique, et enfin de détecter l'hybridation de tels spots en temps réel et sans marquage.

D'autre part, nous avons montré que le couplage SECM-SPRi permet d'électrogénérer des gradients de concentration de polypyrrole-oligonucléotide et d'en suivre la formation en temps réel. De plus, il autorise le contrôle du processus de dépôt en terme de dimensions des motifs et de concentration des espèces immobilisées en variant des paramètres expérimentaux tels que la valeur de la vitesse de déplacement de la microélectrode, ou encore l'intervalle de temps entre deux sauts de potentiel. Une perspective à ce travail sera l'étude du mouvement de cellules le long de ces profils.

Ce couplage des deux techniques présente donc l'avantage de modifier et de caractériser une surface en une seule étape.

**Références bibliographiques du chapitre III**

- <sup>1</sup> C. A. Parent, P. N. Devreotes, *Science* **1999**, 284, 765–770.
- <sup>2</sup> L. V. Decker, A. W. Segal, *Science* **2000**, 287, 982–985.
- <sup>3</sup> H. J. Song, M. M. Poo, *Curr. Opin. Neurobiol.* **1996**, 9, 355–363.
- <sup>4</sup> J. Aizenberg, A. J. Black, G. M. Whitesides, *Nature* **1999**, 398, 495–497.
- <sup>5</sup> B. S. Gallardo, B. S. Gupta, F. D. Eagerton, L. I. Jong, V. S. Craig, R. R. Shah, N. L. Abbott, *Science* **1999**, 283, 57–60.
- <sup>6</sup> I. Caelen, A. Bernard, D. Juncker, B. Michel, H. Heinzelmann, E. Delamarche, *Langmuir* **2000**, 16, 9125–9130.
- <sup>7</sup> K. A. Fossier, R. G. Nuzzo, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 5775–5782.
- <sup>8</sup> N. L. Jeon, S. K. W. Dertinger, D. T. Chiu, I. S. Choi, A. D. Stroock, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 1240–1246.
- <sup>9</sup> S. Morgenthaler, S. Lee, S. Zurcher, N. D. Spencer, *Langmuir* **2003**, 19, 10459–10462.
- <sup>10</sup> M. Lestelius, I. Engquist, P. Tengvall, M. K. Chaudhury, B. Liedberg, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1999**, 15, 57–70.
- <sup>11</sup> S. Kramer, H. Xie, J. Gaff, J. R. Williamson, A. G. Tkachenko, N. Nouri, D. A. Feldheim, D. L. Feldheim, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 5388–5395.
- <sup>12</sup> R. R. Bhat, D. A. Fischer, J. Genzer, *Langmuir* **2002**, 18, 5640–5643.
- <sup>13</sup> I. Caelen, H. Sigrist, *Langmuir* **2002**, 18, 2463–2467.
- <sup>14</sup> H. Gao, E. Kislig, N. Oranth, H. Sigrist, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1994**, 20, 251–263.
- <sup>15</sup> C. L. Hypolite, T. L. McLernon, D. N. Adams, K. E. Chapman, C. B. Herbert, C. C. Huang, M. D. Distefano, W. S. Hu, *Bioconjug. Chem.* **1997**, 8, 658–663.
- <sup>16</sup> T. Wu, K. Efimenko, P. Vlcek, V. Subr, J. Genzer, *Macromolecules* **2003**, 36, 2448–2453.
- <sup>17</sup> R. H. Terrill, K. M. Balss, Y. Zhang, P. W. Bohn, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 988–989.
- <sup>18</sup> S. T. Plummer, K. M. Balss, *Langmuir* **2002**, 18, 4142–4149.
- <sup>19</sup> S. T. Plummer, Q. Wang, P. W. Bohn, *Langmuir* **2003**, 19, 7528–7536.
- <sup>20</sup> R. R. Fuierer, R. L. Carroll, D. L. Feldheim, C. B. Gorman, *Adv. Mater.* **2002**, 14, 154–157.
- <sup>21</sup> A. Otto, *Z. Physik* **1968**, 216, 398–410.
- <sup>22</sup> E. Kretschmann, H. Raether, *Z. Naturforsch.* **1968**, 23A, 2135–2136.
- <sup>23</sup> B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundström, *Sens. Actuators*, **1983**, 4, 299–304.
- <sup>24</sup> R. L. Rich, D. G. Myszka, *Drug Discovery Today: Technologies* **2004**, 1, 301–308.

- <sup>25</sup> Y. Sato, K. Fujimoto, H. Kawaguchi, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2003**, 27, 23–31.
- <sup>26</sup> P. Y. Tsoi, M. Yang, *Biosensors & Bioelectronics* **2004**, 19, 1209–1218.
- <sup>27</sup> A. W. Drake, D. G. Myszka, S. L. Klakamp, *Anal. Biochem.* **2004**, 328, 35–43.
- <sup>28</sup> K. Taniwaki, A. Hyakutake, T. Aoki, M. Yoshikawa, M. D. Guiver, G. P. Robertson, *Anal. Chim. Acta* **2003**, 489, 191–198.
- <sup>29</sup> A. Kobori, S. Horie, H. Suda, I. Saito, K. Nakatani, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 557–562.
- <sup>30</sup> B. Rothenhäusler, W. Knoll, *Nature* **1988**, 332, 615–616.
- <sup>31</sup> H. J. Lee, T. T. Goodrich, R. M. Corn, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5525–5531.
- <sup>32</sup> T. Livache, E. Maillart, N. Lassalle, P. Mailley, B. Corso, P. Guedon, A. Roget, Y. Levy, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2003**, 32, 687–696.
- <sup>33</sup> P. Guedon, T. Livache, F. Martin, F. Lesbre, A. Roget, G. Bidan, Y. Levy, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 6003–6009.
- <sup>34</sup> S. Szunerits, N. Knorr, R. Calemczuk, T. Livache, *Langmuir* **2004**, 20, 9236–9241.
- <sup>35</sup> Y. T. Kim, D. L. Allore, R. W. Collins, K. Vedon, *J. Electrochem. Soc.* **1991**, 138, 3266–3275.



## **Chapitre IV :**

Caractérisation de spots de polypyrrole–  
oligonucléotide électrogénérés et détection  
de leur hybridation par SECM



La microscopie électrochimique présente un avantage majeur dans sa dualité d'utilisation en tant qu'outil de fonctionnalisation et d'imagerie de surfaces.

Des spots de polypyrrole–oligonucléotide (Ppy–ODN) de taille micrométrique ont été formés sur une surface d'or par localisation des lignes de champ électrique, selon la méthode décrite dans le chapitre II. Après avoir étudié l'influence des paramètres expérimentaux d'électrocopolymérisation sur la taille et l'homogénéité de ces spots par microscopie de fluorescence, nous avons ainsi défini les conditions optimales de dépôt.

La microscopie électrochimique a ensuite été utilisée en mode feedback afin d'obtenir les images de ces surfaces modifiées. En effet, la différence de conductivité de surface entre l'or et les spots électrogénérés se traduira par une différence du courant de feedback mesuré à la microélectrode en présence d'un médiateur redox. Ceci montre la sensibilité de la SECM, l'épaisseur des spots de polypyrrole–oligonucléotide étant de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres d'après des mesures préliminaires en microscopie à force atomique (AFM)<sup>1</sup>.

Afin d'étudier l'hybridation de ces spots, nous avons utilisé à nouveau le mode feedback de la microscopie électrochimique, plutôt que le mode génération/collection davantage exploité par d'autres équipes de recherche et dans lequel des espèces électroactives générées par la biomolécule immobilisée diffusent depuis le substrat jusqu'à la sonde où elles sont détectées<sup>2,3,4</sup>. Le mode feedback a été utilisé principalement pour la détection d'enzymes immobilisées sur des surfaces conductrices ou isolantes<sup>5,6,7</sup>, mais est limité à des enzymes possédant une forte activité spécifique et un taux important de recouvrement de la surface. Afin d'étudier la réaction spécifique d'hybridation, nous avons ainsi utilisé le mode feedback basé sur des différences de réactivité et/ou conductivité entre la surface d'or et les spots sur lesquels est formé une couche par précipitation, la 4–chloro–1–naphthone, qui va bloquer la régénération du médiateur redox.

Ce chapitre, constitué de deux parties, est consacré à l'utilisation du mode feedback de la microscopie électrochimique pour réaliser de l'imagerie de surfaces biologiques. La première partie présente les images obtenues lors de la détection de spots de polypyrrole–oligonucléotide électrogénérés par mode direct de la SECM. Dans la seconde partie, la microscopie électrochimique est utilisée afin de détecter l'hybridation de ces spots.

## I. Détection des spots de polypyrrole–oligonucléotide par SECM

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'imagerie de spots de polypyrrole–oligonucléotide par microscopie électrochimique. Ces spots ont été électrogénérés sur des lames d'or par mode direct de la SECM, suivant la méthode décrite dans le chapitre II. Nous avons utilisé les conditions optimisées à l'aide de la microscopie de fluorescence, à l'exception du temps de polymérisation ( $\tau$ ) ; celles-ci sont résumées dans le **tableau I.1**. En effet, nous avons observé qu'une durée de 10 ms d'application du potentiel  $E_{app}$  permettait d'obtenir des spots homogènes, reproductibles et de petite taille. Cependant, afin de réaliser la détection par microscopie électrochimique, nous avons doublé ce temps, ce qui permet d'obtenir des dépôts d'épaisseur plus importante. Par la suite, nous avons vérifié que des spots élaborés avec un temps de polymérisation de 10 ms étaient également détectables par mode feedback de la SECM.

concentration en pyrrole ( $c_{pyr}$ )	<b>200 mM</b>
concentration en pyrrole–oligonucléotide ( $c_{pyr-ODN}$ )	<b>10 <math>\mu</math>M</b>
potentiel appliqué ( $E_{app}$ )	<b>0,7 V vs. Ag/Ag<sup>+</sup></b>
temps de polymérisation ( $\tau$ )	<b>20 ms</b>
distance microélectrode–substrat ( $d$ )	<b>60 <math>\mu</math>m</b>

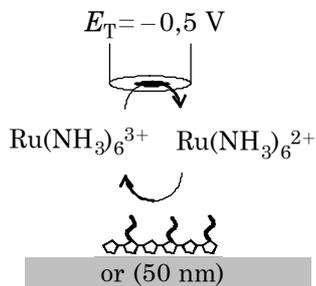
**Tableau I.1** Paramètres utilisés pour l'électrogénération des spots de polypyrrole–oligonucléotide par mode direct de la SECM dans ce chapitre.

Après avoir expliqué le principe de détection de ces spots par mode feedback, nous nous intéresserons tout d'abord à la détection d'une couche de polypyrrole–oligonucléotide déposée sur une surface d'or (étude d'un dépôt de taille macroscopique) par variation du tracé de courbes d'approche. Ensuite, nous étudierons la détection de spots de polypyrrole–oligonucléotide (étude d'un dépôt de taille microscopique) en réalisant des courbes d'approche et des balayages 2D de la surface, puis nous analyserons l'influence de différents paramètres expérimentaux tels que la distance entre la microélectrode et le substrat lors du balayage, ou encore la vitesse et le sens de déplacement de la sonde.

### I.A. Principe

La réalisation d'imagerie de spots par SECM est basée sur le principe du mode feedback. La microélectrode est placée à proximité de la surface et polarisée négativement en présence d'une espèce redox, le médiateur,  $Ru(NH_3)_6^{3+}$ . Cette espèce va être réduite à la

sonde, puis l'espèce générée va diffuser jusqu'au substrat où elle sera ré-oxydée. L'un des avantages à travailler sur or est que ce substrat est très conducteur avec une forte mobilité électronique. Ainsi, il n'est pas nécessaire de le polariser pour régénérer le médiateur  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ , ce qui évite de perturber ou modifier la couche biologique (**Fig. I.1**).



**Figure I.1** Schéma du principe du mode feedback utilisé pour la détection des spots électrogénérés sur la surface d'or.

Nous avons réalisé deux types d'images permettant de détecter la présence d'un spot sur la surface d'or.

Tout d'abord, des courbes d'approche peuvent être tracées avant et après électroco polymérisation. Les conductivités de l'or et du polypyrrole-ODN sont différentes, le polypyrrole-ODN étant certainement à l'état réduit puisqu'un potentiel de  $0 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ , inférieur à son potentiel thermodynamique, est appliqué après la copolymérisation pour ramener le système dans son état initial. Le polypyrrole-ODN forme une couche sur le substrat d'or qui représente une barrière à la diffusion, ce qui modifie le transfert de matière. Le transfert de charge peut lui aussi être affecté par la présence de cette couche de polymère fonctionnalisé qui modifie la surface accessible. Il sera ainsi possible de distinguer entre ces deux matériaux en observant les différences sur ces deux courbes d'approche. Nous parlerons, dans la suite de ce chapitre, de modification de la conductivité surfacique entre la surface d'or et la surface modifiée.

Selon le même principe, un balayage 2D, c'est-à-dire selon la direction des axes X ou Y, peut être étudié. Il consiste à placer la microélectrode à une distance faible de la surface, puis à enregistrer le courant mesuré à la sonde lorsque celle-ci est déplacée avec une vitesse déterminée dans l'une des directions X ou Y à une distance constante du substrat. Lorsque la sonde traverse des zones modifiées où la réactivité est plus faible, le transfert de charge sera ralenti et donc le phénomène d'amplification localisée dans le cas du mode feedback positif, sera moins important. Ainsi le courant normalisé mesuré à la microélectrode dans cette zone sera plus faible.

Nous avons préalablement étudié l'influence de la présence d'un dépôt macroscopique de polypyrrole-ODN sur une surface d'or sur l'allure des courbes d'approche obtenues.

### **I.B. Etude préliminaire d'un dépôt macroscopique**

Dans un premier temps, nous avons validé la sensibilité de la microscopie électrochimique pour la détection d'un dépôt de taille macroscopique sur la surface entière d'or accessible dans la cellule électrochimique. Nous avons ainsi utilisé un système classique de 3 électrodes : électrode de travail (surface d'or), électrode de référence ( $\text{Ag}/\text{Ag}^+$ ) et contre-électrode (platine). En appliquant un potentiel de 0,7 V pendant 200 ms au substrat dans une solution de monomères pyrrole et pyrrole-oligonucléotide, un film de copolymère est formé sur toute la surface ( $S=0,196 \text{ cm}^2$ ).

#### **I.B.1. Calcul de l'épaisseur du dépôt**

Le temps de synthèse est un paramètre important car il permet de contrôler l'épaisseur du film de polypyrrole à partir de la charge consommée lors de son élaboration. En supposant que le film est uniforme sur toute la surface de l'électrode et en ne prenant pas en compte la présence des oligonucléotides en raison du faible pourcentage de monomères pyrroles fonctionnalisés, il est possible, en première approximation, d'estimer l'épaisseur du film ( $e$ ) à partir de la charge de synthèse ( $Q$ ) à l'aide de la formule établie par B. D. Malhotra<sup>8</sup>:

$$e = \frac{(M_{\text{pyr}} + \delta M_{\text{ClO}_4})Q}{(2 + \delta)FS \rho_{\text{ppy}}} \quad (\text{I.1})$$

avec :  $e$  l'épaisseur du film (cm),  $M_{\text{pyr}}$  la masse molaire du pyrrole qui est de  $67,09 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $M_{\text{ClO}_4}$  la masse molaire de l'ion dopant  $\text{ClO}_4^-$ , soit  $99,45 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $Q$  la charge de synthèse (C),  $\delta$  le taux de dopage qui est ici de  $1/3$ ,  $F$  la constante de Faraday ou charge d'une mole d'électrons soit  $96500 \text{ C}$ ,  $S$  la surface géométrique de l'électrode, soit  $0,196 \text{ cm}^2$ ,  $\rho$  la masse volumique de polypyrrole<sup>9</sup>, qui est de  $1,51 \text{ g cm}^{-3}$ .

En tenant compte de ces valeurs, nous obtenons la formule suivante :

$$e = 2,94 \cdot 10^{-4} Q_S \quad (\text{I.2})$$

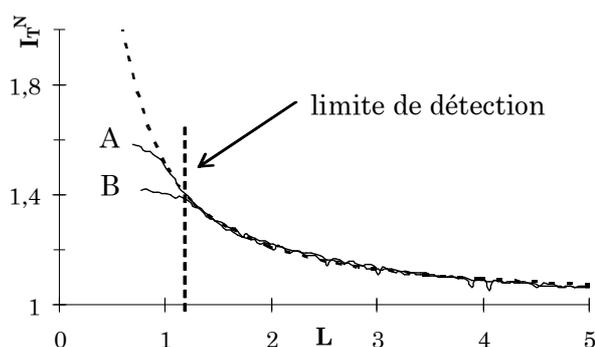
avec :  $Q_S$  la charge surfacique ( $\text{C cm}^{-2}$ ).

La charge surfacique d'oxydation des monomères est de  $270 \pm 48 \mu\text{C cm}^{-2}$ , ce qui engendre une épaisseur calculée suivant ce modèle de  $0,79 \pm 0,14 \text{ nm}$ . Cette épaisseur est du même ordre de grandeur que la valeur de  $1,5 \pm 0,4 \text{ nm}$  obtenue à partir des mesures en résonance plasmonique de surface (SPR) réalisées sur un dépôt macroscopique de polypyrrole-ODN élaboré en appliquant une impulsion pendant 20 ms (partie II.C.1).

Cette faible valeur peut s'expliquer par un temps de polymérisation très faible. En effet, un potentiel de 0,7 V est appliqué au substrat d'or pendant 200 ms, ce qui peut conduire à des dépôts inhomogènes, et, éventuellement, à un recouvrement partiel de la surface de l'électrode. Ces résultats sont en accord avec les observations réalisées au laboratoire lors du dépôt d'un film de polypyrrole pendant de faibles temps de polymérisation à l'aide de la technique de l'électrospotting. Une durée de polarisation plus élevée, de l'ordre de 2 à 3 s, serait nécessaire afin d'obtenir un dépôt homogène et d'épaisseur plus importante sur toute la surface du substrat d'or.

### I.B.2. Courbes d'approche

La **figure I.2** présente les courbes d'approche sur or (A), puis sur le dépôt de polypyrrole-ODN (B). Ces deux courbes ont la même allure que la courbe théorique du mode feedback positif (courbe en pointillés) calculée suivant le modèle de M. V. Mirkin<sup>10</sup> (annexe III). Cependant, lorsque la microélectrode est placée, par exemple, à une distance de 5  $\mu\text{m}$  de la surface ( $L=1$ ), les courants normalisés ( $I_T^N$ ) ont pour valeurs 1,40 et 1,51 dans le cas de la surface d'or et du polypyrrole-ODN respectivement. Cette chute de 7 % du courant normé lorsqu'un dépôt de copolymère est déposé sur la surface d'or provient du fait que la conductivité de l'assemblage est moins importante, ce qui diminue le transfert de charge et donc le courant de feedback mesuré à la sonde. Ainsi, il est possible, en traçant les courbes d'approche, de mettre en évidence la formation d'un dépôt macroscopique sur la surface d'or, lorsque la sonde est située à des distances inférieures à 6,3  $\mu\text{m}$ .



**Figure I.2** Courbes d'approches normalisées théorique (traits en pointillés) et expérimentale (traits continus) sur une surface d'or (A) nue, (B) recouverte d'un dépôt de polypyrrole-oligonucléotide.

Conditions de dépôt :  $c_{\text{pyr}}=200 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pyr-CP}}=10 \text{ }\mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $\tau=200 \text{ ms}$ .

Conditions de détection :  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+} 10 \text{ mM}$  dans  $\text{KCl}$  0,1 M,  $V_z=1 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$ ,  $a=5 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $E_T=-0,44 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $E_S=\text{OCP}$ .

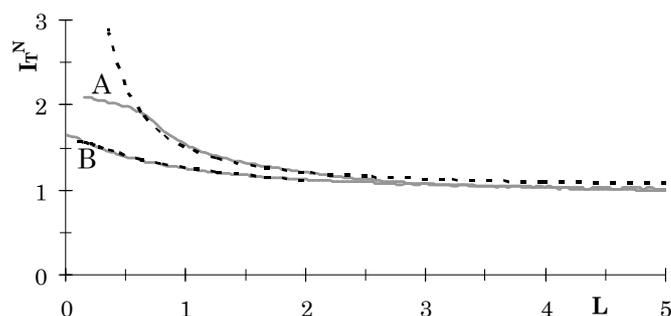
Cette première étude montre qu'un dépôt de polypyrrole fonctionnalisé sur une surface peut être détecté en microscopie électrochimique par l'analyse de courbes d'approche. Nous avons ensuite réalisé une détection de spots de polypyrrole-ODN de taille micrométrique en utilisant le même principe.

### I.C. Etude de spots de polypyrrole-oligonucléotide

Nous avons mené une étude de la détection par mode feedback de spots de polypyrrole-oligonucléotide d'un diamètre compris entre 100 et 200  $\mu\text{m}$ .

#### I.C.1. Courbes d'approche

De la même façon que dans le paragraphe précédent, nous avons tracé les courbes d'approche d'une surface d'or (**Fig. I.3A**), puis d'un spot de polypyrrole-ODN (**Fig I.3B**) électrogénéré par mode direct de la SECM comme décrit dans le chapitre II.



**Figure I.3** Courbes d'approche normalisées théoriques (en pointillés) et expérimentales (traits continus) (A) sur or, (B) sur un spot de polypyrrole-oligonucléotide électrogénéré sur or.

Conditions de dépôt :  $c_{\text{pyr}}=200 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pyr-CP}}=10 \mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),  $\alpha=5 \mu\text{m}$ ,  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $\tau=20 \text{ ms}$ ,  $d=60 \mu\text{m}$ .

Conditions de détection :  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+} 10 \text{ mM}$  dans  $\text{KCl}$  0,1 M,  $V_z=1 \mu\text{m s}^{-1}$ ,  $\alpha=5 \mu\text{m}$ ,  $E_T=-0,5 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $E_S=\text{OCP}$ .

La **figure I.3** présente les deux courbes obtenues, ainsi que les courbes théoriques correspondantes (annexe III). Nous pouvons remarquer ici que la courbe correspondant à l'approche de la surface d'or non modifiée s'écarte de la courbe théorique du mode feedback positif à une valeur de 1,9 en terme de courant normalisé, alors que celle obtenue dans la **figure I.2** s'en éloignait à 1,51. Ceci peut être expliqué par plusieurs facteurs qui diffèrent entre ces deux expériences, tels que la microélectrode utilisée (taille, planéité), et la surface de l'or (défauts, planéité). En effet, deux microélectrodes différentes auront des réactivités différentes et donc aboutiront à un courant de feedback mesuré qui sera lui aussi différent.

Cependant, nous pouvons observer une cohérence entre ces deux expériences en terme de distance normalisée. En effet, dans les **figures I.2 et I.3**, la courbe expérimentale sur substrat d'or s'éloigne de la courbe théorique du mode feedback positif pour une valeur de distance normalisée comparable. Ces observations valident la possibilité de réaliser de l'imagerie de surface en plaçant la microélectrode à hauteur constante au-dessus du substrat.

D'après la **figure I.3**, il est possible, comme dans le cas d'un dépôt macroscopique, de détecter la présence de polypyrrole-ODN sur l'or, en plaçant la microélectrode à une distance constante inférieure à 15  $\mu\text{m}$  ( $L=3$ ). Plus la sonde est proche de la surface, plus l'effet d'amplification localisée du mode feedback positif est important, et donc plus la nature de la surface va influencer ce phénomène. Ainsi, une meilleure sensibilité de détection du spot est obtenue lorsque la microélectrode est placée très proche de la surface ( $d=3,5 \mu\text{m}$ , par exemple). Cependant, si la surface présente une légère pente, les risques de collision entre la sonde et la surface en sont également accentués, ce qui peut endommager soit la microélectrode, soit le spot électrogénéré. Il est ainsi important de trouver un compromis entre la sensibilité et le risque de heurter la surface avec la microélectrode.

A une distance de 5  $\mu\text{m}$  du substrat, le courant normalisé mesuré lors de l'approche du spot de polypyrrole-ODN chute de 16 % par rapport à sa valeur sur or, contre 7 % dans le cas d'un dépôt macroscopique. Ceci peut être expliqué par une épaisseur et une homogénéité plus importantes du spot électrogénéré. En effet, dans le cas d'un spot électrogénéré à 0,7 V *vs.* Ag/Ag<sup>+</sup> pendant 20 ms avec un diamètre de 100  $\mu\text{m}$  (taille minimale déterminée par microscopie de fluorescence), la charge surfacique est de l'ordre de 127 mC cm<sup>-2</sup>. Le calcul du modèle décrit plus haut prévoit une épaisseur de 37 nm, donc plus importante que dans le cas du dépôt de taille macroscopique sur toute la surface d'or. Ainsi, le transfert de charge du médiateur est d'autant plus limité et ralenti que l'épaisseur du polypyrrole-ODN est importante. De plus, ces microdépôts étant plus homogènes et d'épaisseur plus importante, la limite inférieure de la distance permettant d'observer la présence du spot est plus grande que celle obtenue dans le cas d'un dépôt macroscopique. C'est pourquoi la courbe d'approche du spot s'écarte davantage et à partir de distances supérieures que dans le cas du dépôt de taille macroscopique.

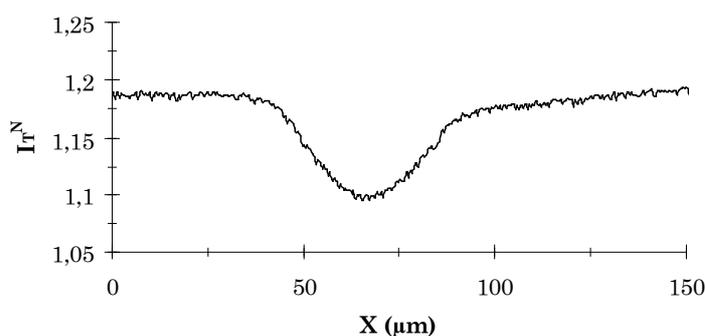
Ces courbes montrent la présence d'un spot de polypyrrole-ODN à l'endroit où est réalisée l'approche. Nous avons ensuite déplacé la microélectrode à vitesse constante, afin de "balayer" le spot électrogénéré, et mesuré le courant à la sonde. Les variations de ce courant indiquent des changements dans le transfert de charge, et donc dans la nature de la surface balayée.

### I.C.2. Balayage 2D de la microélectrode

Après avoir observé en quoi consiste l'image obtenue, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'influence de certains paramètres de détection tels que la distance microélectrode–substrat lors du balayage de la surface, le sens et la vitesse de déplacement de la sonde.

#### I.C.2.a. Image d'un spot en mode feedback

La **figure I.4** montre l'évolution du courant normalisé, c'est-à-dire le rapport entre le courant mesuré à la sonde et son courant loin du substrat, lors du balayage de la surface par la microélectrode selon l'axe X à une distance de 10  $\mu\text{m}$  du substrat. Lorsque la microélectrode arrive au niveau du spot, ce courant de feedback diminue, indiquant ainsi le changement de conductivité surfacique entre l'or et l'or modifié par la couche de polypyrrole–ODN. La présence du spot de polypyrrole fonctionnalisé est donc détectable en balayage 2D de la sonde.



**Figure I.4** Image d'un spot de polypyrrole–oligonucléotide par mode feedback de la SECM.

Conditions de dépôt :  $c_{\text{pyr}}=200 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pyr-CP}}=10 \mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),  $a=5 \mu\text{m}$ ,  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $\tau=20 \text{ ms}$ ,  $d=60 \mu\text{m}$ .

Conditions de détection :  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+} 10 \text{ mM}$  dans  $\text{KCl}$  0,1 M,  $V=20 \mu\text{m s}^{-1}$ ,  $a=5 \mu\text{m}$ ,  $E_T=-0,54 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $E_S=\text{OCP}$ ,  $d=10 \mu\text{m}$ .

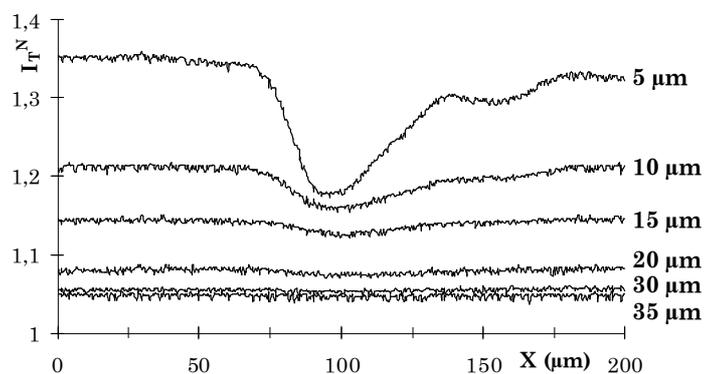
#### I.C.2.b. Influence des paramètres expérimentaux de détection

##### I.C.2.b.i. Influence de la distance microélectrode–substrat

La distance de travail, ainsi que la taille de la sonde, constituent les deux principaux paramètres influant sur la résolution du microscope électrochimique, c'est-à-dire sa capacité à distinguer deux objets proches ayant une topographie ou une réactivité différente.

La **figure I.5** présente les courbes obtenues lors du balayage d'un spot de polypyrrole-ODN par la microélectrode à une vitesse de  $20 \mu\text{m s}^{-1}$  à différentes distances du substrat (de 5 à 35  $\mu\text{m}$ ). La présence de ce spot sur la surface d'or est détectable lorsque la sonde est placée à une distance inférieure à 20  $\mu\text{m}$  de la surface. Au-delà, le courant mesuré à la sonde n'est plus sensible à la différence de conductivité surfacique entre l'or et l'or modifié par le polypyrrole-ODN. Cette valeur est en accord avec les courbes d'approche réalisées précédemment.

Nous avons ensuite voulu déterminer la largeur de ce spot à partir de la largeur à mi-hauteur des pics selon la méthode décrite par K. Borgwarth *et al.* dans le cas d'une bande isolante sur substrat d'or <sup>11</sup>.



**Figure I.5.** Influence de la distance microélectrode-substrat (de 5 à 35  $\mu\text{m}$ ) lors de la détection d'un spot de polypyrrole-oligonucléotide par mode feedback de la SECM.

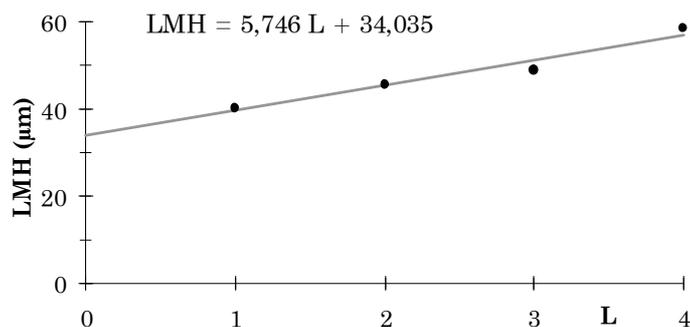
Conditions de dépôt :  $c_{\text{pyr}}=200 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pyr-CP}}=10 \mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),  $\alpha=5 \mu\text{m}$ ,  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $\tau=20 \text{ ms}$ ,  $d=60 \mu\text{m}$ .

Conditions de détection :  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+} 10 \text{ mM}$  dans  $\text{KCl}$  0,1 M,  $V=20 \mu\text{m s}^{-1}$ ,  $\alpha=5 \mu\text{m}$ ,  $E_T=-0,5 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $E_S=\text{OCP}$ ,  $d=5, 10, 15, 20, 30$  ou  $35 \mu\text{m}$  ( $L=1, 2, 3, 4, 6$  ou  $7$ ).

La **figure I.6** montre une linéarité de l'évolution de la largeur à mi-hauteur (notée LMH) avec la distance de travail ( $L=d/\alpha$ ). Ceci a également été mis en évidence par l'équipe de K. Borgwarth lors du balayage en mode feedback d'une bande isolante de 100  $\mu\text{m}$  de largeur avec une microélectrode de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre pour des distances normalisées comprises entre 0,7 et 1,9. Dans ces conditions, K. Borgwarth *et al.* ont déterminé une relation entre la largeur à mi-hauteur des pics et la distance de travail :

$$\text{LMH}_{(d)} = \text{LMH}_{(d=0)} + 1,64 d \quad (\text{I.3})$$

Le second terme proportionnel à la distance  $d$  correspond à l'influence de la diffusion latérale des espèces électroactives à l'interface "isolant-conducteur". En effet, même lorsque la sonde est placée au-dessus de l'isolant, le courant mesuré ne correspond pas totalement à un courant de feedback négatif car l'espèce générée à la microélectrode peut diffuser vers les bords de la zone conductrice, y réagir puis re-diffuser vers la sonde.



**Figure I.6** Largeurs à mi-hauteur (LMH) mesurées sur les courbes de la figure I.5 pour  $L=1, 2, 3$  et 4.

Dans notre cas du balayage de spots de polypyrrole-ODN par la sonde, nous pouvons établir une relation similaire exprimant l'évolution de la largeur à mi-hauteur des pics obtenus en fonction de la distance microélectrode-substrat :

$$\text{LMH}_{(d)} = \text{LMH}_{(d=0)} + 1,15 d \quad (\text{I.4})$$

$$\text{avec } \text{LMH}_{(d=0)} = 34,035$$

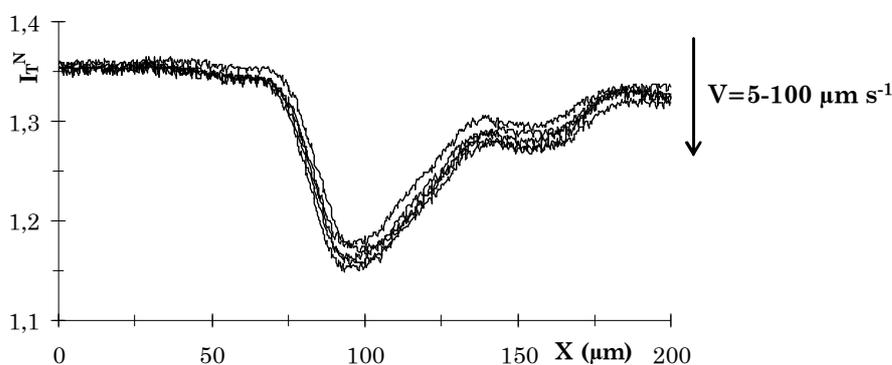
En appliquant le même raisonnement ici que dans le cas des bandes isolantes sur substrat conducteur proposé par K. Borgwarth et ses collègues, nous pouvons approximer la largeur réelle des spots par extrapolation à distance nulle ( $L=0$ ). Nous obtenons alors une valeur de 34  $\mu\text{m}$  pour la taille des spots, qui est très largement inférieure à la valeur obtenue en microscopie de fluorescence et en imagerie de résonance plasmonique de surface (SPRi). Ceci montre donc la limite de cette théorie qui peut s'expliquer par trois facteurs. Tout d'abord, cette limite est due à la réactivité car ces relations simples ne peuvent s'appliquer pour la détermination d'une distance réelle d'un objet non parfaitement isolant et ne présentant pas un courant de feedback négatif sur un substrat conducteur. Puis, deux facteurs de forme différent entre notre expérience et celle décrite par K. Borgwarth. Celui-ci étudie des objets conducteurs sur substrat isolant alors que dans notre cas, il s'agit d'objets non parfaitement isolants sur substrat conducteur. Enfin, les objets décrits par K. Borgwarth sont des bandes de dimensions latérales infinies, alors que les spots étudiés ici ont des dimensions finies et micrométriques. Ce phénomène de limitation avait également été observé par J. Chane-Tune dans sa thèse de doctorat lors de la réalisation de dépôts d'or sur des substrats de diamant dopé au bore<sup>12</sup>. A la base du pic en balayage de la **figure I.5**, nous obtenons une taille de l'ordre de 100  $\mu\text{m}$ , ce qui est en accord avec les expériences en microscopie de fluorescence et en SPRi.

Ainsi, le balayage 2D de la microélectrode placée à une distance suffisamment faible de la surface permet de mettre en évidence la présence de spots de polypyrrole-ODN. Cependant, la détermination de la taille de ces motifs créés sur la surface d'or à partir de la

courbe représentant l'évolution du courant mesuré à la sonde lors du balayage de la surface est relativement imprécise.

### I.C.2.b.ii. Influence de la vitesse de balayage

La **figure I.7** montre l'évolution du courant mesuré à la microélectrode lors du balayage de la surface modifiée à une distance de 5  $\mu\text{m}$  (distance qui permet la meilleure sensibilité de détection d'après la **figure I.5**) pour différentes vitesses de déplacement de la sonde ( $V= 5, 10, 20, 50$  et  $100 \mu\text{m s}^{-1}$ ). Nous pouvons observer que la réponse obtenue en terme de courant mesuré à la sonde au cours du déplacement est similaire quelle que soit la vitesse de balayage.



**Figure I.7** Influence de la vitesse de déplacement de la microélectrode (de 5 à  $100 \mu\text{m s}^{-1}$ ) lors de la détection d'un spot de polypyrrole-oligonucléotide par mode feedback de la SECM.

Conditions de dépôt :  $c_{\text{pyr}}=200 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pyr-CP}}=10 \mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  ( $0,1 \text{ M}$ ),  $a=5 \mu\text{m}$ ,  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $\tau=20 \text{ ms}$ ,  $d=60 \mu\text{m}$ .

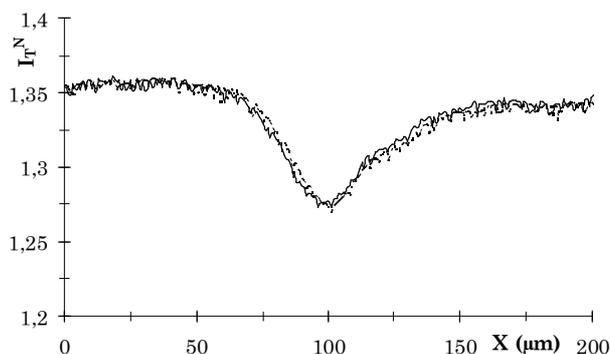
Conditions de détection :  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+} 10 \text{ mM}$  dans  $\text{KCl } 0,1 \text{ M}$ ,  $a=5 \mu\text{m}$ ,  $E_T=-0,5 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $E_S=\text{OCP}$ ,  $d=5 \mu\text{m}$ ,  $V=5, 10, 20, 50, 100 \mu\text{m s}^{-1}$ .

Cette caractéristique de la détection des spots est particulièrement intéressante en vue d'une application de cette méthode pour la lecture de biopuces. En effet, il sera possible de réaliser une cartographie d'un nombre important de plots créés sur la surface en un temps d'autant plus faible que la vitesse de déplacement est élevée. Considérons une matrice carrée ( $2 \times 2 \text{ mm}$ ) de 36 plots de  $100 \mu\text{m}$  de diamètre espacés les uns des autres par une distance de  $200 \mu\text{m}$ . Pour obtenir une cartographie de cette surface à hauteur constante composée de balayages de lignes (selon l'axe X) tous les  $10 \mu\text{m}$ , il est ainsi nécessaire de réaliser successivement 201 balayages. Si la vitesse de déplacement de la sonde est de  $5 \mu\text{m s}^{-1}$ , l'image totale sera obtenue en plus de 22 heures, sans tenir compte du temps de déplacement du moteur selon l'axe Y. Par contre, si la vitesse de balayage est de  $100 \mu\text{m s}^{-1}$ , il faudra seulement 67 minutes pour réaliser une cartographie complète de la puce. Cet exemple met

donc en évidence l'intérêt de pouvoir balayer la surface avec une vitesse importante, sans diminution de la sensibilité de détection.

### I.C.2.b.iii. Influence du sens de balayage

Nous avons vérifié que l'image obtenue lors du balayage d'un spot n'est pas fonction du sens de déplacement de la microélectrode.



**Figure I.8.** Influence du sens de balayage sur la détection d'un spot de polypyrrole-oligonucléotide par mode feedback de la SECM.

Conditions de dépôt :  $c_{\text{pyr}}=200 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pyr-CP}}=10 \text{ }\mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  ( $0,1 \text{ M}$ ),  $a=5 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $\tau=20 \text{ ms}$ ,  $d=60 \text{ }\mu\text{m}$ .

Conditions de détection :  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+} 10 \text{ mM}$  dans  $\text{KCl } 0,1 \text{ M}$ ,  $V=20 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$ ,  $a=5 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $E_T=-0,5 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $E_S=\text{OCP}$ ,  $d=5 \text{ }\mu\text{m}$ .

