



**HAL**  
open science

# Développement de supports polythiophène conducteurs pour l'immobilisation d'ADN, la détection électronique de l'hybridation et la libération locale de gènes

Christelle Gautier

► **To cite this version:**

Christelle Gautier. Développement de supports polythiophène conducteurs pour l'immobilisation d'ADN, la détection électronique de l'hybridation et la libération locale de gènes. Matériaux. Université du Maine, 2006. Français. NNT: . tel-00192830

**HAL Id: tel-00192830**

**<https://theses.hal.science/tel-00192830>**

Submitted on 29 Nov 2007

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

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

# THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du grade de

**DOCTEUR**

**de l'UNIVERSITE DU MAINE**

Spécialité : Chimie et Physicochimie des polymères

Présentée par

**Christelle GAUTIER**

---

## **Développement de supports polythiophène conducteurs pour l'immobilisation d'ADN, la détection électronique de l'hybridation et la libération locale de gènes**

---

*Soutenue le 27 octobre 2006 devant la commission d'examen :*

M. B. CHENAIS	Professeur, Université du Maine, <b>Examineur</b>
M. C. COUGNON	Chargé de Recherche CNRS, Université du Maine, <b>Co-directeur de thèse</b>
M. A. DERONZIER	Directeur de Recherche CNRS, Université de Grenoble 1, <b>Rapporteur</b>
M. J.-C. LACROIX	Professeur, Université de Paris VII, <b>Rapporteur</b>
M. J.-F. PILARD	Professeur, Université du Maine, <b>Directeur de thèse</b>
M <sup>me</sup> J. RAULT-BERTHELOT	Directeur de Recherche CNRS, Université de Rennes1, <b>Présidente</b>



*À mes parents.*

*À ma sœur Aurélie.*

*À mon mari Cédric.*



Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé dans l'Unité de Chimie Organique Moléculaire et Macromoléculaire de l'Université du Maine (Unité de Recherche Associée au CNRS n°6011) dirigée par le Professeur Laurent Fontaine. Je lui témoigne toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie dans son équipe de recherche et je le remercie pour ses conseils et son soutien.

Je remercie vivement le Professeur Jean-François Pilard pour l'accueil qu'il m'a réservé au sein de son équipe, pour la confiance qu'il m'a accordée et pour ses conseils avisés.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Messieurs Alain Deronzier, Directeur de Recherche au CNRS à l'Université de Grenoble 1 et Jean-Christophe Lacroix, Professeur à l'Université de Paris VII, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapporteurs. J'associe à ces remerciements Madame Joëlle Rault-Berthelot, Directeur de Recherche au CNRS à l'Université de Rennes 1 et Monsieur Benoît Chénais, Professeur à l'Université du Maine, pour leurs précieux conseils et pour avoir accepté de participer à ce jury.

L'accueil que les Professeurs Marc Laulier, puis Benoît Chénais m'ont réservé au laboratoire de Biologie et de Génétique Evolutive m'a permis de travailler dans de très bonnes conditions. La bonne humeur qui règne dans ce laboratoire et l'aide précieuse dont j'ai toujours bénéficié ont contribué à me faire adorer la manipulation de l'ADN. Je remercie Laurence, Elisabeth, Yann, Françoise et Brigitte pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur sourire. J'adresse un grand merci à Nathalie Casse, Maître de Conférence, avec qui ce fut un réel plaisir de travailler, pour sa patience, pour le temps qu'elle a consacré à m'apprendre toujours avec un grand enthousiasme à manipuler comme « une vraie biologiste » et pour sa bonne humeur constante.

Je ne saurais assez remercier Charles Cougnon, Chargé de Recherche au CNRS à l'Université du Maine (couramment appelé « Chef ») pour m'avoir communiqué, avec autant de ferveur, ses connaissances en électrochimie, pour les discussions passionnantes que nous avons échangées lors de l'interprétation des résultats et les discussions, toutes aussi intéressantes, que nous avons eues autour d'un café. Son implication dans ce sujet de recherche, sa disponibilité, sa patience, sa bonne humeur, ses carambars périmés et ses expressions sorties de « derrière les fagots » ont largement contribué à rendre agréables ces trois années. J'espère qu'il gardera ce côté « bouquet de fleurs » qui lui va si bien.

Je tiens à remercier vivement Sagrario Pascual et Véronique Montembault, pour leur soutien, leur disponibilité et je leur suis très reconnaissante pour l'aide précieuse qu'elles m'ont

apportée. Je remercie Véronique pour les conseils avisés qu'elle m'a prodigués, lors des préparations de mes enseignements et des corrections de TP.

Je remercie le Professeur Jean Claude Brosse, Daniel Derouet, Jean Claude Soutif, Albert Laguerre, Michel Thomas, Frédéric Gohier et Irène Campistron, pour leur disponibilité de tous les jours au laboratoire, leur gentillesse et leurs conseils.

Je remercie « Jean Louc » Moneger et Anita Loiseau pour leur aide au quotidien.

Je tiens à remercier les stagiaires de master, Fanny (copine de paillasse avec qui j'ai partagé tant de bons moments, et avec qui il m'en reste tout autant à partager je l'espère), Thang et Ornella qui ont participé à l'avancement de ces travaux. Je remercie également Charles E., Gaëlle, Stéphanie, Nhung, Ngoc, Tang, Chuanpit, Anuwat, Freddy, Mounia, Zoubida et Sandra, pour les moments sympathiques que nous avons partagés.

Je garderai également des supers souvenirs des bons repas partagés au RU avec les copains du LSO Céline P., Arnaud N., Catherine, Fred, Ludo, Jane, Lucie, Sophie, Anne.

Je n'oublie pas, malgré l'éloignement, mes fidèles coéquipiers de tarot et amis Alexandre, Olivier et Pierre, dont le soutien et l'humour sont toujours aussi infaillibles.

Mes remerciements vont également à mes collègues de bureau, que j'ai vu partir les uns après les autres avec un gros pincement au cœur Vincent (Pépère), David (Foufou), qui ont su m'accueillir lors de mes premiers pas de thésarde et m'ont bien fait rire, Prakash et Duan. Mes collègues de bureau actuels, tous aussi sympas les uns que les autres, pour qui c'est le moment de me voir partir à mon tour. Céline L. (toujours dispo ainsi bien pour m'aider lors de mes cafouillages informatiques que pour papoter devant un café), Jean-Marc (le rossignol milanais), Sandie (Paris Hilton), Rachidou (le tombeur), vous me manquerez. Un grand merci également à Nasreddine pour sa gentillesse et l'ardeur qu'il déploie pour chasser les animaux nocturnes.

Je remercie sincèrement mes amis, qui, sans être présents au laboratoire, ont toujours été là Céline F. et Stéphane (nos incontournables coéquipiers sur Catane, sans qui les soirées d'hiver seraient bien tristes), Erika et Benoît (les rois des pommes au four), et tous les autres.

Merci à ma famille, plus particulièrement mes beaux-parents et à Michel et Maryline.

Enfin, un grand merci à mes parents qui m'ont toujours soutenue, à Aurélie et Julien et à mon mari Cédric, qui a eu la patience de partager mon quotidien et a su garder son calme et son humour en toutes circonstances.

## Liste des abréviations et symboles

$\alpha$	Angle de déphasage
$\delta$	Taux de dopage du polymère
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFM	« Atomic Force Microscopy », microscopie à force atomique
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CPDT	4H-cyclopenta[2,1-b ;3,4-b']dithiophène
ECS	Electrode au Calomel Saturé
F	Constante de Faraday (96480 C.mol <sup>-1</sup> )
NCS	N-ChloroSuccinimide
ODN	OligoDésoxyriboNucléique (ou Oligonucléotide)
PCR	« Polymerase Chain Reaction », réaction de polymérisation en chaîne
PMMA	Poly(méthacrylate de méthyle)
PP	Polypropylène
Q <sub>p</sub>	Charge correspondant à l'oxydation du polymère
Q <sub>s</sub>	Charge de synthèse
R <sub>f</sub>	Rapport frontal
SECM	Microscopie électrochimique à balayage
SIE	Spectroscopie d'Impédance Electrochimique
SPR	« Surface Plasmon Resonance », Résonance Plasmonique de Surface
UME	Ultra MicroElectrode





<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
<b>Etude bibliographique</b> .....	<b>4</b>
<b>I. Principe de fonctionnement d'un biocapteur</b> .....	<b>4</b>
<b>II. Préparation des couches sensibles</b> .....	<b>6</b>
<i>II.1. Les supports</i> .....	6
<i>II.2. Modification des supports par le matériel biologique sonde</i> .....	7
II.2.1 La synthèse « on chip » ou synthèse in situ .....	7
II.2.2 La synthèse « off chip » .....	11
<b>III. Lecture de l'hybridation</b> .....	<b>16</b>
<i>III.1. Transduction de l'hybridation par la détection d'un marqueur actif</i> .....	16
III.1.1 Détection par marquage radioactif ou fluorescent .....	16
III.1.2 Détection électrochimique .....	17
<i>III.2. Détection de l'hybridation par l'emploi d'un support actif dans la transduction du signal</i> .....	18
III.2.1 Microgravimétrie par microbalance à cristal de quartz .....	18
III.2.2 Résonance plasmonique de surface (SPR) .....	19
III.2.3 Microscopie électrochimique à balayage (SECM).....	20
III.2.4 Oxydation des bases nucléiques de l'ADN .....	21
<b>IV. La spectroscopie d'impédance électrochimique appliquée au développement de capteurs ADN</b> .....	<b>22</b>
<i>IV.1. Notions d'impédance électrochimique</i> .....	22
<i>IV.2. Détection de l'hybridation par impédance électrochimique</i> .....	23
<b>V. Pour de nouvelles applications</b> .....	<b>24</b>
<b>Partie 1 :</b> .....	<b>26</b>
<b>Chapitre 1 :</b> .....	<b>27</b>
<b>Synthèse du monomère <math>M_1</math> et comportement électrochimique du poly(<math>M_1</math>)</b> .....	<b>27</b>
<b>I. Le choix du monomère</b> .....	<b>27</b>
<b>II. Synthèse du monomère <math>M_1</math></b> .....	<b>28</b>
<b>III. Formation du poly(<math>M_1</math>)</b> .....	<b>28</b>
<b>IV. Etude électrochimique d'un film de poly(<math>M_1</math>)</b> .....	<b>31</b>
<i>IV.1. Comportement anodique</i> .....	31
IV.1.1 Etude du dopage p par voltamétrie cyclique couplée à la microbalance à cristal de quartz.....	31

---

IV.1.2 Etude du dopage p par impédance électrochimique.....	33
IV.2. Comportement cathodique.....	37
IV.3. Etude de la dégradation cathodique du poly( $M_1$ ).....	42
IV.4. Post-fonctionnalisation de la matrice poly( $M_1$ ) par des amines primaires.....	51
<b>Chapitre 2 :.....</b>	<b>56</b>
<b>Elaboration de supports de type polythiophène autorisant la lecture électronique de l'hybridation.....</b>	<b>56</b>
<b>I. Préparation et étude des supports polymères conducteurs.....</b>	<b>58</b>
I.1. Formation du copolymère.....	58
I.2. Etude électrochimique du copolymère.....	59
I.2.1 Comportement anodique.....	60
I.2.2 Comportement cathodique.....	62
<b>II. Fonctionnalisation des supports par de l'ADN.....</b>	<b>64</b>
II.1. Immobilisation des brins d'ADN sondes.....	64
II.2. Hybridation avec les brins d'ADN cibles.....	65
<b>III. Diagnostic de l'hybridation.....</b>	<b>67</b>
<b>IV. Modélisation par un circuit équivalent.....</b>	<b>69</b>
<b>Chapitre 3 :.....</b>	<b>75</b>
<b>Vers des dispositifs à commande électrochimique permettant de délivrer une sonde biologique.....</b>	<b>75</b>
<b>I. Les difficultés rencontrées.....</b>	<b>75</b>
<b>II. Préparation du matériel biologique.....</b>	<b>78</b>
<b>III. Préparation et modification des supports.....</b>	<b>80</b>
III.1. Immobilisation des sondes.....	80
III.2. Hybridation avec les brins cibles.....	81
<b>IV. Libération à potentiel imposé du fragment d'ADN préalablement immobilisé.....</b>	<b>83</b>
<b>V. Conclusion et perspectives.....</b>	<b>87</b>

<b>Partie 2</b> .....	<b>88</b>
<b>Chapitre 4</b> :.....	<b>89</b>
<b>Synthèse et comportement électrochimique du poly(M<sub>i</sub>)</b> .....	<b>89</b>
<b>I. Synthèse du monomère 4-cyclopenta[2,1-b;3,4-b']dithiophène-4-ylidèneméthyl-N;N-diéthyl-benzènesulfonamide (M<sub>i</sub>)</b> .....	<b>89</b>
1.1. Synthèse du 4H-cyclopenta[2,1-b ;3,4-b']dithiophène (CPDT).....	89
1.2. Synthèse du 4-(diéthylsulfonyl)benzaldéhyde et préparation du composé M <sub>i</sub> .....	91
<b>II. Formation et étude électrochimique du poly(M<sub>i</sub>)</b> .....	<b>92</b>
II.1. Formation du poly(M <sub>i</sub> ).....	92
II.2. Comportement anodique du poly(M <sub>i</sub> ) en milieu organique.....	93
II.3. Comportement cathodique du poly(M <sub>i</sub> ) en milieu organique.....	94
II.4. Apport de la connexion électronique entre la chaîne principale du polymère et la fonction d'ancrage électroactive.....	97
II.4.1 Effet de la communication électronique établie par la chaîne latérale sur l'oxydation du polymère .	98
II.4.2 Effet de la communication électronique établie par la chaîne latérale sur la réduction du polymère .....	102
<b>III. Vers de nouveaux actionneurs électrochimiques</b> .....	<b>105</b>
<b>Chapitre 5</b> :.....	<b>107</b>
<b>Elaboration de supports de type poly(cyclopentadithiophène) autorisant la lecture électronique de l'hybridation</b> .....	<b>107</b>
<b>I. Préparation et étude des supports polymères conducteurs</b> .....	<b>107</b>
1.1. Formation du copolymère .....	107
1.2. Etude du comportement anodique du poly(M <sub>i</sub> -co-CPDT).....	108
<b>II. Fonctionnalisation des supports par de l'ADN</b> .....	<b>110</b>
II.1. Immobilisation des brins d'ADN sondes.....	110
II.2. Hybridation avec les brins d'ADN cibles.....	112
II.2.1 Hybridation avec les brins d'ADN cibles de 37 bases .....	112
II.2.2 Hybridation avec les brins d'ADN cibles de 675 bases .....	113
<b>III. Diagnostic de l'hybridation</b> .....	<b>115</b>
III.1. Lecture électronique de l'hybridation par SIE.....	115
III.2. Mise en évidence de la participation des brins d'ADN au dopage p.....	118
III.2.1 Etude par SIE .....	118
III.2.2 Etude par microbalance à cristal de quartz.....	120

<b>Chapitre 6 :</b> .....	<b>122</b>
<b>Etude d'un dispositif organique à commande électrochimique appliqué à la libération d'ADN en milieu physiologique</b> .....	<b>122</b>
<b>I. Comportement cathodique du poly(M<sub>i</sub>) en milieu aqueux</b> .....	<b>123</b>
<b>II. Libération contrôlée d'une sonde électroactive greffée en surface</b> .....	<b>125</b>
<i>II.1. Immobilisation de la sonde électroactive</i> .....	125
<i>II.2. Libération de la sonde redox immobilisée</i> .....	127
<b>III. Etat d'une matrice poly(cyclopentadithiophène) modifiée permettant la libération électrochimiquement contrôlée d'ADN</b> .....	<b>129</b>
<b>Conclusion générale</b> .....	<b>133</b>
<b>Partie A :</b> .....	<b>136</b>
<b>Synthèse et caractérisation des molécules organiques</b> .....	<b>136</b>
<b>I. Solvants et réactifs</b> .....	<b>136</b>
<i>I.1. Solvants</i> .....	136
<i>I.2. Réactifs</i> .....	136
<b>II. Techniques de caractérisation</b> .....	<b>137</b>
<i>II.1. Résonance Magnétique Nucléaire</i> .....	137
<i>II.2. Points de fusion</i> .....	137
<i>II.3. Chromatographies</i> .....	137
<b>III. Modes opératoires des synthèses organiques</b> .....	<b>137</b>
<i>III.1. Synthèse du monomère M<sub>1</sub> (N,N-diéthyl-4-(2-thiophén-3-yl-éthoxyméthyl)-benzènesulfonamide)</i> .....	137
4-bromométhyl-N,N-diéthylbenzènesulfonamide :.....	137
<i>III.2. Synthèse du monomère M<sub>i</sub> (4-cyclopenta[1,2-b ; 3,4-b']dithiophène-4-ylidèneméthyl-N,N-diéthylbenzènesulfonamide)</i> .....	139
<b>Synthèse du 4H-cyclopenta[2,1-b ;3,4-b']dithiophène (CPDT)</b> .....	139
<i>III.3. Synthèse du monomère M<sub>s</sub></i> .....	143
<i>III.4. Synthèse de la sonde ferrocenalkylamine (2-aminoéthyl ferrocénylméthyl éther)</i> .....	143
<b>Partie B :</b> .....	<b>145</b>
<b>Instrumentation et procédures électrochimiques</b> .....	<b>145</b>
<b>I. Milieu électrolytique</b> .....	<b>145</b>
<i>I.1. Milieu organique</i> .....	145
<i>I.2. Milieu aqueux</i> .....	145

---

<b>II. Cellules électrochimiques.....</b>	<b>145</b>
<i>II.1. A l'échelle analytique.....</i>	<i>145</i>
<i>II.2. A l'échelle préparative.....</i>	<i>147</i>
<b>III. Mesures électrochimiques .....</b>	<b>147</b>
<i>III.1. Microbalance à cristal de quartz.....</i>	<i>147</i>
<i>III.2. Spectroscopie d'impédance électrochimique.....</i>	<i>148</i>
<b>IV. Préparation et refunctionalisation des polymères.....</b>	<b>148</b>
<i>IV.1. Polymérisation anodique des monomères.....</i>	<i>148</i>
<i>IV.2. Refonctionnalisation des polymères en chlorure de sulfonyle .....</i>	<i>148</i>
<b>Partie C :.....</b>	<b>146</b>
<b>Biologie moléculaire : materiel et méthodes.....</b>	<b>146</b>
<b>I. Matériel biologique .....</b>	<b>146</b>
<i>I.1. Les séquences d'ADN synthétiques .....</i>	<i>146</i>
<i>I.2. Les séquences d'ADN issues du milieu naturel .....</i>	<i>146</i>
<b>II. Méthodes .....</b>	<b>147</b>
<i>II.1. Purification des plasmides .....</i>	<i>147</i>
<i>II.2. Amplification d'un fragment d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) .....</i>	<i>147</i>
<i>II.3. Electrophorèse sur gel d'agarose .....</i>	<i>148</i>
<i>II.4. Elution des fragments d'ADN à partir d'un gel d'agarose.....</i>	<i>148</i>
<i>II.5. Synthèse d'ADN simple brin par PCR asymétrique.....</i>	<i>149</i>
<i>II.6. Refonctionnalisation des polymères par de l'ADN.....</i>	<i>149</i>
<i>II.7. Traitement des brins d'ADN délivrés en solution après clivage électrochimique .....</i>	<i>150</i>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>151</b>



# *Introduction générale*





# Introduction générale

Les biocapteurs sont présents dans un grand nombre de secteurs tels que la génétique, l'agroalimentaire ou l'environnement<sup>1</sup>. Le suivi de la qualité de l'eau, de l'air et le respect des normes alimentaires appliquées, ont créé de nouveaux besoins qui ont initié le développement d'outils d'analyse sensibles et spécifiques. L'intérêt qu'ils suscitent depuis vingt ans correspond à un besoin croissant d'outils d'analyse toujours plus sensibles, permettant une détection rapide et non destructive de l'analyte cible présent dans des milieux physiologiques complexes.