La **figure I.8** montre que la même image est obtenue en balayant la surface selon l'axe X dans le sens gauche-droite ou dans le sens contraire, ce qui montre la reproductibilité de la mesure de détection. De plus, nous pouvons observer ici l'indépendance de la réponse obtenue avec le déplacement de la sonde, ce qui prouve que l'effet convectif n'a pas d'influence sur la mesure et est donc bien négligeable.

### I.C.3. Conclusion

Dans cette première partie, nous nous sommes intéressés à l'utilisation du mode feedback de la SECM afin de détecter la présence de spots de polypyrrole-oligonucléotide sur la surface d'or. Nous avons montré que ceci était possible, en déplaçant la microélectrode à une distance proche de la surface (inférieure à  $20 \text{ }\mu\text{m}$ ), quelle que soit la vitesse de balayage (comprise entre  $5$  et  $100 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$ ). Le fait que la réponse obtenue en terme de courant mesuré à la microélectrode ne soit fonction ni de la vitesse, ni du sens de déplacement de la sonde électrochimique montre que les spots électrogénérés sur la surface ne sont pas perturbés par le balayage, ni sensibles à la présence de la microélectrode.

La possibilité de détecter de tels spots d'épaisseur nanométrique prouve la sensibilité de la SECM. De plus, l'un des avantages de l'imagerie par SECM, en comparaison avec l'imagerie en fluorescence, est qu'il est possible de visualiser les spots de polypyrrole-ODN immédiatement après leur synthèse sans utiliser de marqueur. La SECM permet donc de visualiser les spots de polypyrrole-ODN et de déterminer l'ordre de grandeur de leur taille, mais elle ne fournit pas d'information directe concernant l'épaisseur des dépôts.

Nous allons maintenant étudier la détection de l'hybridation de ces spots par SECM.

## **II. Détection de l'hybridation des spots de polypyrrole-oligonucléotide par SECM**

La détection du phénomène d'hybridation consiste à traduire le signal biologique issu de la reconnaissance en une grandeur mesurable et facilement interprétable.

Cette détection peut être réalisée au moment de la reconnaissance biologique et est alors appelée transduction (temps réel). Par contre, si elle est réalisée après le phénomène d'appariement spécifique, elle est appelée détection (point final). La transduction présente l'avantage d'un gain de temps pour l'analyse et permet également d'obtenir des informations sur la cinétique d'hybridation.

### **II.A. Les différents modes de détection**

Il existe deux types de détection : directe et indirecte, selon l'utilisation ou non d'un marqueur. Nous allons voir ici succinctement les principaux modes de détection utilisés.

#### **II.A.1. Détection indirecte**

##### **II.A.1.a. Détection par marquage radioactif**

Les marqueurs radioactifs<sup>13</sup> ont été les premiers marqueurs utilisés pour la détection de l'hybridation. Cependant, cette méthode quantitative basée sur la mesure de la radioactivité est délicate à mettre en œuvre.

##### **II.A.1.b. Détection électrochimique avec intercalants électroactifs**

Ce type de transduction utilise des intercalants électroactifs qui se glissent dans le duplex entre l'empilement des bases nucléiques. La détection de l'hybridation est ensuite réalisée, le plus souvent, par des méthodes potentiodynamiques qui mettent en évidence un changement de l'électroactivité de l'intercalant en absence et en présence d'oligonucléotides

complémentaires. Ainsi, K. Hashimoto *et al.* utilisent la daunomycine en tant que molécule intercalante afin de détecter l'hybridation par mesure en voltamétrie cyclique de la différence entre les pics anodiques du brin d'ODN immobilisé sur l'électrode et de son complémentaire<sup>14</sup>. L'équipe de M. Mascini a également utilisé la daunomycine en tant qu'indicateur de l'hybridation dans des capteurs à ADN<sup>15</sup>.

### **II.A.1.c. Détection optique**

La détection optique par fluorescence<sup>16</sup> est une technique indirecte semi-quantitative en point final et multi-étapes ne permettant pas d'accéder aux cinétiques d'hybridation. Elle est très utilisée car sensible, facile à mettre en œuvre et présentant une forte résolution spatiale ( $\mu\text{m}$ ). Cette technique a été décrite et utilisée au cours du chapitre II.

### **II.A.2. Détection directe**

Les modes de transduction directe intéressent de nombreuses équipes car s'affranchir de l'étape de marquage des ODN constitue un enjeu important en vue d'une commercialisation des biocapteurs.

#### **II.A.2.a. Détection électrochimique**

La plupart des techniques de détection électrochimique directe utilisent l'électroactivité des bases constituantes de l'ADN en tant qu'indicateur de l'hybridation, le plus souvent le pic anodique de la guanine. La voltamétrie cyclique étant une méthode peu sensible pour de faibles concentrations en ADN, d'autres techniques électrochimiques telles que la voltampérométrie pulsée<sup>17</sup>, ou encore l'analyse potentiométrique par redissolution anodique (PSA)<sup>18</sup> sont utilisées.

D'autres équipes de recherche étudient les modifications induites par l'hybridation sur les propriétés électrochimiques du matériau support. C'est le cas de la spectroscopie d'impédance<sup>19</sup>.

#### **II.A.2.b. Transduction gravimétrique**

Certains chercheurs se sont intéressés à la caractérisation de l'hybridation de l'ADN par microbalance à quartz<sup>20,21</sup>. Le principe de cette technique est que toute perturbation de la surface d'un cristal de quartz piézoélectrique se traduit par une variation de sa fréquence de résonance qui est reliée par l'équation de Sauerbrey à une variation de masse.

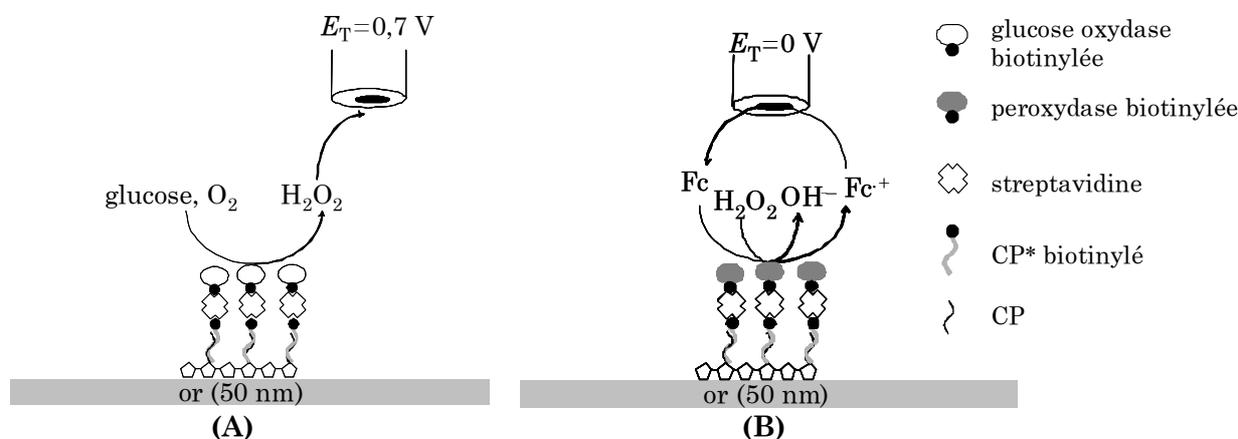
### II.A.2.c. Transduction optique

Il existe plusieurs types de détections directes optiques. Nous citerons plus particulièrement la résonance de plasmon de surface (SPR) dont le principe est décrit dans le chapitre III, et l'ellipsométrie basée sur l'étude du changement de polarisation d'un faisceau de lumière en fonction des variations de l'interface<sup>22</sup>.

Après avoir étudié l'hybridation des spots de polypyrrole-ODN par microscopie de fluorescence (chapitre II) et par SPRi (chapitre III), nous avons réalisé la détection de ce phénomène spécifique par SECM.

### II.B. Principe utilisé de la détection par SECM

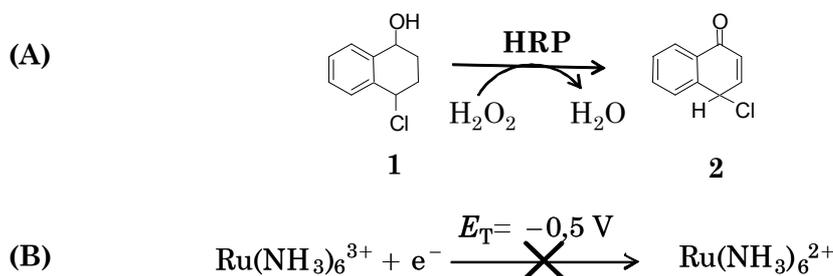
Plusieurs types de détection de l'hybridation par microscopie électrochimique basés sur un marquage enzymatique (l'enzyme remplace alors le fluorophore utilisé en microscopie de fluorescence) peuvent être envisagés, tels que, par exemple, le mode génération/collection en détectant à la microélectrode l'oxydation du peroxyde d'hydrogène formé au substrat par une réaction biocatalysée par la glucose oxydase (**Fig. II.1A**), ou le mode feedback positif en détectant à la sonde la réduction de l'ion ferricinium carboxylique, en présence d'une réaction biocatalysée par la peroxydase au substrat (**Fig. II.1B**).



**Figure II.1** Schémas de principe de détection de l'hybridation par SECM: (A) mode génération/collection, (B) mode feedback positif.

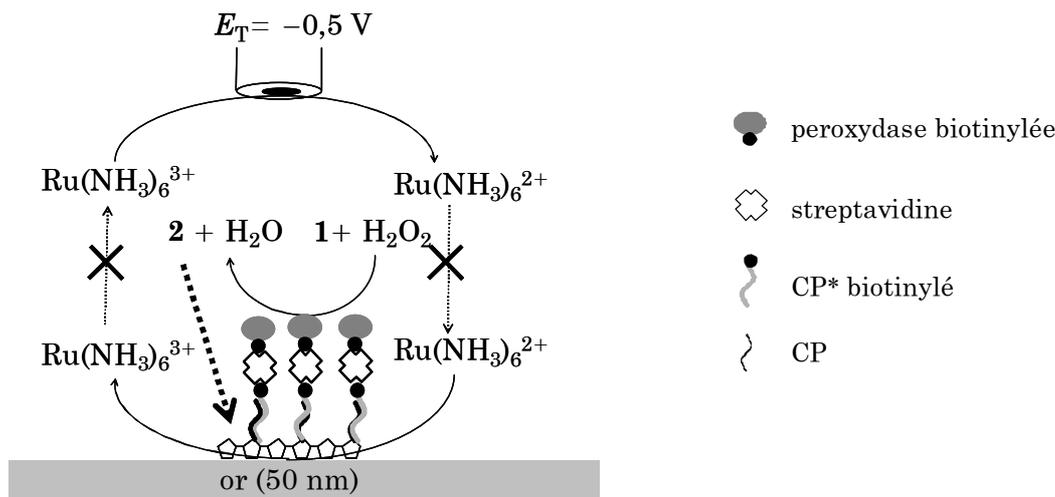
Nous avons développé une méthode de détection de l'hybridation des spots par SECM basée sur une modulation du courant mesuré à la microélectrode en mode feedback négatif. Cette différence de courant est due à la précipitation d'un produit isolant insoluble en solution aqueuse, la 4-chloro-1-naphtone (notée **2**), sur la surface. Sur la base des travaux de l'équipe de I. Willner<sup>23</sup>, ce produit est formé par la réaction biocatalysée par la peroxydase entre le 4-chloro-1-naphtol (noté **1**) et le peroxyde d'hydrogène (**Fig. II.2A**). La présence

du produit précipité à la surface va ainsi bloquer la réaction de transfert de charge du médiateur au niveau du substrat, ce qui va conduire à l'obtention d'un courant de feedback plus négatif (**Fig. II.2B**).



**Figure II.2 (A)** Réaction entre le 4-chloro-1-naphtol noté (1) et le peroxyde d'hydrogène catalysée par la peroxydase (HRP) pour former la 4-chloro-1-naphtone notée (2), et (B) régénération du médiateur à la microélectrode impossible en raison de la couche isolante de 4-chloro-1 naphtol sur les spots hybridés.

La **figure II.3** résume la procédure de détection des spots par SECM.



**Figure II.3** Schéma du principe de la détection de l'hybridation par mode feedback après assemblage biologique et précipitation de la 4-chloro-1 naphtone (2) sur les spots hybridés.

Une fois la réaction d'hybridation en présence d'oligonucléotides complémentaires biotinylés réalisée, un assemblage biologique, constitué de streptavidine puis de peroxydase biotinylée, est formé sur les spots grâce à l'affinité très forte entre la biotine et l'avidine. Puis une solution de 4-chloro-1-naphtol et de peroxyde d'hydrogène est ajoutée. Ces deux espèces vont réagir en présence de l'enzyme et spécifiquement aux endroits où l'enzyme est immobilisée. L'équipe de I. Willner a utilisé cette réaction de précipitation sur la surface afin d'amplifier la détection d'interaction antigène-anticorps et oligonucléotide-ADN<sup>23</sup>. Dans

notre cas, la 4-chloro-1-naphtone formée (notée **2** sur la figure) va précipiter aux endroits où l'hybridation a eu lieu. Ainsi, lorsque la microélectrode polarisée négativement va se trouver au-dessus d'un spot hybridé, le transfert de charge de l'espèce  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$  ne pourra pas se produire au niveau du substrat, ce qui se traduira par un courant mesuré à la sonde inférieur à son courant à l'infini (feedback négatif).

Afin de réaliser la détection de l'hybridation des spots selon cette méthode, nous avons tout d'abord déterminé la procédure d'assemblage et de précipitation. Pour cela, nous avons étudié le cas de dépôts macroscopiques sur la surface d'or.

### **II.C. Etude de la réaction de précipitation sur un dépôt macroscopique**

Nous avons étudié les étapes d'assemblage biologique et de précipitation sur un dépôt macroscopique par deux méthodes : la SPR et la SECM.

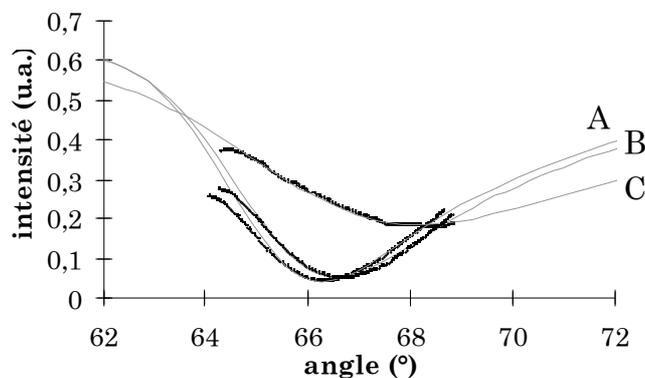
#### **II.C.1. Etude de la réaction par résonance plasmonique de surface (SPR)**

Comme nous l'avons vu dans le chapitre III sur l'élaboration de gradients de surface par couplage SECM-SPRi, la résonance plasmonique de surface (SPR) permet d'observer la formation d'un dépôt par analyse des courbes de réflectivité en fonction de l'angle incident du faisceau.

La **figure II.4** présente les courbes de réflectivité obtenues sur une surface d'or (**A**), puis sur un dépôt macroscopique de polypyrrole-ODN (**B**). L'hybridation en présence d'ODN complémentaires, suivie de la formation de l'assemblage biologique, sont ensuite réalisées. Enfin, la réaction entre le 4-chloro-1-naphtol et le peroxyde d'hydrogène se produit, et l'espèce formée notée **2** précipite à la surface. Une nouvelle courbe représentant la variation de la réflectivité est tracée (**C**). Nous pouvons observer un décalage angulaire faible du minimum de réflectivité lors du dépôt de polypyrrole-ODN, mais un décalage beaucoup plus important après précipitation du produit isolant à la surface. Ceci est dû à la formation d'une couche biologique d'indice de réfraction différent. Par SPR, nous avons ainsi validé la formation du produit **2** et sa précipitation à la surface.

De plus, la SPR permet de déterminer les épaisseurs des différents dépôts par comparaison des courbes expérimentales de réflectivité obtenues (en noir) et des courbes théoriques (en gris). Ainsi, l'épaisseur du dépôt macroscopique de polypyrrole-ODN peut être estimée à  $e=1,5\pm 3$  nm, et celle de l'assemblage biologique et de la couche de 4-chloro-

1-naphtone est de l'ordre de  $22 \pm 3$  nm. Cette valeur est à utiliser avec précaution car, lors de la modélisation, nous avons considéré que la 4-chloro-1-naphtone se déposait au-dessus de l'assemblage biologique. Or, il est possible qu'elle se dépose à la surface de l'électrode à travers la porosité de l'assemblage, et non au-dessus de l'assemblage formé sur les spots hybridés.



**Figure II.4** Evolution de l'intensité réfléchie en fonction du déplacement angulaire sur : (A) une surface d'or, (B) un dépôt macroscopique de polypyrrole-ODN, (C) un dépôt de polypyrrole-ODN après hybridation, assemblage moléculaire et précipitation de la 4-chloro-1-naphtone.

Les courbes en noir sont expérimentales et les courbes en gris sont obtenues par la théorie (avec  $n_{\text{prisme}} = 1,58$ ;  $n_{\text{titane}} = 2,36 + i3,11$ ,  $d = 3$  nm;  $n_{\text{or}} = 0,287 + i3,4$ ,  $d = 50$  nm;  $n_{\text{solution}} = 1,33$ ;  $n_{\text{pyr-ODN}} = 1,66 + i0,26$ ;  $n_{\text{chloro-naphtone}} = 1,396 + i0,08$ )

Conditions de dépôt:  $c_{\text{pyr}} = 200$  mM,  $c_{\text{pyr-CP}} = 10$   $\mu$ M dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),  $E_{\text{app}} = 0,7$  V vs.  $\text{Ag}/\text{Ag}^+$ ,  $\tau = 20$  ms.

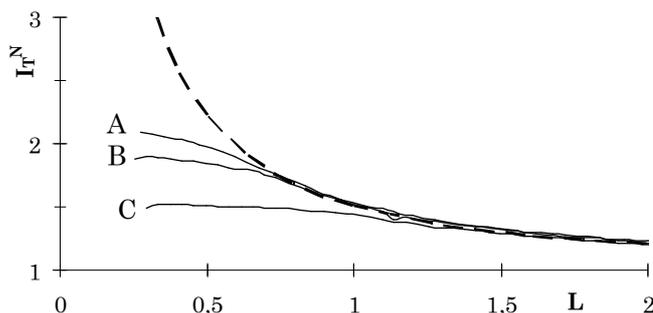
Conditions d'assemblage et de précipitation: 1) streptavidine ( $0,5$  mg  $\text{mL}^{-1}$ ) pendant 15 min, 2) HRP-biot ( $120$  U  $\text{mL}^{-1}$ ) pendant 15 min, 3) 4-chloro-1-naphtol ( $9,8 \cdot 10^{-4}$  M) et  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,56$  M) pendant 15 min.

### II.C.2. Influence de la précipitation sur la réponse en SECM

La **figure II.5** présente les courbes d'approche normalisées obtenues sur la surface d'or (A), puis sur un dépôt macroscopique de polypyrrole (B). Une solution contenant la peroxydase, le peroxyde d'hydrogène et le 4-chloro-1-naphtol est ensuite ajoutée. La réaction de précipitation se produit alors sur toute la surface et une nouvelle approche de la microélectrode vers la surface est tracée (C).

Nous pouvons observer une diminution significative du courant de feedback. Celui-ci n'est pas négatif mais est largement inférieur aux valeurs obtenues dans les cas A et B. Ceci peut être expliqué par le fait que la quantité de précipité formé n'est peut-être pas suffisante pour recouvrir toute la surface. Néanmoins, cette expérience préliminaire prouve

que la précipitation du produit **2** sur la surface est détectable par analyse de courbes d'approche en SECM.



**Figure II.5** Influence du précipité (**2**) sur la mesure du courant à la microélectrode en mode feedback de la SECM ; courbes d'approche : (A) sur or, (B) sur un dépôt macroscopique de polypyrrole sur or, (C) après précipitation de la 4-chloro-1-naphtone sur la surface.

Conditions de dépôt :  $c_{pyr}=200\text{ mM}$ ,  $E_{app}=0,7\text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $\tau=200\text{ ms}$ .

Conditions de précipitation : HRP ( $120\text{ U mL}^{-1}$ )+4-chloro-1-naphtol ( $23\text{ mM}$ )+ $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,5\text{ M}$ ) en solution pendant 30 min.

Nous avons ensuite étudié la formation de l'assemblage biologique sur des spots de polypyrrole-ODN puis détecté leur hybridation par SECM.

## **II.D. Etude de l'hybridation des spots de polypyrrole-oligonucléotide**

### **II.D.1. Etude de l'assemblage biologique**

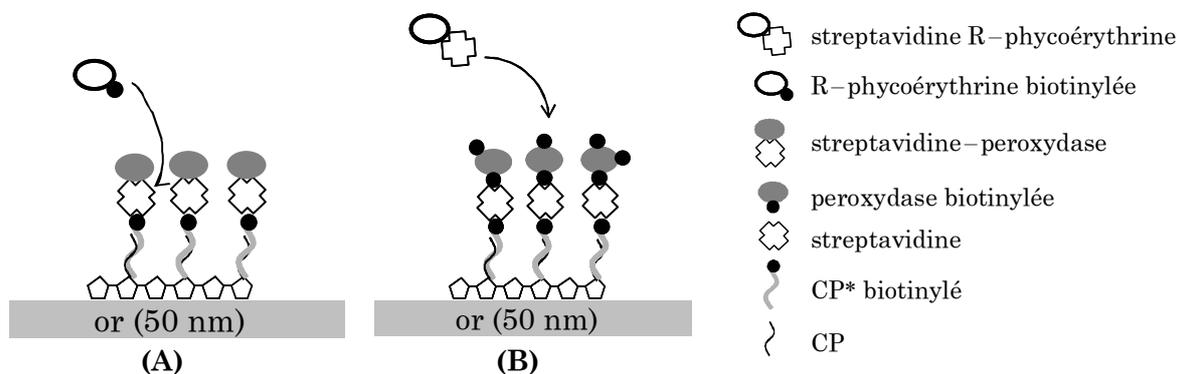
Nous avons tout d'abord étudié la formation de l'assemblage biologique sur les spots à l'aide de deux techniques : la microscopie de fluorescence et la SECM.

#### **II.D.1.a. Mise au point de la procédure d'assemblage par microscopie de fluorescence**

La première étape pour réaliser la détection par SECM sur les spots de polypyrrole-ODN est de déterminer la procédure expérimentale telle que l'assemblage biologique se forme spécifiquement aux endroits où l'hybridation a lieu. En effet, nous avons observé dans le chapitre II que l'hybridation se produit spécifiquement sur les spots de polypyrrole-ODN en présence de l'ODN complémentaire lorsqu'au préalable, une solution de BSA est introduite afin de bloquer la surface d'or.

Nous avons étudié deux procédures d'assemblage enzymatique sur des spots de polypyrrole-ODN électrogénérés par mode direct et hybridés spécifiquement en présence d'ODN complémentaires.

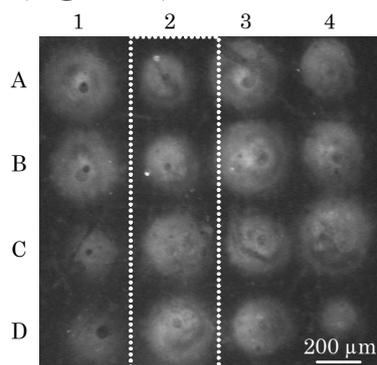
Dans le premier cas, nous avons ajouté une solution de conjugué de peroxydase–streptavidine (40–100 et 80–200 U mL<sup>-1</sup>). La forte affinité entre la biotine et l'avidine ( $K_a=10^{15}$ ) permet une liaison rapide entre ces deux espèces. Nous avons rincé puis ajouté un fluorophore marqué, la R–phycoérythrine biotinylée, pendant 15 min à l'obscurité. Après rinçage au tampon PBS, l'échantillon est ensuite observé en microscopie de fluorescence afin de vérifier la formation de l'assemblage biologique. Cette procédure a été reproduite pour différentes conditions d'électrogénération et donc différentes tailles et épaisseurs de spots de polypyrrole–ODN, et pour différents temps d'assemblage de l'enzyme sur les spots hybridés. Dans chaque cas, nous obtenons une image sombre, où les spots ne fluorescent pas et ne sont même pas visibles. Nous avons alors reproduit cette procédure en bloquant la surface avec de la BSA (solution de PBS–BSA 1%) avant la mise en contact avec l'enzyme. Les images en microscopie de fluorescence de ces échantillons présentent une surface noire dans laquelle des spots apparaissent en couleur sombre. Nous n'obtenons donc aucune fluorescence sur les spots. Dans le premier cas, il était impossible de distinguer les spots alors qu'en bloquant la surface au préalable, les spots apparaissent. Dans les deux cas, nous n'obtenons aucune fluorescence. Ceci semble indiquer que, dans le premier cas, l'enzyme s'est fixée sur toute la surface alors qu'en bloquant, elle s'est fixée spécifiquement sur les spots hybridés. Cependant, le fait qu'aucune intensité de fluorescence n'est observée montre que le fluorophore ne se fixe ni sur toute la surface (premier cas), ni sur les spots (second cas). Ceci peut s'expliquer par un problème d'encombrement stérique, dû à la grande taille de l'enzyme fonctionnalisée par la streptavidine (**Fig. II.6A**). En effet, la streptavidine–peroxydase est très encombrante du fait de sa taille importante et il est donc difficile pour la molécule de fluorophore (R–phycoérythrine biotinylée) d'accéder à la streptavidine. Ceci explique ainsi qu'il n'y ait pas de fluorescence car une quantité insuffisante de fluorophores se fixe sur les spots hybridés.



**Figure II.6** Deux types d'assemblages moléculaires utilisés. (A) Hybridation en présence d'ODN complémentaires biotinylés, puis ajout successivement de streptavidine–peroxydase, puis de R–phycoérythrine biotinylée. (B) Hybridation en présence d'ODN complémentaires biotinylés, puis ajout successivement de streptavidine, puis de peroxydase biotinylée, et enfin de streptavidine R–phycoérythrine.

Dans la seconde procédure, l'assemblage biologique est constitué de la streptavidine puis de la peroxydase, ce qui ajoute une étape à l'assemblage (**Fig. II.6B**). La streptavidine est tout d'abord couplée aux spots hybridés, suivie de la R-phycoérythrine biotinylée. Sur l'image en microscopie de fluorescence obtenue, aucune fluorescence n'apparaît. Nous renouvelons alors cette procédure en bloquant la surface avec de la BSA (solution de PBS-BSA 1%) avant que la streptavidine ne soit couplée. Puis nous ajoutons la solution de streptavidine. Après rinçage, nous plaçons une solution de fluorophore biotinylé au contact avec l'échantillon à l'obscurité pendant 15 min. L'image en microscopie de fluorescence montre les spots de couleur claire sur fond noir. Ce phénomène, bien que non expliqué, montre clairement que le blocage avec la BSA est indispensable avant l'étape d'assemblage de la streptavidine afin que cette dernière soit couplée aux spots hybridés.

Nous renouvelons donc cette dernière expérience, mais à la place du fluorophore, nous ajoutons une solution de peroxydase biotinylée. Après rinçage, nous mettons en contact l'échantillon avec une solution de streptavidine-R-phycoérythrine et nous le plaçons à l'obscurité pendant 15 min (**Fig. II.6B**).



**Figure II.7.** Image en microscopie de fluorescence des spots hybridés de Ppy-ODN après formation de l'assemblage biologique.

Conditions de dépôt :  $c_{pyr} = 200 \text{ mM}$ ,  $c_{pyr-CP} = 10 \text{ } \mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),  $d = 60 \text{ } \mu\text{m}$ ,  $a = 5 \text{ } \mu\text{m}$ .

Spots 1 (A,B,C,D) :  $E_{app} = 0,5 \text{ V}$  vs.  $\text{Ag}/\text{Ag}^+$ ,  $\tau = 20 \text{ ms}$  (A,B),  $\tau = 10 \text{ ms}$  (C,D).

Spots 2 (A,B,C,D) :  $E_{app} = 0,7 \text{ V}$  vs.  $\text{Ag}/\text{Ag}^+$ ,  $\tau = 10 \text{ ms}$  (A),  $\tau = 20 \text{ ms}$  (B,C,D).

Spots 3 (A,B,C,D) :  $E_{app} = 1,0 \text{ V}$  vs.  $\text{Ag}/\text{Ag}^+$ ,  $\tau = 20 \text{ ms}$  (A,B),  $\tau = 10 \text{ ms}$  (C,D).

Spots 4 (A,B,C,D) :  $E_{app} = 2,0 \text{ V}$  vs.  $\text{Ag}/\text{Ag}^+$ ,  $\tau = 10 \text{ ms}$  (A,B),  $\tau = 20 \text{ ms}$  (C,D).

Conditions d'hybridation :  $c_{CP^*} = 0,1 \text{ } \mu\text{M}$  dans PBS-BSA 1%.

Conditions d'assemblage : streptavidine ( $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) pendant 30 min, HRP-biot ( $60 \text{ U mL}^{-1}$ ) pendant 45 min.

Conditions de microscopie de fluorescence : temps d'exposition : 0,32 s, marqueur fluorescent : streptavidine-R-phycoérythrine.

La puce est ensuite observée en microscopie de fluorescence (**Figure II.7**) afin de vérifier la formation de l'assemblage enzymatique. Nous pouvons observer que les spots apparaissent de couleur plus claire que le fond de l'image (or). Ces résultats mettent en évidence que la streptavidine et la peroxydase se couplent successivement et spécifiquement sur les spots de polypyrrole-ODN hybridés. La **figure II.6B** montre que le fluorophore peut se fixer plus facilement que dans le cas de l'utilisation du conjugué de streptavidine-peroxydase, l'accessibilité des biotines étant plus importante (pas de problème d'encombrement stérique).

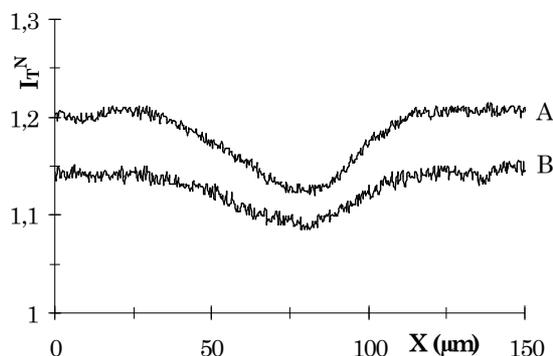
#### II.D.1.b. Etude de l'assemblage par SECM

Nous avons ensuite étudié l'influence de l'assemblage biologique constitué de la streptavidine et de la peroxydase sur la valeur du courant de feedback mesuré à la microélectrode en présence du médiateur redox.

Des spots de polypyrrole-ODN ont été électrogénérés par mode direct de la SECM. La **figure II.8A** présente le balayage d'un spot, après électrocopolymérisation, par la microélectrode placée à 10  $\mu\text{m}$  de la surface et polarisée négativement en présence du médiateur redox,  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ . L'hybridation a ensuite été réalisée en présence d'ODN complémentaires biotinylés en solution. Après blocage de la surface avec la BSA, un assemblage biologique constitué successivement de streptavidine et de peroxydase biotinylée a été formé sur ces spots hybridés par l'intermédiaire de la forte affinité entre biotine et avidine. Le balayage du même spot est à nouveau réalisé dans les mêmes conditions (**Fig. II.8B**). Une diminution du courant normalisé sur la surface d'or est observée lors du second balayage ( $I_T^N = 1,2$  après la synthèse du spot et 1,14 après la constitution de l'assemblage biologique), ce qui peut être expliqué par le blocage de la surface d'or avec la BSA. La protéine d'albumine (BSA) utilisée pour limiter les interactions non spécifiques sur la surface d'or lors de l'hybridation et de l'adsorption de la streptavidine semble ne pas être totalement éliminée lors des rinçages et limiter ainsi la régénération rapide du médiateur. En effet, la désorption de la BSA est difficile sur des substrats d'or.

De plus, la hauteur de pic varie de 0,07 à 0,05 après formation de l'assemblage biologique. Cependant, la hauteur de ce pic ne peut être calculée ainsi puisque la ligne de base pour la courbe B ne correspond pas à un balayage sur or mais sur une surface d'or modifiée par la BSA. Ainsi, pour pouvoir comparer les hauteurs de pic des spots dans chaque cas, il est nécessaire d'utiliser la ligne de base sur or de la courbe A. Dans ces conditions, la valeur réelle de la hauteur du pic dans le cas B est de 0,11 alors qu'elle n'est que de 0,07 dans

le cas A. Ceci peut être expliqué par le fait que lorsqu'on ajoute des couches de molécules biologiques (streptavidine, peroxydase) sur la surface, la réactivité diminue. Ainsi, le courant de feedback mesuré sera plus faible et donc, la hauteur de pic plus importante.



**Figure II.8** Evolution du courant de feedback mesuré à la microélectrode pendant l'étape d'assemblage biologique : (A) après électrogénération du spot par copolymérisation, (B) après hybridation et assemblage avec la streptavidine et la peroxydase biotinylée.

Conditions de dépôt :  $c_{pyr}=200\text{ mM}$ ,  $c_{pyr-CP}=10\text{ }\mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  ( $0,1\text{ M}$ ),  $\alpha=5\text{ }\mu\text{m}$ ,  $E_{app}=0,7\text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $\tau=20\text{ ms}$ ,  $d=60\text{ }\mu\text{m}$ .

Conditions d'assemblage: 1) streptavidine ( $0,5\text{ mg mL}^{-1}$ ) pendant  $15\text{ min}$ , 2) HRP-biot ( $120\text{ U mL}^{-1}$ ) pendant  $15\text{ min}$ .

Conditions de détection :  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$   $10\text{ mM}$  dans  $\text{KCl}$   $0,1\text{ M}$ ,  $V=20\text{ }\mu\text{m s}^{-1}$ ,  $\alpha=5\text{ }\mu\text{m}$ ,  $E_T=-0,5\text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $E_S=OCP$ ,  $d=10\text{ }\mu\text{m}$ .

## II.D.2. Détection de l'hybridation des spots par SECM

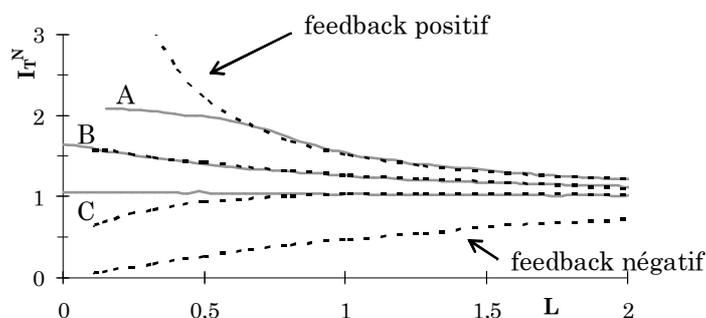
### II.D.2.a. Détection par analyse des courbes d'approche

La **figure II.9** présente les courbes d'approche normalisées obtenues sur la surface d'or (A), après synthèse d'un spot de polypyrrole-ODN sur la surface d'or (B), puis après constitution de l'assemblage biologique (streptavidine et peroxydase), réaction enzymatique et précipitation au niveau du spot de la 4-chloro-1-naphtone (notée **2**), insoluble en milieu aqueux et isolante sur la surface (C).

Nous observons ainsi une diminution du courant normalisé après assemblage et précipitation de **2** et l'établissement d'un régime plus proche du mode feedback négatif. En effet, par la présence de l'isolant **2** sur la surface au niveau des spots hybridés, l'espèce  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  ne peut subir de transfert de charge au niveau du substrat, ce qui conduit à une valeur normalisée du courant à la sonde de l'ordre de 1.

Ces courbes ont ensuite été comparées aux courbes théoriques (courbes en pointillés) obtenues en utilisant la théorie des courbes  $i_T-d$  à cinétique contrôlée sur une surface totalement conductrice avec une constante hétérogène de moindre amplitude<sup>10</sup> (annexe III).

Nous avons ainsi déterminé, en première approximation, les valeurs de la constante de vitesse hétérogène apparente  $k_{\text{eff}}$  dans chaque cas :  $k_{\text{eff}}=1 \text{ cm s}^{-1}$  sur une surface d'or ;  $k_{\text{eff}}=0,21 \text{ cm s}^{-1}$  sur un spot de polypyrrole–oligonucléotide, et  $k_{\text{eff}}=0,006 \text{ cm s}^{-1}$  après formation de l'assemblage biologique et réaction du 4–chloro–1–naphtol biocatalysée par la peroxydase.



**Figure II.9** Courbes d'approche normalisées théoriques (traits pointillés) et expérimentales (traits continus) (A) sur or, (B) sur un spot de polypyrrole–oligonucléotide électrogénéré sur or, (C) sur le même spot de Ppy–ODN après assemblage biologique et précipitation de la 4–chloro–1–naphtone sur la surface.

Conditions de dépôt :  $c_{\text{pyr}}=200 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pyr-CP}}=10 \text{ }\mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  ( $0,1 \text{ M}$ ),  $\alpha=5 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $\tau=20 \text{ ms}$ ,  $d=60 \text{ }\mu\text{m}$ .

Conditions d'hybridation:  $c_{\text{CP}^*}=1 \text{ }\mu\text{M}$  dans  $\text{PBS-BSA } 1\%$  pendant  $20 \text{ min}$ .

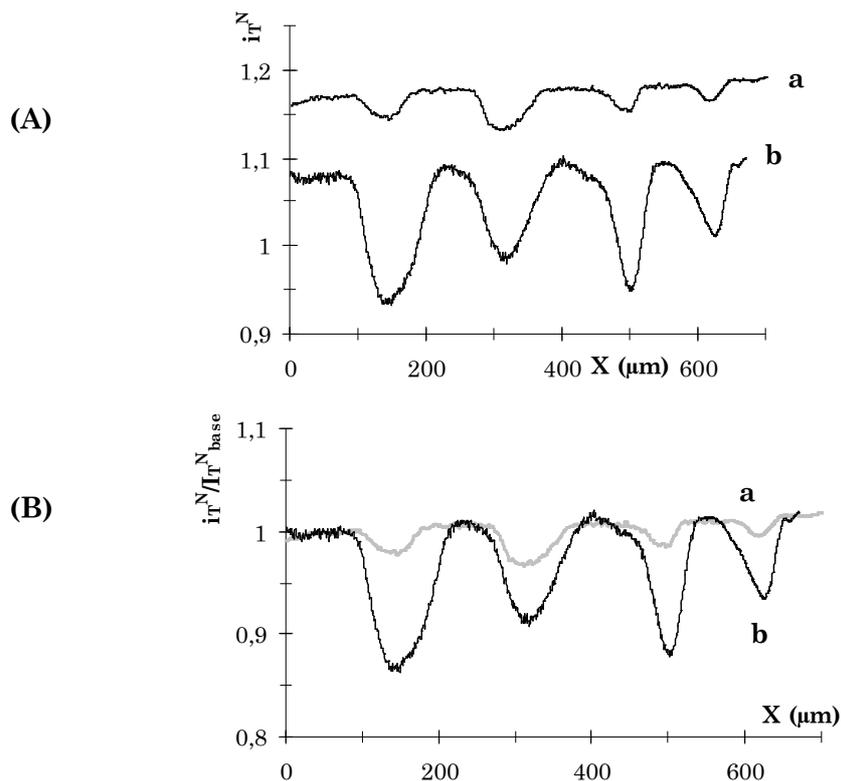
Conditions d'assemblage et de précipitation: 1) streptavidine ( $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) pendant  $15 \text{ min}$ , 2) HRP–biot ( $120 \text{ U mL}^{-1}$ ) pendant  $15 \text{ min}$ , 3) 4–chloro–1–naphtol ( $9,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) et  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,56 \text{ M}$ ) pendant  $15 \text{ min}$ .

Conditions de détection :  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$   $10 \text{ mM}$  dans  $\text{KCl } 0,1 \text{ M}$ ,  $V=20 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$ ,  $\alpha=5 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $E_T=-0,5 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $E_S=\text{OCP}$ ,  $d=10 \text{ }\mu\text{m}$ .

### II.D.2.b. Détection par analyse des courbes de balayage 2D

Nous avons étudié le phénomène d'hybridation par balayage de la microélectrode le long de la surface.

La **figure II.10A.a** est obtenue en mesurant le courant à la sonde lors du balayage dans la direction X de quatre spots électrogénérés. Les largeurs à mi–hauteur (LMH) des quatre pics obtenus sont différentes, ce qui indique une hétérogénéité des mesures. Néanmoins, l'écart entre les minimums de courant normalisé de chaque pic est de  $158\pm 35 \text{ }\mu\text{m}$ . Cette valeur est en accord avec la distance de  $150 \text{ }\mu\text{m}$  entre deux impulsions lors de l'électrogénération des spots.



**Figure II.10** *Détection de l'hybridation de spots* : évolution du courant de feedback mesuré à la microélectrode (a) après électrogénération du spot de polypyrrole-ODN par copolymérisation, (b) après hybridation, assemblage biologique et précipitation de la 4-chloro-1-naphtone sur la surface.

(A) courbe  $I_T^N = f(X)$ , (B) courbe  $I_T^N / I_T^N_{base} = f(X)$

Conditions de dépôt :  $c_{pyr} = 200 \text{ mM}$ ,  $c_{pyr-CP} = 10 \text{ } \mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  (0,1 M),  $a = 5 \text{ } \mu\text{m}$ ,  $E_{app} = 0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $\tau = 20 \text{ ms}$ ,  $d = 60 \text{ } \mu\text{m}$ .

Conditions d'hybridation :  $c_{CP^*} = 1 \text{ } \mu\text{M}$  dans PBS-BSA 1% pendant 20 min.

Conditions d'assemblage et de précipitation : 1) streptavidine ( $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) pendant 15 min, 2) HRP-biot ( $120 \text{ U mL}^{-1}$ ) pendant 15 min, 3) 4-chloro-1-naphtol ( $9,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) et  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,56 \text{ M}$ ) pendant 15 min.

Conditions de détection :  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+} = 10 \text{ mM}$  dans KCl 0,1 M,  $V = 20 \text{ } \mu\text{m s}^{-1}$ ,  $a = 5 \text{ } \mu\text{m}$ ,  $E_T = -0,5 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $E_S = \text{OCP}$ ,  $d = 10 \text{ } \mu\text{m}$ .

La **figure II.10A.b** présente l'image obtenue en balayant les mêmes spots après hybridation, formation de l'assemblage et précipitation de la 4-chloro-1-naphtone. Nous retrouvons une diminution du courant mesuré sur la surface d'or, comme dans la partie II.D.1.b., due au blocage de la surface par la BSA ( $I_T^N = 1,17$  sur l'or dans le cas a et 1,09 dans le cas b). La taille des spots est légèrement supérieure (en moyenne de  $26 \text{ } \mu\text{m}$ ) après formation de l'assemblage moléculaire, ce qui indique que ce dernier se forme avec une précision importante sur les spots hybridés. La constante de vitesse hétérogène apparente, et donc la hauteur du pic de courant normalisé, différent légèrement pour chacun des spots

électrogénérés, mais ont une valeur très distinctes de celles du cas **a**. En effet, la hauteur du pic pour les spots est en moyenne de  $0,028 \pm 0,008$  après électrogénération et de  $0,11 \pm 0,03$  après précipitation. De plus, la valeur du minimum en terme de courant normalisé de ces pics est inférieure ou proche de 1. Ceci indique une modulation de la réactivité du substrat par la précipitation du produit isolant, la 4-chloro-1-naphtone, qui rend ce substrat moins réactif vis-à-vis de la régénération du médiateur redox. Le comportement du système tend alors vers celui du mode feedback négatif.

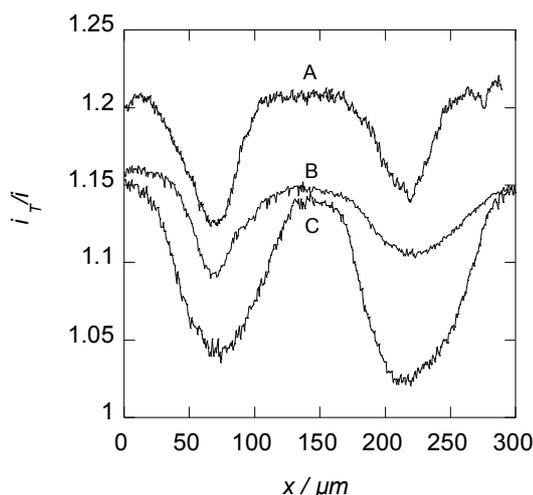
La **figure II.10B** a été construite à partir de la **figure II.10A** en divisant le courant de feedback mesuré par le courant obtenu sur or dans chacun des cas a et b. Cette figure indique clairement une diminution du courant sur le spot par rapport à sa valeur sur or qui est plus importante dans le cas de la courbe b que dans le cas a, ce qui indique la précipitation du produit isolant sur la surface et donc le phénomène d'hybridation des spots.

#### II.D.2.c. Etude de la spécificité de la méthode de détection de l'hybridation

Des expériences ont été réalisées par la suite par S. Szunerits afin d'étudier la spécificité de cette méthode d'hybridation.

La **figure II.11** présente les courbes obtenues après électrogénération du spot (**A**), après hybridation en présence de l'oligonucléotide de séquence complémentaire (**C**), après incubation en présence d'un oligonucléotide de séquence non complémentaire (**B**).

Cette figure montre que la hauteur du courant normé du pic n'augmente pas lorsque l'incubation est réalisée en présence d'oligonucléotide non complémentaire, alors qu'elle augmente nettement lorsque cet oligonucléotide possède la séquence complémentaire de celui électrodéposé sur la surface. Il est donc possible de détecter le phénomène d'hybridation en mesurant la différence entre la hauteur du pic normalisé avant incubation et celle après incubation. Si celle-ci est nulle ou légèrement positive, le spot n'a pas été hybridé. A l'inverse, si la différence est négative, cela signifie que l'hybridation a eu lieu.



**Figure II.11** *Etude de la spécificité de la méthode d'hybridation utilisée: évolution du courant de feedback mesuré à la microélectrode (A) après électrogénération du spot de polypyrrole-ODN par copolymérisation, (B) après incubation avec l'oligonucléotide non complémentaire (M5\*), assemblage biologique et précipitation de la 4-chloro-1-naphtone sur la surface, (C) après hybridation avec un oligonucléotide de séquence complémentaire (CP\*), assemblage biologique et précipitation de la 4-chloro-1-naphtone sur la surface.*

Conditions de dépôt :  $c_{\text{pyr}}=200 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pyr-CP}}=10 \text{ }\mu\text{M}$  dans  $\text{LiClO}_4$  ( $0,1 \text{ M}$ ),  $a=5 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $E_{\text{app}}=0,7 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $\tau=20 \text{ ms}$ ,  $d=60 \text{ }\mu\text{m}$ .

Conditions d'hybridation:  $c_{\text{CP* ou M5*}}=1 \text{ }\mu\text{M}$  dans  $\text{PBS-BSA } 1\%$  pendant  $20 \text{ min}$ .

Conditions d'assemblage et de précipitation: 1) streptavidine ( $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) pendant  $15 \text{ min}$ , 2) HRP-biot ( $120 \text{ U mL}^{-1}$ ) pendant  $15 \text{ min}$ , 3) 4-chloro-1-naphtol ( $9,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) et  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,56 \text{ M}$ ) pendant  $15 \text{ min}$ .

Conditions de détection :  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$   $10 \text{ mM}$  dans  $\text{KCl } 0,1 \text{ M}$ ,  $V=20 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$ ,  $a=5 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $E_T=-0,5 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ ,  $E_S=\text{OCP}$ ,  $d=10 \text{ }\mu\text{m}$ .

### II.D.3. Conclusion

Dans cette seconde partie, nous avons montré que la microscopie électrochimique pouvait détecter avec une forte sensibilité de faibles variations de la conductivité de surface causées par le dépôt localisé d'un solide, la 4-chloro-1-naphtone. Ce produit est formé par la réaction biocatalysée par la peroxydase entre le 4-chloro-1-naphtol et le peroxyde d'hydrogène. L'enzyme est liée sur les spots d'oligonucléotides hybridés par l'intermédiaire d'un assemblage moléculaire basé sur l'affinité forte entre la streptavidine et la biotine. La maîtrise de cet assemblage est une des limitations de la technique de détection développée ici.

### **III. Conclusions et perspectives**

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons montré que la microscopie électrochimique permet de visualiser des spots de polypyrrole–oligonucléotide électrogénérés sur une surface d'or. Le fait de détecter ces dépôts localisés d'épaisseur nanométrique montre le fort potentiel de la SECM en mode imagerie. De plus, cette méthode est reproductible et rapide, ce qui démontre son importance pour une utilisation pour les puces à ADN.

Dans la seconde partie, nous avons mis en évidence la capacité de la microscopie électrochimique pour détecter le phénomène d'hybridation de spots d'oligonucléotides. Cette méthode, basée sur la détection d'un produit isolant précipité à la surface des spots hybridés, démontre une fois encore la sensibilité de la SECM, et apporte des résultats clairs et simples à interpréter.

Il est envisagé de réaliser une étude de la sensibilité en terme de limite de détection. Il serait également nécessaire de réaliser une cartographie d'un spot après précipitation afin de pouvoir ensuite appliquer cette méthode de détection à des puces constituées d'un grand nombre de plots.

Ainsi, cette étude en SECM réalisée au cours de ma thèse illustre l'intérêt de la combinaison des modes direct et feedback de la microscopie électrochimique afin de générer des spots d'oligonucléotides et de détecter leur hybridation.

**Références bibliographiques du chapitre IV**

- <sup>1</sup> S. Szunerits, N. Knorr, R. Calemczuk, T. Livache, *Langmuir* **2004**, 20, 9236–9241.
- <sup>2</sup> S. A. G. Evans, K. Brakha, M. Billon, P. Mailley, G. Denuault, *Electrochem. Comm.* **2005**, 7, 135–140.
- <sup>3</sup> R. E. Gyurcsanyi, G. Jagerszki, G. Kiss, K. Toth, *Bioelectrochem.* **2004**, 63, 207–215.
- <sup>4</sup> S. Bi, B. Liu, F.–R. Fan, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 3690–3691.
- <sup>5</sup> C. Kranz, G. Wittstock, H. Wohlschläger, W. Schuhmann, *Electrochim. Acta.* **1997**, 42, 3105–3111.
- <sup>6</sup> T. Yasukawa, N. Kanaya, D. Mandler, T. Matsue, *Chem. Let.* **2000**, 5, 458–459.
- <sup>7</sup> D. T. Pierce, P. R. Unwin, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **1992**, 64, 1795–1804.
- <sup>8</sup> B. D. Malhotra, N. Kumar, S. Chandra, *Prog. Polym. Sci.* **1986**, 12, 179–218.
- <sup>9</sup> N. Lassalle, E. Vieil, J. P. Correia, L. M. Abrantes, *Biosensors & Bioelectronics* **2001**, 16, 295–303
- <sup>10</sup> M. V. Mirkin, B. R. Horrocks, *Anal. Chim. Acta* **2000**, 406, 119–146.
- <sup>11</sup> K. Borgwarth, C. Ricken, D. G. Ebling, J. Heinze, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1996**, 356, 288–294.
- <sup>12</sup> J. Chane–Tune, *Thèse : La microscopie électrochimique : développement et applications*, soutenue le **07/10/2004**, Institut National Polytechnique de Grenoble.
- <sup>13</sup> T. Livache, A. Roget, E. Dejean, C. Barthet, G. Bidan, R. Teoule, *Nucleic Acids Research* **1994**, 22, 2915–2921.
- <sup>14</sup> K. Hashimoto, K. Ito, Y. Ishimori, *Anal. Chim. Acta* **1994**, 286, 219–224.
- <sup>15</sup> G. Marrazza, I. Chianella, M. Mascini, *Biosensors & Bioelectronics* **1999**, 14, 43–51.
- <sup>16</sup> T. Livache, H. Bazin, P. Caillat, A. Roget, *Biosensors & Bioelectronics* **1998**, 13, 629–634.
- <sup>17</sup> F. Jelen, M. Tomschik, E. Palecek, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, 423, 141–148.
- <sup>18</sup> J. Wang, X. Cai, B. Tian, H. Shiraishi, *Analyst* **1996**, 121, 965–970.
- <sup>19</sup> C. M. A. Brett, A. M. Oliveira Bretta, S. H. P. Serrano, *Electrochim. Acta* **1999**, 44, 4233–4239.
- <sup>20</sup> F. Caruso, E. Roda, D. N. Furlong, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2043–2049.
- <sup>21</sup> C. Nicolini, V. Erokhin, P. Facci, S. Guerzoni, A. Ross, P. Paschkevitsch, *Biosensors & Bioelectronics* **1997**, 12, 613–617.
- <sup>22</sup> H. Arwin, *Thin Solid Films* **1998**, 313–314, 764–774.
- <sup>23</sup> L. Alfonta, A. K. Singh, I. Willner, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 91–102.



## **Chapitre V :**

Présentation du diamant dopé bore (BDD)



Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à un nouveau matériau d'électrode, le diamant dopé bore, en vue de son utilisation en tant que substrat pour les biopuces.

Le diamant est considéré comme un matériau excellent pour de nombreuses applications en raison de ses propriétés physiques et chimiques particulières, telles que, sa haute résistivité électrique, sa forte conductivité thermique<sup>1,2</sup>, sa grande résistance à la corrosion<sup>3</sup>, son faible coefficient de friction, son inertie chimique, son extrême dureté, ou encore sa transparence optique (**Tableau 1**). Cependant, le diamant est un isolant à large bande interdite (5,5 eV) et était donc inutilisable en tant que matériau d'électrode en électrochimie, jusqu'à ce que l'on découvre l'existence d'une conduction de type p liée à un dopage au bore et celle d'une conduction de type n due à l'incorporation d'azote<sup>4</sup>. Le dopage du diamant par des atomes de bore le rend semi-conducteur de type p en créant un niveau accepteur dans sa bande interdite. Ainsi, le diamant dopé au bore est un nouveau matériau carboné dont l'utilisation en électrochimie constitue un domaine en plein développement. Certaines propriétés électrochimiques macroscopiques de base de ce matériau sont bien connues, mais il reste cependant à comprendre de nombreux aspects concernant les relations entre structure, composition de la surface et réactivité de l'électrode. En effet, les propriétés électrochimiques du diamant dopé bore peuvent être influencées par de nombreux facteurs, tels que le taux de dopage, la morphologie, les impuretés (carbone graphitique), l'orientation cristallographique, et principalement, les terminaisons de surface. Le degré d'influence de ces facteurs sur la réponse électrochimique dépend fortement du mécanisme de la réaction à l'électrode pour un couple redox donné.

Extrême dureté mécanique (~90 GPa)

Très faible compressibilité ( $8,3 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2 \text{ N}^{-1}$ )

Très forte conductivité thermique à température ambiante ( $2 \cdot 10^3 \text{ W/m/K}$ )

Coefficient d'expansion thermique faible à température ambiante ( $0,8 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ )

Transparence optique depuis l'UV jusqu'à l'IR lointain du spectre électromagnétique

Bon isolant électrique (résistivité à température ambiante :  $\sim 10^{16} \Omega \text{ cm}$ )

Possibilité de dopage pour modifier la résistivité

Très résistant à la corrosion

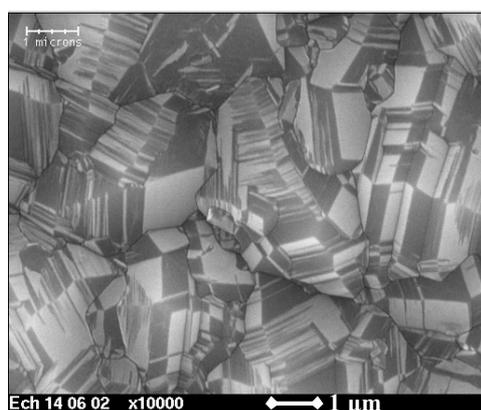
Biocompatibilité

**Tableau 1** *Quelques propriétés remarquables du diamant.*

Ce chapitre est consacré à la présentation de ce nouveau matériau d'électrode. Nous étudierons ici les propriétés électrochimiques caractéristiques de ce matériau, ainsi que quelques applications de la littérature. Nous expliquerons également l'intérêt de modifier la surface de l'électrode par un pré-traitement d'oxydation avant toute étude, et nous étudierons les conséquences de cette oxydation sur les propriétés électrochimiques du matériau, telles que la fenêtre d'électroinactivité en milieu aqueux et la réversibilité de différents couples redox.

## I. Présentation du diamant dopé au bore

Il existe différents protocoles de synthèse de films fins de diamant. Parmi eux, les plus utilisés sont le dépôt chimique en phase vapeur (CVD, "Chemical Vapor Deposition") par chauffage du filament ("hot-filament") ou assisté par plasma micro-ondes ("microwave assisted") pour lesquels les sources d'activation du mélange gazeux de méthane et d'hydrogène sont respectivement une énergie thermique ou un plasma. Les échantillons de diamant sur substrat de silicium utilisés dans chacune de nos expériences sont polycristallins et ont été synthétisés par B. Marcus au LEPMI par CVD assistée par plasma micro-ondes ou MPCVD (annexe I). Il est important de signaler ici que des films monocristallins et nanocristallins de diamant sont synthétisés par d'autres équipes de recherche.



**Figure I.1** Image en Microscopie Electronique à Balayage (MEB) d'un échantillon de diamant dopé au bore.

D'un point de vue structural, le diamant est un matériau cubique constitué d'atomes de carbone arrangés tétraédriquement et hybridés  $sp^3$ . Afin de les rendre conducteur, ces films fins peuvent être dopés avec différentes concentrations d'atomes de bore. Pour un dopage

modéré de l'ordre de  $10^{18}$  atomes de bore par  $\text{cm}^3$ , la résistivité est de l'ordre de  $10^4 \Omega \text{ cm}$ , ce qui donne un comportement semi-conducteur à l'électrode, alors que, pour des dopages plus importants (entre  $10^{20}$  et  $10^{21} \text{ B cm}^{-3}$ ), la résistivité décroît jusqu'à  $10^{-3} \Omega \text{ cm}$ , l'électrode possédant alors un comportement semi-métallique. Les échantillons utilisés par la suite ont un taux de dopage de l'ordre de  $10^{20}$  atomes de bore par  $\text{cm}^3$ . La **figure I.1** présente l'image obtenue en microscopie électronique à balayage (MEB) d'un échantillon de diamant dopé au bore. Il est ainsi constitué de cristaux orientés aléatoirement d'une taille de quelques micromètres avec les faces prédominantes cubique (100) et triangulaire (111). Les films fins obtenus après synthèse MPCVD sont hydrophobes, et leurs terminaisons de surface sont majoritairement des fonctions C-H.

### **I.A. Des propriétés électrochimiques remarquables**

Les études électrochimiques sur des films de diamant<sup>5</sup> ont débuté dans le milieu des années 1980, et le nombre d'équipes de recherche concernées, ainsi que celui des publications dans ce domaine, n'ont cessé de croître.

Les films de diamant dopé au bore possèdent des propriétés électrochimiques remarquables qui les distinguent nettement des autres électrodes de carbone hybridé  $\text{sp}^2$ , telles que le carbone vitreux, le graphite pyrolytique, ou encore les pâtes de carbone. Parmi celles-ci, nous pouvons citer :

- Une large fenêtre de potentiel électrochimique en milieu aqueux<sup>6</sup> et non-aqueux<sup>7</sup>. La largeur de cette fenêtre diminue avec la qualité du film et l'incorporation d'impuretés de carbone non-diamant de type  $\text{sp}^2$ . Dans le cas d'un film de faible qualité, la fenêtre d'électroinactivité est comparable à celle obtenue sur carbone vitreux ou graphite pyrolytique hautement orienté<sup>8</sup>.
- Une très faible capacité de double-couche, et un faible et stable courant résiduel, ce qui conduit à un bon rapport signal sur bruit. L'épaisseur de la double-couche est inférieure de plus d'un ordre de grandeur à celle du carbone vitreux<sup>9</sup>.
- Une stabilité de la réponse à long terme, et une forte tendance à résister à la désactivation. Ainsi, l'équipe de G. M. Swain a montré que, contrairement aux électrodes de carbone de type  $\text{sp}^2$  telles que les électrodes de carbone vitreux et de graphite pyrolytique hautement orienté, les électrodes de diamant, présentant des terminaisons de type carbonyles ou hydroxydes, étaient peu affectées par les

processus de désactivation<sup>10</sup>. De plus, G. M. Swain a mis en évidence que la réponse en voltamétrie cyclique du couple  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  sur une électrode de diamant pré-traitée était stable au cours de plusieurs balayages de potentiels de manière continue pendant plus de deux semaines<sup>11</sup>.

- Une résistance à la corrosion, même en milieu très agressif<sup>8,12</sup>, tel qu'en milieu alcalin, acide fluorhydrique, ou encore acide chlorhydrique.
- Une transparence optique dans les régions de l'UV/visible et de l'IR du spectre électromagnétique, propriété particulièrement intéressante pour des mesures spectroélectrochimiques. Cette propriété est dégradée lorsque la concentration en bore augmente.
- Une biocompatibilité, particulièrement intéressante pour notre étude.
- L'absence de sites d'adsorption à la surface du diamant dopé bore<sup>3,6,13,14,15</sup>. Ainsi, G. M. Swain a montré que les molécules polaires s'adsorbent très peu sur des surfaces de diamant non pré-traitées, contrairement au carbone vitreux ou au graphite pyrolytique hautement orienté<sup>10</sup>.

Les propriétés électrochimiques de ce matériau peuvent être influencées par plusieurs facteurs :

- La propreté de la surface,
- Le type de dopant et sa concentration, c'est-à-dire les propriétés électroniques<sup>16</sup>,
- La morphologie (joints de grains, défauts ponctuels...)<sup>17</sup>,
- Les impuretés structurales (carbone non diamant ou amorphe)<sup>18</sup>,
- L'orientation cristallographique,
- La terminaison de surface<sup>6,15,19,20,21,22</sup>.

La manière dont chaque facteur influence la réponse dépend fortement du mécanisme de la réaction à l'électrode pour un analyte donné. Ceci demeure encore peu expliqué et peu décrit dans la littérature à l'heure actuelle.

Grâce à ces propriétés particulières, le diamant semble être un matériau d'électrode prometteur. Durant la dernière décennie, il a été très étudié principalement dans trois domaines que sont le traitement de l'eau, l'électrosynthèse et l'électroanalyse. Enfin, nous citerons également quelques études réalisées sur le diamant dopé bore concernant la détection de l'ADN et de ses constituants.

## **I.B. Quelques applications**

### **I.B.1. Traitement des eaux**

Des études récentes ont montré que l'électrochimie constitue une voie intéressante pour le traitement des eaux usées contenant des composés organiques. Le traitement électrochimique de ces effluents dépend de nombreux facteurs, dont, plus particulièrement, la nature de l'électrode qui influence fortement à la fois la sélectivité et l'efficacité du processus. Le matériau d'électrode doit donc présenter une forte stabilité et une haute activité pour l'oxydation des composés organiques. Plusieurs matériaux ont été testés (carbone vitreux, IrO<sub>2</sub>, PbO<sub>2</sub>, SnO<sub>2</sub>...) et se sont révélés non adaptés. Au contraire, le diamant dopé au bore se présente comme un matériau prometteur pour la combustion complète de molécules organiques dans le traitement des eaux usées et la désinfection de l'eau, en raison de sa forte stabilité anodique et sa large fenêtre de potentiel électrochimique.

En fonction du potentiel appliqué, l'oxydation de molécules organiques sur diamant dopé au bore peut être réalisée selon deux mécanismes : soit un transfert d'électrons direct dans la zone de potentiel précédant celle d'évolution de l'oxygène (zone de stabilité de l'eau), soit une oxydation indirecte, par l'intermédiaire de radicaux hydroxyles générés, dans la zone de potentiel d'évolution de l'oxygène (décomposition de l'eau). Ceci a été observé par J. Iniesta *et al.* lors de l'oxydation électrochimique du phénol sur des électrodes de diamant dopé au bore<sup>23</sup>. Selon la valeur du courant appliqué et la concentration en phénol, il est possible d'obtenir la combustion complète du phénol en dioxyde de carbone, ou l'oxydation partielle du phénol pour donner d'autres composés aromatiques tels que la benzoquinone, ou encore le catechol.

Les équipes de recherche ont utilisé les électrodes de diamant afin d'étudier l'oxydation de divers composés organiques polluants (le polyacrylate<sup>24</sup>, les herbicides<sup>25</sup>, les cyanures<sup>26</sup>, les surfactants<sup>27</sup>, l'acide benzoïque<sup>28</sup>, le naphthol<sup>29,30</sup>, le phénol<sup>31,32</sup>, le nitrophénol<sup>33,34</sup> ou encore les triazines<sup>35</sup>), mais également la réduction d'espèces telles que les nitrates<sup>36</sup>.

### **I.B.2. Electrosynthèse**

Le diamant dopé bore est un matériau inerte, doté d'une large fenêtre d'électroinactivité et d'une importante résistance à la corrosion en milieu très agressif, même pour de fortes densités de courant. Il offre ainsi de nouvelles possibilités pour l'électrosynthèse de composés inorganiques ou organiques.

Tout d'abord, l'équipe de Ch. Comninellis a étudié la production d'acide peroxydisulfurique à partir de l'oxydation d'acide sulfurique sur une électrode de BDD<sup>37</sup>. M. S. Saha *et al.* ont ensuite développé une méthode pour la transformation du dioxyde de carbone atmosphérique, basée sur sa solubilité en milieu alcalin, puis sa conversion en peroxycarbonate, après réaction avec les radicaux hydroxydes électrogénérés à l'anode en diamant dopé bore<sup>38</sup>.

Dans la région de potentiel précédant l'évolution de l'oxygène, les électrodes de diamant dopé bore ne présentent pas d'activité electrocatalytique pour l'oxydation d'acides carboxyliques, et l'oxydation de composés aromatiques résulte de la désactivation de l'électrode due à la formation d'un produit polymère sur la surface de l'anode. Au contraire, dans la région de potentiel d'évolution de l'oxygène, l'oxydation organique implique la formation de radicaux hydroxydes qui conduit à la minéralisation complète des produits organiques. Ainsi, les électrodes de diamant dopé bore ne semblent pas pouvoir être utilisées en électrosynthèse organique. Cependant, il a été démontré que ces électrodes y jouaient un rôle important. En effet, il est possible d'influencer le chemin réactionnel et la nature des produits, non pas en contrôlant le potentiel comme en électrosynthèse "classique", mais en contrôlant le rapport entre la vitesse de formation des radicaux hydroxydes et le flux de réactants à la surface de l'électrode. Ainsi, l'équipe de Ch. Comninellis a montré que l'acide nicotinique peut être produit par l'oxydation sélective de la 3-méthylpyridine<sup>39</sup>. Ils ont également étudié la formation de la benzoquinone à partir de l'oxydation du phénol sur diamant dopé au bore<sup>40</sup>. Plus récemment, D. Zollinger *et al.* ont étudié la méthylation du *p-tert*-butyltoluène (TBT) dans une solution de CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O pour former sélectivement le *p-tert*-butylbenzaldéhyde diméthyl acétal (TBAL) sur BDD et sur graphite<sup>41</sup>. Ils ont montré que le taux de conversion était plus élevé sur des électrodes de graphite en raison de la présence de certaines fonctionnalités de surface telles que des groupes quinones. Dans le cas du diamant dopé au bore, la méthylation se produit selon un mécanisme indirect impliquant la formation de radicaux méthoxydes.

### **I.B.3. Electroanalyse**

Le diamant dopé au bore possède des propriétés particulièrement intéressantes pour des applications en électroanalyse, telles qu'un faible et stable courant de fond, une large fenêtre d'électroinactivité et une forte résistance à la corrosion. Son utilisation dans ce domaine a fait l'objet de nombreuses publications durant la dernière décennie ; c'est pourquoi nous nous contenterons ici d'en citer quelques-unes d'intérêt biologique ou médical.

O. Chailapakul et son équipe ont montré l'intérêt en terme de sensibilité du diamant dopé au bore par rapport au carbone vitreux pour la détection de l'oxydation de composés destinés à des applications cliniques tels que la D-penicillamine<sup>42</sup>, la tiopronine<sup>43</sup> (N-(2-mercaptopropionyl)glycine), le captopril<sup>44</sup>, la tétracycline<sup>45</sup> ou encore la lyncomycine<sup>46</sup>. Ils ont également montré que le diamant pouvait être utilisé en tant que matériau d'électrode pour l'analyse en flux (FIA, "Flow Injection Analysis"). De la même manière, l'équipe de S. Yoshihara a réalisé la détection ampérométrique de l'oxydation du 3,6-dihydroxyphénanthrène en milieu aqueux ou non-aqueux<sup>47</sup> et du thiosulfate de sodium<sup>48</sup>, composé possédant des applications dans les domaines chimique et biologique.

De plus, A. Fujishima et ses collègues ont étudié les réactions d'oxydation de la leucine-encéphaline<sup>49</sup> ou de drogues contenant des fonctions soufrées<sup>50</sup> par voltamétrie cyclique, analyse sous injection en flux (FIA) et chromatographie liquide. Plus récemment, A. Fujishima, en collaboration avec d'autres équipes de recherche, s'est intéressé à modifier le diamant pour diverses applications électroanalytiques. Différentes électrodes ont été préparées dans le but d'améliorer ou d'ajouter certaines fonctions électrochimiques, telles que des électrodes en microfibres de diamant modifiées par du polypyrrole sur-oxydé dans le but de détecter la dopamine, ou encore des détecteurs ampérométriques à base de diamant intégrés dans des micropuces d'électrophorèse<sup>51</sup>.

J. Zhang *et al.* se sont intéressés à l'utilisation du diamant pour l'électrochimie de protéines, telles que l'hémoglobine et la myoglobine<sup>52</sup>.

Enfin, L. Codognoto *et al.* ont utilisé la voltamétrie à signaux carrés (SWV, "Square Wave Voltammetry") pour étudier l'oxydation du pentachlorophénol sur une électrode de diamant dopé au bore<sup>53</sup>.

#### **I.B.4. Etude de l'ADN et de ses constituants**

Quelques équipes se sont intéressées récemment à l'utilisation du diamant dopé au bore pour la détection des bases nucléiques ou de l'ADN.

Dès 1999, A. R. Mahon *et al.* ont mis au point un système basé sur le diamant élaboré par CVD qui utilise l'absorption intrinsèque de l'ADN à 260 nm pour localiser, identifier et quantifier l'ADN dans des gels d'agarose<sup>54</sup>. Quelques travaux ont suivi sur le diamant concernant notamment la construction de puces à ADN en utilisant du diamant CVD<sup>55</sup>.

Puis, dès 2000, certaines équipes de recherche se sont intéressées à l'utilisation du diamant dopé au bore pour l'étude de l'ADN ou des bases nucléiques.

Ainsi, l'équipe de A. Fujishima a étudié les réactions d'oxydation des purines (guanine et adénine) et des nucléotides correspondants (guanosine-5'-monophosphate et adénosine-5'-monophosphate) sur des électrodes de diamant dopé au bore et sur carbone vitreux par des méthodes voltamétriques (voltamétrie cyclique et voltamétrie impulsionnelle différentielle) et coulométriques<sup>56</sup>.

L'équipe de R. G. Compton a réalisé la détection de la 2'-désoxyguanosine 5'-monophosphate (dGMP), d'un ARN de transfert et d'ADN simple et double brins de thymus de veau par voltamétrie cyclique et voltamétrie à signaux carrés (SWV) sur une électrode de diamant dopé au bore non pré-traitée<sup>57</sup>.

Puis, T. A. Ivandini *et al.* ont étudié la sélectivité, la sensibilité et la limite de détection des acides nucléiques sur des électrodes de diamant par voltamétrie à signaux carrés (SWV) *via* la détection de la guanine et de l'adénine dans l'ADN simple et double brins<sup>58</sup>. Ils ont également évalué l'influence de la terminaison de surface du diamant et ont ainsi montré que l'électrode sans pré-traitement, donc présentant des terminaisons hydrogènes, était plus sensible pour cette détection.

Puis, l'équipe de A. Fujishima a démontré l'intérêt d'utiliser une électrode de diamant dopé au bore pour la détection de bases nucléiques, les purines, et de leurs dérivés en sortie d'une colonne d'électrophorèse capillaire<sup>59</sup>.

H. Gu *et al.* ont utilisé la nature conductrice des électrodes de diamant dopé au bore pour immobiliser de l'ADN par l'intermédiaire d'un dépôt de polyaniline/polyacide acrylique (PANI/PAA), et ils ont réalisé par la suite la détection du phénomène d'hybridation de ce brin immobilisé<sup>60,61</sup>.

Enfin, R. J. Hamers *et al.* ont montré que des surfaces de diamant dopé au bore modifiées de manière covalente avec des monocouches moléculaires (groupes amine primaire réactifs, groupes vinyl(C=C), éthylène glycol, selon le type d'utilisation par la suite) peuvent permettre d'immobiliser de l'ADN et des protéines<sup>62</sup>. Grâce à ses propriétés semi-conductrices, le diamant dopé peut être utilisé afin de détecter directement et spécifiquement l'hybridation de l'ADN<sup>63</sup> ou les interactions anticorps-antigène.

## **II. Détermination de la procédure d'activation de la surface de diamant dopé bore**

Des études préliminaires du comportement électrochimique du diamant dopé au bore en présence du couple redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  ont montré une variation des réponses obtenues en raison d'une instabilité de la surface de l'électrode après synthèse possédant des terminaisons hydrogènes. En effet, lorsque plusieurs voltamétries sont successivement réalisées, nous pouvons observer un déplacement des pics anodique et cathodique en terme

d'intensité de courant mais aussi de potentiel. Ainsi, un pré-traitement de la surface destiné à la stabiliser est nécessaire avant toute détection électrochimique sur le matériau.

### II.A. Les procédures d'activation de la surface décrites dans la littérature

Plusieurs équipes de recherche ont constaté cette instabilité de la surface de diamant dopé au bore lors des études électrochimiques, et ont appliqué des pré-traitements de différentes natures à l'électrode. Le diamant dopé bore, après synthèse, est constitué majoritairement de terminaisons hydrogènes. Ce pré-traitement de la surface consiste à en transformer une part importante en terminaisons oxygènes de type carbonyles et hydroxydes. La surface est alors oxygénée et possède donc des propriétés électrochimiques différentes.

Tout d'abord, les électrodes de diamant peuvent être oxydées électrochimiquement en appliquant un potentiel fortement anodique dans diverses solutions.

Ainsi, S. Ferro *et al.* ont polarisé une électrode de diamant dopé au bore à 3 V *vs.* ECS pendant 20 minutes dans une solution de HClO<sub>4</sub> 1 M<sup>64</sup>.

H. B. Suffredini *et al.* ont comparé l'influence d'un pré-traitement anodique, consistant à appliquer un potentiel de 3 V *vs.* ESH pendant 30 min dans une solution d'acide sulfurique, avec celle d'un traitement cathodique où le potentiel appliqué est de -3 V dans les mêmes conditions<sup>65</sup>. Ils ont montré que certaines réactions de transfert de charge de couples connus pour leur réversibilité présentent un comportement apparent irréversible lorsqu'un pré-traitement anodique est appliqué. A l'inverse, une polarisation cathodique semble accroître l'activité électrochimique du matériau. D'autres équipes ont également utilisé une procédure d'activation anodique dans une solution d'acide sulfurique<sup>13,66,67,68</sup>. H. Notsu *et al.* ont utilisé une solution d'acide sulfurique en appliquant un potentiel de 2,4 V *vs.* Ag/AgCl pendant 60 min, générant ainsi une plus grande quantité de groupes carbonyles par unité de surface que lors d'une activation par plasma d'oxygène<sup>21</sup>.

F. Marken *et al.* ont étudié le comportement électrochimique de différents couples redox (Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>3+/2+</sup>, Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>, benzoquinone/hydroquinone) sur des électrodes de diamant dopé au bore en fonction de différents pré-traitements : un polissage, une oxydation en présence d'acide nitrique (balayage de potentiels entre 0 et 5 V *vs.* ECS) et une réduction (balayage dans la même solution entre 0 et -3 V)<sup>69</sup>. Ils ont montré que l'influence de ce pré-traitement, qui a pour effet de modifier les groupes fonctionnels de surface, sur la réponse électrochimique était fonction du couple redox considéré. Par exemple, une réponse similaire dans les trois cas est obtenue pour le couple Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>3+/2+</sup>, alors que le transfert d'électrons

est fortement ralenti pour le couple  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  dans le cas d'une électrode polie ou oxydée électrochimiquement au préalable.

Enfin, D. A. Tryk *et al.* ont utilisé une procédure d'activation anodique qui consiste à polariser l'électrode à 2,4 V *vs.* Ag/AgCl pendant 1 h dans une solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 0,1 M<sup>22</sup>, et ont étudié son effet sur la fenêtre de potentiel électrochimique en milieu aqueux de l'électrode et la réponse électrochimique du couple  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ .

Une seconde méthode consiste à placer l'échantillon de diamant dopé au bore sous plasma d'oxygène. I. Yagi *et al.* ont montré que ce pré-traitement affectait peu la conductivité de surface apparente de l'électrode, mais que les réponses électrochimiques de divers couples redox tels que  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  étaient fortement modifiées<sup>70</sup>.

La procédure d'activation utilisée par d'autres équipes de recherche, telles que celle de D. J. Riley, consiste à plonger l'électrode de diamant dans une solution d'acide chromique chaud, ce qui a pour effet de générer des terminaisons oxygènes tout en réduisant considérablement la conductivité de surface<sup>71</sup>. Ils ont également montré que la réponse électrochimique obtenue lors la réduction de la 1,4-benzoquinone dans l'acétonitrile sur de telles électrodes était similaire à celle obtenue sur des électrodes de carbone ou de platine, contrairement à celle obtenue sur des électrodes après synthèse possédant des terminaisons hydrogènes<sup>72</sup>.

Enfin, ce pré-traitement peut également être réalisé par voie thermique. S. Ferro *et al.* ont utilisé ce procédé en plaçant l'électrode de diamant à 400°C pendant 30 minutes<sup>64</sup>.

## **II.B. La procédure d'activation de la surface retenue**

Afin de détecter les réactions d'oxydation des nucléosides sur une électrode de diamant dopé au bore qui se produisent à des potentiels anodiques relativement élevés, nous avons appliqué un pré-traitement anodique, appelé activation, à l'électrode afin de s'affranchir du problème d'instabilité dans le domaine anodique de la surface de l'électrode après synthèse. Le milieu réactionnel utilisé pour la détection de telles réactions est un tampon phosphate préparé à partir de solutions aqueuses de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Nous avons donc appliqué le pré-traitement proposé par D. A. Tryk<sup>22</sup> qui consiste à polariser l'électrode à 2,4 V *vs.* Ag/AgCl pendant 1 h dans une solution à 0,1 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Cette activation a pour effet de transformer les terminaisons hydrogènes de surface du diamant après synthèse en terminaisons oxygènes. Ainsi, lors de l'anodisation, l'oxygène se lie à la surface du diamant ou aux joints de grains dans des groupes carbonyles ( $\text{sp}^2$ ) et/ou

hydroxydes ( $sp^3$ ), ce qui stabilise la surface pour des études en électrochimie. Nous verrons dans la suite que l'activation du diamant a également une influence sur la fenêtre de potentiel électrochimique du matériau en milieu aqueux et sur la cinétique de transfert de charge de certaines espèces redox. De plus, la surface ainsi oxydée devient hydrophile.