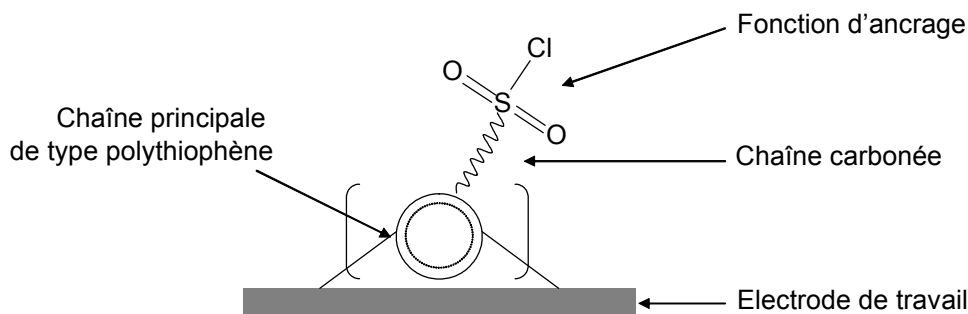
Le principe d'un biocapteur repose sur la reconnaissance spécifique d'une sonde, généralement immobilisée à la surface d'un support, avec un analyte cible en solution. Le motif sonde est souvent emprunté au vivant, ce qui confère à ces outils d'analyse une grande sensibilité et une reconnaissance spécifique du motif cible autorisant leur emploi dans des milieux parfois complexes. Dans le cas particulier des puces à ADN, c'est l'interaction spécifique entre deux brins d'ADN qui est mise à profit. Pour traduire l'hybridation en un signal physique mesurable, il est alors nécessaire d'introduire un transducteur dans le dispositif. La transduction, puis la détection du signal contribuent à augmenter la complexité de ces systèmes par l'emploi de marqueurs greffés sur les brins d'ADN cibles en solution. Par ailleurs, la nécessité de miniaturiser et d'automatiser les procédés justifie les difficultés rencontrées dans le développement de ces dispositifs d'analyse.

Pour de nouvelles applications il devient alors nécessaire de produire des supports de plus grande capacité permettant l'immobilisation d'une grande variété de sondes et participant activement à la transduction du signal. Depuis le début des années 90, de nombreux travaux ont concerné l'étude de nouveaux supports polymères conducteurs<sup>2</sup> dédiés au développement de biocapteurs combinant les avantages de l'électrochimie avec ceux offerts par l'emploi d'un polymère conducteur conçu comme un élément actif dans la transduction du signal.

En pratique, une étape préliminaire consiste à immobiliser l'espèce biologique sonde ayant une affinité particulière pour la substance à détecter. Après l'étape de reconnaissance, une étape de transduction du signal permet de convertir l'évènement biochimique en un signal physique mesurable. Différentes techniques ont été développées pour immobiliser un motif sonde et de nombreux modes de transduction sont mis au point pour détecter la présence de l'analyte cible en solution. Parmi la variété de dispositifs aujourd'hui disponibles, les biocapteurs électrochimiques concilient à une grande acuité d'analyse, une détection rapide et

non destructive permettant de conserver l'intégrité du matériel biologique. Les polymères conducteurs constituent des candidats de choix pour l'élaboration de biocapteurs électrochimiques car ils offrent la possibilité d'un suivi direct des modifications des propriétés de conduction de la matrice par des mesures simples et rapides à mettre en œuvre. Des progrès fulgurants ont été apportés en recherche génétique grâce au développement de biopuces multi-sondes capables de stocker une grande quantité d'informations. De nombreuses équipes de recherche ont entrepris de développer des supports autorisant la biodétection électrochimique de l'hybridation<sup>3,4</sup>. Des matrices polypyrrroles modifiées par des fonctions esters activés permettant l'immobilisation covalente de brins d'ADN sondes terminés par un groupement aminé en extrémité 5', sont largement employées<sup>5,6</sup>.

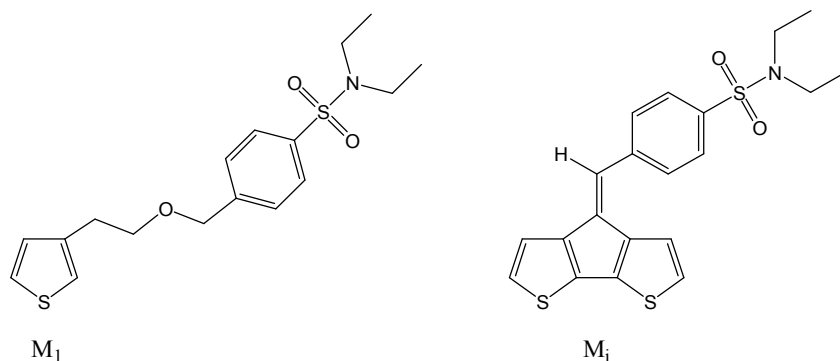
Sur la base d'essais préliminaires, notre choix s'est orienté vers l'emploi de films polythiophènes en raison de leurs bonnes propriétés de conduction et de leur électroactivité en milieux organique et aqueux. Les motifs développés dans le cadre de cette étude sont modifiés par une fonction chlorure de sulfonyle, autorisant, dans des conditions douces, l'immobilisation de matériel biologique fragile<sup>7</sup>.



Ainsi, l'utilisation de telles matrices conductrices est compatible avec l'immobilisation de brins d'ADN sondes modifiés par une fonction amine primaire en extrémité 5' et avec le diagnostic électronique de l'hybridation par simple analyse des modifications des propriétés de conduction électrique induites par le processus de reconnaissance moléculaire.

Par ailleurs, l'originalité des motifs développés réside dans la possibilité de délivrer l'ADN immobilisé par coupure électrochimique de la liaison covalente S-N formée entre la sonde et la matrice<sup>8,9</sup>. A notre connaissance, en dehors des travaux de L. Miller<sup>10</sup>, tous les exemples de libération par coupure électrochimique mentionnés dans la littérature sont effectués en milieu organique. Dans la perspective d'utiliser ces matrices *in vivo*, leur efficacité en milieu

physiologique est primordiale. Nous avons donc entrepris d'optimiser les matrices polythiophènes étudiées pour rendre la coupure électrochimique accessible en milieu aqueux. Deux motifs ont été étudiés dans le cadre de ce travail. La première partie du document est consacrée à la synthèse et à l'étude du N,N-diéthyl-4-(2-thiophén-3-yl-éthoxyméthyl)-benzènesulfonamide, appelé monomère  $M_1$ . La seconde partie concerne la synthèse et l'étude du 4-Cyclopenta[1,2-b ; 3,4-b']dithiophène-4-ylidèneméthyl-N,N-diéthylbenzènesulfonamide, appelé monomère  $M_i$ .



Chacune de ces deux parties est composée de trois chapitres qui sont organisés de la même façon pour chaque matrice. Les chapitres 1 et 4 traitent de la synthèse et de l'étude des matrices poly( $M_1$ ) et poly( $M_i$ ), respectivement. Les chapitres 2 et 5 concernent la préparation de supports copolymères modifiés par de l'ADN et le diagnostic de l'hybridation par spectroscopie d'impédance électrochimique. Enfin, les chapitres 3 et 6 présentent les résultats obtenus lors de la libération à potentiel imposé du matériel biologique immobilisé.



# *Etude bibliographique*

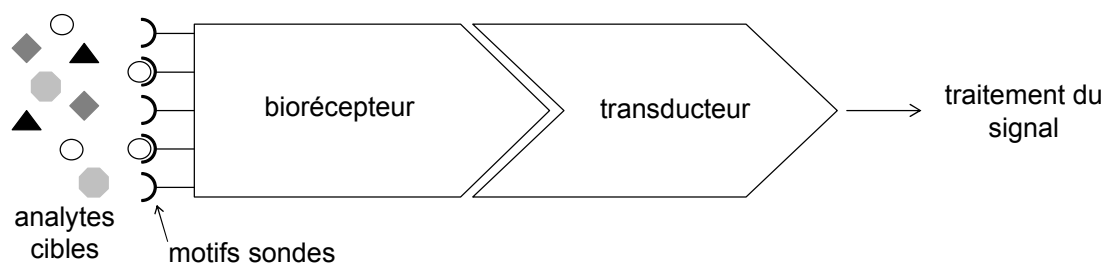


# Etude bibliographique

## I. Principe de fonctionnement d'un biocapteur

Au cours des vingt dernières années, les capteurs ont envahi le monde de la recherche en terme d'investissement financier, de publications et de nombre de chercheurs<sup>2</sup>.

Les biocapteurs se définissent comme des outils analytiques permettant de traduire un évènement biologique ou une réaction chimique en un signal physique mesurable. En dépit de leurs très grande variété, ils comprennent toujours un transducteur et un biorécepteur ayant une affinité avec l'analyte cible à détecter<sup>2</sup>.



Les biocapteurs présentent l'avantage de conduire à des analyses fiables, rapides et peu coûteuses et se substituent peu à peu aux techniques conventionnelles comme la chromatographie, l'électrophorèse, la titration, etc., qui sont des méthodes plus coûteuses et plus complexes à mettre en œuvre. Ils trouvent de nombreuses applications dans des domaines variés comme le diagnostic médical<sup>11</sup>, le contrôle de la qualité de l'air<sup>12</sup>, la détection de polluants organiques dans l'eau<sup>13</sup> ou l'évaluation de la qualité des produits alimentaires<sup>14,15</sup>.

Lorsque la nature du motif sonde est empruntée au vivant, ces outils d'analyse présentent une grande sensibilité et une spécificité autorisant leur emploi dans des milieux parfois complexes. Parmi les biocapteurs développés, une attention particulière est accordée aux





ADN : la complexité, correspondant au nombre de sites d'immobilisation des sondes par unité de surface et la densité correspondant au nombre de brins d'ODN sondes par unité de volume ou de surface sur un plot biologiquement actif<sup>24</sup>.

La capacité des puces à ADN à collecter des quantités massives de données en un temps très court justifie leur emploi en biotechnologie.

L'utilisation de ces outils d'analyse rend possible la détection simultanée de dizaines de milliers d'analytes. Grâce aux puces à ADN, 40 000 molécules d'ARN différentes ou 100 000 polymorphismes d'un simple nucléotide peuvent être détectés sur une plaque de verre de 1 à 8 cm<sup>2</sup> selon la technologie employée<sup>25</sup>.

Il existe une grande diversité de puces à ADN en raison des différents supports utilisés, du mode d'immobilisation des brins sondes, et de la stratégie employée pour détecter l'hybridation.

## **II. Préparation des couches sensibles**

### **II.1. Les supports**

Le substrat le plus utilisé pour le développement de biopuces à ADN est le verre à cause de sa fluorescence intrinsèque faible, de son faible coût, de sa stabilité mécanique et de sa bonne résistance chimique et thermique. D'autres matériaux tels que le silicium, l'or, le platine ou les polymères sont également employés. Les surfaces dédiées à l'immobilisation de brins d'ODN sondes se déclinent en deux catégories : les supports passifs et les supports actifs dans la transduction du signal. A ce titre, l'élaboration de nouveaux polymères conducteurs bénéficie, depuis 2000, d'un intérêt grandissant<sup>26</sup>. En effet, de nombreux travaux rapportent qu'il est possible de diagnostiquer l'hybridation par simple étude des modifications des propriétés de conduction du support organique conducteur. En outre, une large gamme de polymères conducteurs est accessible grâce aux efforts fournis en chimie organique dans la synthèse de nouveaux monomères à architectures spécifiques permettant de moduler les propriétés électroniques ou mécaniques des supports obtenus. De plus, la formation de ces films conducteurs à la surface d'une électrode, autorise l'immobilisation de matériel biologique sur des électrodes de taille et de forme variées et est compatible avec la fabrication de systèmes multi-sondes.

Quel que soit le support utilisé, son choix constitue une étape clé qui conditionne le choix de la technique d'immobilisation du composé biologique.

## II.2. Modification des supports par le matériel biologique sonde

Les brins d'oligonucléotides sondes peuvent être synthétisés directement sur le support (synthèse « on chip » ou in situ) ou préalablement synthétisés, puis greffés sur le support (synthèse « off chip ») selon le type d'application.

### II.2.1 La synthèse « on chip » ou synthèse in situ

La synthèse in situ est une méthode combinatoire qui donne accès à des systèmes à haute densité de plots<sup>27</sup>. Comme toutes les synthèses sur support solide, la synthèse « on chip » présente l'avantage de pouvoir séparer le produit de la réaction par simple lavage. Cependant, l'impossibilité de contrôler une éventuelle erreur durant la synthèse est l'un des inconvénient inhérent à cette méthode.

La synthèse directe d'oligonucléotides sur un support solide fait généralement appel à la synthèse phosphoramidite, dont le principe général est présenté sur le Schéma 1.

#### ➤ *Description de la synthèse phosphoramidite*

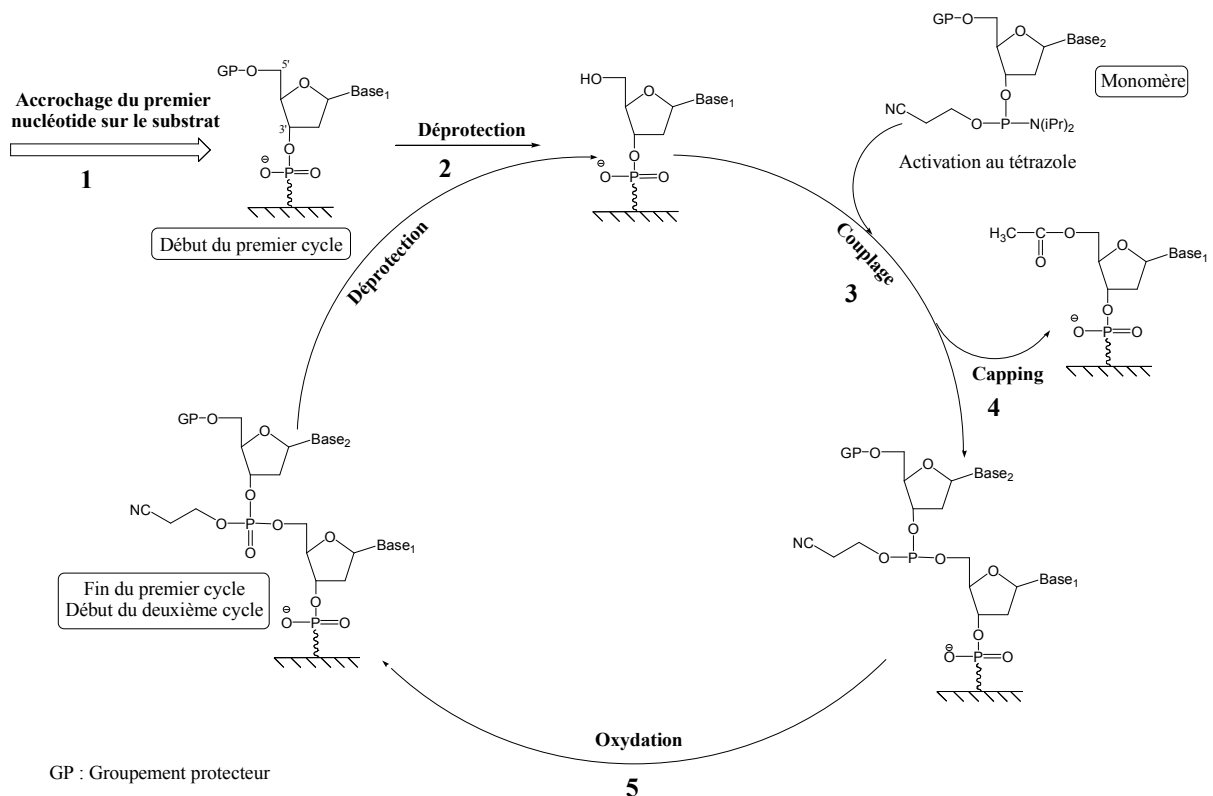


Schéma 1 : Cycle de synthèse phosphoramidite d'oligonucléotides « on chip »

Cette synthèse comprend six étapes incontournables ; quatre d'entre elles (étape 2 → étape 5) sont récurrentes :

- 1) La première étape est la fixation du nucléotide par formation d'une liaison covalente entre l'extrémité 3' de ce dernier et le substrat possédant la fonction appropriée.
- 2) La déprotection permet d'activer la fonction alcool en 5' du nucléotide immobilisé.
- 3) Le couplage consiste à additionner l'alcool formé en 5' du nucléotide fixé au support, sur le phosphoramidite activé du nouveau monomère ajouté au milieu réactionnel, en présence de tétrazole utilisé comme catalyseur.
- 4) Durant l'étape nommée « capping » les fonctions alcool précédemment activées et n'ayant pas réagi avec le nouveau monomère sont acétylées, pour ne plus réagir lors des cycles suivants.
- 5) Avant le démarrage du cycle suivant, le groupe phosphodiester possédant un phosphore trivalent chimiquement instable est transformé en une forme pentavalente plus stable, par oxydation dans un mélange iode/eau/pyridine.

Un nouveau cycle, débutant par l'étape 2 peut ensuite être redémarré, jusqu'à l'étape 5, et ce autant de fois que l'ajout d'un nouveau nucléotide sera nécessaire.

- 6) Lorsque les séquences ODN souhaitées sont entièrement synthétisées, la synthèse est stoppée de façon définitive par l'intermédiaire d'une déprotection totale avec  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

Dans la synthèse phosphoramidite conventionnelle de l'ADN, le groupement protecteur employé est le groupement diméthoxytrityle (DMT). L'étape de déprotection (étape 2) est une détritylation qui s'effectue en milieu acide trifluoroacétique.

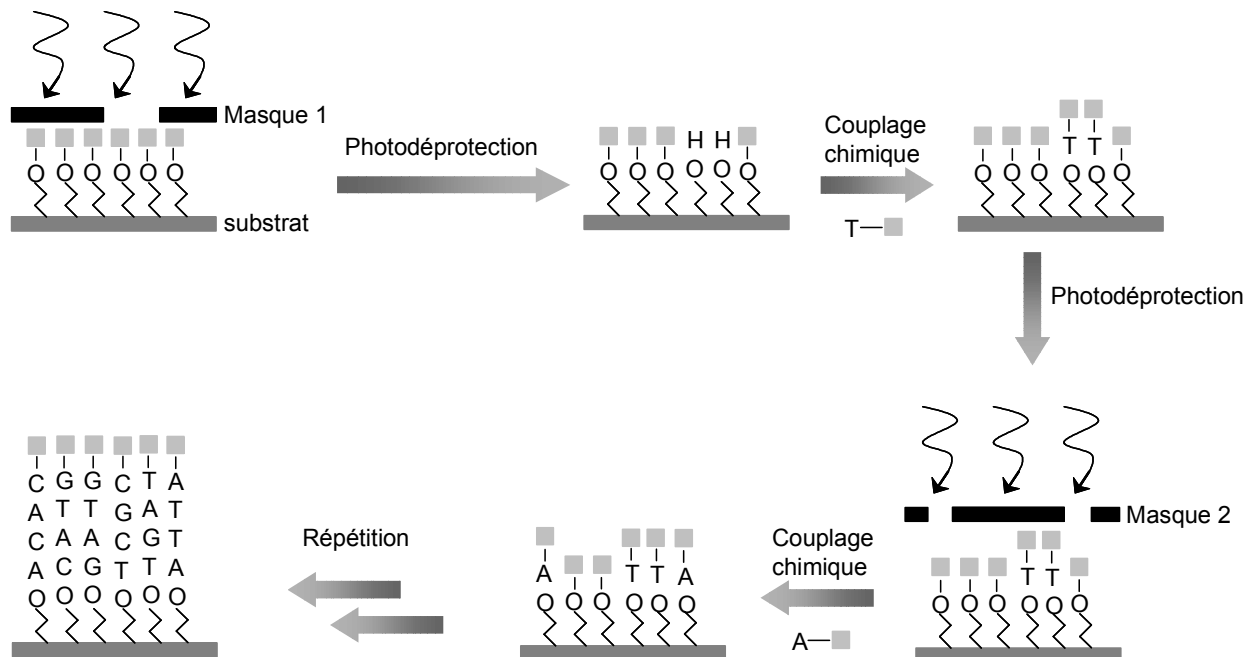
D'autres techniques dérivant de cette synthèse ont été développées. Même si les groupements protecteurs et donc les méthodes de déprotection diffèrent, les différents types de synthèse développés sont très ressemblants les uns des autres et les mêmes cycles répétitifs sont imposés au substrat.

#### ➤ *Irradiation photochimique de groupements protecteurs photolabiles*

Cette méthode, empruntée aux techniques de photolithographie utilisées pour l'élaboration de semiconducteurs, permet de synthétiser des milliers de séquences ODN sur des surfaces très restreintes<sup>28</sup>.

Les groupements protecteurs diméthoxytrityle utilisés pour la synthèse phosphoramidite conventionnelle sont remplacés par des groupements protecteurs photochimiquement clivables. La fonction alcool en 5' du nucléotide fixé sur le substrat est déprotégée par irradiation lumineuse. Les zones à irradier sont délimitées par un masque de chrome. Ainsi les

groupements protecteurs photolabiles liés à des nucléotides situés dans les zones laissées apparentes par les trous du masque sont détruits, permettant ainsi l'addition d'un nucléotide sur les sites irradiés. Le substrat est ensuite irradié à travers un autre masque de façon à introduire sur de nouvelles zones un autre nucléotide. Les cycles se répètent jusqu'à l'obtention des séquences ODN désirées (Schéma 2).



**Schéma 2 : Synthèse in-situ d'ODN par irradiation lumineuse à travers un masque**

De cette façon, Affymetrix produit en routine des biopuces contenant plus d'un million de sondes immobilisées sur une surface de verre de 1,28 x 1,28 cm, subdivisée en plots d'une largeur inférieure à  $10\mu\text{m}$ <sup>29</sup>.