Nous avons ensuite observé l'évolution dans le temps d'une surface de diamant activé suivant cette procédure par l'étude de la réponse électrochimique en présence du couple redox  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ . Nous avons choisi ce couple comme référence car le mécanisme réactionnel s'effectue par un transfert de type "inner sphere", c'est-à-dire qu'un transfert de ligand est réalisé entre les sphères de coordination, et la cinétique à l'électrode est alors très sensible aux terminaisons de la surface de diamant<sup>5,73</sup>. L'observation des réponses successives en voltamétrie cyclique en présence de ce couple redox montre que ce phénomène d'activation de la surface n'est pas totalement irréversible. En effet, en reproduisant plusieurs fois le même voltamogramme, nous observons à nouveau un décalage des pics en terme de densité de courant et de potentiel, qui peut être du à une adsorption de l'espèce redox sur la surface de l'électrode oxygénée, ou à une modification de l'état de surface lors du balayage de potentiel. Or, selon A. D. Modestov *et al.*, les anions  $Fe(CN)_6^{3-}$  et  $Fe(CN)_6^{4-}$  ne s'adsorbent pas de manière irréversible sur la surface de diamant dopé bore<sup>74</sup>. Malgré ce décalage en raison d'une modification de la composition de la surface de l'électrode, l'ensemble des courbes obtenues reste différent de celle correspondant à une électrode de diamant hydrogéné. Après activation, il est donc impossible, dans nos conditions, de revenir à l'état initial de l'électrode, c'est-à-dire possédant des terminaisons hydrogènes. Nous avons établi un procédé de régénération de l'activation qui consiste à polariser l'électrode dans les mêmes conditions mais pendant une durée plus courte (900 s). Ce temps de 900 s est minimal afin d'obtenir une reproductibilité des réponses des couples redox en voltamétrie cyclique après chaque régénération (**Tableau II.1**).

	solution	potentiel appliqué	durée
<b>Activation initiale</b>	$KH_2PO_4$ 0,1 M	2,4 V vs. Ag/AgCl	3600 s
<b>Régénération de l'activation</b>	$KH_2PO_4$ 0,1 M	2,4 V vs. Ag/AgCl	900 s

**Tableau II.1** Paramètres expérimentaux de l'activation d'une surface de diamant dopé bore après synthèse et de la régénération de l'échantillon entre deux expériences.

En pratique, l'électrode de diamant dopé au bore sera activée pendant 1 h lorsqu'elle est restée plusieurs heures à l'air sans subir de réaction électrochimique, et elle sera régénérée pendant 15 min entre chaque expérience.

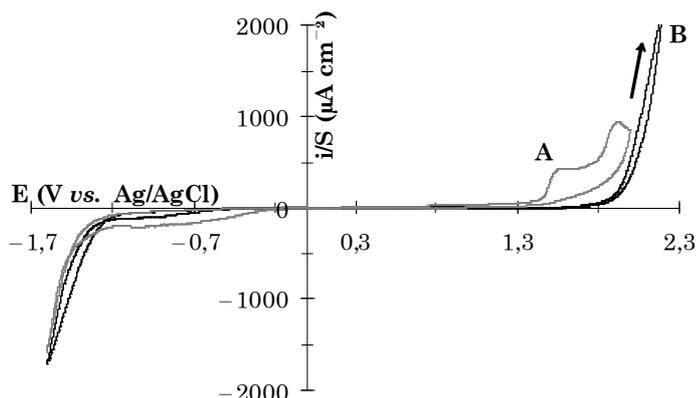
### III. Etude des propriétés électrochimiques du diamant dopé au bore

Les électrodes de diamant dopé au bore possèdent des propriétés électrochimiques caractéristiques, dont, plus particulièrement, la fenêtre de potentiel électrochimique et la réversibilité des couples redox.

#### III.A. Etude de la fenêtre de potentiel électrochimique

##### III.A.1. Influence de l'activation

Nous avons tout d'abord étudié la fenêtre de potentiel électrochimique du diamant dopé au bore dans un milieu tamponné (pH 7), c'est-à-dire la gamme de potentiel pour laquelle l'électrode plongée dans cette solution ne subit aucune réaction électrochimique. Ainsi, tout élément dont le potentiel de réaction est inclus dans cette fenêtre pourra être transformé sans que le milieu n'interfère au niveau électrochimique. Cette propriété est très importante pour la suite des expériences réalisées.



**Figure III.1** Fenêtre de potentiel électrochimique sur diamant dopé bore dans du tampon phosphate pH 7 (0,1 M) non désoxygéné à  $V=50 \text{ mV s}^{-1}$  (A) avant, (B) après activation.

*Activation du diamant dopé au bore (BDD) : polarisation à 2,4 V vs. Ag/AgCl dans  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M pendant 1 h.*

Les faibles courants de fond observés dans la gamme médiane du potentiel (de  $-0,2 \text{ V}$  à  $1,4 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ ) sur la fenêtre d'électroinactivité du carbone diamant après dépôt CVD (**Fig. III.1A**) indiquent que les espèces présentes autres que l'oxygène et l'hydrogène ne sont pas fortement adsorbées et que, par conséquent, la surface du diamant est relativement inactive. Cependant, nous pouvons observer un pic d'oxydation à  $1,55 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ , mis en évidence mais non expliqué dans la littérature<sup>8</sup>. Son intensité diminue au fur et à mesure des cycles de voltamétrie cyclique réalisés, c'est-à-dire lorsqu'un potentiel anodique est appliqué à l'électrode et donc que la surface du diamant est oxydée. La synthèse du film de

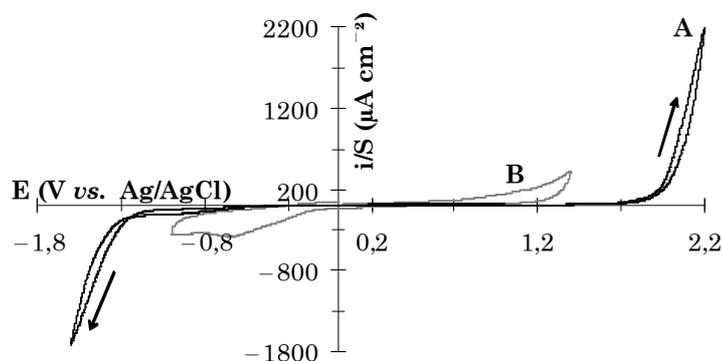
diamant étant réalisée sous plasma d'hydrogène, la surface du matériau est terminée par des liaisons hydrogènes. Le processus d'activation de l'électrode a pour effet d'oxyder en partie les terminaisons  $-CH$  de surface, mais également les défauts de surface de type  $sp^2$  ( $-CH_2$ ) pour former des groupes carbonyles ou hydroxydes. Or, selon M. H. P. Santana *et al.*, le carbone de surface de type  $sp^2$  joue le rôle de médiateur de transfert de charge, et donc, la disparition, même partielle, de ces défauts sur la surface entraîne une diminution de l'activité de l'électrode en milieu aqueux. C'est pourquoi la fenêtre d'électroinactivité du matériau est plus large après activation<sup>68</sup>. Cette équipe a alors proposé un mécanisme réactionnel basé sur la génération de radicaux hydroxydes par l'oxydation de l'eau. Ce phénomène d'élargissement de la fenêtre d'électroinactivité pour des électrodes de diamant oxygéné de haute qualité a également été observé par H. B. Martin *et al.* en présence d'acide sulfurique<sup>8</sup>.

De plus, cette oxydation de surface peut être reliée à la mouillabilité de surface. En effet, les électrodes après synthèse sont hydrophobes. Lorsque le potentiel évolue uniquement cathodiquement, la surface reste hydrophobe. Par contre, lorsque le potentiel évolue dans le domaine anodique, la surface du diamant devient hydrophile suivant un processus irréversible.

Ainsi, si nous réalisons un voltamogramme en milieu tamponné dans les mêmes conditions sur une électrode de carbone diamant dopé au bore ayant préalablement subi une oxydation à 2,4 V *vs.* Ag/AgCl pendant une heure dans  $KH_2PO_4$  à 0,1 M, nous pouvons remarquer que le pic à 1,55 V *vs.* Ag/AgCl a entièrement disparu (**Figure III.1B**). Par cette activation consistant à appliquer un potentiel fortement anodique à l'électrode, la composition de surface du diamant, et, par conséquent, sa stabilité, sont modifiées puisqu'une grande partie des terminaisons hydrogènes est remplacée par des terminaisons oxygènes. La fenêtre de potentiel électrochimique du domaine anodique est alors étendue jusqu'à environ 1,8 V *vs.* Ag/AgCl. Cette propriété est particulièrement intéressante afin de détecter des espèces dont l'oxydation se produit à un potentiel anodique relativement élevé, ce qui est parfois difficile, voire impossible, sur les électrodes de carbone classiquement utilisées, comme nous le verrons dans le chapitre suivant. De plus, dans le domaine cathodique, nous pouvons également observer un élargissement de la fenêtre, réduisant ainsi les phénomènes liés à l'oxygène pour des potentiels supérieurs à  $-1$  V. Cet élargissement de la fenêtre d'électroinactivité a également été observé par D. A. Tryk *et al.* sur des électrodes de diamant dopé au bore oxydées par plasma d'oxygène ou électrochimiquement selon le protocole que nous avons utilisé<sup>22</sup>.

### III.A.2. Comparaison avec une électrode de carbone vitreux

La **figure III.2** présente les fenêtres de potentiel électrochimique du diamant dopé au bore (A) et du carbone vitreux (B) activés. L'activation de l'électrode de carbone vitreux consiste à appliquer un potentiel de 1,75 V *vs.* Ag/AgCl pendant 5 min, puis -1 V pendant 1 min dans la même solution que dans le cas de l'électrode de diamant ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M)<sup>75</sup>. Le carbone vitreux est constitué de carbone de type  $\text{sp}^2$ , mais en surface, plusieurs terminaisons peuvent être présentes et plus ou moins actives, telles que, des carbonyles, des hydroxydes, des carboxyles ou encore des ponts epoxy. Ce pré-traitement électrochimique permet alors de modifier ces fonctions de surface. Ainsi, l'électrode oxygénée présentera une activité électrochimique plus importante.



**Figure III.2** Fenêtre de potentiel électrochimique sur : (A) diamant dopé bore activé, et (B) carbone vitreux activé, dans du tampon phosphate pH 7 (0,1 M) non désoxygéné à  $V=50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Activation du diamant dopé au bore (BDD) : polarisation dans  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M à 2,4 V *vs.* Ag/AgCl pendant 1 h.

Activation du carbone vitreux (GC) : polarisation dans  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M à 1,75 V *vs.* Ag/AgCl pendant 300 s, puis -1 V pendant 60 s.

Sur la **figure III.2**, nous pouvons observer que la fenêtre d'électroinactivité du carbone vitreux activé est beaucoup plus limitée que celle du diamant dopé au bore activé. Ainsi, il sera possible de détecter davantage d'espèces sur diamant dopé au bore. En effet, des espèces dont le potentiel d'oxydation est élevé, comme, par exemple, un potentiel de 1,4 V *vs.* Ag/AgCl, pourront être détectées sur ces électrodes de diamant alors qu'il était difficile d'étudier leur oxydation sur des électrodes plus classiques de carbone vitreux. Cette propriété illustre bien l'intérêt de ce nouveau matériau d'électrode.

De plus, nous pouvons observer que le courant mesuré dans le cas du carbone vitreux est beaucoup plus élevé que celui du carbone diamant. En effet, pour des potentiels de 0,81 et 1,17 V correspondants respectivement aux valeurs des potentiels d'oxydation sur une électrode de graphite pyrolytique de la guanosine<sup>76</sup> et de l'adénosine<sup>77</sup> comme nous le verrons

dans le chapitre suivant, les valeurs des densités de courant mesurées d'après la **figure III.2** sont respectivement de 76 et 213  $\mu\text{A cm}^{-2}$  sur carbone vitreux, alors qu'elles sont de 0,06 et 0,07  $\mu\text{A cm}^{-2}$  dans le cas du carbone diamant. Le diamant semble donc être un matériau d'électrode particulièrement adapté pour l'étude de l'oxydation de ces espèces biologiques.

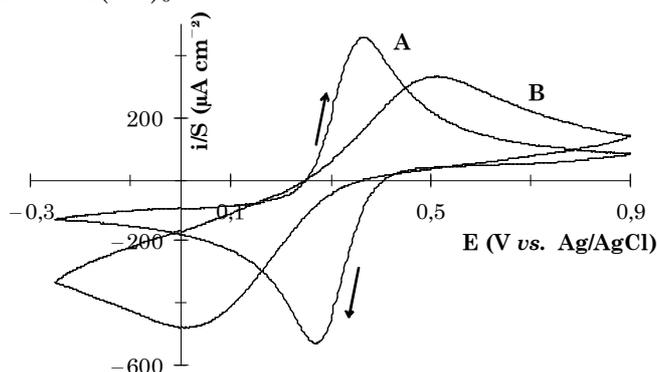
### III.B. Etude de la réversibilité électrochimique du diamant dopé au bore

Nous nous sommes ensuite intéressés à la réversibilité électrochimique de deux couples redox,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  très souvent utilisé comme couple référence dans la littérature, et  $\text{IrCl}_6^{2-/3-}$ , qui nous a permis de modéliser des phénomènes interfaciaux décrits dans le chapitre VII.

#### III.B.1. Etude du couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ : influence de l'activation

Nous avons tout d'abord étudié l'influence de la procédure d'activation anodique sur la réactivité du diamant *via* l'utilisation du couple redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ . Comme nous l'avons vu précédemment, la cinétique de ce couple redox à l'électrode est très sensible à la composition de la surface<sup>5</sup>.

La **figure III.3** présente les réponses des voltamétries cycliques réalisées avant (A) et après (B) activation sur une électrode de diamant dopé au bore. Le couple  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  a été utilisé en tant qu'exemple de système électrochimique réversible en milieu aqueux. La réaction électrochimique qui se produit à l'électrode est :



**Figure III.3** Etude de la réversibilité électrochimique du couple ferri/ferrocyanure sur diamant dopé bore : voltammogrammes des électrodes de (A) diamant hydrogéné et (B) diamant oxygéné dans une solution à 10 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  dans  $\text{LiClO}_4$  0,1 M à une vitesse de balayage de 50  $\text{mV s}^{-1}$ .

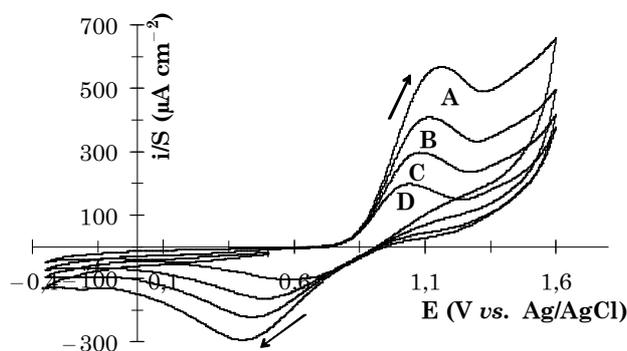
D'après la **figure III.3**, la cinétique du couple considéré est fortement modifiée lorsque l'électrode est oxygénée au préalable, ce qui confirme un mécanisme de type "inner sphere". Elle est donc sensible à ce pré-traitement anodique. En effet, le couple Nerstien

présente un comportement quasi-réversible sur une électrode de diamant dopé au bore après synthèse (**Fig. III.3A**) avec un  $\Delta E_p$  de l'ordre de 100 mV. Après activation de l'électrode, la réversibilité électrochimique du couple considéré est fortement limitée, et la différence entre les potentiels anodique et cathodique ( $\Delta E_p$ ) atteint alors 500 mV (**Fig. III.3B**). La polarisation anodique du pré-traitement désactive donc la surface pour ce système. Ainsi, les terminaisons oxygènes formées inhibent le transfert ion-dipôle ou dipôle-dipôle entre les espèces en solution et les dipôles C-O très orientés de surface<sup>22,23</sup>.

### III.B.2. Etude du couple $\text{IrCl}_6^{3-/4-}$ : influence de la vitesse de balayage

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence de la vitesse de balayage sur la réponse en voltamétrie cyclique obtenue sur une électrode de diamant oxygéné. Cette étude a été réalisée pour le couple  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ , puis pour le couple  $\text{IrCl}_6^{2-/3-}$ . Nous présenterons ici les résultats obtenus dans ce second cas (**Fig. III.4**), cette espèce redox étant choisie pour la suite de l'étude et, notamment, pour la modélisation du phénomène d'adsorption des produits des réactions d'oxydation des nucléosides dans le chapitre VII.

La réaction électrochimique qui se produit à l'électrode est :



**Figure III.4** Voltammogrammes de l'électrode de diamant dopé bore oxygéné dans une solution de 2 mM  $\text{K}_3\text{IrCl}_6$  dans  $\text{LiClO}_4$  0,1 M à différentes vitesses de balayage : (A) 200  $\text{mV s}^{-1}$ , (B) 100  $\text{mV s}^{-1}$ , (C) 50  $\text{mV s}^{-1}$ , (D) 20  $\text{mV s}^{-1}$ .

D'après la **figure III.4**, une augmentation de la vitesse de balayage entraîne une augmentation du courant du pic en raison d'une différence de gradient de concentration à l'interface électrode-solution. De plus, nous pouvons observer que la différence de potentiel inter-pics  $\Delta E_p$  augmente avec la vitesse de balayage. Elle est supérieure à la valeur (56,5 mV à 25 °C) caractéristique d'une cinétique de transfert électronique rapide et réversible (domaine d'application de la loi de Nernst). Dans le cas d'un système non réversible, l'écart

des potentiels de pic augmente avec un paramètre  $\phi$  égal à  $\frac{k^\circ}{\sqrt{\left(\frac{\pi VFD}{RT}\right)}}$ . Cet écart dépend

donc de la constante de vitesse du transfert électronique et de la vitesse de balayage<sup>78</sup>. Ainsi, la dépendance entre la différence inter-pics et la vitesse de balayage, observée sur la **figure III.4** et reprise dans le **tableau III.1**, indique que le courant est contrôlé par la cinétique d'un transfert d'électrons irréversible.

De plus, dans le cas d'un système non réversible, la courant peut être exprimé à l'aide de la formule théorique suivante<sup>78</sup> :

$$i_{\text{pth}} = (2,99 \cdot 10^5) \cdot S \cdot C \cdot (\alpha \cdot D \cdot V)^{1/2} \quad (\text{III.3})$$

avec :

$i_{\text{pth}}$  : courant théorique de pic (A),

$S$  : surface de l'électrode (ici,  $S=0,196 \text{ cm}^2$ ),

$C$  : concentration de l'espèce en solution ( $\text{mol cm}^{-3}$ ),

$\alpha$  : coefficient de transfert de charge,

$D$  : coefficient de diffusion de l'espèce (ici,  $D = 6,8 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ),

$V$  : vitesse de balayage du potentiel ( $\text{V s}^{-1}$ ).

V ( $\text{V s}^{-1}$ )	$i_{\text{pa}}$ ( $\mu\text{A}$ )	$i_{\text{pth}}$ ( $\mu\text{A}$ )	$\Delta E_p$ (mV)
0,02	19,9	30,5	448
0,05	27,9	48	598
0,1	37,2	68,3	684
0,2	46,5	96	758

**Tableau III.1** Comparaison des valeurs expérimentales  $i_{\text{pa}}$  (Fig. III.4), théoriques  $i_{\text{pth}}$  (Eq. III.3) du courant de pic anodique, et de la différence de potentiel inter-pics  $\Delta E_p$  en fonction de la vitesse de balayage utilisée dans une solution de 2 mM  $\text{K}_3\text{IrCl}_6$  dans  $\text{LiClO}_4$  0,1 M.

L'intensité du pic anodique expérimental est inférieure à sa valeur théorique. Cependant, ceci est à nuancer puisque lorsque nous avons appliqué l'équation III.3, nous avons considéré la surface géométrique de l'électrode ( $S=0,196 \text{ cm}^2$ ) qui peut être très différente de la surface électroactive réelle après activation. De plus, nous avons choisi arbitrairement un coefficient de transfert de charge de 0,5. Cependant, nous avons observé que le courant du pic est proportionnel à la racine carrée de la vitesse, ce qui confirme un mode de transport de matière diffusionnel.

#### **IV. Conclusion**

L'activation anodique est une procédure indispensable afin de stabiliser la surface de l'électrode de diamant dopé bore électrochimiquement dans le domaine anodique. En effet, l'électrode obtenue après synthèse est stable chimiquement, mais son état et sa composition de surface évoluent lorsqu'elle est polarisée anodiquement. La transformation des terminaisons hydrogènes en terminaisons oxygènes élargit nettement la fenêtre de potentiel électrochimique, mais limite la réversibilité électrochimique de certains couples redox couramment utilisés tels que  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ . La réversibilité est un critère important en électrochimie, mais cependant, les processus d'oxydation des nucléosides considérés par la suite sont des réactions irréversibles et se produisant à des potentiels anodiques relativement importants, plus particulièrement dans le cas de l'adénosine. C'est pourquoi l'élargissement de la fenêtre d'électroinactivité du matériau en milieu aqueux est une propriété nettement plus intéressante dans notre cas que la réversibilité électrochimique. Ainsi, l'utilisation de ces nouveaux matériaux carbonés pour l'étude de l'électrochimie des nucléosides apparaît particulièrement appropriée.

**Références bibliographiques du chapitre V**

- <sup>1</sup> Y. Yamamoto, T. Imai, K. Tanabe, T. Tsuno, Y. Kumazawa, N. Fujimori, *Diamond Relat. Mater.* **1997**, 6, 1057–1061.
- <sup>2</sup> A. V. Sukhadolau, E. V. Ivakin, V. G. Ralchenko, A. V. Khomich, A. V. Vlasov, A. F. Popovich, *Diamond Relat. Mater.* **2005**, 14, 589–593.
- <sup>3</sup> G. M. Swain, *J. Electrochem. Soc.* **1999**, 141, 3382–3393.
- <sup>4</sup> R. Kalish, *Carbon* **1999**, 37, 781–785.
- <sup>5</sup> M. Hupert, A. Muck, J. Wang, J. Stotter, Z. Cvackova, S. Haymond, Y. Show, G. M. Swain, *Diamond Relat. Mater.* **2003**, 12, 1940–1949.
- <sup>6</sup> M. Yanagisawa, L. Jiang, D. A. Tryk, K. Hashimoto, A. Fujishima, *Diamond Relat. Mater.* **1999**, 8, 2059–2063.
- <sup>7</sup> M. Yoshimura, K. Honda, T. Kondo, R. Uchikado, Y. Einaga, T. N. Rao, D. A. Tryk, A. Fujishima, *Diamond Relat. Mater.* **2002**, 11, 67–74.
- <sup>8</sup> H. B. Martin, A. Argoitia, U. Landau, A. B. Anderson, J. C. Angus, *J. Electrochem. Soc.* **1996**, 143, L133–L136.
- <sup>9</sup> G. M. Swain, P. Ramesham, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 345–351.
- <sup>10</sup> J. Xu, Q. Chen, G. M. Swain, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 3146–3154.
- <sup>11</sup> G. M. Swain, *Adv. Mater.* **1996**, 6, 388–392.
- <sup>12</sup> R. Ramesham, M. F. Rose, *Diamond Relat. Mater.* **1997**, 6, 17–27.
- <sup>13</sup> S. Ferro, A. De Battisti, *Electrochim. Acta* **2002**, 47, 1641–1649.
- <sup>14</sup> C. H. Goeting, F. Jones, J. S. Foord, J. C. Eklund, F. Marken, R. G. Compton, P. R. Chalken, C. Johnston, *J. Electroanal. Chem.* **1998**, 442, 207–216.
- <sup>15</sup> T. Yano, D. A. Tryk, K. Hashimoto, A. Fujishima, *J. Electrochem. Soc.* **1998**, 145, 1870–1876.
- <sup>16</sup> N. G. Ferreira, L. L. G. Silva, E. J. Corat, V. J. Trava-Airoldi, *Diamond Relat. Mater.* **2002**, 11, 1523–1531.
- <sup>17</sup> M. Yanagisawa, L. Jiang, D. A. Tryk, K. Hashimoto, A. Fujishima, *Diamond Relat. Mater.* **1999**, 8, 2059–2063.
- <sup>18</sup> E. Mahé, D. Devilliers, Ch. Comninellis, *Electrochim. Acta* **2005**, 50, 2263–2277.
- <sup>19</sup> T. N. Rao, D. A. Tryk, K. Hashimoto, A. Fujishima, *J. Electrochem. Soc.* **1999**, 146, 680–684.
- <sup>20</sup> M. C. Granger, G. M. Swain, *J. Electrochem. Soc.* **1999**, 146, 4551–4558.
- <sup>21</sup> H. Notsu, I. Yagi, T. Tatsuma, D. A. Tryk, A. Fujishima, *J. Electroanal. Chem.* **2000**, 492, 31–37.

- <sup>22</sup> D. A. Tryk, K. Tsunozaki, T. N. Rao, A. Fujishima, *Diamond Relat. Mater.* **2001**, 10, 1804–1809.
- <sup>23</sup> J. Iniesta, P. A. Michaud, M. Panizza, G. Cerisola, A. Aldaz, Ch. Comninellis, *Electrochim. Acta* **2001**, 46, 3573–3578.
- <sup>24</sup> R. Bellagamba, P. A. Michaud, Ch. Comninellis, N. Vatista, *Electrochem. Comm.* **2002**, 4, 171–176.
- <sup>25</sup> A. Perret, W. Haenni, N. Skinner, X.-M. Tang, D. Gandini, C. Comninellis, B. Correa, G. Foti, *Diamond Relat. Mater.* **1999**, 8, 820–823.
- <sup>26</sup> E. Brillas, B. Boye, I. Sirés, J. A. Garrido, R. M. Rodriguez, C. Arias, P.-L. Cabot, C. Comninellis, *Electrochim. Acta* **2004**, 49, 4487–4496.
- <sup>27</sup> G. Lissens, J. Pieters, M. Verhaege, L. Pinoy, W. Verstraete, *Electrochim. Acta* **2003**, 48, 1655–1663.
- <sup>28</sup> F. Montilla, P. A. Michaud, E. Morallon, J. L. Vasquez, Ch. Comninellis, *Electrochim. Acta* **2002**, 47, 3509–3513.
- <sup>29</sup> M. Panizza, P.A. Michaud, G. Cerisola, Ch. Comninellis, *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 507, 206–214.
- <sup>30</sup> M. Panizza, G. Cerisola, *Electrochim. Acta* **2004**, 49, 3221–3226.
- <sup>31</sup> A. V. Diniz, N. G. Ferreira, E. J. Corat, V. J. Trava-Airoldi, *Diamond Relat. Mater.* **2003**, 12, 577–582.
- <sup>32</sup> A. Morao, A. Lopes, M. T. Pessoa de Amorim, I. C. Gonçalves, *Electrochim. Acta* **2004**, 49, 1587–1595.
- <sup>33</sup> P. Canizares, C. Saez, J. Lobato, M. A. Rodrigo, *Electrochim. Acta* **2004**, 49, 4641–4650.
- <sup>34</sup> C. Flox, J. A. Garrido, R. M. Rodriguez, F. Centellas, P.-L. Cabot, C. Arias, E. Brillas, *Electrochim. Acta* **2005**, 50, 3685–3692.
- <sup>35</sup> A. M. Polcaro, A. Vacca, M. Mascia, S. Palmas, *Electrochim. Acta* **2005**, 50, 1841–1847.
- <sup>36</sup> C. Levy-Clement, N. A. Ndao, A. Katty, M. Bernard, A. Deneuveille, C. Comninellis, A. Fujishima, *Diamond Relat. Mater.* **2003**, 12, 606–612.
- <sup>37</sup> K. Serrano, P. A. Michaud, Ch. Comninellis, A. Savall, *Electrochim. Acta* **2002**, 48, 431–436.
- <sup>38</sup> M. S. Saha, T. Furuta, Y. Nishiki, *Electrochem. Comm.* **2004**, 6, 201–204.
- <sup>39</sup> J. Iniesta, P. A. Michaud, M. Panizza, Ch. Comninellis, *Electrochem. Comm.* **2001**, 3, 346–351.
- <sup>40</sup> J. Iniesta, P. A. Michaud, M. Panizza, G. Cerisola, A. Aldaz, Ch. Comninellis, *Electrochim. Acta* **2001**, 46, 3573–3578.
- <sup>41</sup> D. Zollinger, U. Griesbach, H. Putter, Ch. Comninellis, *Electrochem. Comm.* **2004**, 6, 600–604.
- <sup>42</sup> N. Wangfuengkanagul, O. Chailapakul, *Talanta* **2002**, 58, 1213–1219.
- <sup>43</sup> W. Sianproh, N. Wangfuengkanagul, O. Chailapakul, *Anal. Chim. Acta* **2003**, 499, 183–189.

- <sup>44</sup> W. Siangproh, P. Ngamukot, O. Chailapakul, *Sensors and Actuators B* **2003**, 91, 60–66.
- <sup>45</sup> N. Wangfuengkanagul, W. Siangproh, O. Chailapakul, *Talanta* **2004**, 64, 1183–1188.
- <sup>46</sup> K. Boonsong, S. Chuanuwatanakul, N. Wangfuengkanagul, O. Chailapakul, *Sensors and Actuators B* **2005**, 108, 627–632.
- <sup>47</sup> Y. Zhang, S. Asahina, M. Suzuki, S. Yoshihara, T. Shirakashi, *Surface and Coatings Technology* **2003**, 169–170, 303–306.
- <sup>48</sup> V. Suryanarayanan, Y. Zhang, S. Yoshihara, T. Shirakashi, *Sensors and Actuators B* **2004**, 102, 169–173.
- <sup>49</sup> T. A. Ivandini, B. V. Sarada, C. Terashima, T. N. Rao, D. A. Tryk, H. Ishiguro, Y. Kubota, A. Fujishima, *J. Chromatography B* **2003**, 791, 63–72.
- <sup>50</sup> T. N. Rao, B. V. Sarada, D. A. Tryk, A. Fujishima, *J. Electroanal. Chem.* **2000**, 491, 175–181.
- <sup>51</sup> Y. Einaga, R. Sato, H. Olivia, D. Shin, T. A. Ivandini, A. Fujishima, *Electrochim. Acta* **2004**, 49, 3989–3995.
- <sup>52</sup> J. Zhang, M. Oyama, *Microchemical Journal* **2004**, 78, 217–222.
- <sup>53</sup> L. Codognoto, S. A. S. Machado, L. A. Avaca, *Diamond Relat. Mater.* **2002**, 11, 1670–1675.
- <sup>54</sup> A. R. Mahon, J. H. MacDonald, A. Mainwood, R. J. Ott, *Diamond Relat. Mater.* **1999**, 8, 1748–1752.
- <sup>55</sup> K. Takahashi, M. Tanga, O. Takai, H. Okamura, *Diamond Relat. Mater.* **2003**, 12, 572–576.
- <sup>56</sup> E. Popa, D. A. Tryk, A. Fujishima, *Electrochemical Society Proceedings* **2000**, 99–32, 512–517.
- <sup>57</sup> C. Prado, G.–U. Flechsig, P. Grundler, J. S. Foord, F. Marken, R. G. Compton, *Analyst* **2002**, 127, 329–332.
- <sup>58</sup> T. A. Ivandini, B. V. Sarada, T. N. Rao, A. Fujishima, *Analyst* **2003**, 128, 924–929.
- <sup>59</sup> J. Wang, G. Chen, A. Muck, D. Shin, A. Fujishima, *J. Chromatography A* **2004**, 1022, 207–212.
- <sup>60</sup> H. Gu, X. Su, K. P. Loh, *Chem. Phys. Letters* **2004**, 388, 483–487.
- <sup>61</sup> H. Gu, X. Su, K. P. Loh, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 13611–13618.
- <sup>62</sup> R. J. Hamers, J. E. Butler, T. Lasseter, B. M. Nichols, J. N. Russel Jr., K.–Y. Tse, W. Yang, *Diamond Relat. Mater.* **2005**, 14, 661–668.
- <sup>63</sup> W. Yang, J. E. Butler, J. N. Russel Jr., R. J. Hamers, *Langmuir* **2004**, 20, 6778–6787.
- <sup>64</sup> S. Ferro, M. Dal Colle, A. De Battisti, *Carbon* **2005**, 43, 1191–1203.
- <sup>65</sup> H. B. Suffredini, V. A. Pedrosa, L. Codognoto, S. A. S. Machado, R. C. Rocha–Filho, L. A. Avaca, *Electrochim. Acta* **2004**, 49, 4021–4026.
- <sup>66</sup> N. Simon, H. Girard, D. Ballutaud, S. Ghodbane, A. Deneuille, M. Herlem, A. Etcheberry, *Diamond Relat. Mater.* **2005**, 14, 1179–1182.

- <sup>67</sup> I. Duo, A. Fujishima, Ch. Comninellis, *Electrochem. Comm.* **2003**, 5, 695–700.
- <sup>68</sup> M. H. P. Santana, L. A. De Faria, J. F. C. Boodts, *Electrochim. Acta* **2005**, 50, 2017–2027.
- <sup>69</sup> F. Marken, C. A. Paddon, D. Asogan, *Electrochem. Comm.* **2002**, 4, 62–66.
- <sup>70</sup> I. Yagi, H. Notsu, T. Kondo, D. A. Tryk, A. Fujishima, *J. Electroanal. Chem.* **1999**, 473, 173–178.
- <sup>71</sup> G. Pastor–Moreno, D. J. Riley, *Electrochim. Acta* **2002**, 47, 2589–2595.
- <sup>72</sup> G. Pastor–Moreno, D. J. Riley, *Electrochem. Comm.* **2002**, 4, 218–221.
- <sup>73</sup> A. E. Fischer, Y. Show, G. M. Swain, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 2553–2560.
- <sup>74</sup> A. D. Modestov, Y. E. Evstefeeva, Y. V. Pleskov, V. M. Mazin, V. P. Varnin, I. G. Teremetskaya, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, 431, 211–218.
- <sup>75</sup> R. C. Engstrom, V. A. Strasser, *Anal. Chem.* **1984**, 56, 136–141.
- <sup>76</sup> P. Subramanian, G. Dryhurst, *J. Electroanal. Chem.* **1987**, 224, 137–162.
- <sup>77</sup> G. Dryhurst, *Talanta* **1972**, 19, 769–787.
- <sup>78</sup> F. Miomandre, S. Sadki, P. Audebert, R. Méallet–Renault, *Electrochimie : Des concepts aux applications*, Dunod.

## **Chapitre VI :**

Electrochimie des nucléosides sur diamant  
dopé au bore (BDD)



Au cours du chapitre précédent, nous avons présenté les propriétés électrochimiques particulières du diamant dopé bore, notamment sa large fenêtre de potentiel électrochimique en milieu aqueux et son faible et stable courant de fond. Ces propriétés sont très intéressantes afin de détecter des espèces dont l'oxydation se produit à un potentiel anodique relativement élevé.

Nous allons ainsi montrer au cours de ce chapitre qu'il est possible de détecter l'oxydation des deux nucléosides électroactifs que sont la 2'-désoxyguanosine et la 2'-désoxyadénosine sur une électrode de diamant dopé bore, en raison, notamment, de la large fenêtre d'électroinactivité du matériau.

La comparaison avec les résultats obtenus sur une électrode classique de carbone vitreux illustrera l'intérêt d'utiliser une électrode de diamant dopé bore.

Enfin, nous étudierons la faisabilité de l'extension de cette étude à la détection de nucléotides, d'oligonucléotides et de l'ADN.

## I. Etat de l'art

### I.A. Quelques rappels sur l'ADN

L'ADN<sup>1,2</sup>, ou Acide DésoxyriboNucléique, est une molécule d'importance biologique fondamentale car elle constitue le support de l'information génétique. En effet, elle renferme les informations nécessaires à la reproduction, au développement, au contrôle et à l'entretien des organismes vivants.

D'un point de vue chimique, l'ADN est un acide faible, constitué par la répétition de quatre groupements organiques de base appelés nucléotides. Chaque nucléotide est à son tour un ensemble de trois parties : un groupe phosphate, un sucre, le désoxyribose, et une base azotée ou base nucléique. Alors que tous les groupes phosphates et toutes les molécules de désoxyribose qui composent l'ADN sont identiques, les bases peuvent être de deux types : les pyrimidines (Thymine T et Cytosine C) et les purines (Adénine A et Guanine G).

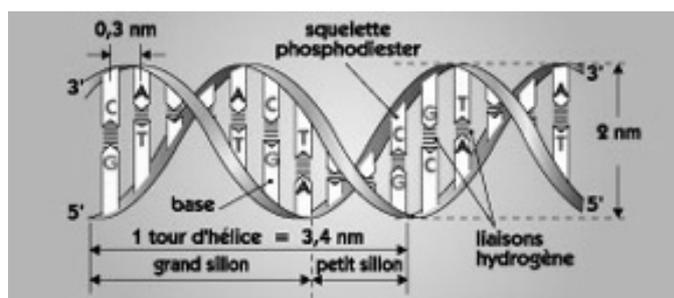


Figure I.1 Conformation moléculaire de l'ADN.

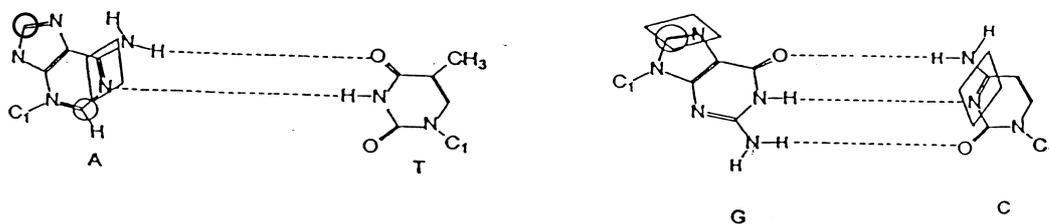
Une molécule d'ADN à l'état naturel est formée de deux chaînes polynucléotidiques, appelées brins, appariées et enroulées en une spirale pour former une double hélice (**Fig. I.1**).

L'appariement de deux chaînes polynucléotidiques est possible grâce à la complémentarité des bases. En effet, l'adénine présente deux régions qui peuvent former des liaisons hydrogènes avec la thymine. La guanine et la cytosine sont capables, quant à elles, de former trois liaisons hydrogènes grâce à deux groupes  $-NH$  et un atome d'oxygène. Ces propriétés chimiques permettent un appariement extrêmement spécifique de deux chaînes contiguës d'ADN. En effet, un brin d'ADN composé d'une suite donnée de nucléotides ne peut s'apparier avec un autre brin que si celui-ci est formé des nucléotides complémentaires dans le même ordre. Ce processus, à la base du concept des biocapteurs à ADN, est appelé hybridation. La dénaturation est le phénomène inverse, c'est-à-dire qu'elle consiste en la séparation des liaisons faiblement énergétiques entre les deux brins complémentaires appariés, sans altérer la structure primaire de chaque brin.

L'ADN peut être divisé en fragments de quelques dizaines de nucléotides qui sont appelés oligonucléotides ou OligoDésoxyriboNucléiques (ODN).

### **I.B. Les réactions d'oxydation des nucléosides**

Afin d'étudier la détection de l'ADN, il est important de connaître les conditions d'oxydation des acides nucléiques (potentiel, milieu, pH...). Dans les acides nucléiques, les seuls groupements électroactifs sont les bases azotées (adénine, guanine, thymine et cytosine) et le ribose (mais à un potentiel d'oxydation inaccessible en milieu aqueux). La **figure I.2** présente les sites d'oxydation et de réduction des quatre bases appariées entre elles.

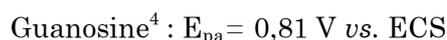
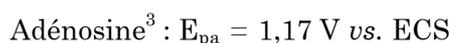


**Figure I.2** Appariement des bases nucléiques selon Watson et Crick. Les sites de réduction sont indiqués par des rectangles et les sites d'oxydation par des cercles. A est l'adénine, T la thymine, G la guanine et C la cytosine.

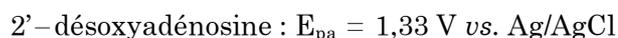
### I.B.1. L'électrochimie des nucléosides

Nous nous sommes particulièrement intéressés aux nucléosides qui sont les formes les plus proches de celles rencontrées dans l'ADN, puisqu'ils renferment la base azotée et le désoxyribose. Les nucléosides sont donc des glycosylamines formées par le rattachement d'une nucléobase à un anneau de ribose. Leurs conditions d'oxydation et de réduction, comme le potentiel par exemple, sont légèrement différentes de celles des bases azotées seules du fait de l'encombrement stérique et de la différence de densité de charge. Les formules chimiques de ces composés et des produits des réactions d'oxydation, ainsi que les réponses en voltamétrie cyclique (CV) et en voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV) sur une électrode de carbone vitreux activé sont données dans la **figure I.3**. L'irréversibilité du processus est confirmée par la forme de la courbe en voltamétrie cyclique puisqu'aucun pic n'apparaît au balayage retour.

Dans la littérature, seules les valeurs des pics d'oxydation de l'adénosine et de la guanosine sont données pour un pH de 7 sur une électrode de graphite pyrolytique :

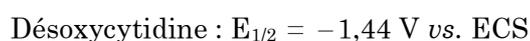
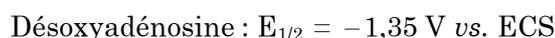


Expérimentalement, une oxydation électrochimique des dérivés de la guanine et de l'adénine est mise en évidence sur une électrode de carbone vitreux (**Fig. I.3**):



Les potentiels d'oxydation obtenus sont donc relativement peu éloignés de ceux de la littérature et décalés d'une valeur de l'ordre de 0,17 V. De plus, le fait que nous n'obtenons aucune réaction d'oxydation pour la désoxythymidine et la désoxycytidine est confirmé par la littérature.

En ce qui concerne la réduction, la littérature ne prévoit aucune réaction en milieu aqueux pour les dérivés de la thymine et de la guanine. En effet, ces deux bases sont protonées. Or, le mécanisme envisagé de réduction des bases débute par une protonation de l'atome d'azote de la fonction imine, ce qui peut expliquer le fait que la réduction soit plus difficile pour la thymine et la guanine. Ainsi, pour les dérivés de la cytosine et de l'adénine, la réduction est possible et les potentiels de demi-vague sont les suivants<sup>5</sup> :



Cependant, nous n'avons observé de réduction ni sur carbone vitreux, ni sur diamant dopé au bore en raison de la limite inférieure d'électroinactivité de ces matériaux ("mur" du solvant).

### **I.B.2. Les mécanismes d'oxydation des nucléosides**

Il existe peu de publications dans la littérature concernant l'électrochimie des nucléosides en comparaison avec celle des bases nucléiques<sup>6</sup>, et peu d'équipes se sont intéressées à leur mécanisme d'oxydation.

#### **I.B.2.a. Oxydation de la guanosine**

Le produit primaire de l'électro-oxydation de la guanosine semble être la 8-oxo-guanosine<sup>7,8</sup>. Le potentiel d'oxydation du produit de la réaction électrochimique étant inférieur à celui du nucléoside, une série de réactions secondaires en découle.

D'autres équipes citent un mécanisme présentant la formation des différents sous-produits en fonction du pH et du potentiel. Ainsi, P. Subramanian et G. Dryhurst ont établi que la première étape d'électro-oxydation implique la réaction d'un électron et d'un proton, conduisant ainsi à la formation d'un radical libre avec un électron non apparié en position C8. Ce radical primaire va réagir avec la guanosine et l'eau pour donner d'autres radicaux qui vont ensuite subir une série de réactions chimiques et électrochimiques pour conduire finalement à de nouveaux di- ou tri-nucléosides de guanine<sup>4</sup>.

R. N. Goyal *et al.* ont montré que l'électro-oxydation complète de la guanosine impliquait le transfert de 4 électrons et de 4 protons<sup>9</sup>. La première étape est la même que celle proposée par P. Subramanian et G. Dryhurst, et conduit à la formation d'un radical libre. Celui-ci est ensuite hydrolysé en un radical hydroxy électroactif qui va subir une réaction redox impliquant le transfert d'un électron et d'un proton, afin de former la 8-hydroxyguanosine. Cette dernière espèce est rapidement oxydée (transfert de 2 électrons et 2 protons) pour former la diimine correspondante. Celle-ci va ensuite subir une série de réactions chimiques afin de former la 5-guanidinohydantoïne à pH 7.

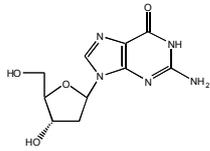
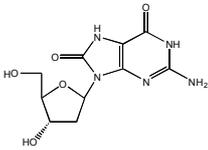
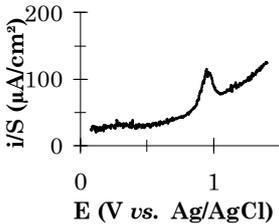
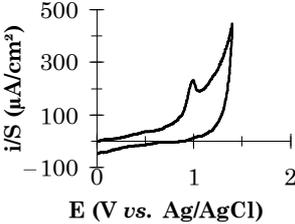
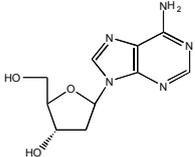
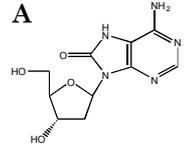
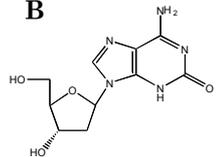
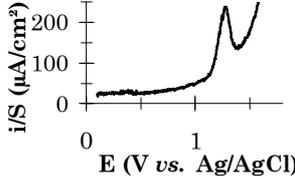
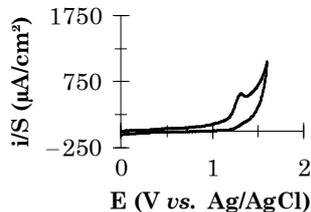
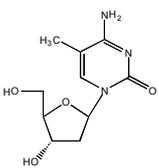
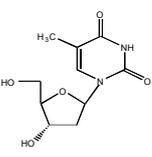
#### **I.B.2.b. Oxydation de l'adénosine**

Comme pour la guanosine, le mécanisme d'oxydation électrochimique de l'adénosine diffère selon les équipes de recherche. Les produits majoritaires de l'électro-oxydation de l'adénosine semblent être la 8-oxo-adénosine et la 4-oxo-adénosine<sup>3</sup>.

R. N. Goyal et A. Sangal ont montré que l'électro-oxydation de l'adénosine consommait près de 5 électrons par mole à pH 7. La première étape de l'oxydation de l'adénosine, impliquant le transfert de 2 électrons et de 2 protons, forme la 2-hydroxadénosine. Celle-ci va réagir avec l'eau pour former la 2,8-dihydroxadénosine (2 électrons, 2 protons). Cette dernière espèce va ensuite subir une réaction d'oxydation (1

électron, 1 proton) et former des espèces radicalaires. Des dimères formés par un couplage oxo sont rapidement obtenus<sup>10</sup>.

Ainsi, les mécanismes d'oxydation de ces deux nucléosides demeurent peu compris à l'heure actuelle. De plus, les formules chimiques des produits des réactions d'oxydation des nucléosides présentées dans la **figure II.3** sont admises par les biologistes, mais font néanmoins l'objet de points de divergence entre les différentes équipes.

nucléoside	produit	DPV	CV
 guanosine	 8-oxo-guanosine	 i/S ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) vs. E (V vs. Ag/AgCl)	 i/S ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) vs. E (V vs. Ag/AgCl)
 adénosine	<p>(A)  8-oxo-adénosine</p> <p>(B)  4-oxo-adénosine</p>	 i/S ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) vs. E (V vs. Ag/AgCl)	 i/S ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) vs. E (V vs. Ag/AgCl)
 cytidine	<p>Pas de réaction possible dans les conditions opératoires utilisées</p>		
 thymidine	<p>Pas de réaction possible dans les conditions opératoires utilisées</p>		

**Figure I.3** Formules chimiques des nucléosides, des produits des réactions d'oxydation et voltammogrammes obtenus en voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV) et voltamétrie cyclique (CV) sur une électrode de carbone vitreux activé ( $S=0,07 \text{ cm}^2$ ) dans une solution de  $0,1 \text{ M}$  en nucléoside dans du tampon phosphate pH 7.

## II. Les réactions d'oxydation des nucléosides sur diamant dopé bore

### II.A. La technique utilisée : la voltamétrie impulsionnelle différentielle

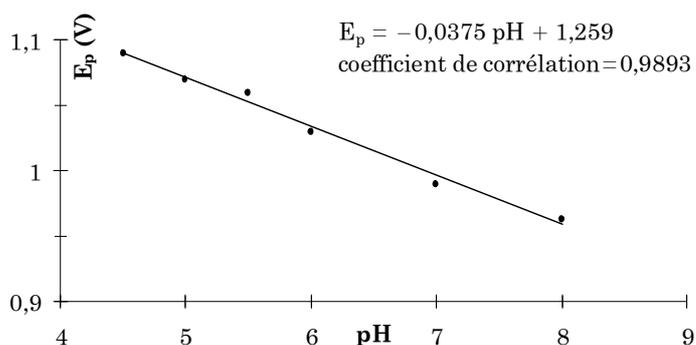
Nous avons choisi de travailler avec la voltamétrie impulsionnelle différentielle, ou DPV, en raison de sa sensibilité accrue par l'échantillonnage différentiel et de l'obtention de pics qui facilitent le repérage des potentiels redox et le découplage des couples redox.

Pour les voltamétries impulsionnelles différentielles réalisées, nous avons appliqué les paramètres suivants : une amplitude de saut de potentiel de 25 mV, une largeur d'impulsion ( $\Delta t$ ) de 60 ms, et une vitesse de balayage de 22,2 mV s<sup>-1</sup>.

### II.B. Etude de l'oxydation électrochimique des nucléosides sur diamant dopé bore

#### II.B.1. Choix du pH de travail

Afin de déterminer le pH à utiliser pour étudier l'oxydation des nucléosides, nous avons réalisé des voltamétries impulsionnelles différentielles sur l'électrode de carbone vitreux activé dans des solutions tamponnées de différents pH contenant 1 mM de 2'-désoxyguanosine. Pour les pH compris entre 6 et 8, nous avons utilisé du tampon phosphate, et pour les pH de 4,5 à 5,5, du tampon acétate. La **figure II.1** présente l'évolution du potentiel d'oxydation ( $E_p$ ) de la 2'-désoxyguanosine avec le pH de la solution.



**Figure II.1** Evolution du potentiel d'oxydation ( $E_p$ ) avec le pH de la solution de 1 mM 2'-désoxyguanosine dans du tampon phosphate ou acétate sur une électrode de carbone vitreux activé ( $S=0,07 \text{ cm}^2$ ).

Sur la **figure II.1** nous pouvons observer que le potentiel d'oxydation diminue linéairement avec le pH. Ainsi, nous avons choisi de travailler avec des solutions à un pH de 7 afin d'obtenir une valeur faible du potentiel d'oxydation en raison de la limite anodique de

la fenêtre de potentiel électrochimique des matériaux carbonés. De plus, afin de conserver l'intégrité structurale des molécules biologiques, il est préférable de travailler dans un milieu tamponné proche de la neutralité.

Cette figure permet également de s'interroger sur le type de mécanisme de la réaction d'oxydation de la 2'-désoxyguanosine. En effet, nous pouvons observer une dépendance du potentiel avec le pH, et, d'après ce qui a été vu précédemment, la réaction est irréversible. La pente peut alors être donnée par la formule suivante, où  $n_{\text{protons}}$  et  $n_{\text{électrons}}$  représentent respectivement les nombres de protons et d'électrons échangés :

$$p = -2,3 \frac{n_{\text{protons}}}{\alpha n_{\text{électrons}}} \frac{\mathcal{R}T}{F} = -0,06 \frac{n_{\text{protons}}}{\alpha n_{\text{électrons}}} \quad (\text{II.1})$$

D'après la **figure II.1**, la pente de la droite obtenue est proche de  $-30 \text{ mV}$  ( $p = -37,5$ ). Cependant, nous ne connaissons pas la valeur du coefficient de transfert de charge  $\alpha$ , donc il nous est impossible de déterminer le rapport entre nombre de protons et nombre d'électrons. Nous pouvons remarquer que, pour une valeur de  $\alpha$  de 0,5, nous obtenons un rapport de  $\frac{1}{4}$  entre nombre de protons et d'électrons, ce qui est en désaccord avec la **figure I.3** (échange de 2 électrons et 2 protons). Ceci semble indiquer un mécanisme plus compliqué impliquant les réactions de sous-produits se produisant à des potentiels inférieurs à celui de l'oxydation de la 2'-désoxyguanosine<sup>4,9</sup>. La compréhension du mécanisme de la réaction d'oxydation des nucléosides n'étant pas l'objectif de notre étude, nous n'avons pas poursuivi dans cette voie. Cependant, il pourrait être intéressant de réaliser des études des produits formés par spectrométrie de masse ou en spectroscopie Raman, afin d'obtenir des éléments supplémentaires permettant de comprendre le mécanisme mis en jeu lors de ces réactions.

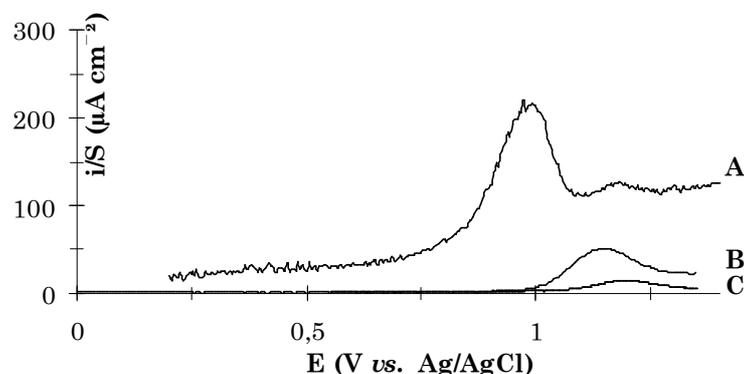
## **II.B.2. Réponse électrochimique en voltamétrie impulsionnelle différentielle**

### **II.B.2.a. Oxydation de la 2'-désoxyguanosine**

Notre première étude a consisté en la détection de l'oxydation de la 2'-désoxyguanosine dans une solution de tampon phosphate à pH 7. Nous avons réalisé des voltamétries impulsionnelles différentielles sur une électrode de diamant dopé au bore après synthèse et après activation, et sur une électrode de carbone vitreux activé. La **figure II.2** présente les voltamogrammes obtenus pour les différents matériaux d'électrode dans une solution à 1 mM de 2'-désoxyguanosine.

La **figure II.2** montre que la densité de courant d'oxydation dépend fortement du matériau d'électrode. En effet, l'électrode de carbone vitreux présente une intensité de pic plus importante que le diamant. Cependant, la surface géométrique utilisée ici pour chacune

des électrodes ( $0,196 \text{ cm}^2$  pour le diamant et  $0,07 \text{ cm}^2$  pour le carbone vitreux) peut être différente de la surface électroactive réelle, ce qui induirait une erreur sur la valeur de la densité de courant. De plus, le courant de fond est beaucoup plus faible dans le cas du carbone diamant que du carbone vitreux. Cette propriété est un avantage important de ce matériau d'électrode, permettant d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit.



**Figure II.2** Réponse en voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV) dans une solution de 1 mM de 2'-désoxyguanosine dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7 sur une électrode de : (A) carbone vitreux activé ( $S=0,07 \text{ cm}^2$ ), (B) carbone diamant oxygéné ( $S=0,196 \text{ cm}^2$ ), et (C) carbone diamant hydrogéné ( $S=0,196 \text{ cm}^2$ ).

Cette figure montre également l'influence de l'activation de l'électrode de diamant sur la valeur du courant de pic obtenue. En effet, l'activation du diamant entraîne la création de terminaisons oxygènes, et la surface devient ainsi hydrophile. La densité de courant de pic et le potentiel de pic sur l'électrode oxygénée sont respectivement de  $36 \mu\text{A/cm}^2$  et  $1,15 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ , alors que ces valeurs sur l'électrode hydrogénée après synthèse et sans pré-traitement préalable sont respectivement de  $9 \mu\text{A/cm}^2$  et  $1,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ . Cette activation semble donc rendre le diamant plus réactif vis-à-vis de l'oxydation des nucléosides. Ceci confirme le fait que, dans le cas d'une électrode utilisée directement après synthèse, la réaction d'oxydation est en compétition avec d'autres réactions se produisant en surface (**Fig. III.1** du chapitre V). Ces résultats sont en opposition avec ceux concernant la réversibilité des couples redox décrits précédemment, ce qui peut s'expliquer par des mécanismes impliqués différents (mécanisme EC ici). Nous avons également remarqué que les valeurs du courant de pic d'oxydation du carbone diamant hydrogéné n'étaient pas très reproductibles et évoluaient sensiblement au fur et à mesure des expériences, puisque lorsqu'un balayage de potentiel entre le potentiel d'abandon du système et  $1,4 \text{ V vs. Ag /AgCl}$  est réalisé, la surface de diamant est oxydée et donc modifiée progressivement. L'électrode de diamant hydrogéné est trop instable et n'est donc pas adaptée à notre objectif. Enfin, plus le potentiel d'oxydation est fort, plus la résistance de transfert de charge est importante et donc plus il

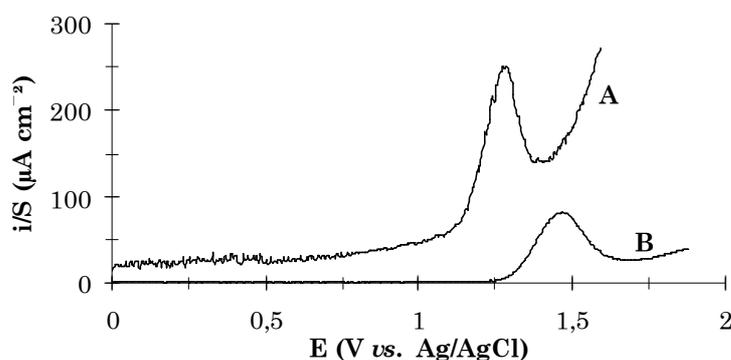
faut d'énergie pour produire la réaction. Ceci confirme que l'électrode de diamant hydrogéné n'est pas adaptée pour l'étude des réactions d'oxydation des nucléosides.

Ainsi, dans la suite de notre étude, nous limiterons nos comparaisons aux électrodes de carbone vitreux et de carbone diamant activés.

Enfin, cette figure montre que les potentiels d'oxydation de la 2'-désoxyguanosine à 1 mM sont respectivement de 1 et 1,15 V *vs.* Ag/AgCl sur carbone vitreux et carbone diamant activés. Ceci indique donc que la réaction d'oxydation de la 2'-désoxyguanosine nécessite davantage d'énergie, et donc l'application d'un potentiel plus élevé, sur carbone diamant.

### II.B.2.b. Oxydation de la 2'-désoxyadénosine

Nous nous sommes ensuite intéressés à la réponse électrochimique de l'oxydation de la 2'-désoxyadénosine sur les électrodes activées de carbone vitreux et carbone diamant.



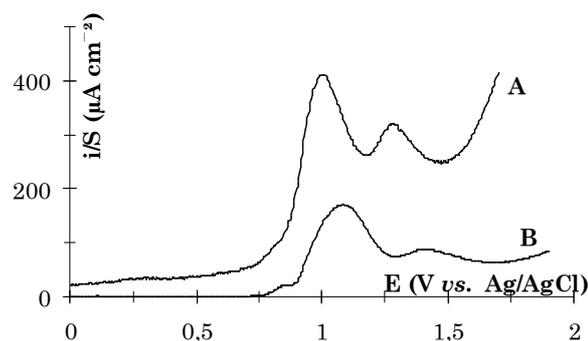
**Figure II.3** Réponse en voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV) dans une solution à 1 mM de 2'-désoxyadénosine dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7 sur : (A) carbone vitreux activé ( $S=0,07 \text{ cm}^2$ ) et (B) carbone diamant oxygéné ( $S=0,196 \text{ cm}^2$ ).

D'après la **figure II.3**, le potentiel d'oxydation du dérivé de l'adénine en solution à 1 mM dans du tampon phosphate à pH 7 est de 1,47 V *vs.* Ag/AgCl sur carbone diamant activé et de 1,33 V *vs.* Ag/AgCl sur carbone vitreux activé, ce qui est supérieur à la valeur de 1,17 V *vs.* ECS obtenue par G. Dryhurst pour l'adénosine sur une électrode de graphite pyrolytique<sup>3</sup>. La valeur de la densité de courant du pic d'oxydation est de 154  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  dans le cas du carbone vitreux, et de 66  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  dans le cas de l'électrode de diamant. Cependant, cette figure montre, dans le cas du carbone vitreux, une surimposition du courant de fond lié au front du solvant, et donc un rapport signal sur courant de fond très défavorable à la détection de cette espèce biologique. Au contraire, la détection de l'oxydation de ce composé sur l'électrode de diamant est possible grâce à la large fenêtre d'électroinactivité de ce matériau

en milieu aqueux. Ceci prouve que les électrodes de diamant dopé bore sont des matériaux carbonés présentant un intérêt majeur pour la détection de la 2'-désoxyadénosine.

### II.B.2.c. Oxydation de la 2'-désoxyguanosine et de la 2'-désoxyadénosine

Après avoir détecté l'oxydation de chacun des nucléosides, nous avons ensuite étudié la réponse électrochimique d'une solution contenant à la fois la 2'-désoxyguanosine et la 2'-désoxyadénosine en mêmes proportions. En effet, ceci pourrait nous permettre d'obtenir la réponse électrochimique complète pour l'ADN en raison de la complémentarité des bases.



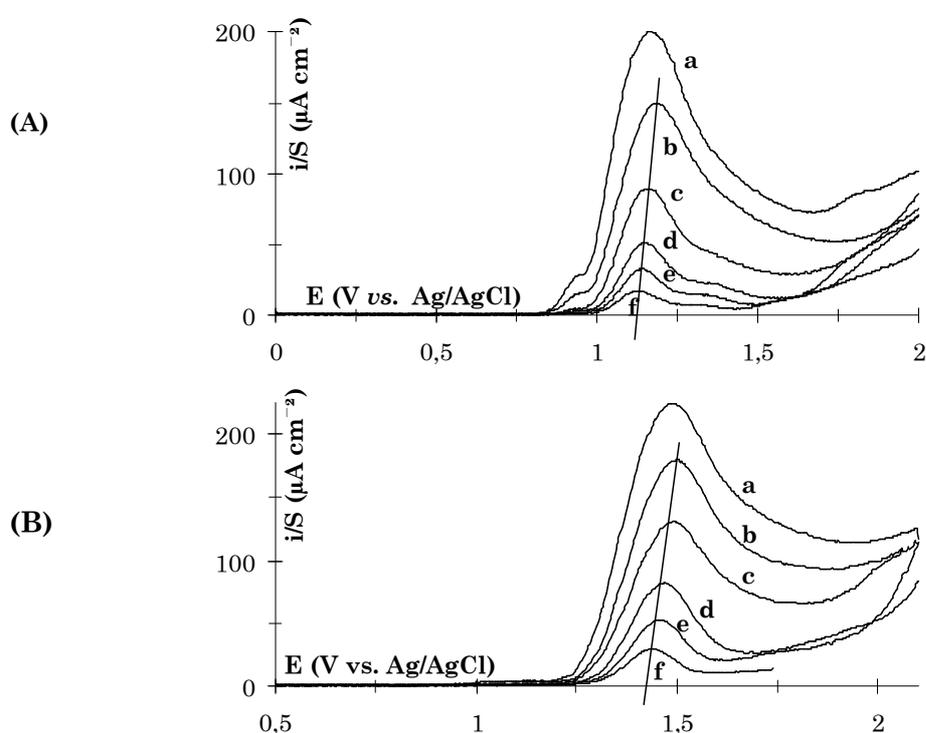
**Figure II.4** Réponse en voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV) dans une solution à 5 mM de 2'-désoxyguanosine et 2'-désoxyadénosine dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7 sur : (A) carbone vitreux activé ( $S=0,07 \text{ cm}^2$ ) et (B) carbone diamant oxygéné ( $S=0,196 \text{ cm}^2$ ).

La **figure II.4** présente les réponses obtenues en voltamétrie impulsionnelle différentielle sur les électrodes de carbone vitreux et carbone diamant activés dans une solution contenant la même proportion de chacun des deux nucléosides. La **figure II.4A** présente deux pics à des potentiels de 1 et 1,3 V vs. Ag/AgCl, ce qui correspond à l'oxydation sur carbone vitreux de la 2'-désoxyguanosine et de la 2'-désoxyadénosine respectivement. De même, les potentiels d'oxydation pour la 2'-désoxyguanosine et la 2'-désoxyadénosine à une concentration de 5 mM sont respectivement de 1,1 et 1,4 V vs. Ag/AgCl sur carbone diamant oxygéné (**Fig. II.4B**). Ces valeurs sont légèrement supérieures à celles obtenues dans les deux cas précédents (parties II.B.2.a et b), la concentration en nucléoside utilisée ici étant elle-même supérieure, ce qui sera confirmé par la suite lors de l'étude de l'influence de la concentration en solution sur les réponses électrochimiques obtenues. De plus, comme nous l'avons observé dans les parties précédentes, la densité de courant de pic et le courant de fond sont plus importants dans le cas de l'électrode de carbone vitreux. Nous pouvons également observer que la densité de courant d'oxydation est plus importante pour la 2'-désoxyguanosine que pour la 2'-désoxyadénosine, ces deux espèces étant présentes à la même concentration dans le milieu, sur diamant comme sur carbone vitreux. Ceci est dû à un

phénomène d'adsorption sur la surface de l'électrode qui fera l'objet d'une étude plus précise dans le chapitre VII.

### II.B.3. Réponse électrochimique en fonction de la concentration de nucléoside

Après avoir mis en évidence la possibilité de détecter l'oxydation de chaque composé en solution, nous avons étudié l'influence de la concentration en nucléoside sur les réponses électrochimiques en voltamétrie impulsionnelle différentielle en traçant des courbes de calibration.



**Figure II.5** Influence de la concentration en nucléosides dans la solution de tampon phosphate pH 7 (0,1 M) sur les réponses en voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV) sur une électrode de diamant dopé bore oxygéné dans le cas de (A) 2'-désoxyguanosine et (B) 2'-désoxyadénosine.

Concentration en nucléosides dans la solution : (a) 10 mM, (b) 5 mM, (c) 2,5 mM, (d) 1 mM, (e) 0,5 mM, (f) 0,25 mM.

La **figure II.5** présente les courbes obtenues sur une électrode de diamant dopé au bore oxygéné pour des concentrations en 2'-désoxyguanosine (**Fig. II.5A**) ou 2'-désoxyadénosine (**Fig. II.5B**) comprises entre 0,25 et 10 mM. Les allures des courbes obtenues sur une électrode de carbone vitreux activé sont similaires. Dans chaque cas, le potentiel de pic évolue avec la concentration de nucléoside en solution. Il est important de préciser que les valeurs des densités de courant obtenues ici ne peuvent pas être corrélées à

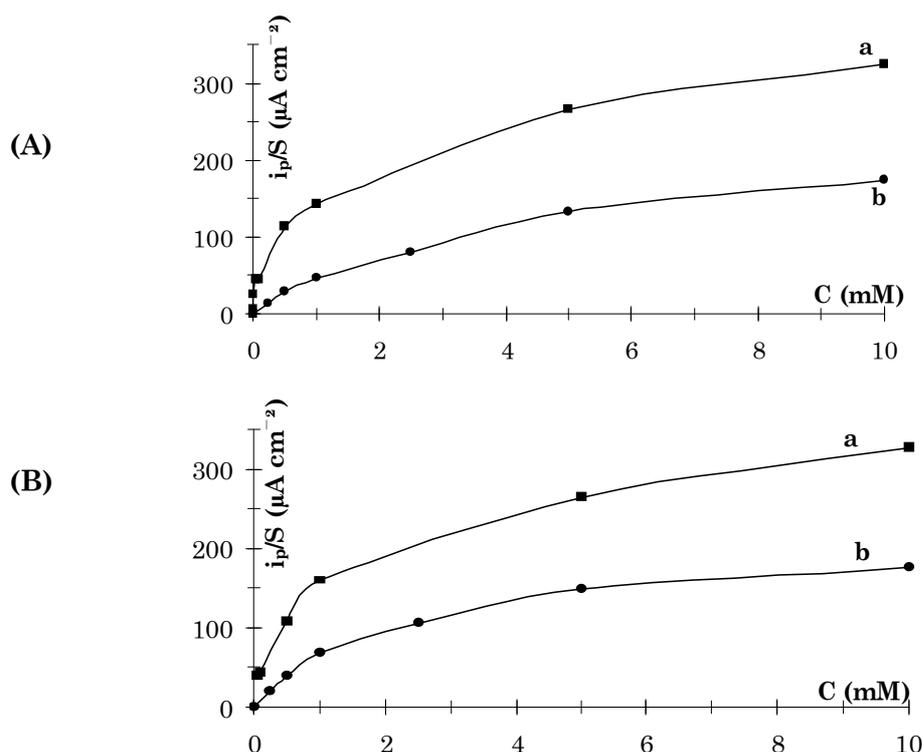
celles de la partie II.B.2. En effet, les électrodes de diamant utilisées dans ces deux parties sont légèrement différentes en terme de structure, de grains et de taux de dopage, et n'ont donc pas les mêmes propriétés électrochimiques.

D'après la **figure II.5A**, nous pouvons observer trois pics correspondant à l'oxydation de la 2'-désoxyguanosine : un pic important à 1,19 V *vs.* Ag/AgCl, précédé d'un pré-pic à 0,95 V *vs.* Ag/AgCl, et suivi par un épaulement vers 1,35 V *vs.* Ag/AgCl pour une concentration en nucléoside de 5 mM par exemple. Le dernier pic devient moins prononcé lorsque la concentration en nucléoside dans la solution augmente. L'obtention de ces trois pics est en accord avec les travaux de P. Subramanian et G. Dryhurst qui obtiennent trois pics d'oxydation de la guanosine à des potentiels de 0,81, 0,99 et 1,2 V *vs.* ECS sur une électrode de graphite pyrolytique<sup>4</sup>. Nos valeurs expérimentales sont supérieures (en moyenne, de 160 mV), en raison de l'irréversibilité de la surface de diamant oxygéné. Le premier pic peut être attribué à des résidus de guanine présents dans la solution et s'oxydant à un potentiel plus faible. Le second pic correspond à l'oxydation de la 2'-désoxyguanosine, alors que la présence du dernier pic demeure inexpliquée à l'heure actuelle.

D'après la **figure II.5B**, seul un pic d'oxydation apparaît dans le cas de la 2'-désoxyadénosine à un potentiel de l'ordre de 1,5 V *vs.* Ag/AgCl, ce qui est accord avec les travaux de R. N. Goyal *et al.* concernant l'oxydation de l'adénosine sur des électrodes de graphite pyrolytique et de carbone vitreux<sup>10</sup>.

D'après la **figure II.5**, l'évolution du potentiel de pic d'oxydation est linéaire avec la concentration pour chacun des nucléosides, à l'exception de la concentration de 10 mM. En effet, nous pouvons observer une diminution du potentiel de pic pour cette valeur. Ceci peut être dû à la limite de solubilité du composé, et donc à une adsorption du nucléoside sur la surface de l'électrode.

La **figure II.6** montre l'évolution de la densité de courant du pic d'oxydation pour chacun des nucléosides sur des électrodes de carbone vitreux ou de diamant activés. Cette évolution en fonction de la concentration en nucléoside en solution est similaire pour les deux matériaux d'électrode et non linéaire, aussi bien pour la 2'-désoxyguanosine que pour la 2'-désoxyadénosine. Cette non-linéarité peut s'expliquer par un phénomène d'adsorption sur la surface de l'électrode comme nous le verrons dans le chapitre VII, ou bien ceci peut être lié au mécanisme multi-étapes de l'électro-oxydation des nucléosides<sup>6</sup>.



**Figure II.6** Evolution de la densité de courant du pic d'oxydation du nucléoside (A) 2'-désoxyguanosine et (B) 2'-désoxyadénosine en fonction de sa concentration en solution dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7 sur une électrode de (a) carbone vitreux activé, (b) carbone diamant oxygéné.

De plus, nous avons cherché la concentration minimale en nucléoside telle que l'oxydation soit observable. Celle-ci est la même pour le carbone vitreux et le carbone diamant, et a pour valeurs 10  $\mu\text{M}$  dans le cas de la 2'-désoxyguanosine, et 50  $\mu\text{M}$  dans le cas de la 2'-désoxyadénosine. Il est important de noter ici que, bien que les concentrations limites soient les mêmes sur carbone vitreux et sur carbone diamant pour chacun des deux nucléosides électroactifs, le rapport entre courant de pic et courant de fond est meilleur sur carbone diamant. Par exemple, ce rapport est égal à 3,2 pour le diamant et 1,3 pour le carbone vitreux dans le cas d'une solution à 50  $\mu\text{M}$  de 2'-désoxyadénosine dans du tampon phosphate pH 7. Ceci renforce l'intérêt des électrodes de diamant pour la détection de l'oxydation des nucléosides en raison de la large fenêtre de potentiel électrochimique, mais aussi de son faible et stable courant de fond.

#### **II.B.4. Conclusion sur l'étude de l'oxydation des nucléosides sur diamant dopé bore**

Au cours de cette partie, nous avons mis en évidence la possibilité de détecter l'oxydation de la 2'-désoxyguanosine et de la 2'-désoxyadénosine seuls ou tous deux présents en solution sur des électrodes de carbone vitreux et de carbone diamant. Bien que

les concentrations minimales détectables soient identiques pour les deux matériaux d'électrode, nous avons observé que la large fenêtre d'électroinactivité en milieu aqueux du diamant permettait de bien séparer le processus d'oxydation du nucléoside du "mur" du solvant, et ce particulièrement pour la 2'-désoxyadénosine.

Nous avons ensuite étendu ce concept à la détection de nucléotides, d'oligonucléotides (ODN) et enfin d'ADN.

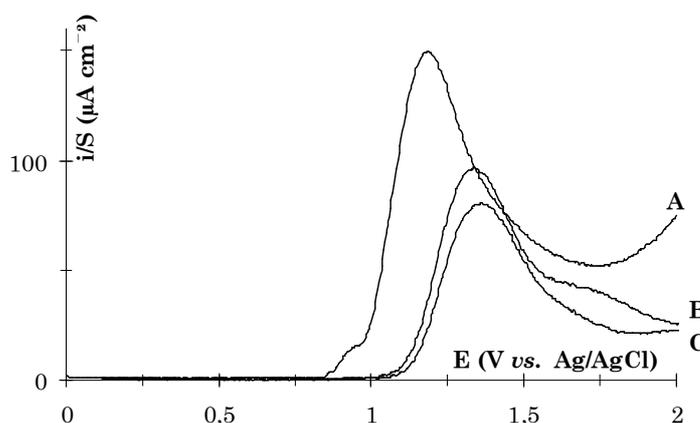
## II.C. Extension de l'étude à la détection de nucléotides, oligonucléotides et ADN

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la détection de l'oxydation des nucléotides à base de guanosine et d'adénosine sur diamant dopé bore oxygéné. Un nucléotide est produit par l'union d'un nucléoside avec l'acide phosphorique entrant dans la composition des acides nucléiques.

### II.C.1. Les réactions d'oxydation des nucléotides

#### II.C.1.a. Les nucléotides à base de guanosine

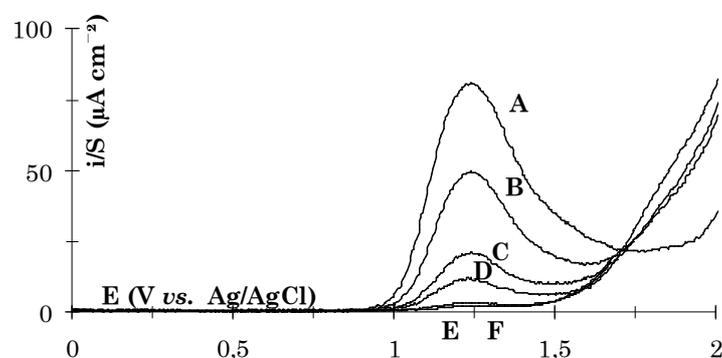
La **figure II.7** présente les réponses électrochimiques obtenues sur une électrode de diamant dopé bore oxygéné dans des solutions contenant le nucléoside, la 2'-désoxyguanosine, ou un nucléotide, la 5'-guanosine monophosphate ou la 3'-guanosine monophosphate, à une concentration de 5 mM.



**Figure II.7** Réponse en voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV) sur une électrode de diamant dopé bore oxygéné ( $S=0,196 \text{ cm}^2$ ) dans une solution de tampon phosphate 0,1 M pH 7 de 5 mM contenant : (A) 2'-désoxyguanosine (B) 5'-guanosine monophosphate, (C) 3'-guanosine monophosphate.

La réponse obtenue dans une solution de 2'-désoxyguanosine est plus complexe. En effet, nous avons vu précédemment que le voltamogramme obtenu dans cette solution présente trois pics : un pic important à 1,19 V *vs.* Ag/AgCl, précédé d'un pré-pic à 0,95 V *vs.* Ag/AgCl, et suivi par un épaulement vers 1,35 V *vs.* Ag/AgCl. Sur les réponses électrochimiques des nucléotides correspondants, nous pouvons observer que le pré-pic a disparu puisque les voltamogrammes obtenus pour les deux nucléotides présentent un pic d'oxydation avec une intensité importante à un potentiel de l'ordre de 1,35 V *vs.* Ag/AgCl et un épaulement à un potentiel de l'ordre de 1,75 V. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour l'oxydation de la 2'-désoxyguanosine-5'-monophosphate par C. Prado *et al.*<sup>11</sup> De plus, l'oxydation des nucléotides se produit à des potentiels plus élevés (1,35 V *vs.* Ag/AgCl au lieu de 1,19 V dans le cas du nucléoside) et les densités de courant de pic sont nettement plus faibles, ce qui est en accord avec la littérature<sup>12</sup>. Ceci peut être attribué à un coefficient de diffusion plus faible et à une gêne plus importante du nucléotide envers le transfert d'électrons.

Comme dans la partie précédente dans le cas du nucléoside, nous avons ensuite étudié l'influence de la concentration en 3'-guanosine monophosphate dans la solution (**Fig. II.8**). Le potentiel d'oxydation évolue linéairement avec la concentration en nucléotide, et la concentration minimale de détection est ici de 50  $\mu\text{M}$ .

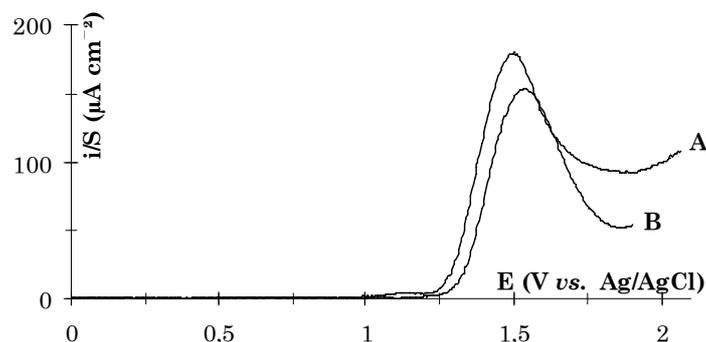


**Figure II.8** Influence de la concentration en 3'-guanosine monophosphate dans la solution de tampon phosphate pH 7 (0,1 M) sur les réponses en voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV) (A) 5 mM, (B) 2,5 mM, (C) 1 mM, (D) 0,5 mM, (E) 0,1 mM, (F) 0,05 mM.

### II.C.1.b. Les nucléotides à base d'adénosine

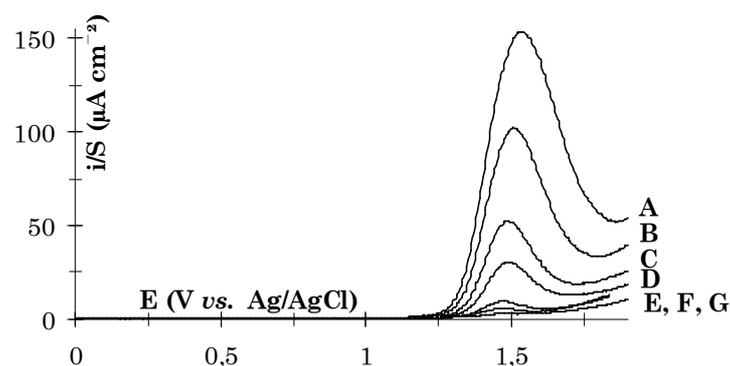
Nous nous sommes ensuite intéressés au nucléotide formé à partir de l'adénosine, la 2'-adénosine-monophosphate. La **figure II.9** compare les voltamogrammes obtenus pour le nucléoside et le nucléotide. Comme dans le cas de la 2'-désoxyguanosine, le potentiel du pic

d'oxydation est plus important dans le cas du nucléotide (1,53 V *vs.* Ag/AgCl au lieu de 1,49 V), et la densité de courant de pic diminue légèrement.



**Figure II.9** Réponse en voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV) sur une électrode de diamant dopé bore oxygéné ( $S=0,196 \text{ cm}^2$ ) dans une solution de tampon phosphate  $0,1 \text{ M}$  pH 7 de  $5 \text{ mM}$  contenant : (A) 2'-désoxyadénosine (B) 2'-adénosine monophosphate.