Le premier groupement protecteur utilisé pour ce type de synthèse d'ODN est le [( $\alpha$ -méthyl-2-nitropipéronyl)-oxy]carbonate (MeNPOC)<sup>30,31</sup>. Le rendement moyen d'un cycle de synthèse, mesuré par fluorescence, est de 92-94% avec le MeNPOC contre 98% pour un cycle conventionnel mettant en jeu un groupement protecteur DMT déprotégé en milieu acide<sup>31</sup>. Pour que la synthèse d'ODN sur support par irradiation photochimique soit performante, il faut que chaque étape de déprotection et de couplage se produise avec un rendement quantitatif de façon à former des ODN aussi proches que possible de ceux attendus. La diminution des rendements lors du procédé photochimique, probablement due à la déprotection incomplète des groupements hydroxyle en 5', entraîne une diminution de la pureté des ODN synthétisés.

D'autres groupements protecteurs photochimiquement clivables, comme notamment le diméthoxybenzoïnyloxycarbonate (DMBOC)<sup>30,32</sup>, ont été développés pour améliorer l'efficacité de la synthèse d'ADN par photolithographie. Un progrès significatif a été accompli avec le groupement 2-(2-nitrophényl)-propyloxycarbonate qui conduit à des rendements moyens de cycles de synthèse quantitatifs<sup>33</sup>.

Cette méthode est limitée par la fabrication de nouveaux masques à chaque irradiation lumineuse. Pour s'affranchir de la préparation de nouveaux masques, une technique qui consiste à diriger la lumière avec des petits miroirs a été mise au point<sup>34,35</sup>.

D'autres alternatives, qui ne relèvent pas de la technique de photolithographie, ont été développées pour s'affranchir de l'utilisation de masques. La déposition successive de nucléotides par jet d'encre<sup>36,37</sup> et la déprotection par voie électrochimique<sup>38,39</sup> en sont deux exemples.

#### ➤ *Déprotection électrochimiquement générée*

La réaction de détritulation, qui consiste à cliver le groupement protecteur diméthoxyltrityle, peut être engendrée par un acide généré électrochimiquement. Des microélectrodes constituent les surfaces élémentaires sur lesquelles il est possible d'effectuer des synthèses toutes différentes les unes des autres<sup>38</sup>.

Un second type de déprotection par voie électrochimique a été validé par Roget et Col.<sup>39</sup> et consiste à réduire un groupement p-nitrobenzoyl électrolabile.

#### ➤ *Déposition de réactifs par jet d'encre*

Cette technique peut permettre soit l'immobilisation de brins d'ODN présynthétisés, soit la synthèse directe d'ODN sur support sans avoir recours à l'utilisation de groupements protecteurs. Pour effectuer la synthèse d'ODN, des microquantités de nucléotides sont déposées localement sur le substrat par les têtes d'une imprimante à jet d'encre. Une fois délivrés à la surface du substrat, les réactifs doivent rester confinés localement. Pour limiter l'étalement des gouttes de réactifs et leur mélange entre plots voisins, le substrat est traité de façon à ce que la surface intérieure des plots possède des propriétés hydrophiles et que les espaces entre plots possèdent des propriétés hydrophobes<sup>36,37</sup>.

Contrairement à la synthèse « off chip », la synthèse in situ conduit exclusivement à des oligonucléotides à extrémité 5' libre, car le premier nucléotide est fixé au substrat par son

extrémité 3' et la synthèse de l'ADN s'effectue dans le sens 3'→5'. Cet inconvénient inhérent à ce type de synthèse ne peut pas être négligé, car il rend impossible les réactions enzymatiques, qui ne peuvent avoir lieu que sur des extrémités 3' libres. Pour pallier à ce problème, une méthode de synthèse directe d'ODN dans le sens 5'→3' a été mise au point<sup>40</sup>. Par ailleurs, la synthèse « in situ » d'ODN, moins flexible que la synthèse « off chip », nécessite un équipement spécialisé et coûteux.

### II.2.2 La synthèse « off chip »

L'immobilisation de brins d'ADN sondes présynthétisés est une méthode adaptée pour l'élaboration de biopuces à densité de plots faible ou moyenne avec une grande rapidité de production. La flexibilité de cette méthode, qui permet d'immobiliser des produits issus de PCR ou des ODN, en fait une technique de choix, souvent préférée à la synthèse « on chip ». Les techniques de dépôt peuvent impliquer le positionnement d'une aiguille au contact de la surface, ou la projection d'une goutte de liquide à partir d'une microbuse. Par ces procédés, des volumes de liquide de 50pL à 100nL peuvent être délivrés, formant des plots de taille comprise entre 75 et 500 $\mu\text{m}^2$ .

D'une façon générale, les lames de verre sont très souvent fonctionnalisées par l'intermédiaire de groupements trialkoxysilanes<sup>41</sup>. Cette réaction de silanisation permet d'introduire en surface des groupements variés (époxyde, thiol, amine, etc.) susceptibles de réagir avec des brins d'ODN sondes modifiés ou non.

#### ➤ *Liens physiques entre les brins d'ADN sondes et le substrat*

Ces liens physiques qui interviennent sous forme d'interactions non covalentes entre l'ADN et le substrat peuvent être des interactions électrostatiques, des interactions hydrophobes ou des encapsulations dans des structures poreuses. Ces techniques permettent l'utilisation d'ODN sondes non marqués.

La présence de groupements phosphate confère à l'ADN un caractère polyanionique. En pratique, pour que ces chaînes chargées négativement puissent être retenues à la surface d'un support solide, ce dernier est polarisé positivement, très souvent au moyen de groupements amine protonés.

Ainsi, de simples lames de verre recouvertes de poly-L-lysine peuvent retenir, par liens électrostatiques, des produits de PCR<sup>42,43</sup>. Afin d'augmenter la durée de vie des systèmes, ces derniers sont irradiés sous UV. Bien que très économiques, ces substrats souffrent de problèmes liés au vieillissement après plusieurs mois de stockage.

Des séquences d'ADN sondes en solution dans l'eau sont déposées sur le substrat, et après séchage, sont retenues à la surface par adsorption électrostatique. Les fonctions amine en excès sont ensuite détruites afin d'éviter l'adsorption non spécifique du matériel cible<sup>44</sup>.

L'immobilisation d'ADN monocaténaire a également été validée dans des structures tridimensionnelles comme des films fins de polyélectrolytes déposés couche par couche sur des lames de verre<sup>45</sup> ou des films lipidiques cationiques<sup>46,47</sup>. L'immobilisation des ODN dans les polyélectrolytes est gouvernée par deux facteurs : l'adsorption électrostatique générée par les groupes  $\text{NH}_3^+$  du substrat et l'encapsulation dans la structure poreuse du film. L'efficacité de l'hybridation révèle une bonne accessibilité des sondes. Une partie des sondes emprisonnées dans des films lipidiques sont disponibles lors de l'hybridation comme l'attestent, après ajout des brins complémentaires, le spectre d'émission de fluorescence des films en présence de bromure d'éthidium (agent intercalant fluorescent des doubles hélices d'ADN)<sup>46,47</sup>.

Si trop peu de contacts sont établis entre la sonde adsorbée et la surface, la molécule d'ADN retenue par des liens non covalents est susceptible de se détacher facilement du support lors des étapes d'hybridation et de lavage. Ainsi, l'accrochage covalent constitue souvent une alternative intéressante à l'adsorption de biomolécules sur des surfaces.

#### ➤ *Formation de liaisons covalentes ADN-substrat*

Dans la plupart des cas, le substrat est modifié chimiquement pour permettre l'ancrage d'un brin d'ADN à sa surface. La séquence sonde est généralement modifiée à son extrémité 3' ou 5' par un groupe fonctionnel qui peut réagir efficacement et spécifiquement avec une fonction d'ancrage présente sur le substrat.

##### ▪ *ADN non modifié*

Une très grande variété de méthodes ont aujourd'hui été développées pour immobiliser des acides nucléiques sur des surfaces de verre.

Par réaction avec les fonctions acides carboxyliques présentes à la surface d'une électrode d'or modifiée par l'acide thioglycolique, les fonctions alcools en 3' de brin d'ADN peuvent former, en présence de carbodiimide des liens ester avec le support<sup>48,49</sup>.

Des brins d'ADN non modifiés peuvent réagir sur une surface de verre portant des groupements diazobenzyle ou époxyde. Les bases adénine, cytosine et guanine de l'ADN, qui contiennent un groupe  $\text{NH}_2$  activant sur leur cycle aromatique, peuvent subir une attaque électrophile d'un ion diazonium sur le cycle<sup>50</sup>. Les fonctions amine primaire des bases nucléiques jouent également un rôle primordial dans le cas de substrats modifiés par des



fonctions époxyde car elles peuvent attaquer ces sites électrophiles présents à la surface du support. Chiu et col. ont démontré grâce à l'utilisation d'un substrat possédant en surface à la fois des groupements amines tertiaires et époxydes, la complémentarité de ses deux fonctions. Les fonctions époxyde autorisent la formation de liaisons covalentes avec les fonctions amine primaire présentes sur les chaînes d'ADN tandis que les fonctions amine tertiaire du substrat permettent, sous leur forme protonée, la formation de liaisons de type hydrogène avec les groupements triphosphate de l'ADN<sup>51</sup>.

L'inconvénient de ces méthodes est que l'immobilisation n'est pas contrôlée, car elle peut mettre en jeu plusieurs bases nucléiques de la sonde.

- *ADN modifié*

Pour un taux d'hybridation optimal, il est préférable que les sondes soient fixées au substrat par l'intermédiaire de liaisons covalentes entre leur extrémité 3' ou 5' et la matrice, de façon à ce que l'intégralité de la chaîne des ODN soit disponible pour participer à l'appariement avec les cibles. Pour cette raison, même si cela nécessite une modification préalable de l'ADN, des groupements réactifs en extrémité de chaîne sont très fréquemment introduits.

Les amines primaires et les thiols sont très souvent utilisés pour fonctionnaliser les extrémités des sondes.

La nucléophilie des fonctions amines primaires est mise à profit dans des réactions avec des substrats possédant en surface des sites électrophiles. Les liaisons covalentes ADN-substrat se forment d'autant plus facilement que le substrat est bon électrophile. Ainsi, la formation de liaisons amide par attaque nucléophile d'un ODN amino-fonctionnalisé sur un substrat recouvert de groupements acide carboxylique s'effectue via une condensation initiée par un carbodiimide (tout comme l'attaque d'un ODN fonctionnalisé  $-CO_2H$  sur un substrat aminé)<sup>52,53</sup>. L'emploi d'intermédiaires du type ester activé obtenus par réaction de l'acide avec le N-hydroxysuccinimide ou le N-hydroxyphthalimide est souvent nécessaire pour augmenter la réactivité de l'acide carboxylique. La fonction acide carboxylique peut être transformée en espèce activée avant immobilisation<sup>54</sup> ou dans le bain d'incubation, durant l'étape d'immobilisation<sup>52</sup>. Les amines primaires en extrémité de brins sondes peuvent également réagir avec des fonctions aldéhyde<sup>55,56</sup>, époxyde<sup>57</sup>, isothiocyanate<sup>57,58</sup> ou imidoester<sup>58</sup>.

Nous avons choisi de faire réagir des ODN sondes possédant un lien amine en leur extrémité 5' sur un polythiophène généré par électropolymérisation de thiophènes possédant une

fonction d'ancrage chlorure de sulfonyle<sup>7</sup>. Outre l'immobilisation d'ADN dans des conditions douces, cette fonction d'ancrage possède d'autres avantages qui seront détaillés dans la suite du manuscrit.

L'interaction or-thiol peut être utilisée pour immobiliser directement des ODN sur des substrats d'or<sup>59</sup>. Des sondes ainsi modifiées peuvent également réagir par addition nucléophile de type Michael sur la double liaison de groupements maléimide<sup>55,60</sup>.

L'immobilisation d'ODN sondes via des ponts disulfide est possible par réaction d'échange thiol disulfide entre les groupes sulfhydryle d'un film modifié par des mercaptosilanes et les extrémités disulfide d'ODN modifiés en 5'<sup>61</sup>.

Plutôt que d'être utilisée pour la fonctionnalisation de groupements susceptibles de réagir avec des ODN, la silanisation de lame de verre non modifiée peut être effectuée directement par des ODN portant eux même des groupes triméthoxysilane<sup>41</sup>.

La reconnaissance spécifique biotine/avidine a été exploitée par Dupont-Filliard et col. pour la mise au point de biopuce à ADN régénérable<sup>62</sup>. Les entités biotines d'un polypyrrole formé par électropolymérisation de pyrroles biotinylés, sont utilisées comme point d'ancrage pour l'immobilisation d'unités avidine. Comme chaque unité avidine possède quatre sites de reconnaissance d'unité biotine, trois sites restent disponibles pour interagir avec des ODN biotinylés en 5'. Le biocapteur ainsi obtenu est mis à incuber dans une solution contenant les cibles fonctionnalisées en 5' par un groupement biotine, lequel ensuite peut permettre l'ancrage d'une entité avidine marquée par un groupement fluorescent. La réutilisation de la biopuce est possible par dénaturation des liens biotine/avidine.

**Tableau 1: Exemples de stratégies développées pour l'immobilisation de brins sondes présynthétisés**

Type de support	Fonction réactive du substrat	Modification de la sonde	Ref
Verre	Epoxyde	ADN non modifié	51,63
Verre	Ion diazonium	ADN non modifié	50
Or	Acide carboxylique	ADN non modifié	48,49
Verre	Epoxyde	-NH <sub>2</sub>	57
Silane, verre, PP	Isothiocyanate	-NH <sub>2</sub>	57,58
PMMA, verre	Aldéhyde	-NH <sub>2</sub>	55,56
Verre	Acide carboxylique	-NH <sub>2</sub>	52
Polymère conducteur, verre, PP	Ester activé (NHS/NHP)	-NH <sub>2</sub>	54,58
Verre, PP	Imidoester	-NH <sub>2</sub>	58
Polythiophène	Chlorure de sulfonyle	-NH <sub>2</sub>	7
Or non modifié	-	-SH	59
PMMA, silice	Maléimide	-SH	55,60
Verre	Mercaptosilane	-S-S-R	61
Verre non modifié	-	-Si(OCH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	41
Verre, polystyrène	Amine	-PO <sub>3</sub>	52,64
Verre	Amine	-CO <sub>2</sub> H	52,53
Polypyrrole, silicone	Avidine	Biotine	62,65

Lorsque les brins sondes sont trop proches les uns des autres, ils ne peuvent pas participer efficacement à l'hybridation à cause des contraintes stériques et des interactions électrostatiques engendrées<sup>66</sup>. La présence d'un bras espaceur entre la matrice et le brin d'ODN sonde peut se révéler très utile pour améliorer l'accessibilité des sondes vis-à-vis des cibles durant l'étape de reconnaissance spécifique entre les deux brins complémentaires<sup>67</sup>. Cette augmentation de la distance sonde-substrat peut aussi avoir pour effet de diminuer l'adsorption des sondes sur le substrat. Enfin, il est possible par l'intermédiaire de cet espaceur d'introduire des fonctions d'ancrage, tout en augmentant la densité de sondes immobilisées lorsque le lien introduit est ramifié<sup>56,68</sup>.

En résumé, la synthèse « off chip » présente trois grands avantages par rapport à la synthèse « on chip » :

- Les rendements de synthèse d'ODN étant typiquement compris entre 98 et 99%, la synthèse « off chip » permet d'éliminer les séquences erronées avant fixation sur le support.
- Les brins sondes peuvent indifféremment être fixés au substrat par leur extrémité 5' ou 3'. Souvent, l'extrémité 5' est préférée à l'extrémité 3' pour l'ancrage des sondes, laissant ainsi l'extrémité 3' libre pour participer à des réactions enzymatiques.
- Cette méthode est également compatible avec l'immobilisation de structures complexes comme des brins d'ADN de grande taille, des duplex d'ADN, des acides nucléiques hybrides, des anticorps, etc., comparée à la synthèse « on chip » qui n'autorise que l'élaboration de chaînes simples et courtes.

### **III. Lecture de l'hybridation**

L'étape de détection de l'hybridation, aussi appelée étape de transduction du signal consiste à diagnostiquer les plots biologiquement actifs qui ont « reconnus » l'analyte cible complémentaire en solution. La détection de l'hybridation peut être directe ou indirecte. Contrairement aux techniques de détection directe, où le brin d'ADN cible peut ne pas être marqué, la détection indirecte consiste à suivre les changements de propriétés d'un marqueur actif lors de l'étape d'hybridation.

#### **III.1. Transduction de l'hybridation par la détection d'un marqueur actif**

##### III.1.1 Détection par marquage radioactif ou fluorescent

Le marquage des brins d'ADN cibles implique l'incorporation d'une entité radioactive<sup>69</sup> ou fluorescente<sup>70</sup>.

Grâce à sa sensibilité et à sa facilité de mise en œuvre, la détection optique de l'hybridation par fluorescence est la plus utilisée<sup>71</sup> et beaucoup d'efforts sont actuellement réalisés pour adapter cette technique de détection aux puces à protéines et à cellules<sup>72</sup>. L'étape de marquage peut avoir lieu lors de la synthèse de l'ADN par introduction d'un nucléotide portant le groupement fluorescent ou lors d'une seconde étape de post-fonctionnalisation. Le Cy3 (vert)<sup>22</sup>, le Cy5 (rouge)<sup>22</sup>, la fluoresceïne<sup>73</sup> et la rhodamine sont les marqueurs fluorescents les plus utilisés. L'emploi de deux tags fluorescents de couleurs différentes permet la détection simultanée de l'hybridation de deux sondes au cours d'une même expérience.

### III.1.2 Détection électrochimique

Quelques techniques de détection indirecte impliquant le marquage des simples brins d'ADN, du duplex ou du support, par une substance électroactive ont été décrites dans la littérature.

#### ➤ *Marquage des simples brins d'ADN*

L'électroactivité du ferrocène a été mise à profit pour la détection de l'hybridation avec des brins cibles modifiés<sup>74-76</sup>. Afin d'amplifier le signal de transduction de l'hybridation, J. Wang et coll. ont développé une stratégie reposant sur l'utilisation de microsphères chargées de ferrocène sur lesquelles sont immobilisés des ADN cibles<sup>77</sup>.

#### ➤ *Marquage du duplex*

Ce type de transduction s'effectue par l'intermédiaire d'agents intercalants électroactifs qui présentent la particularité de s'insérer dans la double hélice d'ADN. Cette approche ne nécessite pas de modification chimique des ADN sondes et des ADN cibles. La daunomycine<sup>78,79</sup> et le  $\text{Co(phen)}_3$ <sup>3+80,81</sup> sont des molécules aromatiques utilisées en tant qu'agents intercalants qui se fixent à l'ADN quasi perpendiculairement à l'axe de la double hélice. Le Hoechst 33258, molécule de reconnaissance du petit sillon grâce à laquelle il est possible de quantifier l'ADN, possède une sélectivité pour les doubles brins (par rapport aux simples brins) plus marquée<sup>82</sup>. On peut citer également le ferrocénylnaphtalène diimide qui forme un complexe stable avec la double hélice d'ADN<sup>83</sup>.

Toutes ces molécules autorisent la transduction du signal d'hybridation par le biais de techniques électrochimiques comme la voltampérométrie et la chronopotentiométrie.

#### ➤ *Marquage du support*

Des groupements ferrocène greffés à la surface d'un support fournissent un signal dépendant de leur environnement électronique et stérique. De tels groupements immobilisés sur un film de polypyrrole modifié par des brins d'ADN sondes, ont permis d'augmenter la sensibilité de détection de l'hybridation par des méthodes ampérométriques<sup>84</sup>.

L'inconvénient majeur de ces méthodes réside dans la nécessité d'effectuer une modification chimique préalable des ADN cibles, c'est pour cette raison que l'on assiste à un développement croissant des techniques de détection d'ADN non marqués.

## III.2. Détection de l'hybridation par l'emploi d'un support actif dans la transduction du signal

### III.2.1 Microgravimétrie par microbalance à cristal de quartz

La microbalance à cristal de quartz est un transducteur piézo-électrique auquel est relié un cristal de quartz vibrant à sa fréquence propre de résonance. Sous certaines conditions, une variation  $\Delta f$  de la fréquence de résonance du cristal de quartz peut être traduite en une variation de masse par la relation de Sauerbrey<sup>85</sup> :

$$\Delta f = \frac{-2f_0^2 \cdot \Delta m}{A\sqrt{\mu_q \cdot \rho_q}}$$

$\Delta f$  : variation de la fréquence de résonance du cristal de quartz

$\Delta m$  : variation de la masse du cristal de quartz

$f_0$  : fréquence de résonance propre du cristal de quartz

$A$  : surface active (métallisée) du cristal de quartz

$\mu_q$  : module de cisaillement du cristal de quartz ( $2,947 \times 10^{11} \text{ g.cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$ )

$\rho_q$  : densité du cristal de quartz ( $2,648 \text{ g.cm}^{-3}$ ).

La microbalance à cristal de quartz permet une mesure sensible de la masse, sur une gamme de quelques nanogrammes à quelques microgrammes. Ce dispositif peut se révéler très utile pour évaluer l'accrochage d'ADN sur un substrat lors des étapes d'immobilisation ou d'hybridation, et permet le suivi in situ de la fréquence de résonance du cristal de quartz, utilisé comme substrat<sup>86,87</sup>. Outre la possibilité de diagnostiquer l'hybridation de brins d'ADN non marqués, l'opportunité d'effectuer des mesures in-situ en temps réel constitue un autre atout majeur de cette technique. De plus, comme elle n'engendre pas de modification du matériel biologique et qu'elle est compatible avec des mesures électrochimiques, cette méthode d'analyse peut être couplée avec d'autres techniques de détection comme la microscopie à force atomique<sup>88</sup>, l'impédance électrochimique<sup>7</sup>, la fluorescence<sup>89</sup>, etc..

Afin d'amplifier la variation de la fréquence de vibration du quartz consécutive à l'hybridation, et ainsi étendre les limites de sensibilité du système de détection par microbalance, les cibles peuvent être greffés sur des liposomes<sup>90</sup> ou des nanoparticules d'or<sup>91,92</sup>. Ces systèmes rendent possible la détection de cibles à des concentrations sub-nanomolaires.

La détection de l'hybridation par mesure de la variation de masse d'un cristal de quartz utilisé comme un « mono-capteur » donne des résultats quantitatifs et est facile à mettre en œuvre.

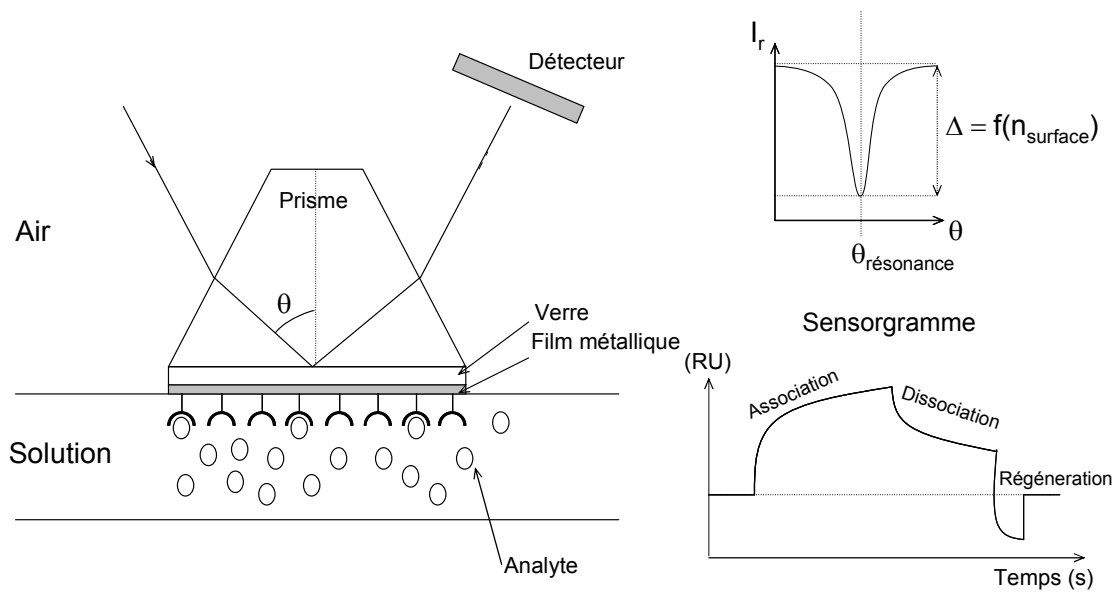
Cette technique de mesure, qui s'effectue sur des surfaces de quelques  $\text{mm}^2$ , incompatible avec la miniaturisation, constitue une bonne approche pour des études préliminaires.

Beaucoup d'efforts sont portés au développement de nouvelles techniques expérimentales qui reposent sur les possibilités offertes par les techniques de microscopies à champ proche (microscopie à effet tunnel, microscopie à force atomique, microscopie optique à champ proche). Ces techniques constituent une voie particulièrement prometteuse pour l'élaboration et l'étude de nano-objets.

### III.2.2 Résonance plasmonique de surface (SPR)

Lorsqu'un faisceau de lumière monochromatique polarisée traverse un prisme et illumine une interface entre deux milieux d'indices de réfraction différents, il existe un angle d'incidence particulier, appelé angle de réflexion interne totale, tel que le faisceau incident est totalement réfléchi. Dans ces conditions, une composante électromagnétique de la lumière, appelée onde évanescente se propage dans le milieu de plus faible indice de réfraction, perpendiculairement à l'interface sur une distance équivalente à sa longueur d'onde. Dans le cas où la surface est recouverte d'un film métallique (argent ou or), les électrons délocalisés de la couche périphérique du métal entrent en résonance avec les photons du faisceau incident. Ce phénomène, appelé résonance plasmonique de surface, se traduit par une diminution de l'intensité lumineuse du faisceau réfléchi. Il en résulte l'apparition d'un minimum de l'intensité réfléchie ( $I_r$ ) pour un angle d'incidence  $\theta$  appelé angle de résonance ( $\theta_{\text{résonance}}$ ). Cet angle dépend de l'indice de réfraction ( $n$ ) du milieu dans le champ évanescent, lui-même dépendant de la modification de la composition de l'interface. Le tracé d'un sensorgramme à partir de l'enregistrement des variations de réflectivité au cours du temps, permet le suivi en temps réel des interactions moléculaires à la surface.

Cette technique a ainsi été appliquée à la détection de nombreuses biomolécules comme l'urée, le glucose<sup>93</sup>, et à l'étude d'interactions du type biotine-avidine<sup>94</sup>, ADN-protéine<sup>95,96</sup>, protéine-protéine<sup>97,98</sup> ou ADN-ADN<sup>99,100</sup>. En effet, la présence d'ADN en solution n'interférant pas avec la détection de l'hybridation à la surface, cette méthode est particulièrement utile pour mesurer l'hybridation d'ODN marqués ou non lors de mesures in situ. De plus, les variations de réflectivité engendrées par les interactions biologiques peuvent être mesurées par une caméra CCD<sup>101,102</sup>. Ce procédé, appelé imagerie de résonance plasmonique de surface (SPRi) présente l'avantage d'analyser en parallèle des interactions ADN-ADN sur des systèmes multiplots<sup>103</sup>.



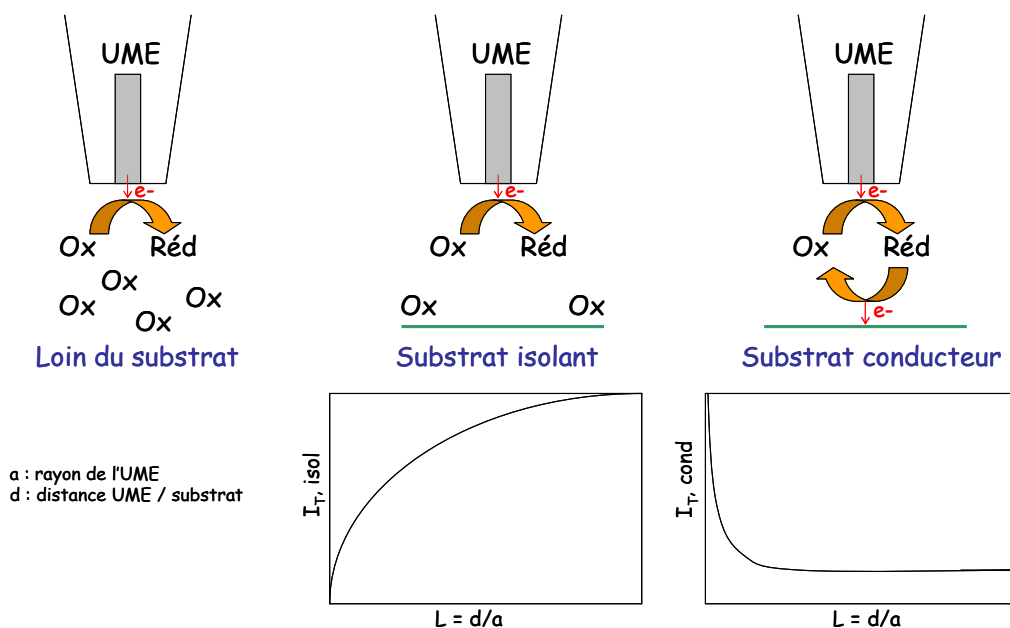
**Schéma 3 : Principe de la résonance plasmonique de surface**

L'hybridation entre un ADN sonde et un ADN cible peut donc être détectée in situ grâce aux mesures de variations de propriétés optiques, de variations de la masse, mais également par l'étude de modifications des propriétés électrochimiques de l'interface.

### III.2.3 Microscopie électrochimique à balayage (SECM)

Le principe de la microscopie électrochimique à balayage (Scanning ElectroChemical Microscopy: SECM) repose sur l'analyse des modifications de courant résultant de l'approche d'une ultramicroélectrode (UME) de la surface d'un échantillon. Il est possible, à partir de l'évolution de courant observée d'en déduire des informations sur les propriétés électrochimiques du substrat et de détecter les processus intervenant à la surface<sup>104</sup>.





**Schéma 4 : Principe de la microscopie électrochimique à balayage (SECM)**

L'équipe de Schuhmann a mis en évidence l'hybridation de sondes immobilisées sur un substrat conducteur d'or avec des cibles non marquées dans une solution contenant le couple  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ , employé comme médiateur redox<sup>105,106</sup>. La répulsion électrostatique entre les anions en solution et les groupements phosphate de l'ADN en surface favorise la migration du médiateur vers la surface de l'UME, lorsque cette dernière est approchée d'un substrat modifié par le matériel biologique. L'augmentation de la densité de charges négatives après formation du duplex permet de distinguer un simple brin de son duplex.

### III.2.4 Oxydation des bases nucléiques de l'ADN

Des quatre bases nucléiques, la guanine est celle qui possède le potentiel d'oxydation le plus bas, potentiel compatible avec une oxydation en milieu aqueux. Différentes études menées sur la guanosine évoquent des mécanismes conduisant à des produits d'oxydation différents<sup>107,108</sup>. Il semble cependant admis que la 8-oxo-guanosine soit le produit d'électro-oxydation de ce nucléoside<sup>108</sup>.

Aucun marquage de l'ADN n'est requis pour ce type de détection, mais son inconvénient réside dans sa faible sensibilité. Afin de palier à cette limite, le complexe  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  a été utilisé comme médiateur redox pour catalyser le transfert des électrons des bases guanine de l'ADN à une électrode d'ITO fonctionnalisée par des brins d'ADN<sup>109,110</sup>. Le recours à l'utilisation d'une électrode de diamant dopé bore<sup>111</sup> permet l'oxydation de deux bases nucléiques : la guanine et l'adénine<sup>112</sup>. Afin de minimiser le signal électrochimique fourni par

les brins sondes, la base guanine de l'ADN peut être remplacée par l'inosine, dont le signal d'oxydation est bien séparé de celui de la guanine et qui forme préférentiellement une paire de base avec la cytosine<sup>113,114</sup>.

De telles techniques permettent la conversion d'un évènement biologique comme la reconnaissance spécifique entre deux bases de l'ADN en un signal électrique utile.

Les techniques électrochimiques ont reçu une attention croissante dans le développement de puces à ADN car elles rendent possible une détection rapide et directe des séquences ADN, elles ont une haute sensibilité et sont compatibles avec la miniaturisation des transducteurs. Les polymères conducteurs, qui peuvent être utilisés comme supports actifs dans la lecture de l'empreinte d'hybridation, offrent la possibilité d'un suivi direct des modifications des propriétés de conduction de la matrice par simple mesure électrochimique. Cette approche autorise la détection de brins d'ADN non modifiés tout en préservant l'intégrité du dispositif.

#### **IV. La spectroscopie d'impédance électrochimique appliquée au développement de capteurs ADN**

Cette technique non destructrice peut permettre de suivre la formation de doubles hélices à la surface d'une électrode grâce à l'étude des modifications des propriétés électrochimiques du support. Dans cette approche, le polymère conducteur se comporte comme un transducteur et son utilisation autorise l'examen direct des différents évènements intervenant à sa surface, ce qui présente un intérêt particulier dans le développement des biocapteurs.

##### **IV.1. Notions d'impédance électrochimique**

La spectroscopie d'impédance électrochimique consiste à induire une perturbation au système étudié au moyen de l'application d'un potentiel alternatif de faible amplitude, et à analyser la réponse du courant résultant

Le potentiel alternatif appliqué peut s'écrire :  $E(t) = E_0 + \Delta E(t) = E_0 + \Delta E \cos(\omega t + \varphi_E)$

Le courant alternatif résultant peut s'écrire :  $I(t) = I_0 + \Delta I(t) = I_0 + \Delta I \cos(\omega t + \varphi_I)$

$I_0$  et  $E_0$  sont les composantes continues du courant et du potentiel et  $\omega = 2\pi f$  est la fréquence de pulsation.

L'impédance est une généralisation de la loi d'Ohm et correspond au rapport entre le potentiel appliqué et le courant recueilli en sortie. Dans le cas particulier des signaux alternatifs,

l'impédance complexe est alors la somme des composantes réelle  $Z'$  et imaginaire  $Z''$  qui sont d'origine résistive et capacitive respectivement.

$$Z(t) = \frac{E(t)}{I(t)} = Z' + iZ''$$

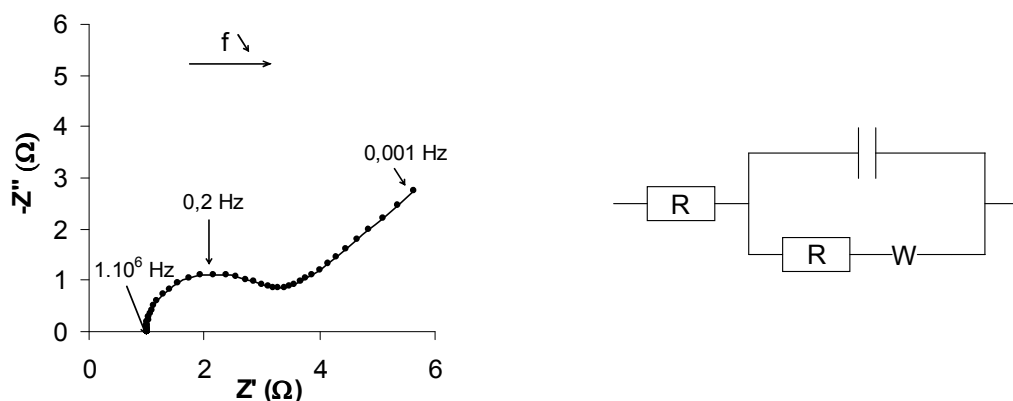
Les modifications du comportement électrochimique de l'interface électrode|électrolyte peuvent être modélisées par l'emploi de circuits électroniques équivalents, déduits de spectres expérimentaux.

#### **IV.2. Détection de l'hybridation par impédance électrochimique**

La spectroscopie d'impédance est un outil performant pour l'analyse des changements de propriétés intervenant à l'interface surface|électrolyte des électrodes modifiées, durant le phénomène de reconnaissance spécifique entre un brin d'ADN immobilisé et un brin cible en solution. Deux approches peuvent être distinguées : la spectroscopie d'impédance faradique et la spectroscopie d'impédance non-faradique.

La spectroscopie d'impédance en mode faradique autorise l'analyse des mécanismes et de la cinétique de réactions bioélectrocatalytiques. Cette technique, qui nécessite la présence dans le milieu électrolytique d'un marqueur redox externe, est la plus utilisée pour la détection de l'hybridation de brins d'ADN à la surface de biocapteurs impédimétriques. Cette méthode est basée sur l'inhibition du transfert électronique entre le marqueur redox (souvent  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ) et la surface de l'électrode, occasionnée par l'immobilisation du matériel biologique sur le support.

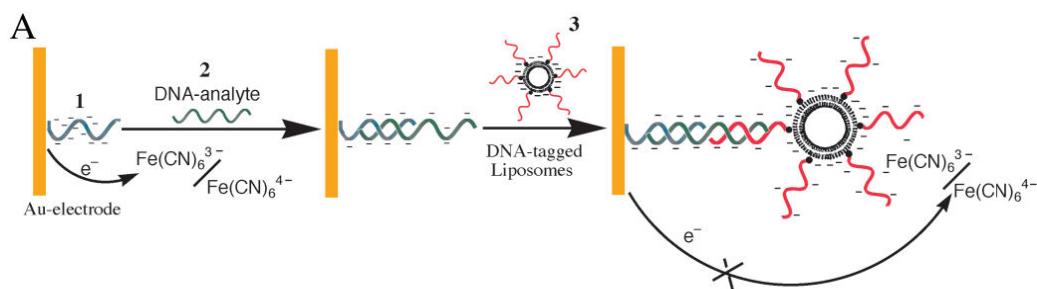
Le graphe suivant représente l'allure typique d'un diagramme de Nyquist dans le cas d'une mesure de spectroscopie d'impédance faradique.



**Schéma 5 : Modélisation par un circuit équivalent de l'impédance totale dans le plan complexe avec le logiciel ZSimpWin 3.10.**

La portion de demi-cercle observée à hautes fréquences correspond à un processus limité par le transfert électronique entre la sonde redox et la surface de l'électrode, alors que la droite inclinée observée aux basses fréquences est attribuable à un processus de transfert électronique limité par la diffusion. Le diamètre du demi-cercle, qui représente la résistance au transfert de charge est inversement proportionnel à la vitesse du transfert électronique.

Avant modification, le transfert électronique entre la sonde redox en solution et l'électrode est rapide, alors que l'immobilisation puis l'hybridation de brins d'ADN chargés négativement gêne l'approche de l'espèce redox par répulsion électrostatique et inhibe le transfert électronique. La conséquence observée est l'augmentation de la résistance au transfert de charge après immobilisation et hybridation<sup>115</sup>. Afin d'amplifier les changements des propriétés électrochimiques de l'interface, Patolsky et col. ont choisi d'augmenter le signal d'hybridation en utilisant des liposomes fonctionnalisés (Schéma 6)<sup>116,117</sup>.



**Schéma 6 : Détection d'un brin d'ADN cible amplifiée par l'utilisation de liposomes fonctionnalisés<sup>117</sup>.**

La spectroscopie d'impédance électrochimique en mode non-faradique est uniquement basée sur l'analyse des changements des propriétés électrochimiques de l'interface électrode modifiée|électrolyte et ne requiert pas l'utilisation d'une sonde redox externe<sup>5,118-120</sup>. Cette technique n'est donc pas adaptée à l'étude mécanistique du processus de transfert électronique mais permet une meilleure compréhension des modifications des propriétés de l'interface, qui ne sont plus occultées par la présence de l'espèce redox.

## **V. Pour de nouvelles applications**

L'identification d'analytes dans des milieux biologiques a bénéficié ces dernières années d'une attention croissante. L'avancée majeure apportée par la technologie des puces à ADN résulte de leur grande sensibilité, qui autorise leur miniaturisation permettant le décryptage d'un grand nombre de gènes et permet l'emploi d'une faible quantité de matériel

génétique. Grâce à leur facilité, à leur rapidité de mise en œuvre, à leur sensibilité et à leur spécificité, les puces à ADN trouvent de nombreuses applications en biologie moléculaire et sont devenues des outils indispensables pour la recherche génomique.

Les puces à ADN sont déjà bien présentes dans des domaines tels que l'analyse alimentaire pour la détection de microorganismes<sup>1</sup>, l'analyse de l'altération de l'expression des gènes pour permettre l'évaluation des risques issus de l'agriculture transgénique<sup>22</sup> ou le diagnostic médical. Afin d'étendre le champ d'action de ces dispositifs et de résoudre les problèmes rencontrés dans la vectorisation de substances actives, leur utilisation pour la libération contrôlée de substances actives constitue un enjeu primordial. Une mauvaise vectorisation entraîne une diminution des effets thérapeutiques par dilution de la substance active. Les barrières extracellulaires conduisent à augmenter les quantités de substances actives libérées et augmentent d'autant les effets secondaires indésirables. Ainsi le recours à des systèmes permettant la libération locale de substances actives pourrait permettre de mieux cibler la zone à traiter. Aussi, un tel challenge nécessite le développement de nouveaux systèmes pouvant opérer dans des milieux physiologiques<sup>121</sup>.

Dans beaucoup de systèmes à libération contrôlée, la substance active est délivrée par altération d'un film polymère soit par biodégradation<sup>122</sup>, soit par dégradation induite. La plupart des systèmes qui opèrent en milieu physiologique mettent à profit les propriétés du milieu. Ainsi, la libération peut être induite par hydrolyse<sup>123,124</sup>, par corrosion<sup>125</sup> ou par expansion de la matrice<sup>126</sup>.