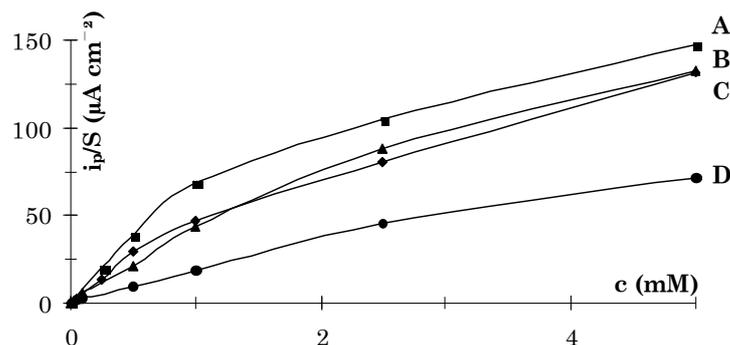
Nous avons ensuite étudié l'influence sur les réponses électrochimiques de la concentration en nucléotide dans la solution (**Fig. II.10**). Comme précédemment, le potentiel de pic évolue linéairement avec la concentration lorsque celle-ci varie entre  $10 \text{ µM}$  et  $5 \text{ mM}$ .



**Figure II.10** Influence de la concentration en 2'-adénosine monophosphate dans la solution de tampon phosphate pH 7 ( $0,1 \text{ M}$ ) sur les réponses en voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV) (A)  $5 \text{ mM}$ , (B)  $2,5 \text{ mM}$ , (C)  $1 \text{ mM}$ , (D)  $0,5 \text{ mM}$ , (E)  $0,1 \text{ mM}$ , (F)  $0,05 \text{ mM}$ , (G)  $0,01 \text{ mM}$ .

### II.C.1.c. Conclusion sur l'étude de l'oxydation des nucléotides sur diamant dopé bore

Ces résultats ont permis de mettre en évidence la possibilité de détecter l'oxydation des nucléotides à base de guanosine et d'adénosine, de la même façon que dans le cas des nucléosides. Nous avons également vérifié qu'aucune oxydation n'était détectée dans des solutions contenant la 3'-uridine monophosphate, la 5'-uridine monophosphate, la 3'-cytidine monophosphate et la 5'-cytidine monophosphate.



**Figure II.11** Evolution de la densité de courant du pic d'oxydation du nucléoside ou nucléotide en fonction de sa concentration en solution dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7 sur une électrode de carbone diamant oxygéné : (A) 2'-désoxyadénosine, (B) 3'-guanosine monophosphate, (C) 2'-desoxyguanosine et (D) 2'-adénosine monophosphate.

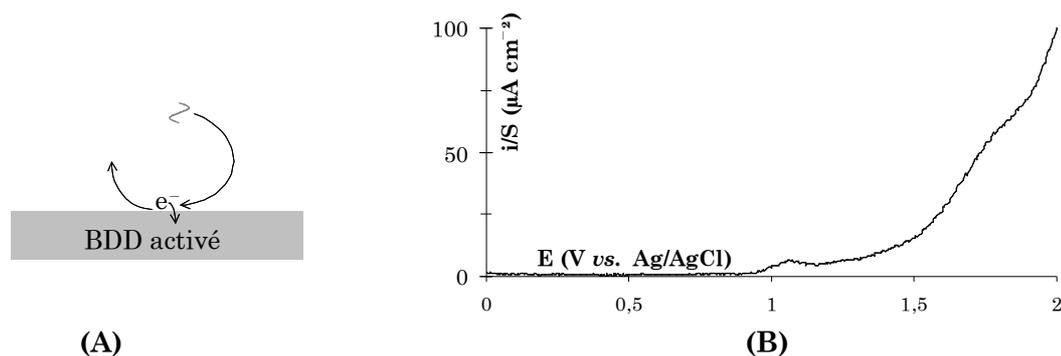
De plus, la **figure II.11** présente l'évolution de la densité de courant du pic d'oxydation en fonction de la concentration en nucléoside ou nucléotide en solution. Nous pouvons observer que les deux composés, nucléoside et nucléotide, à base de guanosine ont des comportements très proches. A l'inverse, les valeurs du courant de pic pour des composés à base d'adénosine sont très différentes. Cependant, les courbes A, B, C et D sont non linéaires et ont même allure.

L'oxydation des nucléotides peut ainsi être étudiée selon la même méthode que les nucléosides. Nous nous sommes ensuite intéressés à la détection d'oligonucléotides (ODN) et d'ADN sur une électrode de diamant oxygéné.

### II.C.2. Détection d'oligonucléotides sur diamant dopé bore

La **figure II.12** présente le principe de la détection à l'électrode d'oligonucléotides en solution constitués de 8 bases nucléiques dont deux guanines et deux adénines, et le voltamogramme obtenu.

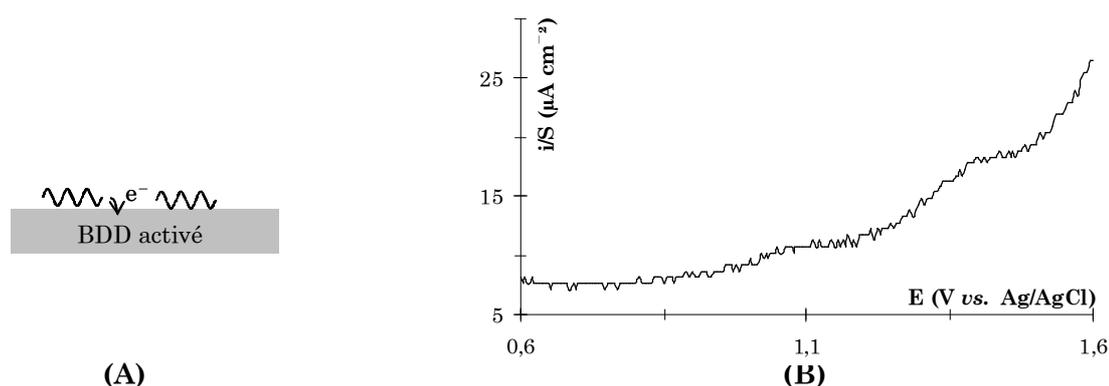
Le voltamogramme comporte deux vagues : la première à 1,06 V vs. Ag/AgCl, et la seconde, moins prononcée, autour de 1,7 V. Ces deux vagues peuvent être attribuées à l'oxydation de la guanosine et de l'adénosine respectivement.



**Figure II.12** (A) Principe et (B) réponse en voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV) sur une électrode de diamant dopé bore oxygéné ( $S=0,196 \text{ cm}^2$ ) dans une solution dans du tampon phosphate  $0,1 \text{ M}$  pH 7 de  $500 \mu\text{M}$  d'oligonucléotides de séquence octamer TGC ATA CG.

### II.C.3. Détection de l'ADN sur diamant dopé bore

Nous avons ensuite étudié la détection d'ADN de thymus de veau simple brin sur une électrode de diamant dopé au bore.



**Figure II.13** (A) Principe et (B) réponse en voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV) sur une électrode de diamant dopé bore oxygéné ( $S=0,196 \text{ cm}^2$ ) en solution dans du tampon phosphate  $0,1 \text{ M}$  pH7 après adsorption dans une solution d'ADN de thymus de veau  $20 \text{ ppm}$  simple brin (2000 bases) pendant  $19 \text{ h}$ .

Nous avons tout d'abord voulu détecter l'ADN en solution, de la même manière que les nucléosides, nucléotides et oligonucléotides, ce qui n'a donné aucun résultat. Ceci peut être dû à un repliement du brin sous forme de pelote statistique, ou encore à un problème de mobilité. En effet, le brin est relativement long, ce qui peut entraîner un transfert de matière limité.

Afin de s'affranchir de ce problème de transfert de matière, nous avons détecté par voltamétrie impulsionnelle différentielle l'ADN après son adsorption sur l'électrode pendant 19 heures (**Fig. II.13A**). La **figure II.13B** présente le voltamogramme obtenu ; celui-ci

comporte deux pics à 1,06 et 1,36 V *vs.* Ag/AgCl qui correspondent respectivement à l'oxydation de la guanosine et de l'adénosine. La densité de courant des pics d'oxydation des deux bases nucléiques est faible, ce qui peut être attribué au fait que peu de bases, guanine et adénine, sont accessibles lors de la détection, ou encore à une désorption rapide de l'ADN lorsque l'électrode est placée dans la solution de tampon phosphate pour la détection

#### **II.C.4. Conclusion sur la détection des nucléotides, oligonucléotides et ADN**

Cette étude montre que l'oxydation des nucléotides à base de guanosine et d'adénosine est similaire à celle des nucléosides. De plus, nous avons montré ici qu'il est possible de détecter, selon la même méthode, des brins d'oligonucléotides. Enfin, la détection d'ADN simple brin sur diamant dopé au bore est possible en adsorbant au préalable le brin sur l'électrode. La technique d'adsorption du simple brin sur la surface de diamant oxygéné, ainsi que la technique de détection, restent néanmoins à optimiser, afin d'obtenir un signal plus sensible.

### **III. Conclusion**

Dans ce chapitre, nous avons montré l'intérêt des électrodes de diamant activés par oxydation électrochimique pour la détection de l'oxydation des nucléosides électroactifs, la 2'-désoxyguanosine et la 2'-désoxyadénosine. La large fenêtre d'électroinactivité en milieu aqueux, ainsi que le faible et stable courant de fond, permettent de détecter par voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV) de faibles concentrations de nucléosides en solution (jusqu'à 10  $\mu\text{M}$  pour la 2'-désoxyguanosine et 50  $\mu\text{M}$  pour la 2'-désoxyadénosine). De plus, nous avons détecté l'oxydation de chacun des nucléosides dans une solution contenant un mélange des deux espèces. Enfin, cette technique de détection par DPV est applicable à l'oxydation des nucléotides correspondants, mais également à la détection d'oligonucléotides en solution et d'ADN adsorbé sur la surface de l'électrode.

**Références bibliographiques du chapitre VI**

- <sup>1</sup> T. K. Christopoulos, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 425R–438R.
- <sup>2</sup> E. Palecek, *Bioelectrochem. & Bioenergetics* **1986**, 15, 275–295.
- <sup>3</sup> G. Dryhurst, *Talanta* **1972**, 19, 769–787.
- <sup>4</sup> P. Subramanian, G. Dryhurst, *J. Electroanal. Chem.* **1987**, 224, 137–162.
- <sup>5</sup> G. Dryhurst, *New York : Academic Press* **1977**.
- <sup>6</sup> E. E. Ferapontova, *Electrochim. Acta* **2004**, 49, 1751–1759.
- <sup>7</sup> *Discussion interne* : J. L. Ravanat, spécialiste des Lésions de l'ADN, CEA Grenoble.
- <sup>8</sup> S. Bi, B. Liu, F.–R. Fan, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 3690–3691.
- <sup>9</sup> R. N. Goyal, N. Jain, D. K. Garg, *Bioelectrochem. & Bioenergetics* **1997**, 43, 105–114.
- <sup>10</sup> R. N. Goyal, A. Sangal, *J. Electroanal. Chem.* **2002**, 521, 72–80.
- <sup>11</sup> C. Prado, G.–U. Flechsig, P. Grundler, J. S. Foord, F. Marken, R. G. Compton, *Analyst* **2002**, 127, 329–332.
- <sup>12</sup> J. Wang, G. Chen, A. Muck, D. Shin, A. Fujishima, *J. Chromatography A* **2004**, 1022, 207–212.



## **Chapitre VII :**

Etude de l'adsorption des produits des  
réactions d'oxydation des nucléosides sur  
diamant dopé au bore (BDD)



Le chapitre VI avait pour objet la détection de l'oxydation électrochimique des deux nucléosides électroactifs, la 2'-désoxyguanosine et la 2'-désoxyadénosine, sur une électrode de diamant dopé au bore activé par oxydation électrochimique. Dans ce précédent chapitre, nous avons montré qu'il est possible de détecter chacun de ces nucléosides seuls ou en mélange en solution par voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV).

Nous allons observer au cours de ce chapitre que l'oxydation des nucléosides s'accompagne d'une adsorption des produits ainsi générés sur la surface de l'électrode. Ce chapitre sera donc consacré à la caractérisation de l'adsorption des produits des réactions d'oxydation des nucléosides sur la surface de l'électrode de diamant dopé au bore.

Dans une première partie, un phénomène d'adsorption sur l'électrode de diamant dopé au bore lors de l'oxydation des nucléosides sera mis en évidence. Nous nous intéresserons ensuite à l'influence de ce phénomène d'adsorption sur la réponse de l'oxydation du nucléoside afin de conclure quant à une adsorption majoritaire des produits des réactions d'oxydation des nucléosides, et non de ces espèces biologiques elles-mêmes. Trois hypothèses concernant le mécanisme de cette adsorption peuvent être formulées : une adsorption sous la forme d'un film continu, sous la forme d'un film poreux ou encore selon le modèle de l'électrode bloquée, c'est-à-dire dans des sites préférentiels.

Puis, au cours d'une étude macroscopique, nous étudierons le comportement électrochimique d'une sonde redox en voltamétrie cyclique en fonction de l'adsorption. A l'aide de calculs analytiques, nous établirons des courbes théoriques courant-potentiel que nous comparerons aux courbes expérimentales afin d'évaluer différents paramètres caractéristiques de la réaction d'oxydation de cette espèce redox en fonction de la quantité de produits de l'oxydation des nucléosides formés, tels que la constante de vitesse, le coefficient de transfert de charge, la résistance à l'interface électrode/produits adsorbés/solution et le potentiel formel du couple redox. Nous étudierons alors l'influence de l'adsorption sur ces valeurs afin de distinguer le mécanisme du phénomène d'adsorption parmi les trois hypothèses envisagées.

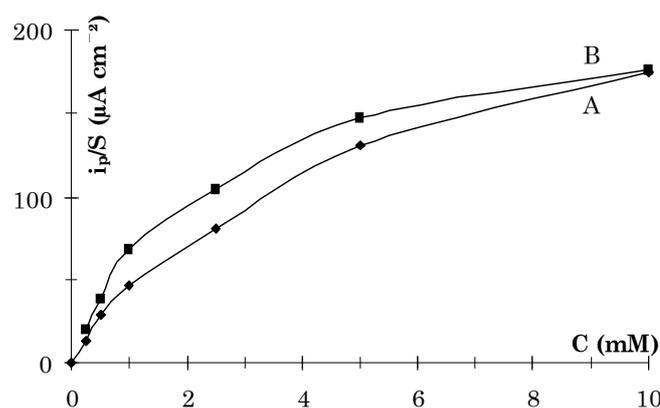
Enfin, dans une dernière partie, nous corrélerons ce résultat concernant le mécanisme d'adsorption avec une étude à l'échelle microscopique du phénomène à l'aide du microscope électrochimique à balayage (SECM).

## I. Adsorption des produits des réactions d'oxydation des nucléosides

### I.A. Mise en évidence d'un phénomène d'adsorption

#### I.A.1. Profils de concentration pour chaque nucléoside

La **figure I.1**, déterminée à partir des courbes de voltamétrie impulsionnelle différentielle de la **figure II.5** du chapitre VI, présente l'évolution de la densité de courant du pic d'oxydation du nucléoside en fonction de la concentration en solution en 2'-désoxyguanosine (A) et 2'-désoxyadénosine (B). Ces deux courbes montrent que le courant de pic n'évolue pas linéairement avec la concentration en nucléoside, ce qui indique une diminution de la réactivité à l'interface probablement causée par une adsorption d'espèces sur la surface de l'électrode de diamant. Deux hypothèses peuvent être envisagées : une adsorption des nucléosides et/ou des produits des réactions d'oxydation.

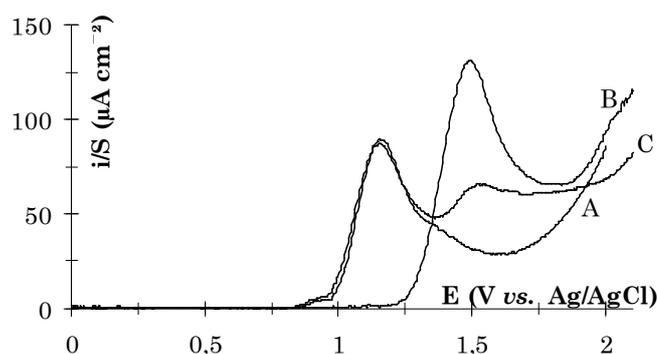


**Figure I.1** Evolution de la densité de courant du pic d'oxydation du nucléoside (A) 2'-désoxyguanosine et (B) 2'-désoxyadénosine en fonction de sa concentration en solution dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7 sur une électrode de carbone diamant oxygéné ( $S=0,196 cm^2$ ).

#### I.A.2. Réponse électrochimique dans une solution contenant les deux nucléosides

La **figure I.2** présente les réponses obtenues en voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV) sur une électrode de diamant dopé au bore oxygéné dans une solution contenant la 2'-désoxyguanosine (A), la 2'-désoxyadénosine (B), ou un mélange des deux espèces en mêmes proportions (C). Le premier pic observé sur la **figure I.2C** correspondant à l'oxydation de la 2'-désoxyguanosine présente une densité de courant comparable à celle obtenue dans une solution contenant uniquement ce nucléoside (**Fig. I.2A**). A l'inverse, le courant d'oxydation de la 2'-désoxyadénosine dans la solution contenant le mélange des deux nucléosides (**Fig. I.2C**) est beaucoup plus faible que celui obtenu pour une solution

contenant uniquement cette nucléobase à la même concentration (**Fig. I.2B**). En effet, cette densité de courant de pic diminue de 86 % dans la solution contenant les deux nucléosides. Ceci indique une forte adsorption soit de la 2'-désoxyguanosine, ce qui limiterait le processus réactionnel, soit de la 8-oxo-désoxyguanosine ou de produits secondaires de la réaction d'oxydation du nucléoside, ce qui inhiberait le transfert de charge de la 2'-désoxyadénosine ou le transfert de matière de cette dernière à la surface de l'électrode. Ce phénomène d'adsorption est également présent dans le cas de l'électrode de carbone vitreux.



**Figure I.2** Réponses obtenues en voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV) sur une électrode de diamant dopé au bore oxygéné dans une solution de : (A) 2,5 mM 2'-désoxyguanosine, (B) 2,5 mM 2'-désoxyadénosine, (C) 2,5 mM 2'-désoxyguanosine et 2'-désoxyadénosine en mêmes proportions.

### **I.A.3. Conclusion sur le phénomène d'adsorption**

Ces deux expériences ont permis de mettre en évidence un phénomène d'adsorption sur l'électrode, ce qui diminue ainsi sa réactivité globale. Cependant, cette adsorption peut être de différente nature : les nucléosides et/ou les produits des réactions d'oxydation des nucléosides.

Nous avons ensuite étudié l'évolution de la réponse électrochimique de l'oxydation du nucléoside en fonction de la quantité de produits oxydés formés.

### **I.B. Adsorption des produits de l'oxydation des nucléosides**

Nous avons choisi de présenter ici les voltamogrammes uniquement dans le cas de la 2'-désoxyguanosine. Il est important de noter que des résultats similaires concernant l'évolution du pic d'oxydation de la 2'-désoxyadénosine, mais aussi celui des nucléotides étudiés dans le chapitre précédent, ont été obtenus sur une électrode de diamant dopé bore.

### I.B.1. Influence de l'adsorption sur la détection électrochimique du nucléoside

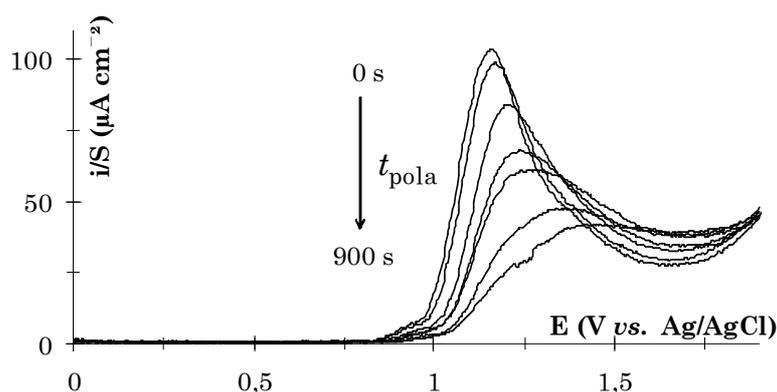
Nous avons étudié l'évolution de la réponse électrochimique de l'oxydation de la 2'-désoxyguanosine en fonction de la quantité formée de produits de la réaction d'oxydation. Cette étude nous permettra de distinguer entre une adsorption majoritaire des nucléosides ou des produits de leurs réactions d'oxydation.

#### I.B.1.a. Procédure

Après activation de l'électrode de diamant dopé bore, un traitement de pré-conditionnement est appliqué à l'électrode : celle-ci est plongée dans une solution contenant la 2'-désoxyguanosine à 2,5 mM dans du tampon phosphate pH 7, et un potentiel correspondant à l'oxydation de la 2'-désoxyguanosine (1,2 V *vs.* Ag/AgCl) et permettant de générer les produits oxydés est appliqué à l'électrode pendant un temps variable (noté  $t_{\text{pola}}$ ). Après rinçage de l'électrode à l'eau distillée, une voltamétrie impulsionnelle différentielle dans une solution identique et neuve est ensuite réalisée.

#### I.B.1.b. Résultats

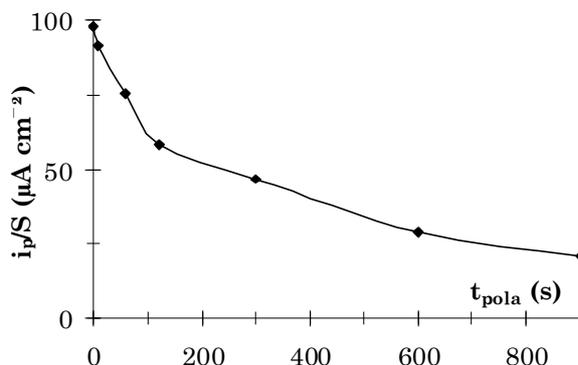
La **figure I.3** présente les voltamogrammes obtenus en appliquant cette procédure à une électrode de diamant dopé bore oxygéné et en utilisant différents temps de polarisation entre 0 et 900 s. Les réponses obtenues dans le cas de durées de polarisation supérieures sont identiques à celle obtenue à 900 s.



**Figure I.3** Réponses en voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV) sur une électrode de diamant dopé bore oxygéné dans une solution de 2'-désoxyguanosine 2,5 mM après différents temps de polarisation à 1,2 V *vs.* Ag/AgCl dans une solution identique : 0 s, 10 s, 60 s, 120 s, 300 s, 600 s et 900 s.

Nous pouvons observer une chute importante de la densité de courant du pic d'oxydation lorsque la durée de polarisation dans la solution de nucléoside augmente, c'est-

à-dire lorsque davantage de produits oxydés sont formés. De plus, cette chute du courant de pic est accompagnée d'un décalage du potentiel de pic vers les potentiels plus anodiques lorsque le temps de polarisation augmente.



**Figure I.4** Evolution de la densité de courant du pic d'oxydation en fonction du temps de polarisation dans une solution de 2'-désoxyguanosine 2,5 mM. Les valeurs des courants de pics sont calculées à partir de la figure I.3.

La **figure I.4** montre l'évolution de la densité de courant du pic d'oxydation de la 2'-désoxyguanosine en fonction du temps de polarisation. Ainsi, la densité de courant de pic passe d'une valeur de  $98 \mu\text{A/cm}^2$  sans polarisation dans la solution de nucléoside, à une valeur de  $20,6 \mu\text{A/cm}^2$  après une durée de pré-conditionnement de 900 s, ce qui représente une diminution de 79 %.

Nous avons également vérifié que lorsqu'une électrode de diamant oxygéné est plongée dans une solution de 2'-désoxyguanosine pendant une durée de 900 s sans polarisation, nous obtenons ensuite le même voltamogramme que celui réalisé directement après activation de l'électrode sans la plonger au préalable dans la solution de nucléoside. Ceci indique bien que l'évolution du pic observée sur la **figure I.3** est due à l'application du potentiel dans la solution de nucléoside et donc aux produits électrogénérés par cette polarisation.

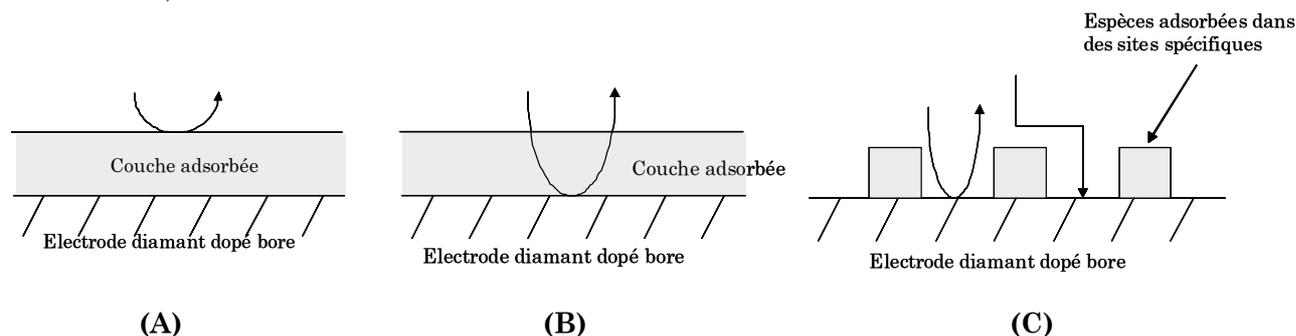
Ces résultats indiquent une adsorption majoritaire des produits de la réaction d'oxydation sur la surface de l'électrode, ce qui limiterait le transfert de charge du nucléoside par la suite, ou son transfert de matière à la surface du diamant.

### **I.B.2. Conclusion : trois mécanismes d'adsorption envisagés**

Ces expériences ont mis en évidence une adsorption des produits de la réaction d'oxydation de la 2'-désoxyguanosine sur la surface de diamant dopé bore oxygéné.

Nous pouvons alors envisager trois hypothèses sur le mécanisme de cette adsorption sur la surface de l'électrode :

- Adsorption sous la forme d'un film continu, permettant le transfert d'électrons (**Fig. I.5A**)
- Adsorption sous la forme d'un film poreux sur la surface, permettant la diffusion du nucléoside à l'intérieur des pores ou des trous (**Fig. I.5B**),
- Adsorption dans des sites spécifiques selon le modèle de l'électrode bloquée<sup>1</sup> (**Fig. I.5C**).



**Figure I.5** Représentation schématique des différents mécanismes possibles d'adsorption des produits de l'oxydation des nucléosides sur l'électrode de diamant dopé bore : (A) sous la forme d'un film continu sur la surface de l'électrode, (B) sous la forme d'un film poreux sur la surface, (C) selon le modèle de l'électrode bloquée.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude macroscopique de ce phénomène à l'aide de sondes redox. Nous avons étudié le comportement électrochimique d'une espèce redox en fonction de la quantité de produits formés et adsorbés sur la surface de l'électrode en voltamétrie impulsionnelle différentielle, puis en voltamétrie cyclique. Nous avons ensuite comparé ces dernières courbes expérimentales avec des courbes théoriques construites à partir de calculs analytiques selon différents modèles, afin d'estimer des paramètres électrochimiques caractéristiques, ce qui nous permettra de comprendre la manière dont cette adsorption se produit sur la surface du diamant dopé bore.

## II. Caractérisation macroscopique de l'adsorption

Les profils de concentration de la 2'-désoxyguanosine et de la 2'-désoxyadénosine étant de même allure, nous avons, dans la suite, considéré uniquement le cas de la 2'-désoxyguanosine.

## **II.A. Etude de l'adsorption à l'aide d'une sonde redox : le ferrocène méthanol**

### **II.A.1. Procédure**

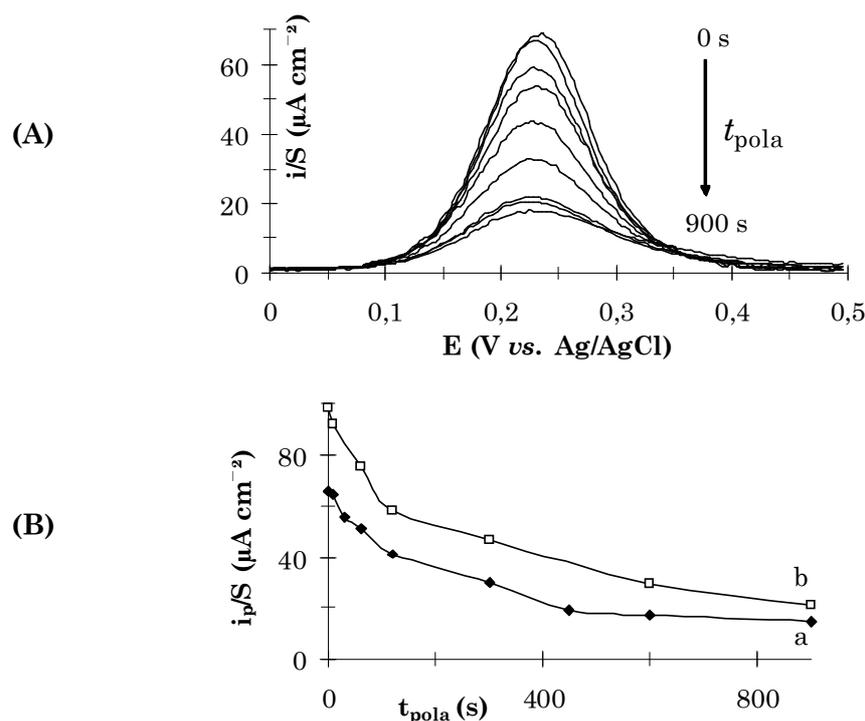
Nous avons étudié l'influence de cette adsorption sur l'oxydation d'une sonde redox, le ferrocène méthanol, en voltamétrie impulsionnelle différentielle. Le ferrocène méthanol a été choisi en raison de son faible potentiel d'oxydation, ce qui permet de ne pas interférer avec l'oxydation de la 2'-désoxyguanosine, et également d'obtenir un meilleur rapport entre courant d'oxydation et courant de fond.

L'électrode de diamant dopé bore oxygéné est plongée dans une solution contenant 2,5 mM de 2'-désoxyguanosine dans du tampon phosphate pH 7 et un potentiel de 1,2 V *vs.* Ag/AgCl est appliqué pendant un temps variable ( $t_{\text{pola}}$  entre 0 et 900 s) afin de produire la réaction d'oxydation du nucléoside. Puis l'électrode est rincée à l'eau distillée et séchée. Une voltamétrie impulsionnelle différentielle est ensuite réalisée sur cette électrode dans une solution de 0,5 mM en ferrocène méthanol dans du tampon phosphate pH 7.

### **II.A.2. Résultats**

La **figure II.1A** montre clairement une diminution de la réponse électrochimique du ferrocène méthanol lorsque le temps de polarisation augmente. En effet, la densité de courant du pic d'oxydation de la sonde redox passe de 65,8  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  sans polarisation dans la solution de nucléoside à 14,7  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  lorsqu'un pré-conditionnement de 900 s est appliqué à l'électrode, soit une diminution d'environ 78 % (**Fig. II.1B**).

Ainsi, l'évolution de la densité de courant du pic d'oxydation de cette sonde en fonction du temps de polarisation présente la même allure que celle obtenue par le pic d'oxydation de la 2'-désoxyguanosine (**Fig. I.4 et II.1B**), ce qui indique que ces deux espèces subissent le même transfert d'électrons et valide ainsi l'utilisation de cette technique basée sur le comportement électrochimique de sondes redox.



**Figure II.1** Evolution de l'oxydation du ferrocène méthanol 0,5 mM / tampon phosphate pH 7 sur une électrode de diamant dopé bore oxygéné après polarisation dans une solution de 2'-désoxyguanosine 2,5 mM à 1,2 V vs. Ag/AgCl pendant différents temps de polarisation : 0 s, 10 s, 30 s, 60 s, 120 s, 300 s, 450 s, 600 s et 900 s. (A) Réponses en voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV), (B) évolution de la densité de courant du pic en fonction du temps de polarisation (a) et comparaison avec l'évolution de la densité de courant de pic de la 2'-désoxyguanosine de la figure I.4 (b).

## II.B. Détermination du mécanisme d'adsorption sur la surface

### II.B.1. Principe

Afin de déterminer le mécanisme de l'adsorption des produits des réactions d'oxydation des nucléosides, nous avons étudié le comportement d'une sonde redox, l'hexachloroiridate (III), en fonction du temps de polarisation dans une solution de 2'-désoxyguanosine. Une électrode de diamant dopé bore oxygéné est plongée dans une solution contenant 2,5 mM 2'-désoxyguanosine, et un potentiel de 1,2 V vs. Ag/AgCl est appliqué à l'électrode pendant un certain temps (0, 300, 600 et 900 s) par chronoampérométrie. Puis, après rinçage de l'électrode à l'eau distillée, une voltamétrie cyclique est réalisée en présence de 2 mM  $\text{IrCl}_6^{3-}$ . Nous avons choisi cette technique, et non la voltamétrie impulsionnelle différentielle, afin de pouvoir comparer les courbes obtenues avec les courbes théoriques correspondantes construites à l'aide de calculs analytiques<sup>2,3</sup>. Pour cela, nous avons utilisé un

programme, Wincourbes, implémenté par E. Vieil sous Visual Basic, et permettant de construire des courbes à partir d'équations implicites.

Par comparaison entre les voltamétries cycliques expérimentales obtenues à différents temps de polarisation et différentes vitesses de balayage et les courbes théoriques correspondantes, il sera possible de déterminer des paramètres électrochimiques caractéristiques de la réaction, ce qui nous permettra de distinguer entre les trois hypothèses envisagées du mécanisme de l'adsorption (**Fig. I.5**).

Nous avons tout d'abord réalisé cette étude en utilisant le ferrocène méthanol en tant que sonde redox. Cependant, nous n'avons pu aboutir à aucune conclusion concernant le mécanisme de l'adsorption avec cette espèce (mécanisme réactionnel de type inner-sphere). Nous avons observé un ralentissement global du mécanisme réactionnel de l'oxydation de cette sonde avec le temps de polarisation, mais nous n'avons pas pu séparer l'influence de la cinétique de transfert d'électrons de celle de la résistance ohmique. En effet, il est nécessaire de considérer une résistance ohmique en raison du montage expérimental utilisé, le contact électrique étant réalisé par pression sur la face arrière de l'échantillon de diamant dopé bore par l'intermédiaire d'une pastille en acier cuivré. Ces contraintes expérimentales sont liées au fait que l'échantillon de diamant doit pouvoir être ôté facilement de la cellule en téflon et rincé régulièrement ; c'est pourquoi un contact plus fiable, tel que l'utilisation de la laque d'argent, est exclu ici.

Nous avons alors choisi un autre couple redox,  $\text{IrCl}_6^{2-/3-}$ , connu pour être bien réversible sur différents types d'électrodes de diamant dopé bore<sup>4</sup>. De plus, ce couple ne forme pas de film de passivation sur la surface de l'électrode, ce qui pourrait diminuer la réversibilité de la réaction de transfert d'électrons et fausser nos conclusions concernant l'adsorption des produits d'oxydation des nucléosides.

## II.B.2. Théorie

### II.B.2.a. Etablissement de l'expression du courant

La réaction électrochimique se produisant à l'électrode a pour équation :



Dans la suite, nous noterons A l'indice correspondant à l'espèce  $\text{IrCl}_6^{2-}$ , et B celui de  $\text{IrCl}_6^{3-}$ .

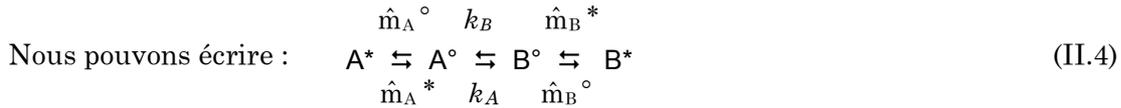
C'est un mécanisme de type E. Notons  $c_i^*$  la concentration initiale de l'espèce i.

L'équation cinétique globale de la réaction peut s'écrire :

$$J = k_{AB}^* c_A^* - k_{BA}^* c_B^* \quad (\text{II.3})$$

Cette réaction peut alors être décomposée en 3 étapes : le transfert de matière de l'espèce A, un transfert de charge, puis le transfert de matière de l'espèce B.

Notons  $\hat{m}$  l'opérateur de transport de matière et  $k$  la constante de vitesse de transfert de charge.



Cette décomposition nous conduit à définir deux vitesses de transfert, une pour chaque sens de la réaction. Une vitesse se comportant de manière analogue à une admittance, la mise en série repose donc sur l'addition d'inverses de vitesse, avec une règle d' " amplification " .

Nous pouvons alors écrire les équations cinétiques de chaque étape :

$$\left\{ \begin{array}{l} J = \hat{m}_A^* c_A^* - \hat{m}_A^\circ c_A^\circ \\ J = k_A c_A^\circ - k_B c_B^\circ \\ J = \hat{m}_B^\circ c_B^\circ - \hat{m}_B^* c_B^* \end{array} \right. \quad (\text{II.5})$$

$$\text{Nous obtenons ainsi : } \frac{-nFSc^*}{i} = \frac{1}{k_{AB}^*} = \frac{1}{\hat{m}_A^*} + \frac{\hat{m}_A^\circ}{\hat{m}_A^*} \left( \frac{1}{k_A} + \frac{k_B}{k_A} \frac{1}{\hat{m}_B^\circ} \right) \quad (\text{II.6})$$

Nous définissons trois densités de flux limites repérées par les indices " mA " pour l'étape de transfert de matière de l'espèce A, " AB " pour l'étape de transfert de charge  $A^\circ - B^\circ$  et enfin " mB " pour l'étape de transfert de matière de l'espèce B.

$$\text{Nous pouvons alors écrire : } \left\{ \begin{array}{l} J_{A,mA}^{lim} = \hat{m}_A^* c_A^* \\ J_{AB}^{lim} = \frac{k_A}{\hat{m}_A^\circ} J_{A,mA}^{lim} \\ J_{A,mB}^{lim} = \frac{\hat{m}_B^\circ}{k_B} J_{AB}^{lim} \end{array} \right. \quad (\text{II.7})$$

$$\text{D'après Eq. II.6, nous obtenons : } \frac{1}{J_A} = \frac{1}{J_{A,mA}^{lim}} + \frac{1}{J_{AB}^{lim}} + \frac{1}{J_{A,mB}^{lim}} \quad (\text{II.8})$$

$$\text{De la même façon, il vient : } \frac{1}{J_B} = \frac{1}{J_{B,mB}^{lim}} + \frac{1}{J_{BA}^{lim}} + \frac{1}{J_{B,mA}^{lim}} \quad (\text{II.9})$$

Dans la suite, nous supposons que la concentration initiale en B est très faible, voire nulle (conditions analytiques), et nous négligerons ainsi l'influence de l'espèce B lors de la transformation de A en B.

$$\text{D'où : } J \approx J_A \quad (\text{II.10})$$

Nous définissons alors par  $\bar{K}_{AB}$  la constante apparente d'équilibre et par  $V_{AB}$  la fonction "vague" donnée par la relation hyperbolique avec cette constante apparente d'équilibre tels

$$\text{que : } \left\{ \bar{K}_{AB} = \frac{\hat{m}_B^\circ k_A}{\hat{m}_A^\circ k_B} \right. \quad (\text{II.11})$$

$$\left. \begin{cases} V_{AB} = \frac{\bar{K}_{AB}}{1 + \bar{K}_{AB}} \end{cases} \right. \quad (\text{II.12})$$

$$\text{D'après Eq. II.10 et Eq. II.11, nous obtenons ainsi : } \frac{J_A}{J_{A,mA}^{lim}} = V_{AB} \left( 1 - \frac{J_A}{J_{AB}^{lim}} \right) \quad (\text{II.13})$$

$$\text{Par définition, } V_{AB, \text{Nernst}} = \frac{1}{1 + \exp[-(X - X_{1/2})]} \quad \text{avec} \quad X = \frac{-nF}{\mathfrak{R}T} (E - E^\circ) \quad (\text{II.14})$$

Lorsque le premier transfert de matière est réversible et que le transfert de charge est complètement irréversible, la cinétique est contrôlée par les deux premières étapes du mécanisme E. La troisième étape qui est le transfert de matière de l'espèce produite B n'a alors aucune influence. Nous faisons l'hypothèse d'une collection simple homogène sur la surface de l'électrode et d'une transduction parfaite du flux de matière en courant électrique et nous introduisons ici la notion de courant d'irréversibilité totale noté  $i_{AB}$  comme :

$$i_{AB} = -nFS J_{AB}^{lim} \quad (\text{II.15})$$

avec S la surface de l'électrode.