Comme le suggère la réversibilité du processus d'échange ionique dans les polymères conducteurs, la chaîne polymère peut être réutilisée dans une nouvelle séquence de stockage/libération par simple immersion dans la solution contenant la substance active<sup>127</sup>. Ainsi, les polymères conducteurs sont d'excellents candidats pour le développement de systèmes à libération contrôlée. La possibilité de stimuler par voie électrochimique les polymères conducteurs fait de ces matériaux des candidats de choix pour le développement de dispositifs permettant la libération contrôlée de composés biologiques<sup>126</sup>. Aussi, le contrôle de la charge introduite par les techniques électrochimiques, ou par des matrices sensibles aux variations de pH<sup>128,129</sup> autorise le stockage et ou la libération d'espèces chargées.

# *Partie 1*



## Partie 1 :

Le développement de supports actifs permettant l'immobilisation d'ADN et le diagnostic électrochimique de l'hybridation nécessite l'élaboration de matrices fonctionnalisées et conductrices.

Dans ce but, un monomère  $M_1$  dérivé du thiophène a été synthétisé. Après une étude du comportement électrochimique du poly( $M_1$ ) formé par électrosynthèse, une matrice conductrice a été modifiée par des brins d'ADN sondes, capables de reconnaître leur séquence complémentaire en solution. La lecture de l'hybridation a été effectuée par microbalance à cristal de quartz et par spectroscopie d'impédance électrochimique. L'ADN immobilisé a ensuite été libéré à potentiel imposé dans un milieu physiologique.





# *Chapitre 1*

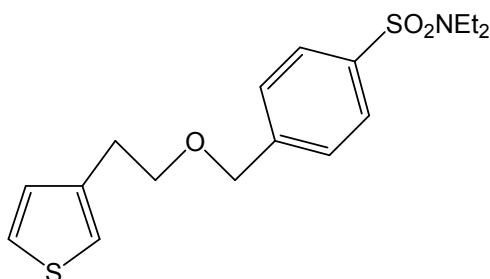


# Chapitre 1 :

## Synthèse du monomère $M_1$ et comportement électrochimique du poly( $M_1$ )

### I. Le choix du monomère

Sur la base de travaux préliminaires<sup>130</sup>, nous avons entrepris la synthèse et l'étude du motif  $M_1$  pour l'élaboration de supports conducteurs actifs dans la transduction d'évènements biologiques.



**N,N-diéthyl-4-(2-thiophén-3-yl-éthoxyméthyl)-benzènesulfonamide ( $M_1$ )**

La synthèse et l'étude du comportement électrochimique du motif  $M_1$  et de motifs analogues ont fait l'objet d'un travail de thèse complet, soutenu en 2000<sup>131</sup>. Ces dérivés du thiophène, initialement employés comme unités monomères pour l'élaboration de matrices conductrices appliquées à la synthèse supportée vont être testés comme supports pour l'immobilisation de matériel biologique.

Notre choix s'est orienté vers l'emploi du motif  $M_1$  pour les raisons qui avaient initialement motivé son utilisation pour le développement d'électrodes modifiées appliquées à la synthèse supportée.

Le monomère  $M_1$  possède :

- un motif thiophène dont les positions adjacentes à l'atome de soufre sont libres et peuvent être engagées, par oxydation, dans la formation de chaînes polymères,
- un groupement arylsulfonamide capable après activations électrochimique et chimique de conduire au groupement chlorure de sulfonyle requis pour l'immobilisation d'amines primaires,

- une chaîne carbonée qui sépare le groupement électropolymérisable de la fonction d'ancrage, permettant ainsi d'améliorer l'accessibilité du groupement fonctionnel capable d'immobiliser le motif sonde. La présence d'un oxygène dans la chaîne carbonée augmente la mouillabilité des chaînes de polymère et améliore son électroactivité en milieu aqueux<sup>132</sup>.

## II. Synthèse du monomère $M_1$

Le monomère  $M_1$  a été obtenu en deux étapes avec un rendement global de 59%, comme décrit dans la littérature<sup>130</sup>. La première étape est une substitution nucléophile du chlore de la fonction chlorure de sulfonyle par la diéthylamine conduisant au groupement sulfonamide avec un rendement de 90%. Cette première réaction constitue une étape de protection du chlorure de sulfonyle. La deuxième étape consiste en une substitution nucléophile du brome par le 2-thiophén-3-yl-éthanolate et conduit au monomère  $M_1$  avec un rendement de 65%.

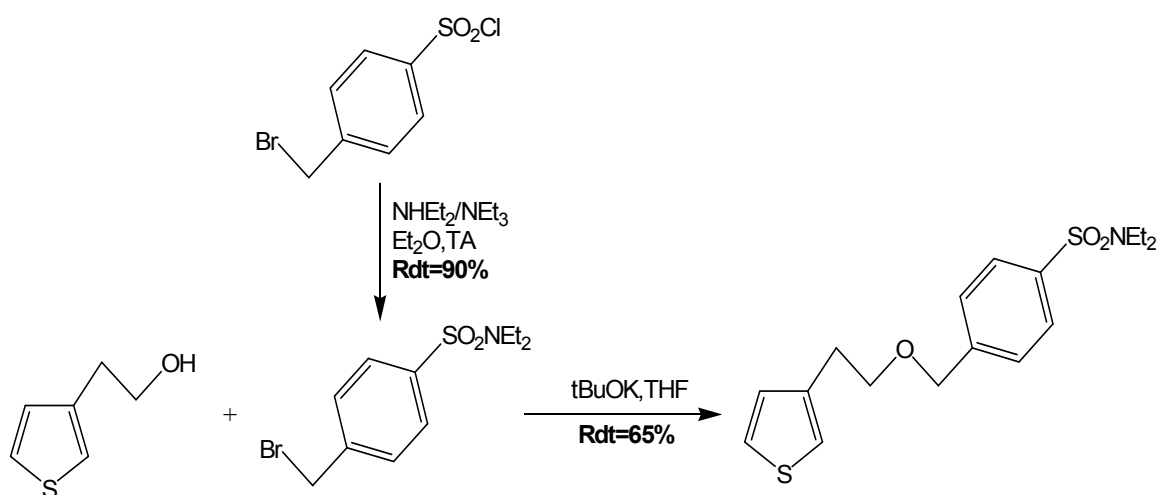


Schéma 1. : Synthèse du monomère  $M_1$

Les conditions opératoires utilisées pour la synthèse de ce motif sont détaillées dans la partie expérimentale (Partie A : synthèse et caractérisation des molécules organiques).

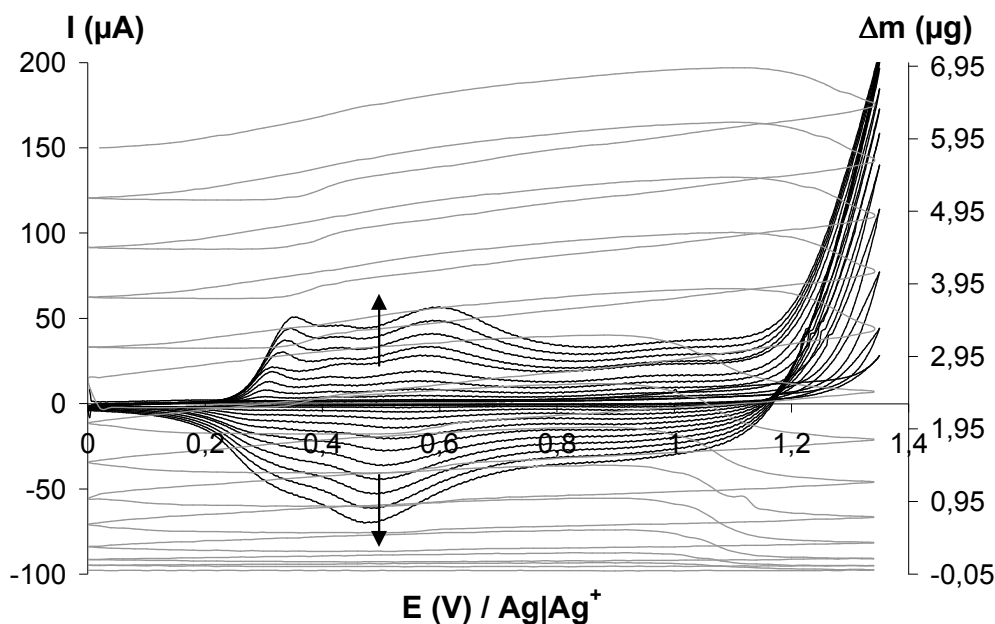
## III. Formation du poly( $M_1$ )

Le film de poly( $M_1$ ) est formé par oxydation d'une solution d'acétonitrile contenant 28mM du composé  $M_1$  et 0,1M d'hexafluorophosphate de tétra-n-butylammonium ( $Bu_4NPF_6$ ) employé comme sel de fond. Les études électrochimiques ont été réalisées avec un

montage à trois électrodes. L'électrode de travail consiste le plus souvent en un disque plan de platine ( $\phi=1\text{mm}$ ) ou en un cristal de quartz platiné ( $\phi=5\text{mm}$ ). L'électrode de référence consiste en un fil d'argent plongeant dans une solution d'acétonitrile contenant un sel d'argent ( $\text{AgNO}_3$  à  $0,1\text{M}$ ). L'électrode auxiliaire ou contre-électrode est un fil de platine. Le potentiel est imposé entre l'électrode de travail et l'électrode de référence. Le courant circule entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire. De cette façon, le système de référence des potentiels n'est pas perturbé au cours de l'étude électrochimique et des courbes intensité-potential (appelées voltammogrammes) peuvent être enregistrées.

Lorsque l'électrode de travail consiste en un cristal de quartz platiné, l'emploi d'un analyseur de fréquence permet de suivre les variations de la fréquence de résonance du cristal de quartz. Sous certaines conditions, les variations en fréquence peuvent être traduites en variations de la masse de l'électrode de travail par la relation de Sauerbrey<sup>85</sup>. Cette relation est vérifiée si au cours du traitement électrochimique, il ne se forme pas de région distincte dans le volume du cristal de quartz platiné caractérisée par une fréquence de résonance propre. C'est le cas des films de polymères suffisamment fins pour rester parfaitement solidaires du quartz platiné et ne pas présenter d'élasticité propre. En pratique, une variation brutale de l'admittance est observée pour des dépôts épais qui entrent en résonance à une fréquence différente de celle du quartz. Pour rester dans le domaine de validité de la relation de Sauerbrey, les films de polymères formés ont des masses inférieures à  $15\mu\text{g}$  et ne s'accompagnent pas d'une variation sensible de l'admittance.

La figure I-1 présente la superposition de plusieurs voltammogrammes enregistrés sur un cristal de quartz platiné avec une vitesse de balayage de  $100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . La solution électrolytique est préalablement séchée sur alumine activée à  $300^\circ\text{C}$  pendant 4 heures, puis désaérée par un courant d'argon.



**Figure I-1: Voltamétrie cyclique et variation consécutive de la masse**

**Courbes noires :** 13 voltammogrammes cycliques successifs enregistrés sur un cristal de quartz platiné ( $\phi=5\text{mm}$ ) plongé dans une solution contenant le monomère  $M_1$  (28mM) dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  (vitesse de balayage,  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ). La charge de synthèse mesurée à l'état neutre est de  $14,3\text{mCcm}^{-2}$ .

**Courbes grises :** variation de la masse enregistrée simultanément aux voltammogrammes cycliques.

La figure I-1 montre au premier balayage du potentiel un courant d'oxydation qui augmente à partir de 1,2V. Ce courant correspond à l'oxydation du monomère  $M_1$  en solution et conduit à la formation de radicaux cations. Dès le second balayage aller, un système réversible apparaît à un potentiel inférieur au potentiel d'oxydation du monomère. L'apparition de ce système est compatible avec un processus ECE qui correspond respectivement à l'oxydation du monomère  $M_1$  en solution, au couplage radicalaire des espèces produites à la surface de l'électrode pour former de proche en proche de longues chaînes de polymère et à l'oxydation des chaînes de poly( $M_1$ ). Des balayages supplémentaires montrent une augmentation de l'intensité de ce nouveau système attribuable à la formation d'un film électroactif qui croît à la surface de l'électrode. Cette croissance du film est également mise en évidence par l'augmentation de la masse au cours des différents balayages du potentiel (Figure I-1, courbes grises). La masse totale de film formé à l'état neutre (à  $E=0\text{V}$ ) à la surface du quartz platiné est de  $5,80\mu\text{g}$ .

Sachant que la charge  $Q_s$  consommée pour former le film de poly( $M_1$ ) à l'état neutre est de  $14,3\text{mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ , il est possible de déterminer le rendement d'électropolymérisation. En supposant que la totalité de la charge consommée sert à oxyder le monomère  $M_1$  en solution, le nombre de moles d'unités  $M_1$  oxydées est alors égal à  $\frac{1}{2} \frac{Q_s}{F}$ , où  $F$  est la constante de Faraday. Soit  $M_{M_1}$  la masse molaire du composé  $M_1$ , la masse théorique du film,  $m_{\text{théo}}$ , est donnée par la relation ci-dessous :

$$m_{\text{théo}} = \frac{1}{2} \frac{Q_s \cdot M_{M_1}}{F}$$

Dans ces conditions, la masse du film poly( $M_1$ ) normalement obtenue est de  $5,15\mu\text{g}$ . Cette masse théorique est relativement proche de celle mesurée par la microbalance à cristal de quartz. Cette bonne corrélation suggère que le rendement d'électrosynthèse est proche de 100%.

#### **IV. Etude électrochimique d'un film de poly( $M_1$ )**

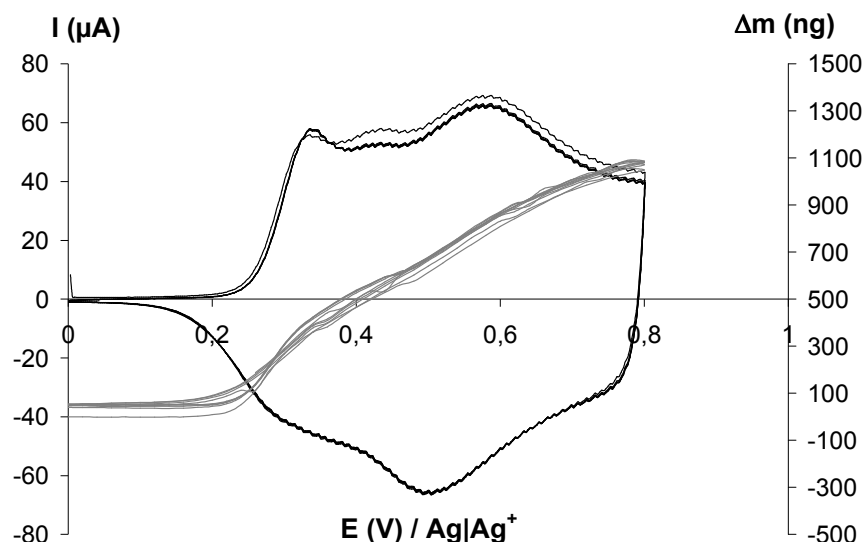
Après avoir soigneusement rincé le film de poly( $M_1$ ) dans l'acétonitrile, l'électroactivité du film formé est étudiée en milieu organique dans une solution électrolytique d'acétonitrile ne contenant pas le monomère.

##### **IV.1. Comportement anodique**

###### **IV.1.1 Etude du dopage p par voltamétrie cyclique couplée à la microbalance à cristal de quartz**

La figure I-2 montre le comportement anodique du film de poly( $M_1$ ) obtenu précédemment. Les voltammogrammes cycliques sont enregistrés à  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  dans un milieu désaéré par un courant d'argon et préalablement séché sur alumine activée.





**Figure I-2 : Voltamétrie cyclique et variation consécutive de la masse**

**Courbes noires : 5 voltammogrammes cycliques enregistrés sur un cristal de quartz platiné ( $\phi=5\text{mm}$ ) recouvert du film poly( $M_1$ ) précédemment obtenu. Le film de polymère est plongé dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  (vitesse de balayage,  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ). La charge  $Q_p$  intégrée au cours d'un balayage aller des potentiels est de  $1,37\text{mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ .**

**Courbes grises : variation de la masse enregistrée simultanément aux voltammogrammes cycliques.**

Les courbes noires de la figure I-2 montrent des voltammogrammes cycliques enregistrés entre 0V et +0,8V et correspondent au processus de dopage p du poly( $M_1$ ). Le dopage p consiste en une perte d'électron, qui entraîne la création d'une lacune électronique à l'origine du mouvement des électrons  $\pi$  le long de la chaîne. Afin d'assurer l'électroneutralité de l'ensemble, chaque charge positive est compensée par l'entrée d'un anion dopant  $\text{PF}_6^-$  provenant du milieu électrolytique. On obtient alors une conduction ionique et électronique avec un taux de dopage contrôlable en fonction de la quantité de charges introduites dans le polymère à un potentiel donné.

L'intensité du courant mesurée au cours du dopage p du poly( $M_1$ ) reste stable lors des différents balayages ce qui suggère une bonne stabilité du dopage p. Par ailleurs, la charge  $Q_p$  correspondant à l'oxydation du poly( $M_1$ ) est très proche en valeur de la charge  $Q_n$  intégrée au cours de la neutralisation des chaînes du polymère ( $Q_p=0,28\text{mC}$  ;  $Q_n=-0,27\text{mC}$ ). Une valeur

voisine de l'unité pour le rapport  $-\frac{Q_p}{Q_n}$  est compatible avec la bonne réversibilité

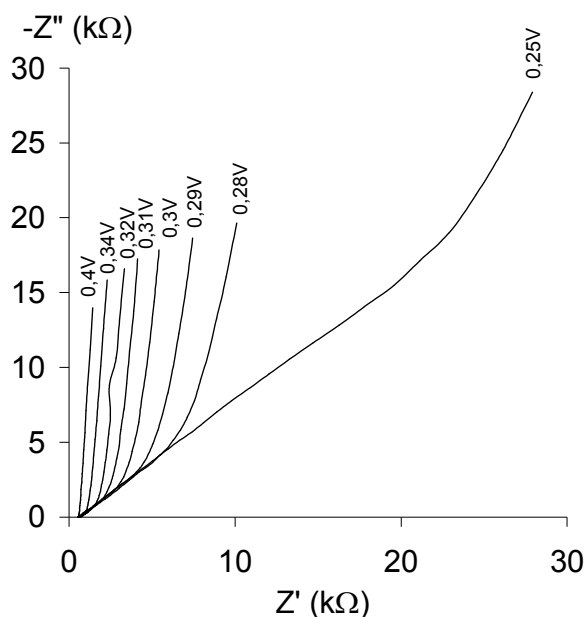
normalement attendue pour le dopage du poly( $M_1$ ).

A partir des charges  $Q_p$  et  $Q_s$ , égales à  $1,37\text{mC}\cdot\text{cm}^{-2}$  et  $14,3\text{mC}\cdot\text{cm}^{-2}$  respectivement, et sachant que le rendement d'électrosynthèse est proche de 100% (comme cela a été établi à la section III), le taux de dopage  $\delta_p$  est de 0,19. Un taux de dopage voisin de 0,2 est en accord avec la valeur normalement attendue pour des dérivés du polythiophène en milieu organique<sup>133</sup>.

Les mesures gravimétriques (courbes grises) témoignent également de la réversibilité du dopage p, puisque la perte de masse enregistrée pendant la neutralisation du film ( $1,05\mu\text{g}$ ) correspond exactement à la prise de masse enregistrée au balayage aller, lors de l'oxydation du poly( $M_1$ ) ( $1,04\mu\text{g}$ ). En considérant que la variation de masse enregistrée lors du processus de dopage p correspond uniquement à une entrée de  $\text{PF}_6^-$ , il est possible de déterminer le taux de dopage p. La valeur de  $\delta_p$  déduite des mesures gravimétriques est égale à 0,44. Cette valeur du taux de dopage p, différente de celle obtenue à partir de la coulométrie, pourrait signifier que les anions dopants sont solvatés et que leur insertion s'accompagne de molécules de solvant, comme cela est quelquefois rapporté dans la littérature<sup>134,135</sup>.

#### IV.1.2 Etude du dopage p par impédance électrochimique

Des mesures par spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) ont été effectuées à des potentiels situés au début du processus de dopage p (pour de faibles taux de dopage), entre +0,25V et +0,4V, en appliquant une composante alternative d'une amplitude de 10mV et en faisant varier la fréquence de 100kHz à 0,1Hz. Les variations de l'impédance totale du système avec la fréquence, pour un dépôt de poly( $M_1$ ) formé sur électrode de platine millimétrique, sont représentées dans le plan complexe (Figure I-3).