Lorsque la première étape de transfert de matière est isotrope, c'est-à-dire lorsque les vitesses aller et retour sont égales, cette équation se simplifie en l'expression suivante :

$$i_{AB} = -nFS k_{CA}^* \quad (\text{II.16})$$

D'après le modèle cinétique de Butler-Volmer, il vient :

$$i_{AB} = -nFS k_{CA}^* \exp(-\alpha_A X) \quad (\text{II.17})$$

Par définition<sup>5</sup>, pour des transferts de matière à modes fixes (modes stationnaire, transitoire ou temporel), l'opérateur de vitesse de transfert de matière peut s'exprimer sous la forme :

$$\hat{m}_i = \frac{D_i}{\ell_i} \tau_{D_i}^{p_i} \frac{dP_i}{dt^{p_i}} \quad \text{avec : } \tau_{D_i} = \frac{\ell_i^2}{D_i} \quad (\text{II.18})$$

$\tau_{D_i}$  est appelé temps caractéristique du transfert de matière et  $\ell$  l'épaisseur de la couche de transport. La constante p est la puissance de l'opérateur de dérivation temporelle, dépendant du mode de transfert de matière : elle vaut 0 dans le cas du mode stationnaire, 1/2 en mode transitoire, et 1 en mode temporel.

D'après **Eq. II.8** et **Eq. II.10**, nous obtenons alors : 
$$\frac{J}{J_{A,mA}^{lim}} + \frac{J}{J_{AB}^{lim}} + \frac{J}{J_{A,mB}^{lim}} = 1 \quad (\text{II.19})$$

Nous définissons également un courant d'échelle tel que : 
$$i_{\ell_A} = -nFS c^* \frac{D_A}{\ell_A} \quad (\text{II.20})$$

Notons : 
$$i^{(-p)} = \frac{d^{-p}}{dt^{-p}} i$$

Ainsi, toutes ces hypothèses conduisent à écrire l'équation suivante :

$$\frac{i^{(-p_A)}}{\tau_{D_A}^{p_A} i_{\ell_A}} \left( 1 + \frac{1}{\bar{K}_{AB}} \right) + \frac{i}{i_{AB}} = 1 \quad (\text{II.21})$$

Nous restreignons cette étude aux cas de transferts de matière de même nature pour les deux espèces A et B. D'où :  $p = p_A = p_B$

D'après **Eq. II.12** et **Eq. II.21**, nous obtenons ainsi l'équation représentant ce mécanisme de type E :

$$\boxed{\frac{i^{(-p)}}{\tau_{D_A}^p i_{\ell_A} V_{AB}} + \frac{i}{i_{AB}} = 1} \quad (\text{II.22})$$

### II.B.2.b. Etablissement d'un premier modèle d'étude

Dans toute la suite, nous nous sommes intéressés uniquement au domaine anodique de la réponse électrochimique de la sonde redox.

Nous considérons ici le cas du mode transitoire, ou diffusion semi-infinie ; la puissance p est alors égale à 1/2.

Dans le cas du mode transitoire, d'après l'équation **II.22**, nous avons :

$$\frac{i^{(-1/2)}}{\tau_{D_A}^{1/2} i_{\ell_A} V_{AB}} + \frac{i}{i_{AB}} = 1 \quad (\text{II.23})$$

Posons : 
$$\begin{cases} I_{\ell_A} = \tau_{D_A}^{1/2} i_{\ell_A} = nFS \sqrt{D_A} c_A^* \\ X = X_i + ut \text{ avec : } u = \frac{nF}{\mathfrak{R}T} V \end{cases} \quad (\text{II.24})$$

avec : V la vitesse de balayage et X<sub>i</sub> le potentiel initial dans le nouvel espace (X,Y).

D'après les équations **II.24** et en utilisant le modèle cinétique de Butler-Volmer (**Eq. II.17**), nous obtenons donc l'équation suivante :

$$\frac{1}{\sqrt{u} I_{\ell_A} V_{AB}} \frac{d^{-1/2} i}{dX^{-1/2}} + i \frac{\sqrt{D_A}}{I_{\ell_A} k^0} \exp(-\alpha_A X) = 1 \quad (\text{II.25})$$

$$\text{Posons : } Y = \sqrt{D_A} \frac{i}{I \ell_A} \text{ et } Y^{(-1/2)} = \frac{d^{-1/2}}{dX^{-1/2}} Y \quad (\text{II.26})$$

L'équation II.25 s'écrit alors :

$$\frac{1}{\sqrt{u D_A} V_{AB}} Y^{(-1/2)} + \frac{1}{k^\circ} \exp(-\alpha_A X) Y = 1 \quad (\text{II.27})$$

D'après Eq. II.14, il vient :

$$\frac{1}{\sqrt{u D_A}} (1 + \exp(-X)) Y^{(-1/2)} + \frac{1}{k^\circ} \exp(-\alpha_A X) Y = 1 \quad (\text{II.28})$$

Nous pouvons ainsi décrire le comportement électrochimique du système dans un nouvel espace (X,Y).

Afin de modéliser les courbes de voltamétrie cyclique expérimentales obtenues, nous allons définir deux paramètres :

$$\begin{cases} A = \log k^\circ \\ B = \log \sqrt{D_A \frac{nF}{\mathcal{R}T}} \end{cases} \quad (\text{II.29})$$

L'équation précédente décrivant le comportement électrochimique du système dans le repère (X,Y) peut donc s'écrire sous la forme suivante :

$$\frac{1}{\sqrt{V} 10^B} (1 + \exp(-X)) Y^{(-1/2)} + \exp(-2,3A - \alpha_A X) Y = 1 \quad (\text{II.30})$$

De plus, nous appelons  $X^\circ$  le paramètre correspondant au potentiel formel du couple dans ce

$$\text{nouvel espace (X,Y) : } X^\circ = \frac{F}{\mathcal{R}T} E^\circ \quad (\text{II.31})$$

En accord avec les travaux de l'équipe de G. M. Swain<sup>3</sup>, nous avons utilisé une valeur de  $6,8 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  pour le coefficient de diffusion de  $\text{IrCl}_6^{2-/3-}$ . Le paramètre  $B$  a donc une valeur constante de 1,8. Nous pouvons alors construire des réseaux de courbes théoriques de plusieurs vitesses de balayage pour différentes valeurs de  $A$ .

Cependant, comme nous l'avons observé précédemment lors des études préliminaires avec le ferrocène méthanol et comme nous l'observerons lors des comparaisons entre courbes théoriques et expérimentales dans la suite de ce chapitre, il est nécessaire de considérer dans le modèle théorique l'influence de la résistance électrode/produits adsorbés/solution incluant la résistivité de l'électrolyte et la résistance de contact. C'est pourquoi nous avons établi un second modèle tenant compte de l'influence de ce paramètre.

### II.B.2.c. Etablissement d'un second modèle en incluant l'influence de la résistance

Le potentiel à l'interface électrode/solution peut être exprimé par :

$$E = \bar{E} - R_{\Omega} i \quad (\text{II.32})$$

avec  $\bar{E}$  le potentiel imposé au système,  $R_{\Omega}$  la chute ohmique incluant la résistivité de l'électrolyte et la résistance de contact.

$$\text{Il vient donc : } \begin{cases} Y = \frac{i}{I_{\ell}} \sqrt{D} = \frac{i}{nF c^* S} & (\text{II.33}) \\ X = \bar{X} - \frac{nF}{\Re T} R_{\Omega} nF c^* S Y & (\text{II.34}) \end{cases}$$

$$\text{Nous posons : } C = \frac{nF}{\Re T} R_{\Omega} nF c^* S \quad (\text{II.35})$$

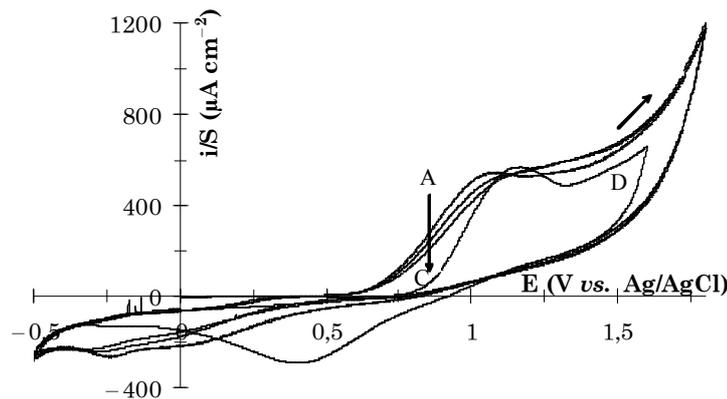
L'équation II.30 décrivant le système dans le repère (X,Y) devient donc :

$$\frac{1}{\sqrt{V} 10^B} (1 + \exp(-(X - CY))) Y^{(-1/2)} + \exp(-2,3A - \alpha_a(X - CY)) Y = 1 \quad (\text{II.36})$$

## II.B.3. Résultats

### II.B.3.a. Courbes de voltamétrie cyclique

Des voltamétries cycliques ont été réalisées à cinq vitesses de balayage (0,02, 0,05, 0,1, 0,2 et 0,5 V s<sup>-1</sup>) sur une électrode de diamant dopé bore oxygéné après différents pré-conditionnements consistant à appliquer un potentiel de 1,2 V vs. Ag/AgCl dans une solution de 2,5 mM 2'-désoxyguanosine pendant des temps variables ( $t_{\text{pola}} = 0, 300, 600$  et 900 s).

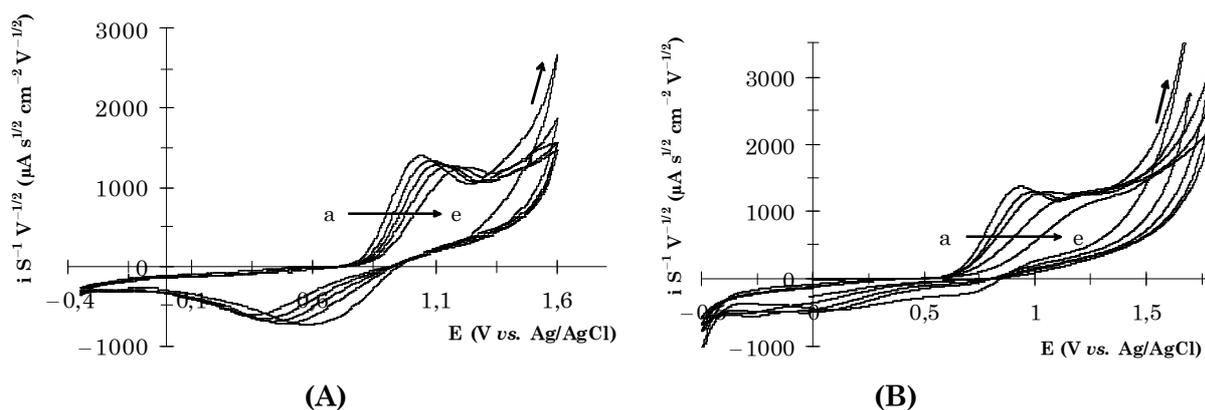


**Figure II.2** Réponses en voltamétrie cyclique à une vitesse de balayage de 0,2 V s<sup>-1</sup> dans une solution de 2 mM K<sub>3</sub>IrCl<sub>6</sub> / LiClO<sub>4</sub> 0,1 M sur une électrode de diamant dopé bore oxygéné après un pré-conditionnement à 1,2 V vs. Ag/AgCl dans une solution de 2,5 mM 2'-désoxyguanosine / tampon phosphate pH 7 0,1 M pendant : (A) 300 s, (B) 600 s, (C) 900 s, (D) 0 s.

La **figure II.2** présente les courbes expérimentales obtenues à une vitesse de balayage de  $0,2 \text{ V s}^{-1}$  pour les différents pré-conditionnements. La réponse électrochimique de l'électrode de diamant oxygéné sans polarisation dans la solution de nucléoside est très différente des autres réponses. En effet, la différence de potentiels entre les pics anodique et cathodique est plus importante lorsqu'une polarisation est appliquée, et elle reste quasi-constante quelle que soit la durée de cette polarisation. Ceci indique qu'un pré-conditionnement de 300 s est suffisant pour modifier totalement la réversibilité du couple redox.

### II.B.3.b. Diffusion semi-infinie

La **figure II.3** montre l'évolution du rapport entre la densité de courant et la racine carrée de la vitesse de balayage en fonction du potentiel pour différentes vitesses (0,02, 0,05, 0,1, 0,2 et  $0,5 \text{ V s}^{-1}$ ) sans pré-conditionnement (**A**) et après une polarisation à  $1,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  pendant 900 s dans une solution de 2'-désoxyguanosine (**B**).

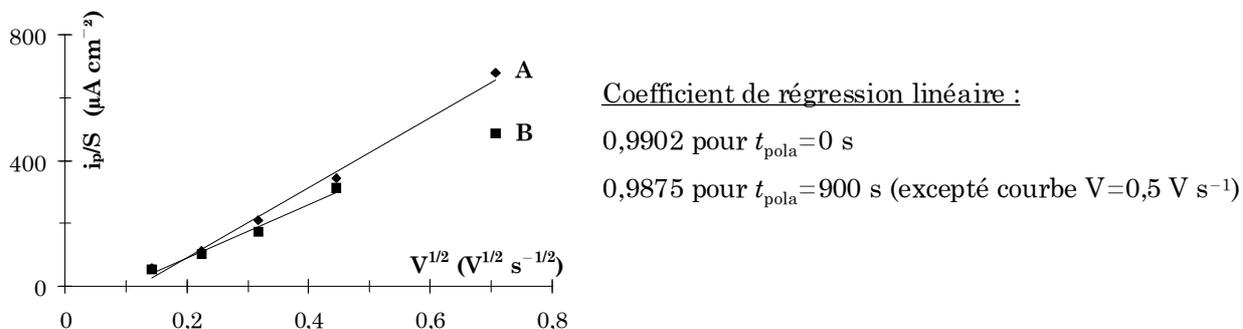


**Figure II.3** Courbes  $iV^{-1/2} = f(E)$  tracées à partir des voltamétries cycliques expérimentales dans une solution de  $2 \text{ mM K}_3\text{IrCl}_6 / \text{LiClO}_4$   $0,1 \text{ M}$  sur une électrode de diamant dopé bore oxygéné pour différentes vitesses de balayage : (a)  $0,02$ , (b)  $0,05$ , (c)  $0,1$ , (d)  $0,2$ , (e)  $0,5 \text{ V s}^{-1}$  (A) sans pré-conditionnement, (B) après un pré-conditionnement à  $1,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  dans une solution de  $2,5 \text{ mM}$  2'-désoxyguanosine / tampon phosphate  $\text{pH } 7$   $0,1 \text{ M}$  pendant  $900 \text{ s}$ .

La **figure II.4** présente l'évolution du courant de pic en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage.

Dans le cas où la voltamétrie cyclique est réalisée directement sur une électrode de diamant oxygéné sans pré-conditionnement dans une solution de nucléoside ( $t_{\text{pola}}=0 \text{ s}$ ), le coefficient de corrélation de la régression linéaire est de  $0,99$ , ce qui indique que l'intensité de pic et la racine carrée de la vitesse de balayage évoluent linéairement (**Fig. II.4A**). Dans le cas où un pré-conditionnement de  $900 \text{ s}$  est appliqué à l'électrode dans la solution de 2'-désoxyguanosine, le coefficient de régression linéaire, déterminé sans tenir compte de la

courbe obtenue pour une vitesse de  $0,5 \text{ V s}^{-1}$ , est de 0,987, ce qui indique également une évolution linéaire (**Fig. II.4B**). La courbe obtenue dans ce cas à  $V=0,5 \text{ V s}^{-1}$  a une forme différente de celle obtenue à d'autres vitesses de balayage, et nous verrons par la suite qu'elle sera également différente des courbes théoriques obtenues, ce qui peut être attribué aux erreurs expérimentales. De plus, nous avons observé qu'il n'y avait pas de phénomène d'adsorption de la sonde redox sur l'électrode de diamant.



**Figure II.4** Evolution de la densité de courant du pic des voltamétries cycliques avec la racine carrée de la vitesse de balayage utilisée. Ces courbes sont tracées à partir des voltamogrammes obtenus expérimentalement sur une électrode de diamant dopé bore oxygéné dans une solution de  $2 \text{ mM K}_3\text{IrCl}_6 / \text{LiClO}_4 0,1 \text{ M}$  : (A, losanges) sans pré-conditionnement dans la solution de nucléoside ; (B, carrés) après un pré-conditionnement à  $1,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  dans une solution de  $2,5 \text{ mM 2'}$ -désoxyguanosine pendant  $900 \text{ s}$ .

Ainsi, toutes ces observations permettent de conclure que le transfert de masse se produit par diffusion semi-infinie.

### II.B.3.c. Détermination des coefficients de transfert $\alpha$

En faisant l'hypothèse que ce mécanisme à réversibilité limitée se produit avec des transferts de matières identiques ( $\hat{m} = \hat{m}_A = \hat{m}_B$ ) et un transfert de charge selon le modèle de Butler-Volmer, le potentiel de demi-vague peut être exprimé par :

$$E_{A,1/2} = E^\circ + \frac{\Re T}{-nF \alpha_A} \ln \frac{m}{k^\circ} \quad \text{et} \quad E_{B,1/2} = E^\circ - \frac{\Re T}{-nF \alpha_B} \ln \frac{m}{k^\circ} \quad (\text{II.37})$$

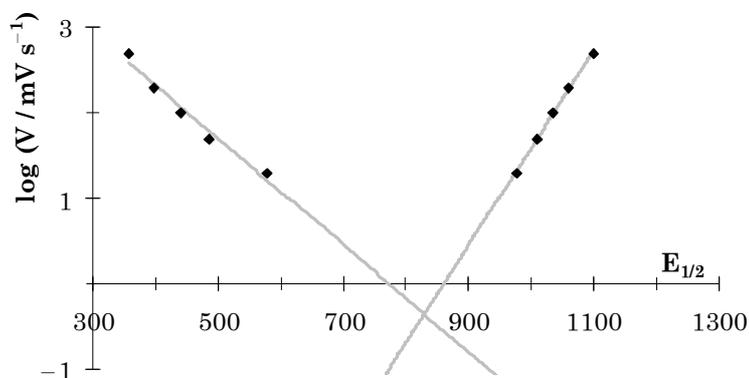
$$\text{avec : } m = \frac{D}{\ell} \sqrt{\frac{u \ell^2}{D}} \quad (\text{II.38})$$

En représentant le logarithme de la vitesse de balayage en fonction du potentiel de pic, il vient :

$$\log(V) = \left( \frac{F \alpha}{1,15 \Re T} \right) E_{1/2} - \left( \frac{F \alpha}{1,15 \Re T} E^\circ + \log \frac{FD}{\Re T} \right) \quad (\text{II.39})$$

avec  $V$  la vitesse de balayage en  $\text{mV s}^{-1}$ .

La **figure II.5** montre une dépendance linéaire des potentiels de pics anodique et cathodique avec le logarithme de la vitesse de balayage  $V$  pour une électrode de diamant oxygéné ne subissant pas de pré-conditionnement dans la solution de 2'-désoxyguanosine. D'après l'équation II.38, nous obtenons des valeurs de 0,22 pour  $\alpha_A$ , et 0,18 pour  $\alpha_B$ , et un potentiel standard  $E^\circ$  de 820 mV. La somme des coefficients de transfert anodique et cathodique est très inférieure à 1. Ceci a également été observé par l'équipe de Y. V. Pleskov sur des électrodes de diamant dopé au bore en utilisant deux couples redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  et quinone/hydroquinone<sup>6</sup> et n'est pas complètement compris, mais il semble que la théorie du modèle de Butler–Volmer d'un même mécanisme pour l'oxydation et la réduction ( $\alpha_a + \alpha_c = 1$ ) n'est pas applicable sur diamant dopé bore et que de telles électrodes ont un comportement électrochimique intermédiaire entre celui d'un semi-conducteur et celui d'un métal.



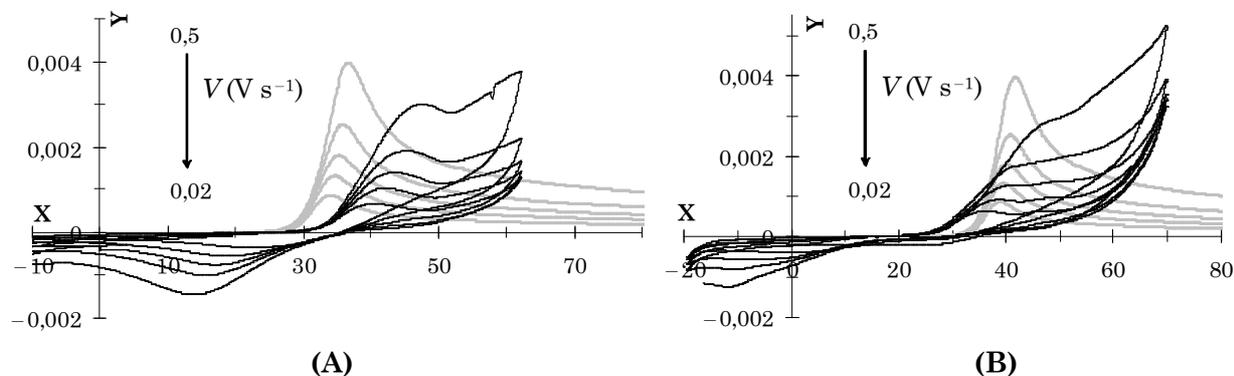
**Figure II.5** Courbes  $\log V=f(E_{1/2})$  tracées à partir des voltamétries cycliques expérimentales sur une électrode de diamant dopé bore oxygéné dans une solution de 2 mM  $\text{K}_3\text{IrCl}_6 / \text{LiClO}_4$  0,1 M sans pré-conditionnement dans la solution de nucléoside et à différentes vitesses de balayages (0,02, 0,05, 0,1, 0,2 et 0,5  $\text{V s}^{-1}$ ) et droites des moindres carrés correspondantes.

Lorsqu'un pré-conditionnement est appliqué à l'électrode ( $t_{\text{pola}} \neq 0$  s), la dépendance entre les potentiels de pics et le logarithme de la vitesse n'est pas linéaire donc l'équation II.39 ne peut être appliqué pour déterminer les coefficients de transfert de charge. Comme nous le verrons dans la suite de ce chapitre, ceci est du à une augmentation importante de la résistance interfaciale ( $R_\Omega$ ).

### II.B.3.d. Etude du premier modèle

La **figure II.6** présente les voltamogrammes obtenus expérimentalement et les courbes théoriques construites à partir du premier modèle (Eq. II.30) dans le cas d'une électrode de diamant oxygéné sans pré-conditionnement (A) ou avec une polarisation dans la solution de 2'-désoxyguanosine pendant 600 s (B). De plus, dans un premier temps, afin de simplifier l'étude, nous avons utilisé une valeur constante pour le coefficient de transfert de charge ( $\alpha_A$ ) de 0,5. Nous pouvons observer que, quelles que soient les valeurs du

paramètre  $A$  (Eq. II.30), il est impossible de superposer les pics anodiques expérimentaux et théoriques. En effet, les pics anodiques expérimentaux s'étendent sur une plus large gamme de potentiels. Ceci est caractéristique de l'effet d'une résistance interfaciale sur ces courbes ; c'est pourquoi nous avons ajouté ce paramètre dans notre second modèle d'étude.



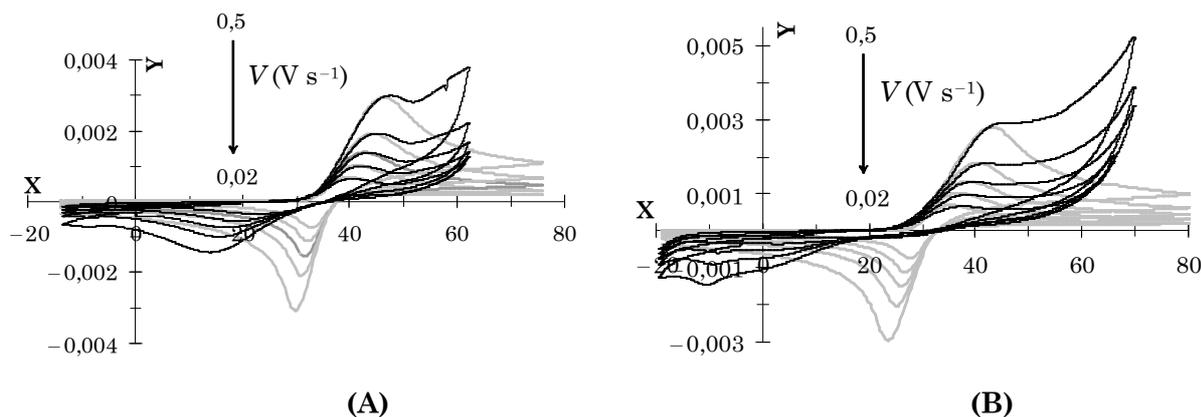
**Figure II.6** Courbes de voltamétrie cyclique expérimentales (en noir) dans le repère  $(X,Y)$  pour une électrode de diamant dopé bore oxygéné dans une solution de  $2 \text{ mM } K_3IrCl_6 / LiClO_4 0,1 \text{ M}$  : (A) sans pré-conditionnement dans la solution de nucléoside, (B) après un pré-conditionnement à  $1,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  dans une solution de  $2,5 \text{ mM } 2'$ -désoxyguanosine pendant  $600 \text{ s}$ . Comparaison avec les courbes théoriques (en gris) correspondantes obtenues en utilisant le premier modèle et les paramètres suivants :  $\alpha_A=0,5$ ,  $A=-3$ ,  $B=-1,8$ ,  $X^0=31$ .

### II.B.3.e. Etude du second modèle

La **figure II.7** présente les courbes expérimentales et théoriques construites selon le second modèle tenant compte de l'influence de la résistance électrode/produits adsorbés/solution dans le cas d'une électrode de diamant dopé bore oxygéné sans polarisation dans la solution de nucléoside (A), et après une pré-conditionnement de  $300 \text{ s}$  (B). Bien que les pics anodiques des courbes théoriques et expérimentales soient bien superposables, nous pouvons observer que le courant expérimental après le pic d'oxydation est très différent de celui calculé.

Ainsi, les courbes théoriques obtenues selon ce second modèle doivent être corrigées par un courant résiduel ; c'est ce qui nous a amené à construire un troisième modèle.

De plus, nous pouvons remarquer ici que l'allure des courbes expérimentales dans le domaine cathodique est bien différente de celle des courbes théoriques. Ceci montre que le phénomène se produisant dans le domaine cathodique a un comportement totalement différent de celui étudié ici, ce qui confirme que les modèles construits peuvent s'appliquer uniquement dans le domaine anodique.



**Figure II.7** Courbes de voltamétrie cyclique expérimentales (en noir) dans le repère (X,Y) pour une électrode de diamant dopé bore oxygéné dans une solution de 2 mM  $K_3IrCl_6$  /  $LiClO_4$  0,1 M : (A) sans pré-conditionnement dans la solution de nucléoside, (B) après un pré-conditionnement à 1,2 V vs.  $Ag/AgCl$  dans une solution de 2,5 mM 2'-désoxyguanosine pendant 300 s. Comparaison avec les courbes théoriques (en gris) correspondantes obtenues en utilisant ce second modèle et les paramètres suivants :  $\alpha_A=0,29$   $A=-3$ ,  $B=-1,8$ ,  $C=500$  pour (A) et 1000 pour (B),  $X^\circ=36$  pour (A) et 31 pour (B).

### II.B.3.f. Etude du troisième modèle

Nous avons donc construit de nouvelles courbes théoriques en utilisant un troisième modèle qui tient compte à la fois de l'influence de la résistance électrode/produits adsorbés/solution, et de celle du courant résiduel.

#### II.B.3.f.i. Détermination du courant résiduel

Afin de déterminer l'équation du courant résiduel noté  $Y_{res}$  dans le repère (X,Y), nous avons utilisé les courbes expérimentales de voltamétrie cyclique à différentes vitesses de balayage sur diamant dopé bore oxygéné sans pré-conditionnement dans la solution de 2'-désoxyguanosine ( $t_{pola}=0$  s). Nous avons ainsi construit le réseau de courbes  $Y_V$  (l'indice V représentant la vitesse de balayage), correspondant à la différence entre courbes expérimentales et courbes théoriques du second modèle pour chaque vitesse de balayage (0,02, 0,05, 0,1, 0,2 et 0,5  $V s^{-1}$ ). Puis nous avons déterminé chaque facteur  $k_V$  permettant de superposer la courbe  $Y_{0,02}$ , choisie arbitrairement comme courbe référence, à chacune des autres courbes  $Y_V$ . La dépendance de ce facteur avec la vitesse de balayage est linéaire, ce qui indique que les courbes  $Y_V$  sont homothétiques et ajustables les unes par rapport aux autres au travers d'un paramètre maîtrisé, la vitesse de balayage. L'allure du courant résiduel est donc la même pour chaque vitesse de balayage utilisée. Ainsi, nous pourrions définir un courant résiduel pour une seule vitesse (arbitrairement, nous avons choisi la vitesse de 1  $V s^{-1}$ ) et ensuite, il suffira de l'ajuster à chaque vitesse de balayage.

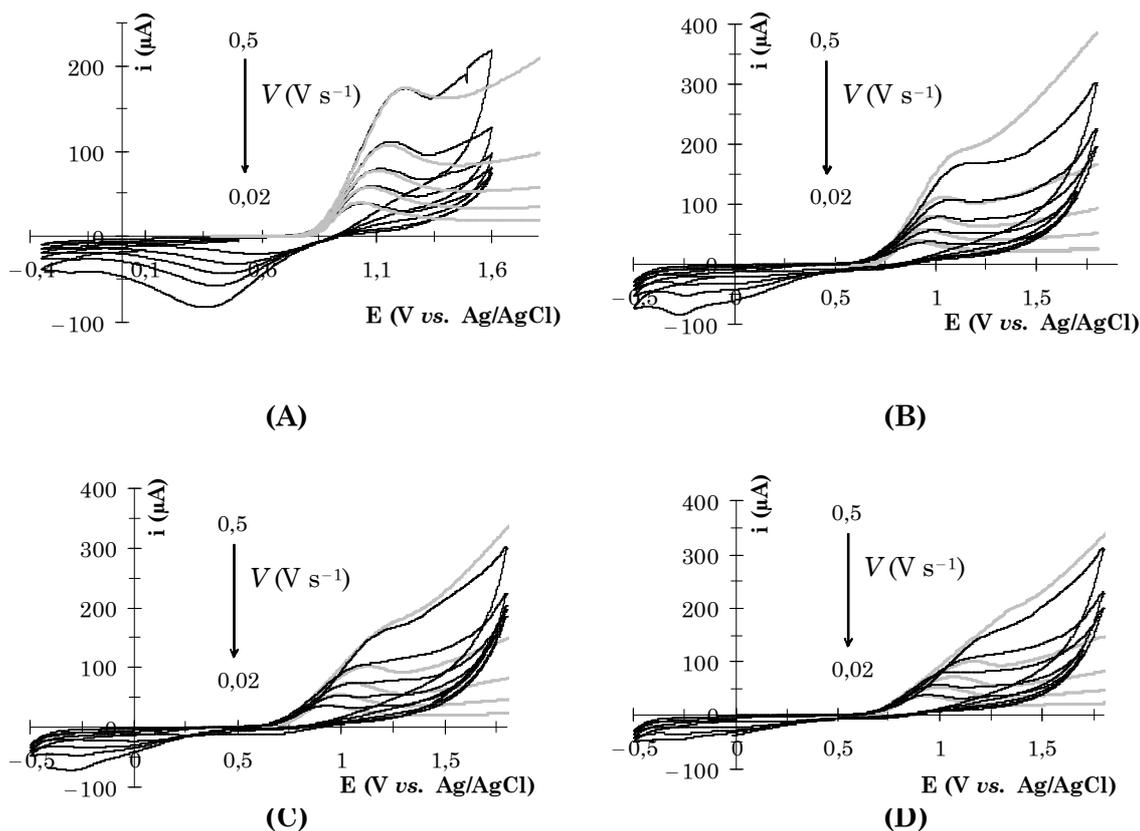
Afin de déterminer l'expression de ce courant résiduel, nous cherchons alors le point commun entre les courbes  $Y_{0,5}$  et  $Y_{0,02k_{0,5}}$  (la courbe de référence multipliée par son facteur de superposition dans l'espace  $(X,Y)$ ), et nous définissons une forme exponentielle passant par ce point d'intersection (pour  $X < 26,5$ ), puis une forme linéaire pour des valeurs de  $X$  supérieures à ce point (pour  $X \geq 26,5$ ).

Ainsi, le courant résiduel, pour une vitesse de balayage de  $V=1 \text{ V s}^{-1}$ , est une combinaison d'une forme exponentielle et d'une forme linéaire :

$$Y_{\text{res}} = \begin{cases} 2 (0,0012 \exp (0,2[X-27])) & \text{pour } X < 26,5 \\ 2 (0,0011 + 0,0002(X-26,5)) & \text{pour } X \geq 26,5 \end{cases} \quad (\text{II.40})$$

Puis, pour chaque vitesse, le courant calculé final est la somme du courant résiduel (Eq. II.40) multiplié par la valeur de la vitesse de balayage (en  $\text{V s}^{-1}$ ), et du courant obtenu selon le second modèle (Eq. II.36).

### II.B.3.f.ii. Comparaison des courbes théoriques et expérimentales



**Figure II.8** Courbes de voltamétrie cyclique expérimentales (en noir) pour une électrode de diamant dopé bore oxygéné dans une solution de  $2 \text{ mM } K_3IrCl_6 / LiClO_4 \text{ } 0,1 \text{ M}$  : (A) sans pré-conditionnement dans la solution de nucléoside, (B, C, D) après un pré-conditionnement à  $1,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  dans une solution de  $2,5 \text{ mM } 2'$ -désoxyguanosine pendant : (B)  $300 \text{ s}$ , (C)  $600 \text{ s}$  et (D)  $900 \text{ s}$ . Les paramètres utilisés pour la construction des courbes théoriques (en gris) sont résumés dans le tableau II.1.

La **figure II.8** présente la superposition des courbes expérimentales (en noir) et théoriques (en gris) obtenues pour une électrode de diamant dopé bore oxygéné après un pré-conditionnement de 0 s (**A**), 300 s (**B**), 600 s (**C**) et 900 s (**D**) pour chacune des vitesses de balayage (0,02, 0,05, 0,1, 0,2 et 0,5 V s<sup>-1</sup>).

Nous pouvons ainsi observer une superposition des pics anodiques des deux courbes dans chacun des cas.

### II.B.3.f.iii. Détermination des différents paramètres

Le **tableau II.1** résume les valeurs des différents paramètres utilisés lors des calculs analytiques pour construire les courbes théoriques pour chaque durée de pré-conditionnement dans la solution de 2'-désoxyguanosine.

Nous pouvons observer que, dans le cas d'un temps de polarisation élevé (900 s), la chute ohmique est très importante ( $R_{\Omega} = 12\,897 \, \Omega \text{ cm}^{-2}$ ), ce qui démontre l'intérêt de prendre en compte ce paramètre lors des calculs analytiques.

Le coefficient de transfert de charge ( $\alpha_A$ ) et la constante de vitesse ( $k^\circ$ ) ont la même valeur quel que soit le temps de polarisation dans la solution de 2'-désoxyguanosine, alors que la résistance interfaciale ( $R_{\Omega}$ ) et le potentiel formel ( $E^\circ$ ) sont fonctions de cette durée. La chute ohmique augmente lorsqu'un pré-conditionnement est appliqué, jusqu'à atteindre une valeur très importante pour une durée de 900 s. Le potentiel formel du couple redox conserve la même valeur quelle que soit la durée de polarisation, mais cette valeur est inférieure à celle obtenue dans le cas où aucun pré-conditionnement n'est appliqué. Le transfert de charge est plus facile d'un point de vue énergétique sur l'électrode modifiée par les produits adsorbés que sur l'électrode de diamant nue. La diminution de la valeur du potentiel formel observée en cas de l'application d'un pré-conditionnement est indépendante du temps de polarisation.

temps de pré-conditionnement (s)	$\alpha_a$	$k^\circ$ (cm s <sup>-1</sup> )	$E^\circ$ (mV)	$R_{\Omega}$ ( $\Omega \text{ cm}^{-2}$ )
0	0,28	0,001	925	1742
300	0,28	0,001	797	2439
600	0,28	0,001	797	8712
900	0,28	0,001	771	12897

**Tableau II.1** Paramètres utilisés pour construire les courbes théoriques  $i-E$  de la figure II.8 dans le domaine anodique.

$k^\circ$  est la constante de vitesse,  $\alpha_a$  est le coefficient de transfert de charge anodique,  $R_{\Omega}$  est la résistance à l'interface électrode/produits adsorbés/solution et  $E^\circ$  est le potentiel formel du couple redox.

#### **II.B.4. Conclusion sur le mécanisme d'adsorption**

Les valeurs des différents paramètres nous permettent de déterminer selon quel mécanisme se produit l'adsorption de la 8-oxo-désoxyguanosine ou des produits de dégradation secondaires : sous la forme d'un film poreux, d'un film continu ou selon le modèle de l'électrode bloquée (**Fig. I.5**).

En effet, la constante de vitesse reste identique et ne diminue pas avec la valeur du temps de polarisation entre 0 et 900 s, ce qui montre que l'hypothèse de la formation d'un film poreux de 8-oxo-désoxyguanosine ou de produits de dégradation secondaires sur la surface de l'électrode est impossible. De plus, si nous supposons que l'adsorption se produit en des sites spécifiques selon le modèle de l'électrode bloquée, la proportion de sites bloquants et actifs évoluerait avec le temps de polarisation, tout comme le potentiel formel du couple redox. Or, d'après le **tableau II.1**, le potentiel formel  $E^\circ$  reste quasi constant lorsque le temps de polarisation augmente de 300 à 900 s. Le modèle de l'électrode bloquée n'est donc pas adapté à notre étude. La seule hypothèse en accord avec l'évolution des paramètres de calculs présentés dans le **tableau II.1** est celle selon laquelle la 8-oxo-désoxyguanosine ou les produits de dégradation secondaires s'adsorbent sous la forme d'un film continu sur la surface du diamant dopé bore permettant ainsi le transfert des électrons.

### **III. Caractérisation microscopique de l'adsorption à l'aide de la SECM**

Nous avons ensuite corrélé ce résultat à celui obtenu en utilisant une méthode d'analyse à l'échelle microscopique, la microscopie électrochimique à balayage (SECM). Nous nous sommes intéressés ici à l'étude de l'adsorption des produits de la réaction d'oxydation de la 2'-désoxyadénosine sur la surface du diamant dopé bore.

#### **III.A. Procédure**

Cette expérience a été menée sur une électrode de diamant dopé bore oxygéné plongée dans une solution de 10 mM  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  dans  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,5 mM.

Afin de s'assurer de pouvoir déterminer la distance entre la microélectrode et le substrat, quelles que soient les évolutions de la réactivité et de l'état de surface du diamant dopé bore (utilisé ici en tant que substrat), nous avons recouvert une fine partie de l'électrode d'un ruban de polypropylène (3M SCOTCH® Easy Use clear) de faible épaisseur (environ 30  $\mu\text{m}$ ). Ceci nous permettra d'obtenir, à tout moment de l'expérience, un point de référence pour réaliser des courbes d'approche en mode feedback négatif, le substrat de diamant ainsi recouvert étant isolant.

L'expérience consiste à réaliser tout d'abord une courbe d'approche ou une courbe de balayage 2D de la surface de diamant avant toute polarisation dans la solution de nucléoside ("blanc" de l'expérience), puis après une polarisation à 1,4 V *vs.* ECS, potentiel d'oxydation, pendant 900 s dans une solution de 2'-désoxyadénosine à différentes concentrations. Nous avons choisi cette durée car nous avons observé précédemment qu'un pré-conditionnement pendant une durée plus importante ne modifiait pas davantage les voltammogrammes obtenus par la suite dans la solution de nucléoside ou en présence d'une sonde redox.