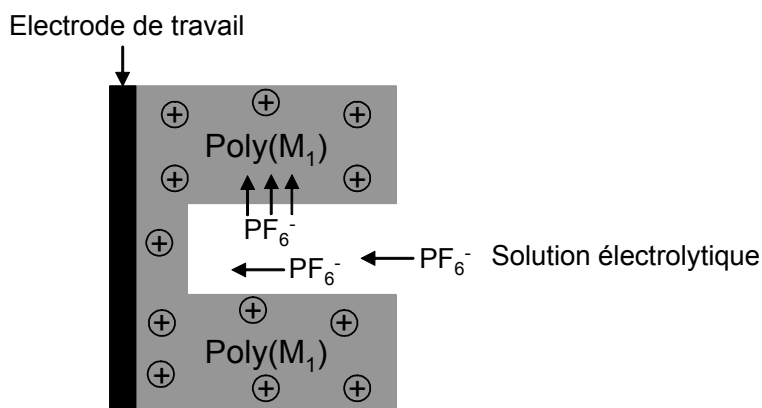
**Figure I-3 : Variations de l'impédance totale dans le plan complexe**

**Diagrammes de Nyquist enregistrés à différents potentiels sur une électrode de Pt ( $\phi = 1\text{mm}$ ) recouverte d'un film de poly( $M_1$ ) et plongée dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$ .**

La figure I-3 montre la superposition de plusieurs courbes d'impédance électrochimique enregistrées à différents potentiels. Sur chacune, deux domaines de fréquence peuvent être distingués : le domaine des hautes fréquences et le domaine des basses fréquences\*. Pour des fréquences élevées, les courbes se présentent sous la forme d'une droite de coefficient directeur 1 et pour des fréquences plus faibles (valeurs de  $Z'$  et  $-Z''$  plus élevées) une droite presque verticale est observable. Cette allure générale de la variation de l'impédance totale avec la fréquence est bien connue et communément observée dans le cas des films conducteurs poreux<sup>136,137</sup>. De nombreuses études traitent de l'application de l'impédance électrochimique et plus particulièrement du modèle dit des « doubles lignes de transmission » à l'analyse du comportement de polymères poreux. Pour notre étude, nous nous sommes appuyés sur le modèle décrit par Bisquert et Garcia-Belmonte<sup>138,139</sup>. Dans ce modèle, la droite de pente 1 aux hautes fréquences peut être considérée comme une impédance de Warburg et correspond à la migration des ions à l'intérieur de la structure mésoporeuse du poly( $M_1$ ). La droite verticale à basses fréquences témoigne d'un comportement capacitif correspondant à l'insertion des anions dopants dans la phase solide du film conducteur durant sa polarisation.

\* La fréquence diminue de la gauche vers la droite suivant l'axe des abscisses.

L'impédance électrochimique appliquée à l'étude du poly( $M_1$ ) montre que la matrice se comporte comme un film mésoporeux dans lequel la phase liquide est en contact intime avec la phase solide comme cela est représenté sur le schéma suivant.



**Schéma 2. : Représentation schématique d'une électrode recouverte d'un film de polymère mésoporeux**

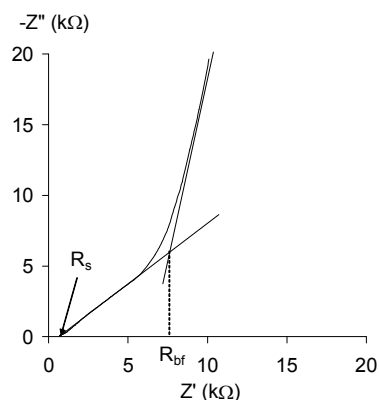
Des modèles théoriques tels que celui des « doubles lignes de transmission » permettent de comprendre le comportement de ces films mésoporeux et donnent facilement accès à la conduction ionique  $\sigma_i$  liée au mouvement des agents dopants dans le volume de la matrice<sup>140</sup>.  $\sigma_i$  est déduite des variations de l'impédance totale présentées sur la figure I-3 et est obtenue en multipliant la conductance ionique (égale à l'inverse de la résistance ionique  $R_i$ ) par le facteur de forme  $L/A$  :

$$\sigma_i = \frac{L}{R_i \cdot A}, \text{ où } L \text{ représente l'épaisseur du film et } A \text{ sa surface géométrique.}$$

$R_i$  est calculée à partir de l'expression suivante :

$$R_i = \frac{1}{3}(R_{bf} - R_s), \text{ où } R_s \text{ et } R_{bf} \text{ correspondent respectivement à la résistance de la solution}$$

électrolytique et à la résistance déterminée aux basses fréquences par construction graphique comme indiqué sur la figure I-4.



La conductivité ionique normalisée est notée  $\sigma_{i,0}$  et est obtenue grâce à l'expression suivante :

$$\sigma_{i,0} = \frac{\sigma_i}{\sigma_0} = \frac{R_0}{R_i}$$

où  $\sigma_0 = \max(\sigma_i)$  et  $R_0 = \min(R_i)$

**Figure I-4 : Détermination graphique des résistances  $R_s$  et  $R_{bf}$**

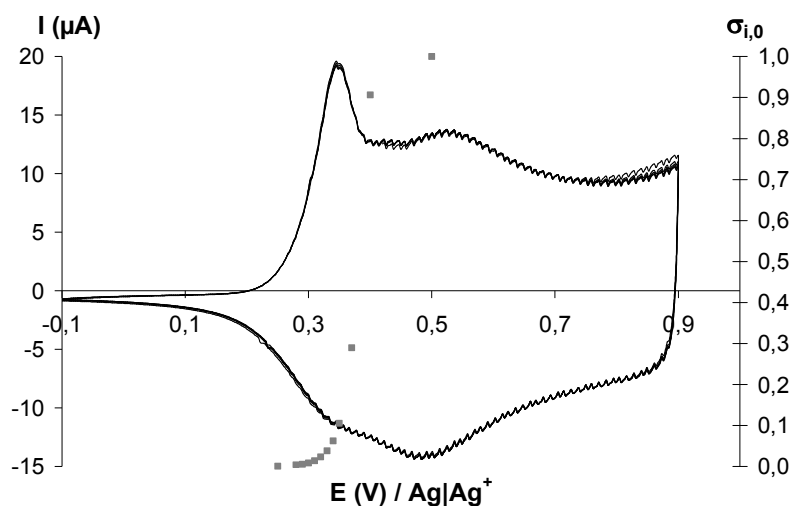
**Diagramme de Nyquist enregistré à +0,28V sur une électrode de Pt ( $\phi = 1\text{mm}$ ) recouverte d'un film de poly( $M_1$ ) et plongée dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$ .**

Le tableau suivant rassemble les valeurs des conductivités ioniques normalisées  $\sigma_{i,0}$  obtenues à différents potentiels (pour différents taux de dopage p).

**Tableau 1 : valeurs de  $\sigma_{i,0}$  en fonction du potentiel d'oxydation**

E (V)	$R_s$ ( $\Omega$ )	$R_{bf}$ ( $\Omega$ )	$R_i$ ( $\Omega$ )	$\sigma_{i,0}$
0,25	736	22800	7355	0,001
0,28	740	7000	2087	0,005
0,29	726	5500	1591	0,006
0,30	714	3900	1062	0,009
0,31	695	2700	668	0,014
0,32	674	1900	409	0,024
0,33	652	1400	249	0,039
0,34	636	1100	155	0,063
0,35	626	900	91	0,106
0,37	600	700	33	0,290
0,40	568	600	11	0,906
0,50	491	520	10	1,000

A partir des résultats obtenus ci-dessus, les valeurs de la conductivité ionique normalisée  $\sigma_{i,0}$  au cours du processus de dopage p du film de poly( $M_1$ ) sont reportées en fonction du potentiel et superposées au courant enregistré (Figure I-5).



**Figure I-5 : Voltamétrie cyclique et conductivité ionique**

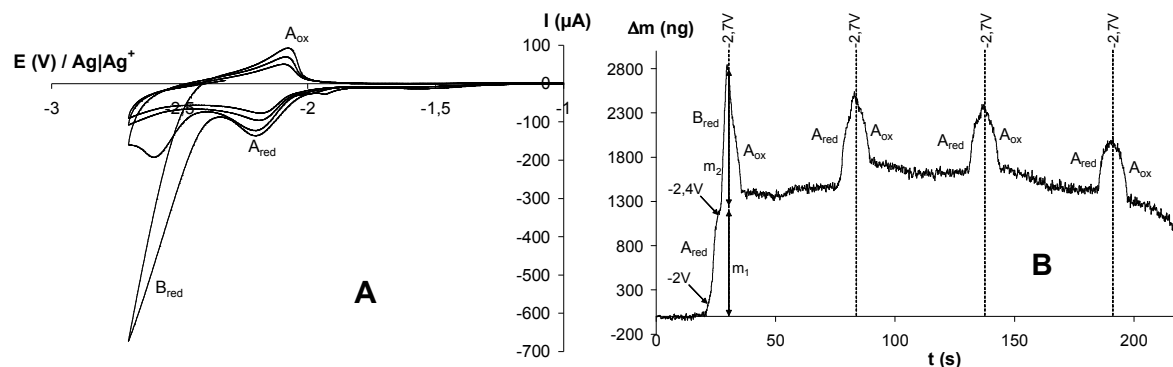
Voltammogrammes cycliques enregistrés sur une électrode de Pt ( $\phi=1\text{mm}$ ) recouverte d'un film poly( $M_1$ ) et plongée dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  (vitesse de balayage,  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Les marqueurs carrés grisés représentent les valeurs de la conductivité ionique normalisée  $\sigma_{i,0}$  en fonction du potentiel.

La figure I-5 met en évidence l'augmentation brutale de la conductivité du film poly( $M_1$ ) au cours du dopage p lorsque le potentiel appliqué augmente, comme cela a déjà été observé par Aubert et col.<sup>141</sup>.

#### **IV.2. Comportement cathodique**

Le comportement cathodique du film de poly( $M_1$ ) formé à la section III. a été étudié sur un domaine de potentiel compris entre 0V et -2,7V (Figure I-6A), dans une solution d'acétonitrile contenant  $\text{Bu}_4\text{NPF}_6$  à 0,1M et préalablement séchée sur alumine activée, puis désaérée par un courant d'argon.



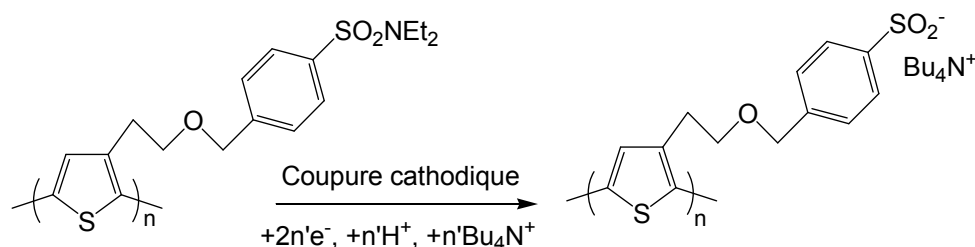
**Figure I-6 : Voltamétrie cyclique et variation consécutive de la masse**

**A :** 4 voltammogrammes cycliques enregistrés sur un cristal de quartz platiné ( $\phi=5\text{mm}$ ) recouvert du film poly( $M_1$ ) obtenu sur la figure I-1. Le film de polymère est plongé dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  (vitesse de balayage,  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

**B :** variation de la masse enregistrée simultanément aux voltammogrammes cycliques.

Au premier balayage, deux systèmes sont observés. Un premier système réversible, noté A, localisé à  $-2,2\text{V}$ , est attribuable au dopage n comme l'atteste la prise de masse consécutive à la réduction des chaînes au balayage aller et la perte de masse enregistrée au balayage retour lors de la neutralisation des chaînes (Figure I-6B).

Un second système irréversible, noté B, est observé au-delà de  $-2,4\text{V}$ . L'intensité de la vague de réduction B diminue rapidement jusqu'à disparaître dès le troisième balayage et est compatible avec la coupure biélectronique des liaisons S-N des fonctions sulfonamide conduisant à des anions sulfinate, en accord avec les travaux réalisés par J. Simonet et son équipe<sup>130,142</sup>.



**Schéma 3. : Coupure biélectronique de la liaison S-N des fonctions sulfonamide du poly( $M_1$ )**

Au cours des balayages du potentiel, l'intensité du dopage n diminue, suggérant une dégradation cathodique de la matrice.

La figure I-6B, enregistrée simultanément aux quatre voltammogrammes cycliques de la figure I-6A, montre les variations de la masse induites au cours des processus  $A_{red}|A_{ox}$  et  $B_{red}$ . Une augmentation brutale de la masse est observée au premier balayage aller du potentiel et atteint un maximum à -2,7V. La rupture de pente observable sur cette portion de la courbe et correspondant à un potentiel proche de -2,4V, suggère la participation de deux processus contribuant à l'augmentation de la masse : le dopage n, puis la coupure biélectronique de la liaison S-N.

La première contribution à l'augmentation de la masse, notée  $m_1$ , enregistrée à des potentiels compris entre -2V et -2,4V, correspond à une entrée de cations  $Bu_4N^+$  dans le volume de la matrice de poly( $M_1$ ) dopée n. A partir de cette masse  $m_1$ , estimée à 1200 ng et de celle du film déposé à la surface du quartz, égale à 5800ng, il est possible de calculer le taux de dopage n du polymère,  $\delta_n$ .

$$\delta_n = \frac{\frac{m_1}{M_{Bu_4N^+}}}{\frac{m_{film}}{M_{M1}}}$$

Le taux de dopage calculé à partir des mesures gravimétriques est de 0,30. Par ailleurs, la charge  $Q_n$  intégrée entre -2V et -2,35V au cours du second balayage du potentiel, correspondant à la réduction des chaînes du poly( $M_1$ ), est égale à -1,62mC.cm<sup>-2</sup>. Sachant que le rendement d'électrosynthèse est proche de 100%, cette valeur de  $Q_n$  conduit à un taux de dopage n égal à 0,22 ( $\delta_n = \frac{2Q_n}{Q_s}$ ).

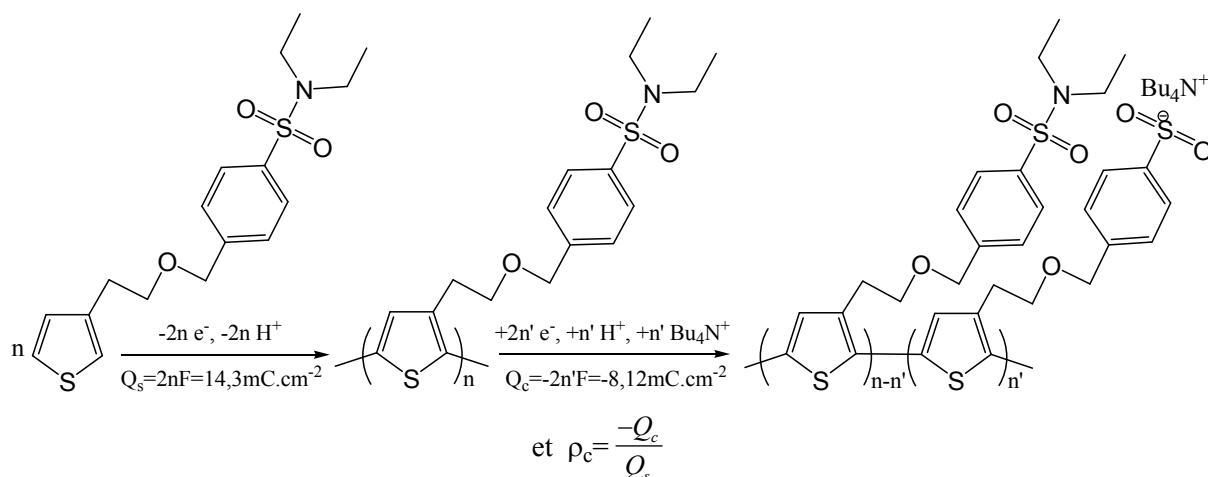
La deuxième contribution à l'augmentation de la masse, notée  $m_2$ , enregistrée à des potentiels compris entre -2,4V et -2,7V, correspond aux cations  $Bu_4N^+$  venus compenser les charges négatives des anions sulfinate formés après coupure de la liaison S-N. La prise de masse  $m_2$ , attribuée à la coupure de la liaison S-N, estimée à 1620ng sur la figure I-6B, donne accès au pourcentage de liaisons coupées. L'augmentation de masse  $m_2$  est un bilan entre la prise de masse due à l'entrée des cations  $Bu_4N^+$  et la perte de masse occasionnée par le départ de l'amine terminale ( $NEt_2$ ).

$$m_2 = \rho_c \frac{m_{film}}{M_{M1}} (M_{Bu_4N^+} - M_{NEt_2}), \text{ où } \rho_c \text{ est le rendement de coupure.}$$



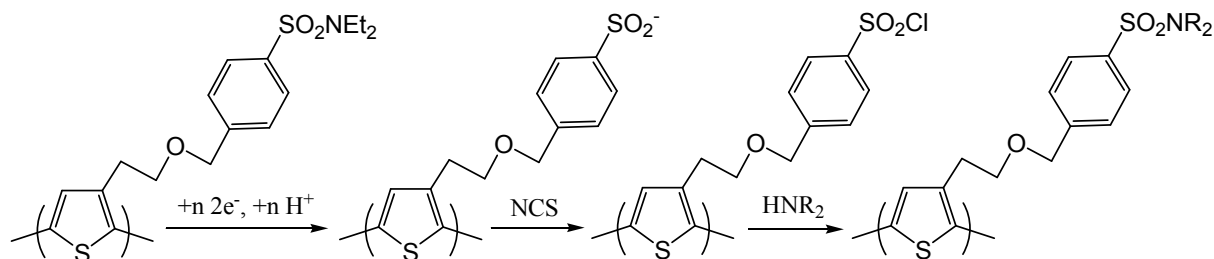
Le pourcentage de coupure  $\rho_c$ , calculé à partir des mesures gravimétriques, est de 58%.

Par ailleurs, la charge  $Q_c$  consommée au cours de la réduction des fonctions sulfonamide et intégrée entre -2,37V et -2,7V au cours du premier balayage du potentiel est égale à -8,12mC.cm<sup>-2</sup>. Sachant que la coupure d'une liaison S-N consomme deux électrons, le rapport de  $Q_c$  et de  $Q_s$  conduit au rendement de coupure<sup>142</sup>.



Le pourcentage de coupure  $\rho_c$ , calculé à partir des mesures coulométriques est égal à 56%. Les rendements de coupure, ainsi que les taux de dopage  $n$  calculés à partir des données obtenues par la microbalance et par la voltamétrie cyclique corrént bien, ce qui conforte l'attribution des différents phénomènes.

Des études préliminaires ont montré que les anions sulfinate obtenus par réduction des fonctions sulfonamide pouvaient être facilement chlorés par réaction avec le N-chlorosuccinimide (NCS) pour conduire au chlorure de sulfonyle. Le groupement chlorure de sulfonyle réagit à température ambiante avec les amines pour restaurer la fonction sulfonamide<sup>130,142</sup>.



Ainsi, cette fonction permet l'immobilisation d'amines après activation en chlorure de sulfonyle.

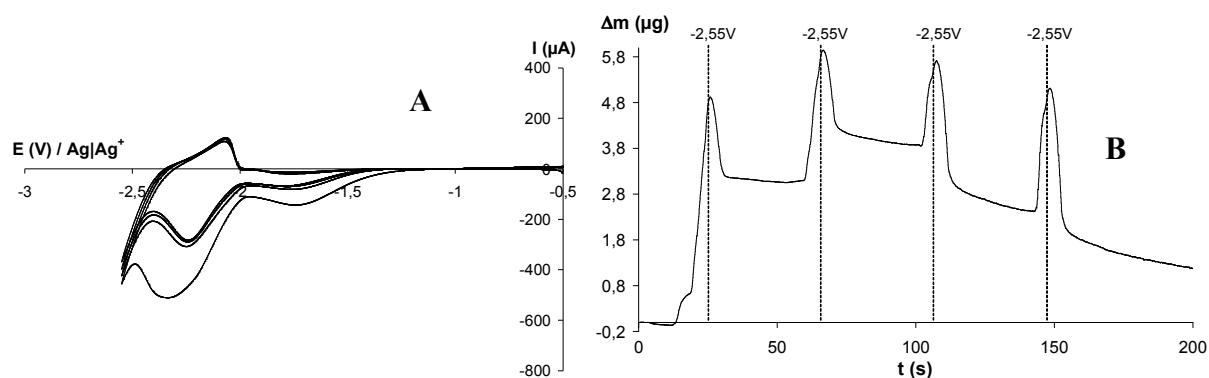
La bonne réactivité, dans des conditions douces, du chlorure de sulfonyle avec les amines primaires autorise la modification de la matrice poly( $M_1$ ) par des sondes d'intérêt biologique. Cependant, pour conserver les avantages du diagnostic électrochimique de la matrice modifiée, il convient de préserver son électroactivité.

Il apparaît donc nécessaire de réduire les liaisons S-N des fonctions sulfonamide pour former les groupes chlorure de sulfonyle prérequis pour l'immobilisation de groupements aminés. Cependant, l'électroactivité de la matrice poly( $M_1$ ) doit être préservée et un compromis doit être trouvé entre la coupure électrochimique et la dégradation cathodique du film polymère.

La figure I-6B, qui montre les variations de la masse associée au comportement cathodique de la matrice poly( $M_1$ ), semble indiquer que le dopage n et la réduction des fonctions sulfonamide ne sont pas couplés. Par conséquent, il est possible de parcourir le domaine de potentiel correspondant au dopage n sans effectuer la réduction des fonctions sulfonamide qui s'accompagne d'une dégradation cathodique de la matrice.

Un autre film de poly( $M_1$ ) est étudié dans les mêmes conditions, en inversant le sens de balayage avant -2,7V afin de limiter la dégradation cathodique.

La figure I-7A montre quatre voltammogrammes cycliques enregistrés à  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  de 0V à -2,55V et la figure I-7B présente les variations de la masse mesurées simultanément.



**Figure I-7 : Voltamétrie cyclique et variation consécutive de la masse**

**A :** 4 voltammogrammes cycliques enregistrés sur un cristal de quartz platiné ( $\phi=5\text{mm}$ ) recouvert d'un film poly( $M_1$ ) ( $10,2\mu\text{g}$ ,  $Q_s=26,04\text{mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Le film de polymère est plongé dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  (vitesse de balayage,  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

**B :** variation de la masse enregistrée simultanément aux voltammogrammes cycliques.

Les voltammogrammes enregistrés sur la figure I-7A entre 0V et -2,55V montrent le dopage n du poly(M<sub>1</sub>) et le début de la vague de réduction des fonctions sulfonamide. L'intensité plus importante du pic de réduction au premier balayage est attribuable à un courant de rémanence<sup>143</sup>. Ce phénomène de rémanence disparaît dès le second balayage et correspond à la réduction d'une fraction du polymère non réduite entre +0,8V et -0,1V, lors de la neutralisation du dopage p préalablement enregistré. Les voltammogrammes suivants se stabilisent et l'intensité du dopage n ne diminue plus comme cela est le cas lorsque la valeur du potentiel cathodique de retour est inférieure à -2,55V (Figure I-6A). Ainsi, il semble que le film puisse être préservé à l'issue de plusieurs balayages du potentiel dans un intervalle compris entre 0V et -2,55V. Sur un domaine de potentiel plus étendu en réduction, le film se dégrade.

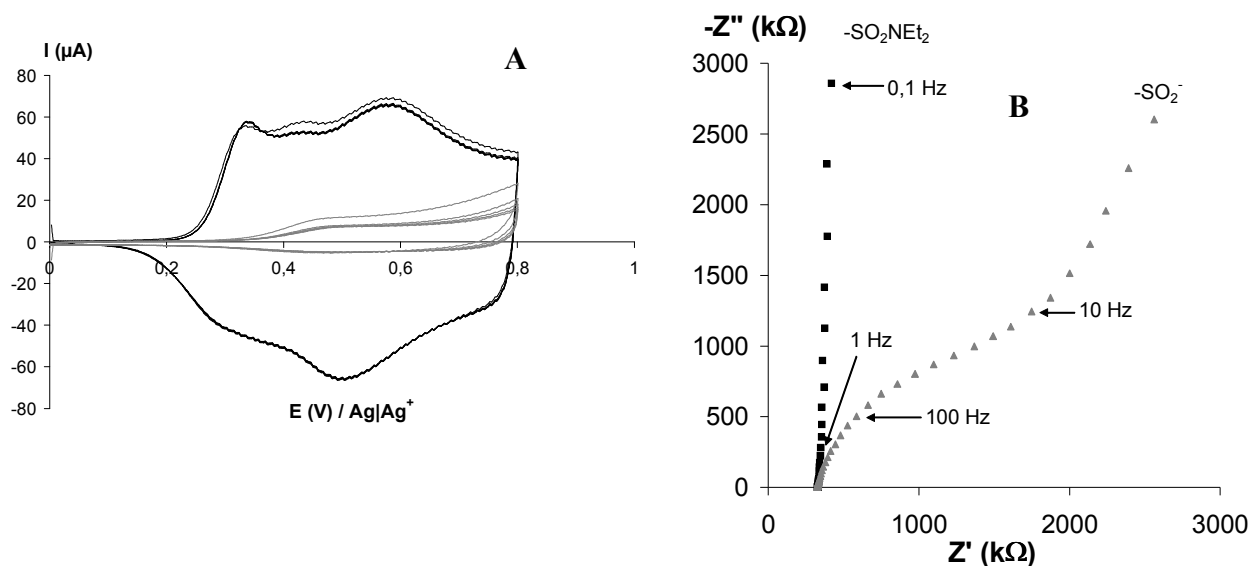
La courbe du suivi gravimétrique effectué simultanément aux mesures voltamétriques (Figure I-6B) montre au balayage aller une prise de masse consécutive à l'entrée des cations dopants Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup> à l'intérieur de la matrice. Au balayage retour, une diminution de la masse témoigne de la sortie des cations. Toutefois cette perte de masse est moins importante que la prise de masse observée au balayage aller. Il apparaît ainsi qu'une fraction de cations reste piégée à l'intérieur du polymère, en accord avec la réduction d'une fraction des fonctions sulfonamide en anions sulfinate. Ainsi, le potentiel cathodique limite de -2,55V permet la réduction des fonctions sulfonamide tout en conservant l'intégrité de la matrice. La valeur de -2,55V pour le potentiel cathodique de retour semble constituer un bon compromis, permettant la réduction des fonctions sulfonamide en anions sulfinate tout en préservant la matrice. Lorsque le film poly(M<sub>1</sub>) est polarisé à des potentiels inférieurs à -2,55V, ses propriétés électrochimiques sont profondément affectées et diffèrent de celles du film de départ. Afin de mieux comprendre les modifications du film de poly(M<sub>1</sub>) occasionnées par le traitement cathodique, les effets de la coupure sur les propriétés de conduction de la matrice ont été étudiés dans la section suivante.

### **IV.3. Etude de la dégradation cathodique du poly(M<sub>1</sub>)**

Le film de poly(M<sub>1</sub>), formé à la section III. par voltamétrie cyclique sur cristal de quartz platiné, est soumis à quatre balayages du potentiel de 0V à -2,7V enregistrés à 100mV.s<sup>-1</sup> dans une solution d'acétonitrile contenant Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub> à 0,1M, afin de réduire les liaisons S-N des fonctions sulfonamide. Le film de poly(M<sub>1</sub>) ainsi traité est étudié par voltamétrie cyclique et par impédance électrochimique.

La figure I-8A montre la superposition de voltammogrammes cycliques effectués lors du processus de dopage p de la matrice avant (courbe noire) et après traitement cathodique

(courbe grise). Les mesures de l'impédance totale représentées dans le plan complexe sur la figure I-8B sont enregistrées sur la matrice dopée p, au potentiel de +0,5V. Les carrés noirs correspondent aux valeurs de l'impédance totale du film non modifié et les triangles gris à l'impédance totale du film réduit par cyclage des potentiels.



**Figure I-8: Voltamétrie cyclique et variations de l'impédance totale dans le plan complexe**

**A :** Voltammogrammes cycliques enregistrés sur un cristal de quartz platiné ( $\phi=5\text{mm}$ ) recouvert du film poly( $M_1$ ) obtenu sur la figure I-1, avant (courbe noire) et après coupure cathodique effectuée sur le polymère en cyclant 4 fois les potentiels de 0V à -2,7V (courbe grise).

**B :** Diagrammes de Nyquist enregistrés à +0,5V sur le film avant (carrés noirs) et après coupure cathodique (triangles gris). Pour chaque mesure, le film de polymère est plongé dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  (vitesse de balayage,  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ )

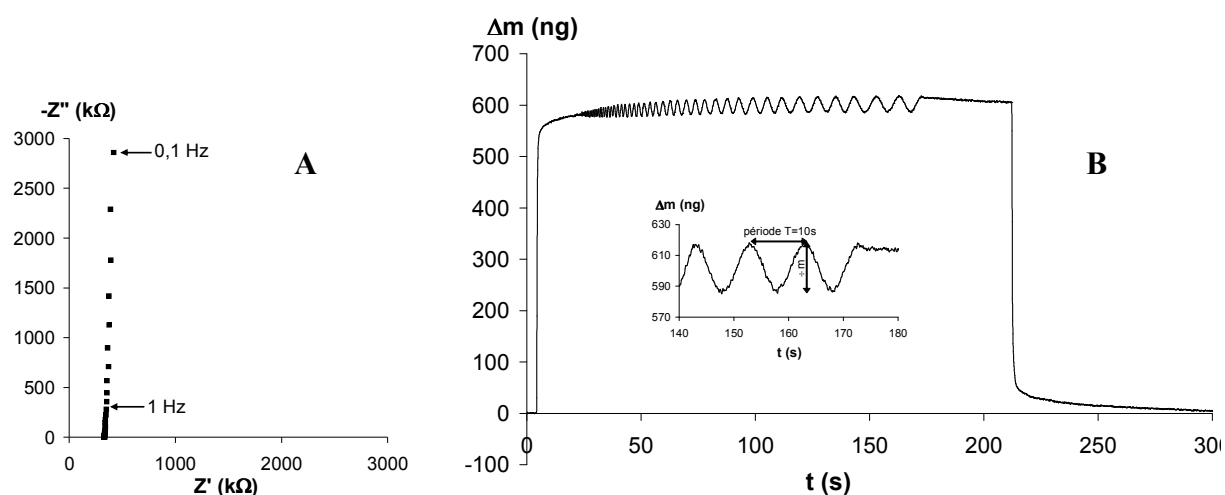
Une très nette différence entre les voltammogrammes enregistrés au cours du processus de dopage p du poly( $M_1$ ) avant (courbe noire) et après clivage cathodique (courbe grise) est observée. La diminution de l'intensité du dopage enregistrée après réduction des fonctions arylsulfonamide est compatible avec la dégradation cathodique du polymère lors de la coupure électrochimique des liaisons S-N.

La figure I-8B montre également deux comportements radicalement différents avant (carrés noirs) et après traitement cathodique (triangles gris).

Avant la coupure électrochimique des liaisons S-N; le film présente un comportement capacitif qui se caractérise par une droite verticale sur le diagramme de Nyquist (Figure I-8B,

carrés noirs). Une telle réponse en spectroscopie d'impédance est attribuable à l'insertion d'agents dopants dans l'épaisseur de la matrice polarisée (dopée p) qui se comporte comme un condensateur chargé<sup>144</sup>. Après clivage cathodique, le film portant des groupements sulfinate présente un comportement différent. L'allure du diagramme de Nyquist enregistré sur le film de poly(M<sub>1</sub>) après traitement cathodique (Figure I-8B, triangles gris) permet de distinguer deux régions en fréquences : le domaine des hautes fréquences et le domaine des basses fréquences. Pour des fréquences élevées, la courbe présente l'amorce d'un demi-cercle caractéristique de l'apparition d'une composante résistive. Cette résistance est compatible avec le mouvement gêné des anions dans la phase polymère lors du processus de dopage p. Cette gêne induite par le traitement cathodique peut avoir deux origines. L'apparition des anions sulfinate occasionnée par la coupure électrochimique engendre une répulsion électrostatique avec les anions dopants PF<sub>6</sub><sup>-</sup> provenant de la solution électrolytique. Par ailleurs, la coupure cathodique peut engendrer une réorganisation des chaînes susceptible d'augmenter la gêne stérique et le désordre dans le volume du film comme le suggère l'apparition d'une pseudo-capacité dans la région des basses fréquences caractérisée par une droite inclinée.

Afin de mieux comprendre l'origine du mouvement gêné des anions dans la matrice au cours du processus de dopage p, des mesures de variations de la masse ont été effectuées simultanément aux mesures d'impédance électrochimique (Figure I-9). Cette approche électrogravimétrique, essentiellement développée par Gabrielli et col.<sup>134</sup>, constitue à notre connaissance une contribution originale dans le cas de l'étude du comportement d'un film polymère conducteur. Les mesures d'impédance électrochimique couplées à la microbalance ont permis d'extraire une information qui n'est pas accessible par chacune des techniques utilisée individuellement. Par conséquent, il nous est apparu indispensable de préciser les domaines de validité de cette approche et de vérifier la pertinence des résultats.



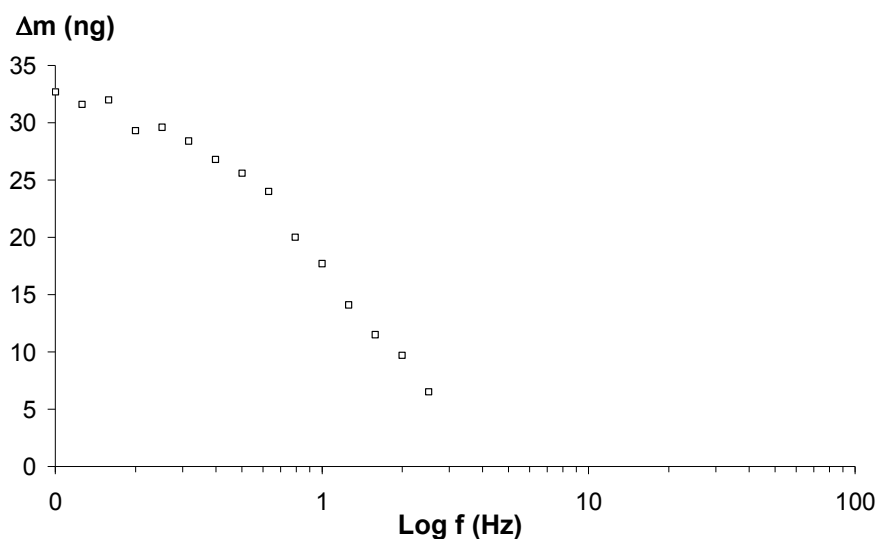
**Figure I-9 : Variation de l'impédance totale dans le plan complexe et variation consécutive de la masse**

**A :** Diagramme de Nyquist enregistré à +0,5V sur un cristal de quartz platiné ( $\phi=5\text{mm}$ ) recouvert du film poly( $M_1$ ) obtenu sur la figure I-1 avant coupure cathodique.

**B :** Variation de la masse mesurée simultanément à l'enregistrement du diagramme de Nyquist de la figure I-9A.

La figure I-9B représente les variations de la masse du film de poly( $M_1$ ) formé à la section III., enregistrées simultanément à une mesure d'impédance réalisée à +0,5V avec une composante alternative d'une amplitude de 10mV et en faisant varier la fréquence de 100kHz à 0,1Hz. Lorsque le potentiel anodique est appliqué à la matrice, l'effet immédiat produit est une augmentation de la masse d'environ 575ng. Cette valeur correspond à la composante

continue de la masse, c'est-à-dire à la prise de masse qui aurait pu être enregistrée sur une matrice identique après avoir imposé un potentiel continu de +0,5V. Au fur et à mesure que la fréquence diminue, des oscillations de période et d'amplitude croissantes apparaissent. Ces variations de masses sont attribuables à l'entrée et à la sortie des anions dopants consécutivement aux variations alternatives du potentiel. Au début de la mesure, la fréquence à laquelle varie le potentiel autour de la composante continue est trop élevée pour laisser le temps aux anions de l'électrolyte de pénétrer à l'intérieur de la matrice. Comme la fréquence diminue au cours de la mesure, elle devient compatible avec l'observation du mouvement des anions au sein de la matrice pour des fréquences inférieures ou égales à 2Hz et des variations alternatives de la masse sont alors enregistrées de manière concomitante (Figure I-9B). A partir des oscillations alternatives de la masse, il est possible de déterminer les valeurs de la fréquence correspondante (insert de la figure I-9B). Ainsi, après avoir déterminé l'amplitude  $\Delta m$  pour chaque oscillation de la masse, ces valeurs de  $\Delta m$  peuvent être reportées en fonction de la fréquence (Figure I-10).



**Figure I-10 : Variations de la masse avec la fréquence**

**Variations de la masse enregistrées à +0,5V sur un cristal de quartz platiné recouvert d'un film de poly( $M_1$ ) plongé dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  avant coupure cathodique des liaisons S-N du polymère.**

Les variations de la masse en fonction de la fréquence présentent un intérêt tout particulier lorsqu'elles sont superposées aux variations de l'impédance totale enregistrées aux différentes

fréquences, car elles permettent d'attribuer sans ambiguïté les différents phénomènes de relaxation observés.

Cependant, les variations de la masse peuvent être superposées à celles de l'impédance seulement si la masse varie linéairement avec le potentiel, comme cela est le cas pour l'intensité\*. Les variations de la masse déterminées à différents potentiels au cours du dopage p, c'est-à-dire à différents taux de dopage, sont reportées sur la figure I-11.

\* Pour satisfaire aux relations de l'impédance électrochimique, le système doit être linéaire et indépendant du temps<sup>145</sup>. Dans cette condition de linéarité, la réponse  $I(t)$  est sinusoïdale et de même pulsation (de même forme analytique) que la contrainte appliquée  $E(t)$ , de telle sorte que la fonction de transfert (rapport entre la réponse et la contrainte) satisfasse la définition générale :  $H(\omega) = H_0 \exp(i\varphi)$ . Dans le cas présent, la loi de variation entre le courant faradique et le potentiel d'électrode n'est pas linéaire (Figure a)

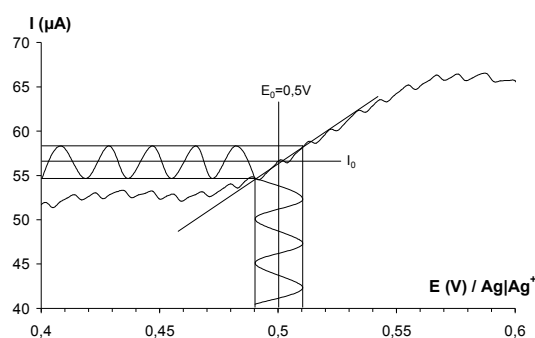


Figure a : Illustration de la condition de linéarité entre le courant et le potentiel dans le cas du dopage p du poly(M<sub>1</sub>)

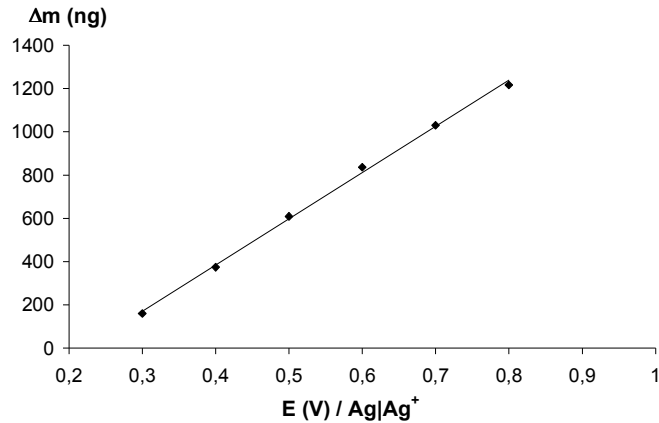
Pour se placer dans des conditions de linéarité, il faut appliquer une contrainte  $\Delta E(t)$  d'amplitude suffisamment faible pour que la courbe  $I=f(E)$  puisse être pratiquement confondue avec sa tangente au point d'abscisse  $E=E_0$ . C'est pour cette raison que lors de nos mesures d'impédance, l'amplitude de la composante alternative du potentiel appliqué a été fixée à 10mV.

L'impédance électronique est une grandeur physique qui correspond à une généralisation de la notion de résistance électronique étendue aux signaux alternatifs.

De même qu'il existe une relation, dite Loi d'Ohm, entre le courant, la tension et la résistance électronique, il existe une relation essentielle entre le courant et la tension sinusoïdale permettant d'établir l'expression analytique de l'impédance électronique :

$$Z(t) = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_0 + \Delta E \cos(\omega t + \varphi_E)}{I_0 + \Delta I \cos(\omega t + \varphi_I)}$$





**Figure I-11 : Variation de la masse avec le potentiel appliqué**

**Variation de la masse mesurée à différents potentiels sur un cristal de quartz platiné ( $\phi = 5\text{mm}$ ) recouvert d'un film de poly( $M_1$ ) et plongé dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$ .**

La figure I-11 montre que la masse augmente linéairement avec le potentiel imposé au cours du dopage p. Cette linéarité prouve que les conditions d'utilisation d'une fonction de transfert sont validées, ce qui permet d'établir que le signal de sortie en masse a la même forme analytique que le signal d'entrée en potentiel. Ceci signifie que les variations alternatives du potentiel imposé et de la masse ont la même fréquence de pulsation  $\omega$ . Dès lors, il est possible de superposer les variations de la masse à celles de l'impédance totale avec la fréquence.