Nous avons vérifié au préalable que l'application d'un potentiel de 1,4 V *vs.* ECS pendant 900 s à l'électrode de diamant dopé bore en absence de nucléoside ne modifiait pas la courbe d'approche obtenue sur ce substrat et donc la cinétique de régénération du médiateur redox au substrat. En effet, les courbes d'approche obtenues sur le substrat avec et sans polarisation sont parfaitement identiques.

De plus, nous avons également vérifié que la présence de la 2'-désoxyadénosine ne perturbait pas la cinétique rapide de la réaction de réduction du médiateur redox à la microélectrode polarisée à -0,4 V *vs.* ECS, potentiel insuffisant pour oxyder le nucléoside. Nous avons observé uniquement une légère diminution du courant mesuré à la sonde (de l'ordre de 6 %) correspondant à la dilution lors de l'introduction de la 2'-désoxyadénosine dans la solution de travail, la concentration du médiateur redox variant de 10 à 9,6 mM après ajout du nucléoside.

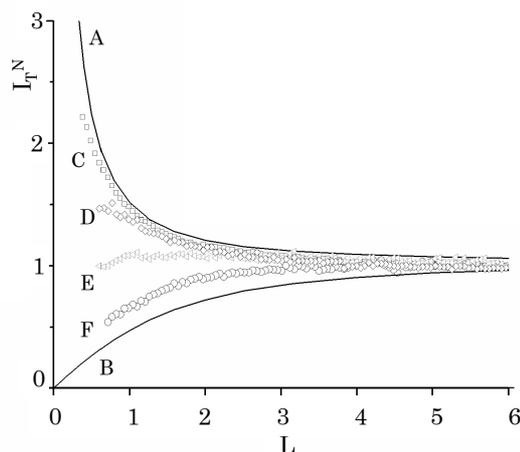
Ces deux observations permettent de considérer par la suite que toute évolution du courant mesuré à la sonde lors des courbes d'approche ou des courbes de balayage 2D sera causée par une variation de la cinétique de régénération du médiateur redox au substrat de diamant en raison de l'adsorption des produits de la réaction d'oxydation de la 2'-désoxyadénosine.

### **III.B. Courbes d'approche**

La **figure III.1** présente les courbes d'approche obtenues sans aucun pré-conditionnement de l'électrode oxygénée (**A**) et après polarisation dans une solution de 2'-désoxyadénosine à 1,4 V *vs.* ECS pendant 900 s à des concentrations de 0,2 mM (**B**), 0,5 mM (**C**) et 1 mM (**D**). Un potentiel de 1 V *vs.* ECS est appliqué au substrat pour réaliser la courbe d'approche, potentiel suffisamment élevé pour obtenir une régénération rapide du médiateur, et suffisamment faible pour que l'oxydation du nucléoside ne se produise pas.

Nous pouvons observer une diminution importante de la cinétique de régénération du médiateur redox au substrat lorsque la concentration introduite en 2'-désoxyadénosine est élevée, c'est-à-dire lorsque davantage de produits oxydés sont formés et susceptibles de s'adsorber sur la surface.

Ces résultats mettent en évidence un changement de réactivité en fonction de la quantité de produits formés et adsorbés sur la surface du diamant.



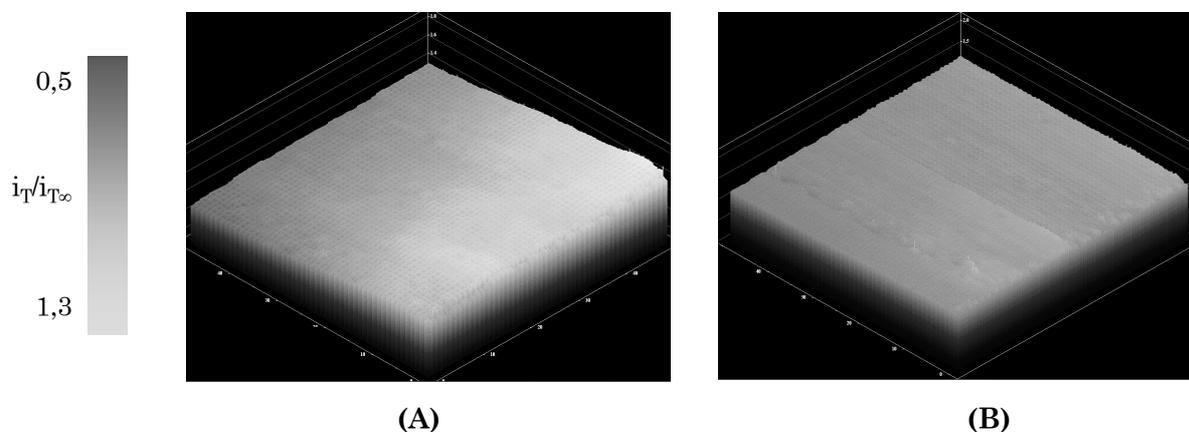
**Figure III.1** Courbes d'approche : (A,B) théoriques des modes feedback (A) positif et (B) négatif, et (C–F) expérimentales à  $V=0,5 \mu\text{m s}^{-1}$  sur une électrode de diamant dopé bore oxygéné dans une solution de  $10 \text{ mM Fe(CN)}_6^{3-}$  et  $0,5 \text{ mM Na}_2\text{SO}_4$  : (C) en absence de 2'-désoxyadénosine, (D–F) après un pré-conditionnement dans une solution de 2'-désoxyadénosine à  $1,4 \text{ V vs. ECS}$  pendant  $900 \text{ s}$  à différentes concentrations : (D)  $0,2 \text{ mM}$ , (E)  $0,5 \text{ mM}$ , (F)  $1 \text{ mM}$  ;  $E_T = -0,4 \text{ V vs. ECS}$ ,  $E_S = 1,0 \text{ V vs. ECS}$  ;  $a = 5 \mu\text{m}$ .

### III.C. Courbes de balayage 2D

Nous avons ensuite réalisé l'imagerie de la surface de diamant oxygéné (**Fig. III.2A**), puis modifiée par l'adsorption des ces produits oxydés (**Fig. III.2B**), afin d'obtenir la répartition de cette diminution de réactivité électrochimique du substrat. Sur la surface de diamant activé en absence de nucléoside, nous pouvons observer que le courant normé à la microélectrode n'est pas homogène sur toute la surface étudiée ( $50 \times 50 \mu\text{m}$ ) et varie jusqu'à 1,3. A l'inverse, après un pré-conditionnement dans une solution de 2'-désoxyadénosine, la réactivité électrochimique de la surface est homogène et le courant mesuré à la sonde est de l'ordre de 0,75. Nous obtenons des résultats similaires dans le cas de la 2'-désoxyguanosine.

Ces résultats montrent donc que les produits adsorbés de la réaction d'oxydation électrochimique de la 2'-désoxyadénosine forment un film homogène sur une surface de  $50 \times$

50  $\mu\text{m}$ , ce qui est en accord avec les conclusions concernant le mécanisme d'adsorption sur la surface de diamant de la partie précédente suite aux études de modélisation du comportement électrochimique de l'hexachloroiridate (III).



**Figure III.2** Images SECM en balayage 2D d'une surface de diamant dopé bore oxygéné de  $50 \times 50 \mu\text{m}$  à une distance de travail de  $L=dl_a=1,3$ ,  $E_T=-0,4 \text{ V vs. ECS}$ ,  $E_S=1,0 \text{ V vs. ECS}$ , dans une solution de  $10 \text{ mM Fe(CN)}_6^{3-}$  et  $0,5 \text{ mM Na}_2\text{SO}_4$  (A) en absence de 2'-désoxyadénosine, (B) après un pré-conditionnement dans une solution de  $2,86 \text{ mM}$  en 2'-désoxyadénosine à  $1,4 \text{ V vs. ECS}$  pendant  $900 \text{ s}$ .

#### IV. Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons mis en évidence une adsorption des produits des réactions d'oxydation des deux nucléosides électroactifs, la 2'-désoxyguanosine et la 2'-désoxyadénosine, sur une surface de diamant dopé bore oxygéné. Nous avons caractérisé ce phénomène en étudiant l'influence de la quantité de produits formés et susceptibles de s'adsorber à la surface sur la réponse électrochimique de l'oxydation du nucléoside lui-même ou d'une sonde redox par voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV), puis par voltamétrie cyclique (CV). Nous avons ensuite construit des réseaux de courbes théoriques à partir de calculs analytiques correspondant aux courbes en voltamétrie cyclique obtenues en présence d'une sonde redox. Cette modélisation nous a amené à déterminer différents paramètres caractéristiques de la réaction redox tels que la constante de vitesse, le coefficient de transfert de charge, la résistance à l'interface électrode/produits adsorbés/solution, et le potentiel formel du couple redox considéré. L'évaluation de tels paramètres nous a permis de conclure quant à une adsorption des produits de ces réactions d'oxydation selon la forme d'un film continu sur la surface de diamant. Des études complémentaires en microscopie électrochimique à balayage (SECM) ont confirmé ce résultat en montrant un changement de réactivité homogène sur la surface à l'échelle micrométrique de l'instrument.

**Références bibliographiques du chapitre VII :**

<sup>1</sup> B. A. Brookes, T. J. Davies, A. C. Fisher, R. G. Evans, S. J. Wilkins, K. Yunus, J. D. Wadhawan, R. G. Compton, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 1616–1627.

<sup>2</sup> F. Miomandre, E. Vieil, *J. Electroanal. Chem.* **1994**, 375, 275–292.

<sup>3</sup> E. Vieil, F. Miomandre, *J. Electroanal. Chem.* **1995**, 395, 15–27.

<sup>4</sup> A. E. Fisher, Y. Show, G. M. Swain, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 2553–2560.

<sup>5</sup> F. Momiandre, *Thèse : Etude de processus électrochimiques non réversibles par une méthode à base d'opérateurs*, soutenue le **27/10/1995**, Université Joseph Fourier.

<sup>6</sup> A. D. Modestov, Y. E. Eystefeeva, Y. V. Pleskov, V. M. Mazin, V. P. Varnin, I. G. Teremetskaya, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, 431, 211–218.

## Conclusion générale



Cette étude démontre les potentialités d'une technique récente de microscopie à sonde locale, la microscopie électrochimique à balayage (ou SECM), dans les domaines des biopuces et de la bioanalyse. Développée en 1986 par le professeur A. J. Bard, cette technique permet à la fois la micro-fabrication et la caractérisation de surfaces, qu'elles soient conductrices ou même isolantes. Ce mémoire illustre ces diverses potentialités en présentant les travaux de recherche réalisés afin d'utiliser le microscope électrochimique pour la caractérisation d'un film de molécules biologiques adsorbées sur une surface, pour la fonctionnalisation de surfaces conductrices par des éléments biologiques, mais aussi pour la détection de l'hybridation d'ADN.

Notre première étude a consisté en l'utilisation de la SECM pour la fabrication de puces à ADN, c'est-à-dire à la fois pour la fonctionnalisation de surfaces d'or par des molécules biologiques, puis pour la reconnaissance du phénomène d'appariement spécifique.

Ainsi, nous avons électrogénéré des spots de polypyrrole-oligonucléotide de taille micrométrique et d'épaisseur nanométrique sur une surface conductrice par mode direct de la microscopie électrochimique. Nous avons montré ici que cette technique de fonctionnalisation était rapide et reproductible.

De plus, la présence de ces spots sur la surface d'or a été observée par SECM en mode feedback positif grâce à la différence de conductivité de surface entre l'or et le polypyrrole-oligonucléotide.

Enfin, le phénomène d'hybridation de ces spots a été détecté par microscopie électrochimique en mode feedback à l'aide d'une méthode basée sur un assemblage moléculaire spécifiquement déposé sur ces spots hybridés suivi d'une réaction de précipitation d'un produit à leurs surfaces.

Cette première étude illustre donc la dualité d'utilisation de la microscopie électrochimique pour la fonctionnalisation et la caractérisation de surfaces.

Ensuite, au cours d'une seconde étude, nous avons montré la possibilité de coupler la SECM à une méthode optique de détection, l'imagerie de résonance plasmonique de surface (SPRi), afin de pouvoir visualiser en temps réel les modifications de surface réalisées. Nous avons ainsi construit des gradients d'oligonucléotides par couplage SECM-SPRi, ce qui

## Conclusion générale

---

permet le contrôle du processus de dépôt (dimensions des motifs biologiques, concentration en sondes) à l'aide de paramètres expérimentaux tels que la vitesse de déplacement de la microélectrode, ou encore l'intervalle de temps entre deux applications de potentiel de copolymérisation.

Ce couplage des deux techniques présente donc l'avantage de modifier et de caractériser une surface en une seule étape.

Notre troisième étude a consisté en la détection électrochimique de nucléosides, constituants de l'ADN, sur un nouveau matériau carboné d'électrode, le diamant dopé bore. Nous avons ainsi montré que ces électrodes étaient particulièrement adaptées à la détection de l'oxydation de telles molécules par voltamétrie impulsionnelle différentielle, en raison de la large fenêtre d'électroinactivité du matériau en milieu aqueux et du faible rapport signal sur bruit.

Cette étude a également mis en évidence un phénomène d'adsorption des produits de la réaction d'oxydation des nucléosides, aussi bien dans le cas de la 2'-désoxyguanosine que de la 2'-désoxyadénosine, sur la surface de diamant dopé bore. Nous avons modélisé les courbes de voltamétrie cyclique expérimentales obtenues en présence d'une sonde redox en fonction de la quantité de produits oxydés formés et susceptibles de s'adsorber sur la surface de l'électrode, par des calculs analytiques selon différents modèles, ce qui nous a permis de conclure quant à une adsorption sous la forme d'un film continu sur la surface de diamant permettant le transfert des électrons.

Enfin, nous avons illustré l'intérêt de la microscopie électrochimique pour la caractérisation d'interfaces en réalisant la cartographie de surfaces de diamant ainsi modifiées. Les images 2D obtenues, ainsi que les courbes d'approche réalisées, ont montré une perte de réactivité homogène sur la surface étudiée du médiateur redox en fonction de la quantité de nucléoside introduite dans la solution, ce qui confirme la présence d'un film homogène de produits oxydés adsorbés sur la surface du diamant dopé bore.

Afin de compléter cette étude, il serait intéressant d'utiliser la fluidique pour la détection d'ODN et d'ADN afin d'améliorer la qualité du signal. De plus, il pourrait être envisagé de réaliser la détection de nucléosides, nucléotides et d'oligonucléotides sous flux et d'intégrer des périodes de régénération de l'électrode de diamant.

## Conclusion générale

---

En conclusion, ces travaux de recherche ont permis de mettre en évidence plusieurs capacités de la microscopie électrochimique, aussi bien en tant qu'outil d'élaboration, que comme outil d'analyse de surfaces. L'ensemble de cette étude a donné lieu à plusieurs publications dans des revues scientifiques :

### *Chapitres II, III et IV :*

- Micro-imprinting of oligonucléotides gradients on gold surfaces : A new approach based on the combination of Scanning Electrochemical Microscopy and Surface Plasmon Resonance imaging (SECM/SPRi)  
E. Fortin, Y. Defontaine, P. Mailley, T. Livache, S. Szunerits, *Electroanalysis* **2005**, 17, 495–503.
- Imaging of DNA hybridization on microscopic polypyrrole patterns using scanning electrochemical microscopy (SECM) : the HRP bio-catalysed oxidation of 4-chloro-1-naphtol  
E. Fortin, P. Mailley, L. Lacroix, S. Szunerits, *Analyst* **2006**, sous presse.
- Comparison of different strategies on DNA chip fabrication and DNA-sensing : optical and electrochemical approaches  
S. Szunerits, L. Bouffier, R. Calemczuk, B. Corso, M. Demeunynck, E. Descamps, Y. Defontaine, J.-B. Fiche, E. Fortin, T. Livache, P. Mailley, A. Roget, E. Vieil, *Electroanalysis* **2005**, 17, 2001–2017.
- Sensitive surface plasmon resonance imaging of hybridization events on a DNA array formed using a microcell : a new way of electrospotting  
S. Szunerits, E. Fortin, E. Descamps, P. Mailley, T. Livache, en cours de préparation.

### *Chapitres V, VI et VII :*

- Nucleosides and ODN electrochemical detection onto boron doped diamond electrodes  
E. Fortin, J. Chane-Tune, P. Mailley, S. Szunerits, B. Marcus, J.-P. Petit, M. Mermoux, E. Vieil, *Bioelectrochemistry* **2004**, 63, 303–306.
- Interfacing Boron Doped Diamond and biology : an insight on its use for bioanalytical applications  
E. Fortin, J. Chane-Tune, D. Delabouglise, P. Bouvier, T. Livache, P. Mailley, B. Marcus, M. Mermoux, J.-P. Petit, S. Szunerits, E. Vieil, *Electroanalysis* **2005**, 17, 517–526.

- Voltammetric study of the adsorption of 2'-deoxyguanosine oxidation products at oxidized Boron Doped Diamond (BDD) films using hexachloroiridate as diffusive redox mediator

E. Fortin, E. Vieil, P. Mailley, S. Szunerits, T. Livache, en préparation pour *Anal. Chem.*

Une perspective importante envisagée à ce travail est une diminution de la taille des microélectrodes en utilisant un fil conducteur de taille nanométrique, ce qui permettrait de réduire la dimension des spots ou des gradients d'oligonucléotides formés et d'augmenter la sensibilité de détection. Une seconde perspective intéressante est d'utiliser différents types d'assemblages moléculaires afin de réaliser la détection de l'hybridation à l'aide d'autres modes de fonctionnement de la SECM, ce qui pourrait augmenter la sensibilité de mesure, tel que le mode feedback positif avec la peroxydase par exemple. Enfin, il pourrait être envisagé d'utiliser le mode feedback de la microscopie électrochimique pour la détection de la reconnaissance de protéines comme les systèmes antigènes/anticorps.

# Annexes



## **I. Annexe 1 : la fabrication des substrats utilisés**

### **I.A. Substrats de diamant dopé bore**

Ces substrats sont utilisés dans les chapitres V, VI et VII.

Les substrats de diamant dopé au bore utilisés ont été synthétisés par dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma micro-ondes (MPCVD) par Mme Bernadette MARCUS au Laboratoire d'Electrochimie et de Physico-chimie des Matériaux et des Interfaces (LEPMI) à Saint Martin d'Hères.

#### **I.A.1. Synthèse des films de diamant**

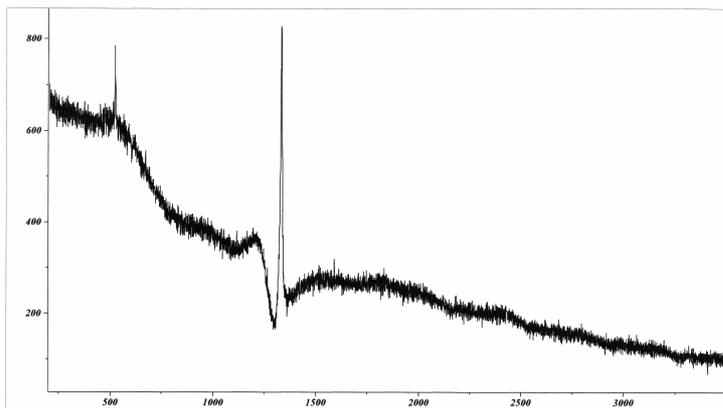
Les films de diamant ont été déposés sur des substrats fortement conducteurs p-Si (100). Ces substrats sont préalablement pré-traités par un nettoyage dans différents solvants puis plongés dans l'acide fluorhydrique pendant une minute. Après rinçage et séchage, ils sont ensuite placés dans un bain à ultrasons dans un mélange d'acétone et de poudre de diamant, puis dans le réacteur micro-ondes. Ceci permet de déposer des particules de diamant ( $>10^8$  particules/cm<sup>2</sup>) sur la surface qui serviront ensuite de sites de nucléation pendant la croissance du film.

Des films de diamant microcristallin de haute qualité peuvent alors être déposés à partir d'un mélange gazeux de dihydrogène et de méthane ( $H_2 + CH_4$ ), ce gaz étant ionisé (plasma) grâce à un rayonnement micro-ondes. Le méthane fournit les atomes de carbone qui forment le diamant. L'hydrogène, quant à lui, possède deux fonctions. La première est de réagir, au moment où le graphite et le diamant sont créés tous les deux, préférentiellement avec le graphite en formant des composés volatils qui se détachent de la surface, éliminant ainsi le graphite au profit du diamant. La seconde est de stabiliser la surface du diamant en saturant ses liaisons pendantes. En effet, à la surface d'une couche de diamant, des liaisons  $sp^2$ , favorables à la formation du graphite, se forment chaque fois que deux atomes de carbone adjacents ont une liaison libre. L'hydrogène se lie sur les atomes de carbone, ce qui évite la formation d'une liaison de type graphite.

Le dopage est réalisé grâce à la présence de poudre d'oxydes de bore ( $B_2O_3$ ) dans le réacteur lors du dépôt. Les atomes de bore se substituent alors à certains atomes de carbone pendant la croissance du film. Nous obtenons ainsi un film polycristallin avec un taux de dopage de l'ordre de  $10^{20}$  atomes de bore par cm<sup>3</sup>.

### **I.A.2. Caractérisation des films de diamant après synthèse**

Les films de diamant ainsi obtenus sont ensuite caractérisés par spectroscopie Raman par M. Michel MERMOUX au LEPMI<sup>1,2</sup>. La spectroscopie Raman fournit des informations spatiales de haute résolution concernant la microstructure du film, les impuretés de carbone non-diamant, le taux de dopage et les propriétés optiques. Les films polycristallins obtenus sont constitués de microcristallites aux diverses orientations préférentielles, de joints de grain inter-cristaux et autres défauts étendus, de dopants et d'impuretés de carbone non-diamant.



**Figure 1:** Spectre Raman d'un film de diamant dopé au bore après synthèse.

Sur la **figure 1**, la bande intense à approximativement  $1332\text{ cm}^{-1}$  correspond au diamant. La bande à  $1230\text{ cm}^{-1}$  indique la présence du dopant, le bore. Son intensité montre que les échantillons étudiés sont fortement dopés. La dispersion observée vers  $1540\text{ cm}^{-1}$  indique la présence de phases d'impuretés de carbone non-diamant.

### **I.B. Substrats d'or**

Ces substrats sont utilisés dans les chapitres II, III et IV.

Les substrats d'or utilisés ont été synthétisés par un procédé de pulvérisation cathodique par M. Jean-Luc THOMASSIN au sein de la plate-forme PROMESS du CEA-Grenoble.

Les films d'or d'une épaisseur de 50 nm ont été déposés sur des lames de verre après un pré-dépôt de 5 nm de titane. Ces lames de verre (76x26x1 mm) sont préalablement

<sup>1</sup> A. Haouni, M. Mermoux, B. Marcus, L. Abello, G. Lucazeau, *Diamond Relat. Mater.* **1999**, 8, 657–662.

<sup>2</sup> M. Mermoux, B. Marcus, G. M. Swain, J. E. Butler, *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 10816–10827.

lavées dans un bain à ultrasons, puis séchées individuellement sous flux d'azote. Elles sont ensuite plongées successivement dans un bain d'acétone, puis d'éthanol et enfin d'eau distillée. Après séchage, les lames sont prêtes à être utilisées pour le dépôt de titane, puis d'or, par pulvérisation cathodique. Ce procédé de dépôt sous vide fonctionnant à froid, en plasma luminescent dans un gaz maintenu à pression réduite ( $10^{-1}$  à  $10^{-2}$  Pa) permet de déposer tout type de matériaux. Les dépôts réalisés par cette technique ont une épaisseur comprise entre quelques nanomètres et quelques dizaines de nanomètres.

## II. Annexe 2 : la fabrication de microélectrodes

La microélectrode représente l'élément central de la microscopie électrochimique. La technique de fabrication utilisée peut se décomposer en plusieurs étapes.

### II.A. L'étirage du capillaire

La première étape consiste à étirer le capillaire et à réduire ainsi son diamètre sur une extrémité (pointe). L'étirage du capillaire est réalisé horizontalement à l'aide d'une étireuse de micro-pipettes (SUTTER P-97—**Fig. 2**), par l'action d'un filament qui chauffe localement, et sous atmosphère contrôlée, le capillaire sur lequel sont appliquées des forces de traction opposées. Après rupture, nous obtenons ainsi deux capillaires étirés de forme conique.



**Figure 2 :** *Etireuse de capillaire SUTTER Instrument P-97.*

Plusieurs paramètres permettent d'étirer le capillaire de manière reproductible, et d'obtenir la taille (100–300  $\mu\text{m}$ ) et la forme de pointe souhaitées. Ces paramètres sont fonctions des caractéristiques du filament et du capillaire (taille et composition) utilisés :

- **HEAT** (0–999) : Ce paramètre contrôle le niveau de courant électrique appliqué au filament, et donc la température de chauffage appliquée au capillaire. Cette température est proche de la température de transition vitreuse du verre. Afin

d'obtenir des pointes fines et reproductibles, il faut choisir une valeur de HEAT telle que le capillaire soit étiré en 5 à 6 secondes.

- **PULL** (0–255) : Ce paramètre contrôle la force de traction appliquée. Plus il est élevé, plus la pointe sera longue et aura un diamètre faible.
- **VELOCITY** (0–255) : Cette valeur représente la vitesse à laquelle le capillaire est étiré. Typiquement, pour les microélectrodes, elle est comprise entre 80 et 120.
- **TIME** (0–255) : Ce paramètre contrôle la durée du pulse de refroidissement. Une unité correspond à 0,5 ms. Plus le temps est court, plus la pointe est longue.

Nos capillaires ont pour diamètre extérieur 1 mm et intérieur 0,6 mm (Narishige).

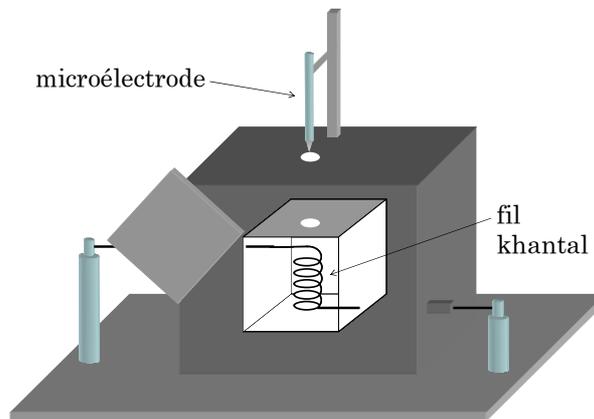
Dans notre cas, les paramètres utilisés sont les suivants :

HEAT	PULL	VELOCITY	TIME
794	160	110	200

**Tableau 1:** Paramètres utilisés pour l'étirage de nos capillaires.

## II.B. La fermeture de la pointe

La seconde étape consiste à chauffer légèrement l'extrémité du capillaire afin de former un cône à l'intérieur du verre (**Fig. 4**). Ceci est réalisé à l'aide d'un montage construit au laboratoire par A. Dominget (**Fig. 3**).



**Figure 3 :** Schéma du montage pour le scellement des microélectrodes.

Celui-ci consiste à utiliser la chaleur dégagée par effet Joule par une bobine de khantal (5 spires). Le capillaire étiré est placé au milieu du bobinage à l'aide d'un pied statique et d'un micromanipulateur, et le fil de khantal est chauffé par une alimentation

stabilisée en courant (2,8 A). La pointe est alors remontée hors du bobinage, puis replacée au centre pendant quelques secondes une dizaine de fois jusqu'à fermeture du capillaire.

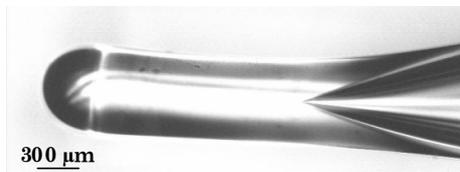


Figure 4 : Fermeture du capillaire étiré.

### II.C. L'insertion du fil de platine

L'étape suivante consiste à insérer dans le capillaire modifié à son extrémité un fil de platine de 10 μm de diamètre. Puis, ce fil est scellé dans le verre selon le même principe que la fermeture du capillaire étiré, avec une intensité appliquée légèrement supérieure, de l'ordre de 3 A (Fig. 5).

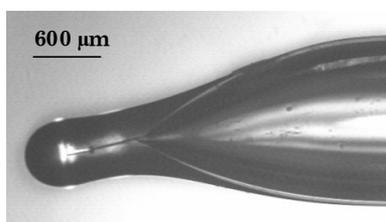


Figure 5 : Scellement verre-platine.

Ensuite, le contact électrique est réalisé par l'intermédiaire de mercure (Fig. 6).

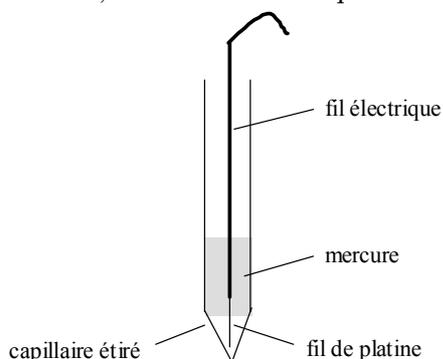


Figure 6 : Schéma d'insertion du platine et contact électrique.

Après cette étape, le haut du capillaire de verre de la microélectrode et le fil de contact électrique sont scellés à la colle.

### II.D. Le polissage de la microélectrode

Le polissage est un stade de fabrication des microélectrodes très important. Il contribue à la planéité de la surface, ce qui est primordial pour l'utilisation de la microélectrode en microscopie électrochimique. Il est réalisé en deux étapes. Nous polissons tout d'abord l'électrode, et plus exactement le verre autour du fil de platine, avec du papier

abrasif (grain 1200) jusqu'à ce que le platine devienne apparent. Ensuite, la microélectrode est polie plus finement à l'aide d'une micro-polisseuse (**Fig. 7**).



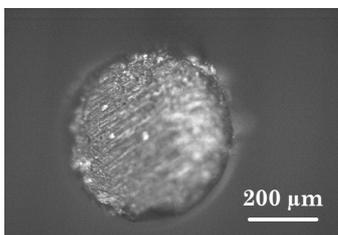
**Figure 7 :** Polisseuse NARISHIGE® EG-44 utilisée.

La microélectrode est placée perpendiculairement au disque micro-abrasif au moyen d'un pied statique. A l'aide du micromanipulateur, elle est approchée délicatement jusqu'au contact du disque mis en rotation. Le polissage est ainsi réalisé en utilisant successivement trois disques micro-abrasifs de granulométries 5, 3 puis 1  $\mu\text{m}$ .

Une fois la microélectrode polie, elle est observée au microscope optique, puis testée électrochimiquement en solution aqueuse.

### **II.E. Observation au microscope optique**

Cette observation nous permet de vérifier plusieurs facteurs tels que le centrage du fil de platine dans l'isolant de verre, et la forme disque de la microélectrode. De plus, il est alors possible de calculer le rapport noté  $R_g$  de la microélectrode, c'est-à-dire le rapport entre le diamètre de la gaine isolante en verre et celui du fil de platine.

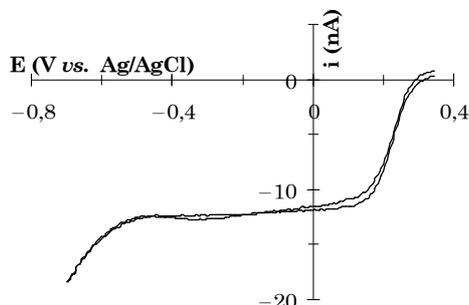


**Figure 8 :** Observation de la microélectrode au microscope optique.

Le fil de platine utilisé a un diamètre de 10  $\mu\text{m}$  et d'après la **figure 8**, le diamètre de la gaine isolante en verre est ici de 450  $\mu\text{m}$ . Nous pouvons donc calculer la valeur du rapport  $R_g$  pour cette microélectrode :  $R_g=45$ .

## II.F. Mesures électrochimiques

Cette seconde vérification du processus de fabrication des microélectrodes consiste à réaliser une voltamétrie cyclique de l'ultramicroélectrode dans une solution contenant une espèce redox dite médiateur, telle que  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  (**Fig. 9**).



**Figure 9 :** Voltamogramme d'une microélectrode (Pt-10  $\mu\text{m}$  de diamètre) dans une solution de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  10 mM /  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,5 M,  $V=50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Nous vérifions alors que ce voltamogramme est en accord avec la théorie des microélectrodes, c'est-à-dire qu'après un temps suffisamment long, supérieur au temps caractéristique du transfert de matière, un état stationnaire est établi (superposition des courbes aller et retour), et le courant mesuré atteint une valeur limite. La diffusivité des espèces au travers de la couche de diffusion est alors suffisamment rapide afin d'obtenir un équilibre entre la vitesse de transfert de charge et la vitesse de transport de matière.

Connaissant le coefficient de diffusion de l'espèce redox en solution, nous pouvons alors calculer cette valeur de courant limite théorique :

$$i_{T,\infty} = 4nFDCa \quad (\text{II.1})$$

avec  $n$  : le nombre d'électrons échangés ( $n=1$  pour le couple  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ),

$F$  : la constante de Faraday,

$D$  : le coefficient de diffusion de l'espèce ( $\text{cm}^2/\text{s}$  ; ici,  $D = 6,4 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ),

$C$  : la concentration de l'espèce en solution ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ ),

$\alpha$  : le rayon de la microélectrode ( $\text{cm}$ ).

Après calcul, il vient  $i_{T,\infty} = -12,3 \text{ nA}$ . Expérimentalement, nous obtenons :  $i_{T,\infty} = -12,1 \text{ nA}$ , d'où une erreur relative de 1,6 %. Cet écart entre les courants limites de diffusion théorique et mesuré peut s'expliquer par l'état de surface de la microélectrode. En effet, nous avons assimilé le platine à un disque lors de l'utilisation de la formule théorique donnant le courant limite de diffusion. Or, celui-ci n'est sans doute pas parfaitement plan et circulaire. Ceci indique l'importance et la difficulté d'un polissage parfait de la microélectrode. Cependant,

cet écart entre les valeurs théorique et expérimentale étant faible, nous pouvons considérer que cette microélectrode est de bonne qualité et qu'elle pourra être utilisée en tant que sonde en microscopie électrochimique par la suite.

### III. Annexe 3 : modélisation des courbes d'approche en SECM

Afin de modéliser les courbes d'approche expérimentales obtenues en SECM, nous avons utilisé la théorie des courbes  $i_T-d$  à cinétique contrôlée sur une surface conductrice. L'équation décrivant un tel système a été établie par M. V. Mirkin et B. R. Horrocks<sup>3</sup> :

$$I_T(L) = I_S \times \left( 1 - \frac{I_T^{INS}}{I_T^C} \right) + I_T^{INS} \quad (\text{III.1})$$

avec :  $I_T^C$  et  $I_T^{INS}$  les courants à la sonde correspondants à la régénération contrôlée par la diffusion du médiateur redox sur une surface conductrice et non conductrice respectivement, et  $I_S$  le courant au substrat.

$I_T^C$ ,  $I_T^{INS}$  et  $I_S$  peuvent être déterminés à partir des approximations analytiques suivantes :

$$I_T^{INS} = \frac{1}{0,15 + \frac{1,5385}{L} + 0,58 \exp\left(\frac{-1,14}{L}\right) + 0,0908 \exp\left(\frac{L-6,3}{1,017L}\right)} \quad (\text{III.2})$$

$$I_T^C = 0,68 + \frac{0,78377}{L} + 0,3315 \exp\left(\frac{-1,067}{L}\right) \quad (\text{III.3})$$

$$I_S = \frac{0,78377}{L\left(1 + \frac{1}{\Lambda}\right)} + \frac{0,68 + 0,3315 \exp\left(\frac{-1,0672}{L}\right)}{1 + F(L, \Lambda)} \quad (\text{III.4})$$

$$\text{avec : } F(L, \Lambda) = \frac{\frac{11}{\Lambda} + 7,3}{110 - 40L} \quad (\text{III.5})$$

$$\Lambda = k_{\text{eff}} \frac{d}{D} \quad (\text{III.6})$$

$$L = \frac{d}{a} \quad (\text{III.7})$$

où  $k_{\text{eff}}$  est la constante de vitesse hétérogène apparente (en  $\text{cm s}^{-1}$ ) et  $D$  le coefficient de diffusion du médiateur redox (ici,  $D[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}] = 6,3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ).

<sup>3</sup> M. V. Mirkin, B. R. Horrocks, *Anal. Chim. Acta* **2000**, 406, 119–146.

## Abstract

This work deals with : (i) the electrochemical detection of nucleosides on a new carbon electrode material, Boron Doped Diamond (BDD), and (ii) the use of a recent apparatus, scanning electrochemical microscopy (SECM) to micropattern surfaces with oligonucleotides and to detect the hybridization event.

On the one hand, we illustrate the capacity of scanning electrochemical microscopy to micropattern and characterize surfaces. By direct mode of SECM, using the microelectrode as a counter electrode, polypyrrole–oligonucleotide spots with micrometric dimensions are deposited on a gold surface. This patterning method is optimized studying the spots hybridization by fluorescence microscopy. By the difference in surface conductivity between gold and polypyrrole–oligonucleotide, SECM can detect the spots on the gold surface using the feedback mode. Then, the hybridization event is detected using the feedback mode by the precipitation of an insulating product on the surface generated by the reaction catalysed by the peroxidase which is coupled by a biological assembly to the complementary oligonucleotide. Finally, this electrochemical method is coupled to an optical one, Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi), to visualize in real time the patterning step of the gold surface with oligonucleotide spots or surface oligonucleotide gradients.

On the other hand, the oxidation reactions of both nucleosides, 2'–deoxyguanosine and 2'–deoxyadenosine, are performed on an oxygenated boron doped diamond electrode. This points out the interest of this new material thanks to its enlarged potential window in aqueous media and its little and stable background current. Then, we show the formation of a continuous film of oxidized products on the BDD surface by a macroscopic study analysing cyclic voltammetries of a redox mediator, and in a microscopic way with the use of scanning electrochemical microscopy.

### **Key words :**

Scanning electrochemical microscopy (SECM), DNA biosensor, nucleoside oxidation, Boron Doped Diamond (BDD), Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi), polypyrrole, surface gradients, hybridization.

## Résumé

L'objectif de ce travail est double : (i) la détection électrochimique des nucléosides sur un nouveau matériau carboné d'électrode, le diamant dopé bore (BDD), et (ii) l'utilisation d'un nouvel outil, la microscopie électrochimique à balayage (SECM), afin de fonctionnaliser des surfaces avec des sondes oligonucléotidiques et de détecter le phénomène d'hybridation.

Dans un premier temps, nous montrerons la dualité d'utilisation de la microscopie électrochimique en tant qu'outil de fonctionnalisation et de caractérisation de surfaces. Par mode direct de la SECM, en utilisant la microélectrode en tant que contre-électrode, des spots de polypyrrole-oligonucléotide de taille micrométrique sont déposés sur un substrat d'or. Cette méthode d'élaboration est optimisée en étudiant l'hybridation des spots en microscopie de fluorescence. La présence de ces spots sur la surface est ensuite détectée en mode feedback de la SECM *via* la différence de conductivité entre le polypyrrole-oligonucléotide et l'or. Puis, le phénomène d'hybridation est étudié par mode feedback par la précipitation d'un produit isolant sur la surface formé par une réaction catalysée par la peroxydase couplée par l'intermédiaire d'un assemblage biologique à l'oligonucléotide complémentaire. Enfin, cette technique électrochimique est couplée à une méthode optique, l'imagerie de résonance plasmonique de surface (SPRi), afin de visualiser en temps réel l'étape de structuration de la surface d'or par des spots d'oligonucléotides ou par des gradients de surface d'oligonucléotides.

Dans un second temps, nous présenterons l'étude des réactions d'oxydation des nucléosides, la 2'-désoxyguanosine et la 2'-désoxyadénosine, sur une électrode de diamant dopée bore oxygéné. Nous montrerons ainsi l'intérêt de ce nouveau matériau carboné d'électrode pour cette application en raison de sa large fenêtre d'électroinactivité en milieu aqueux et son faible et stable courant de fond. Puis, nous mettrons en évidence la formation d'un film continu constitué des produits de ces réactions d'oxydation sur l'électrode par une étude macroscopique à l'aide de voltamétries cycliques d'une sonde redox, et une étude à l'échelle microscopique en utilisant le microscope électrochimique à balayage.

### **Mots clés :**

Microscopie électrochimique à balayage (SECM), puces à ADN, oxydation des nucléosides, diamant dopé bore (BDD), imagerie de résonance plasmonique de surface (SPRi), polypyrrole, gradients de surface, hybridation.