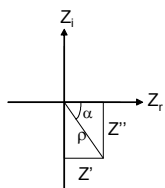
Par ailleurs cette linéarité prouve également que la matrice ne subit aucune dégradation anodique dans cette gamme de potentiels et que le système étudié ne varie pas en fonction du temps.

La figure I-12 montre un diagramme de Bode superposé aux variations de masse mesurées sur un intervalle de fréquence compris entre 0,1Hz et 2 Hz. La représentation de Bode montre les valeurs de l'impédance totale en coordonnées polaires\*. Dans cette représentation,  $\alpha$  représente le déphasage entre la perturbation alternative en potentiel et la réponse du système

\* Dans le plan complexe :

En coordonnées cartésiennes :  $Z_1 = Z' + iZ''$

En coordonnées polaires :  $Z_1 = \rho \cdot e^{i\alpha} = \rho(\cos\alpha + i \sin\alpha)$



étudié en sortie et correspond aux contributions relatives des parties imaginaire et réelle de

$$\text{l'impédance totale : } \alpha = \text{Arctan}\left(\frac{-Z''}{Z'}\right).$$

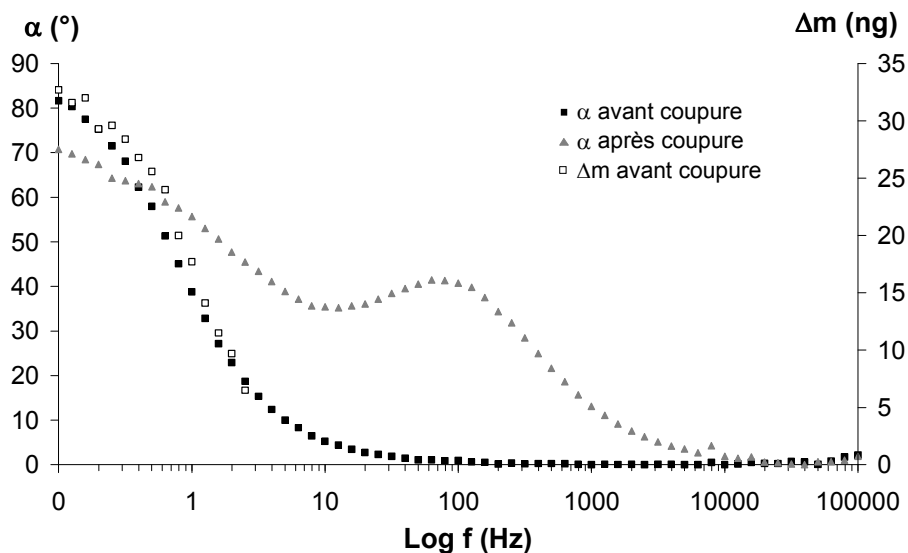


Figure I-12 : Diagramme de Bode

**Variations du déphasage (marqueurs pleins) et de la masse (marqueurs vides) enregistrés à +0,5V sur un cristal de quartz platiné recouvert d'un film de poly(M<sub>1</sub>) plongé dans CH<sub>3</sub>CN + 0,1M Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub>, avant (carrés) et après coupure cathodique (triangles) des liaisons S-N du polymère.**

Un maximum de la composante imaginaire à la contribution de l'impédance totale, correspondant à un maximum pour la valeur de  $\alpha$ , est compatible avec l'apparition d'un comportement capacitif. Ce phénomène de charge correspond pour les polymères conducteurs à l'entrée d'agents dopants consécutivement à la polarisation de la matrice dopée.

Au potentiel de +0,5V, le déphasage enregistré sur le polymère n'ayant pas subi de traitement cathodique (carrés pleins) présente un maximum à basse fréquence (0,1Hz), ce qui signifie que le phénomène de relaxation correspondant est lent. A ce potentiel, le film est dopé dans son volume et les anions migrent dans l'épaisseur du film pour assurer l'électroneutralité. Le phénomène de relaxation intervenant à 0,1Hz est attribué dans la littérature au dopage p dans l'épaisseur du film polymère, limité par l'entrée des anions dopants provenant du milieu électrolytique<sup>146</sup>.

La variation consécutive de la masse prouve qu'à ces potentiels, l'apparition d'une composante capacitive s'accompagne bien d'une entrée de matière. En effet les variations de la masse enregistrées (carrés vides) suivent la même allure que celle du déphasage mesuré. A 0,1Hz, un maximum pour la masse correspond au maximum du déphasage. Le phénomène de relaxation intervenant à cette fréquence peut donc bien être attribué à un dopage de la matrice dans son volume puisqu'il s'accompagne d'une prise de masse compatible avec l'insertion des  $\text{PF}_6^-$  dans le polymère.

Le polymère ayant subi une coupure cathodique présente un comportement différent. En effet, le maximum du déphasage observé à 0,1Hz a une intensité inférieure à celle mesurée avant coupure. Le processus de dopage dans le volume de la matrice polymère est donc gêné après traitement cathodique de la matrice. D'autre part un nouveau maximum du déphasage  $\alpha$  est localisé à des fréquences plus élevées (100Hz) après coupure. L'apparition de ce nouveau phénomène de relaxation plus rapide, déjà commenté dans la littérature<sup>146</sup>, est attribué à un processus de dopage rapide, probablement localisé à la surface du film et n'impliquant pas l'insertion des ions dans le volume du polymère.

Le suivi de la masse a également été enregistré simultanément à une mesure d'impédance à +0,5V sur le film de poly( $\text{M}_1$ ) après coupure électrochimique par voltamétrie cyclique (4 cycles récurrents entre 0V et -2,7V). Aucune prise de masse n'a été enregistrée durant ces mesures, en accord avec l'apparition d'une résistance au mouvement des agents dopants dans le volume du poly( $\text{M}_1$ ) après coupure électrochimique.

Le couplage de la microbalance à cristal de quartz avec la spectroscopie d'impédance électrochimique a permis de mettre en évidence deux contributions au dopage p :

- un dopage p dans le volume quand la matrice n'est pas dégradée (avant traitement cathodique),
- un dopage p superficiel, observé après la coupure, qui traduit une dégradation de la matrice dans son volume. Après traitement cathodique, le volume de la matrice est rendu imperméable aux anions de l'électrolyte et seule une région superficielle est concernée par le dopage.

L'étude du comportement cathodique du poly( $\text{M}_1$ ) a permis de mettre en évidence la coupure des liaisons S-N des fonctions sulfonamide du polymère. Toutefois, les propriétés de conduction de la matrice sont très nettement altérées après ce traitement cathodique. Pour

pouvoir interroger électrochimiquement la matrice et étudier les phénomènes intervenant à sa surface, il est nécessaire de préserver son électroactivité.

En effet, le bon contrôle de la coupure électrochimique des liaisons S-N du polymère est important car elle constitue une étape clé dans la préparation de nos supports. Les anions sulfinate obtenus sont facilement refunctionalisés en chlorure de sulfonyle par simple trempage du polymère dans une solution de N-chlorosuccinimide (NCS) à  $3,4 \cdot 10^{-2}$  M dans l'acétonitrile, à température ambiante pendant 15mn. La fonction chlorure de sulfonyle réagit très vite avec les amines primaires, dans des conditions très douces (trempage de la matrice pendant 15mn à température ambiante).

Le polymère ainsi modifié peut donc être refunctionalisé facilement. Grâce aux conditions très douces requises pour la réaction de couplage avec des amines, l'immobilisation d'espèces fragiles, notamment de matériel biologique est possible.

#### IV.4. Post-fonctionnalisation de la matrice poly(M<sub>1</sub>) par des amines primaires

Afin de valider l'immobilisation d'amine sur notre support, un dérivé ferrocènealkylamine (FcA), le 2-aminoéthylferrocenylméthyléther, utilisé comme sonde redox, a été greffé sur la matrice fonctionnalisée.

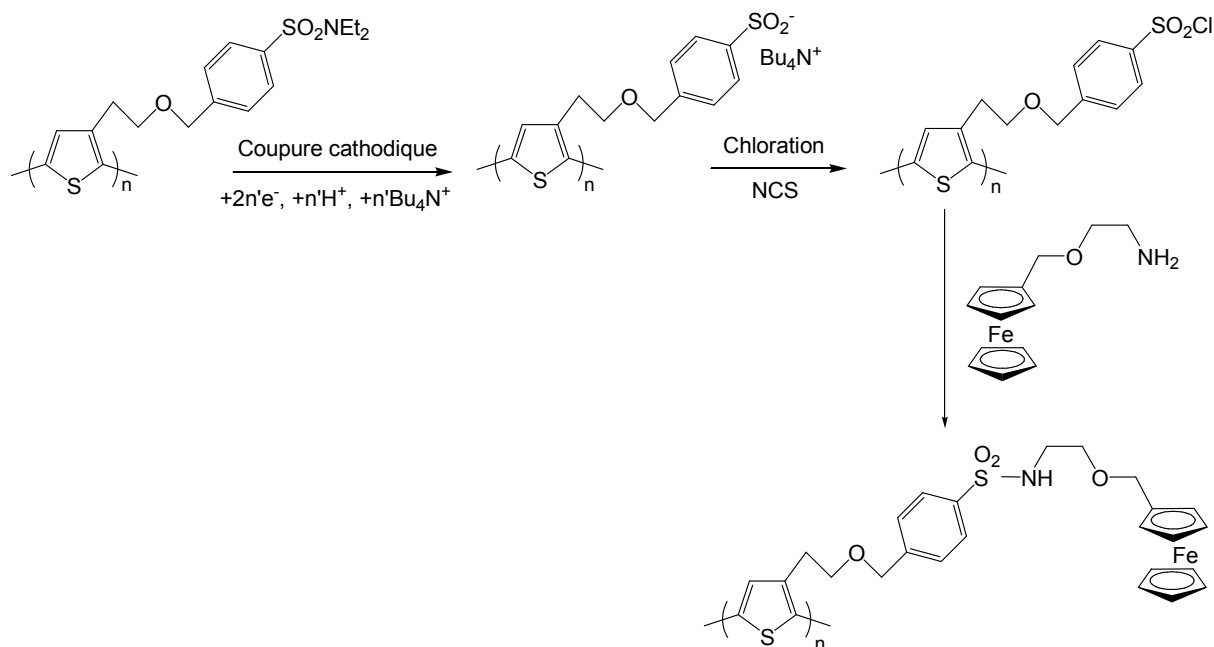
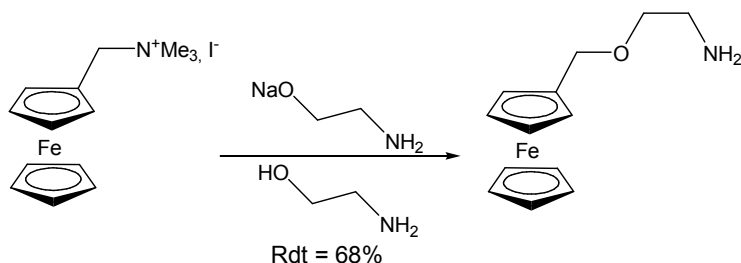


Schéma 4. : Post-fonctionnalisation de la matrice par une sonde électrochimique

La synthèse de cette sonde, déjà décrite par Hiller et col.<sup>147</sup>, est rapportée dans la partie expérimentale. Ce motif est préparé par substitution nucléophile de l'ammonium du iodure de

(ferrocenylméthyl)triméthylammonium par l'éthanolamine en milieu basique et est obtenu avec un rendement de 68%.

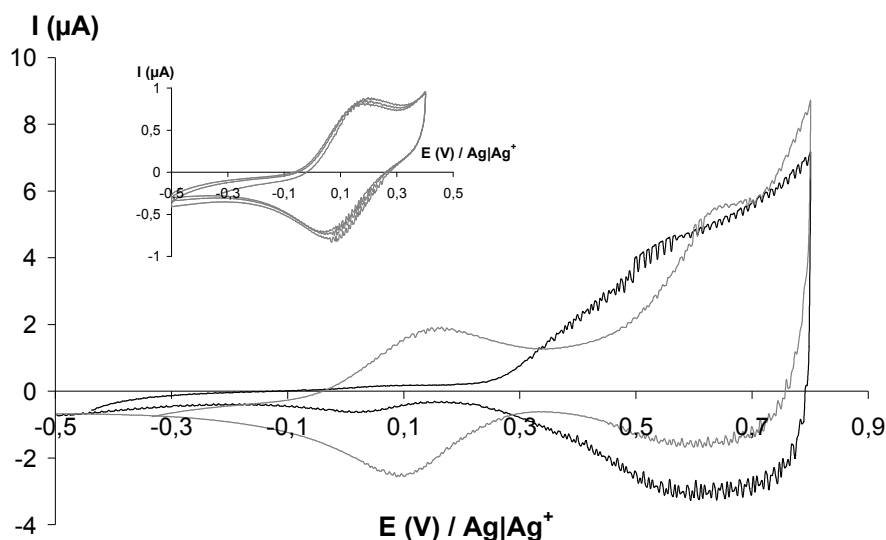


**Schéma 5. : Synthèse de la sonde électrochimique : le 2-aminoéthylferrocenylméthyléther**

Afin de valider l'accrochage de la sonde redox, des mesures ont été effectuées par voltamétrie cyclique et microbalance à cristal de quartz sur un film de poly( $M_1$ ) modifié avec la sonde FcA.

Une électrode de travail consistant en un quartz platiné de 5mm de diamètre recouvert d'un dépôt de poly( $M_1$ ) est réduite (4 balayages des potentiels entre -0,5V et -2,55V à  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Les anions sulfinate du film conduisent aux fonctions chlorure de sulfonyle après 15 mn de trempage dans une solution d'acétonitrile contenant le NCS à  $3,4\cdot 10^{-2} \text{ M}$ . Le film modifié est ensuite plongé dans une solution d'acétonitrile contenant la FcA à 0,1M pendant 15mn.

Ce film est rincé dans l'acétonitrile sous agitation pendant 5mn, puis étudié dans une solution électrolytique par voltamétrie cyclique à une vitesse de balayage des potentiels de  $10\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  (Figure I-13).



**Figure I- 13 : Voltamétrie cyclique**

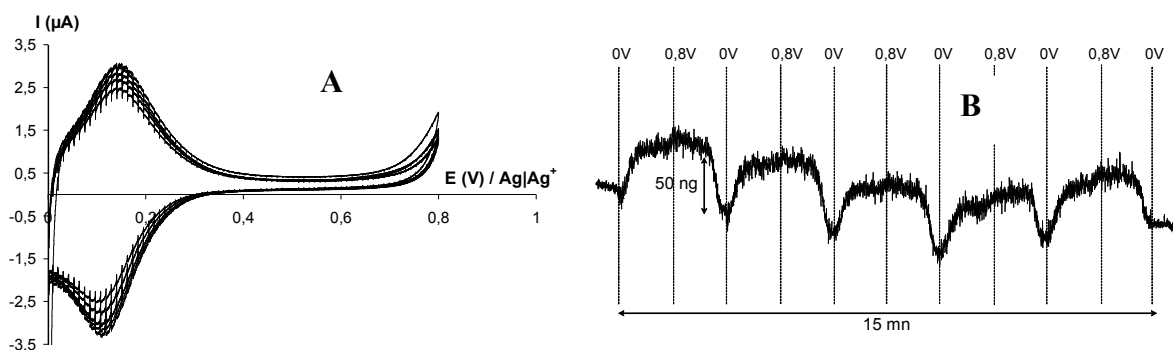
Voltammogrammes cycliques enregistrés sur un cristal de quartz platiné ( $\phi=5\text{mm}$ ) recouvert d'un film de poly( $M_1$ ) ( $Q_s=29,2\text{mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ ,  $\Delta m=12,4\mu\text{g}$ ) et plongé dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  avant (courbe noire) et après immobilisation d'une sonde redox (courbe grise).

**Insert :** voltammogrammes cycliques enregistrés à  $10\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  de  $-0,5\text{V}$  à  $+0,4\text{V}$ .

La figure I-13 montre la superposition de deux voltammogrammes enregistrés avant (courbes noires) et après (courbes grises) immobilisation covalente de la sonde redox. Après trempage dans une solution contenant FcA, un signal réversible correspondant à l'oxydation et à la réduction des unités ferrocène immobilisées est observé vers  $+0,15\text{V}$  par rapport à  $\text{Ag}|\text{Ag}^+$ .

Sur le voltammogramme représenté dans l'insert de la figure I-13, la différence de potentiel de pic à pic,  $\Delta E$ , est de  $50\text{mV}$ . Pour une espèce électroactive immobilisée à la surface d'un substrat conducteur, la valeur attendue est nulle, contrairement au cas d'une espèce électroactive libre en solution, pour laquelle cet écart en potentiel est de  $60\text{mV}$  pour un transfert monoélectronique régit par la loi de Nernst. La valeur intermédiaire obtenue dans le cas de la sonde redox greffée à la surface de la matrice poly( $M_1$ ) est compatible avec une diffusion restreinte de l'espèce immobilisée induite par la flexibilité de la chaîne carbonée<sup>147</sup>. Un tel comportement a été rapporté dans la littérature pour différentes matrices modifiées par des sondes redox et il a été établi que l'écart en potentiel,  $\Delta E$ , augmente avec la longueur de la chaîne carbonée incluse entre le groupe électroactif et la chaîne principale du polymère, sans toutefois excéder  $60\text{mV}$  pour un transfert monoélectronique réversible<sup>148,149</sup>.

Lorsque l'électrode de travail consiste en un cristal de quartz platiné, il est possible de quantifier le nombre de moles d'unités ferrocène immobilisées (Figures I-14).



**Figure I-14 : Voltamétrie cyclique et variation consécutive de la masse**

**A :** 5 voltammogrammes cycliques enregistrés sur un cristal de quartz platiné ( $\phi=5\text{mm}$ ) recouvert d'un film poly( $M_1$ ) ( $Q_s=8,5\text{mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) modifié par une sonde électrochimique. Le film de polymère est plongé dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  (vitesse de balayage,  $10\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

**B :** variation de la masse enregistrée simultanément aux voltammogrammes cycliques.

La figure I-14B montre les variations de la masse enregistrées consécutivement aux voltammogrammes cycliques présentés à la figure I-14A et correspondant au signal des unités ferrocènes immobilisées.

La charge intégrée à partir du signal électrique du ferrocène entre 0V et 0,3V est de  $7\cdot 10^{-3}\text{mC}\cdot\text{cm}^{-2}$  contre  $8,5\text{mC}\cdot\text{cm}^{-2}$  pour la charge consommée lors de la formation du film poly( $M_1$ ) à l'état neutre. Dans le cas des polymères conducteurs modifiés par un groupement électroactif, l'oxydation de la sonde redox et de la matrice peuvent être couplées<sup>150,151</sup>. Un transfert électronique concerté impliquant à la fois le polymère conducteur et le groupe ferrocène peut être envisagé, ce qui complique la détermination de la réponse électrochimique du groupement ferrocène. Cependant, comparée à la charge consommée lors de la formation du film, la faible charge anodique intégrée entre 0V et 0,3V semble indiquer que l'immobilisation de l'espèce électroactive ne concerne que la surface du film.

Au cours du balayage aller du potentiel, la masse augmente et atteint un pallier dès 0,2V (Figure I-14B). Au-delà, la masse ne varie plus et au balayage retour, une perte de masse est observée à partir de 0,3V, correspondant exactement à la masse prise au balayage aller. Ces variations de la masse observées au cours de l'oxydation et de la réduction des unités ferrocènes correspondent aux anions  $\text{PF}_6^-$  associés aux radicaux cations ferricinium.

Il est donc possible à partir des courbes obtenues en voltamétrie cyclique et avec la microbalance, de déterminer le nombre de moles d'unités ferrocène accrochées à la surface du film.

La charge intégrée à partir du signal électrique correspondant au ferrocène permet d'estimer le nombre de moles de sonde immobilisée à la surface de la matrice. De cette façon, il apparaît que  $5,4 \cdot 10^{-10}$  moles d'unités ferrocène sont immobilisées, comparées aux  $9,7 \cdot 10^{-9}$  moles de monomères  $M_1$  contenus dans le film de poly( $M_1$ ).

La prise de masse enregistrée consécutivement à l'oxydation des unités ferrocène immobilisées permet également d'avoir accès au nombre de moles d'anions  $PF_6^-$  associés aux radicaux cations ferricinium et par conséquent de déterminer le nombre de moles d'unités ferrocène immobilisées. Une augmentation de masse de 50ng est observée à chaque cycle du potentiel. En attribuant cette augmentation de la masse à une entrée d'anions  $PF_6^-$  et en considérant que chaque anion vient compenser la charge positive d'un radical ferricinium, le nombre de moles d'unité ferrocène sonde a été estimé à  $3,6 \cdot 10^{-10}$  moles.

Le nombre de moles d'unité ferrocène immobilisées déterminé par la voltamétrie cyclique et par la microbalance sont relativement proches. La faible proportion d'unités ferrocène immobilisées par rapport à la quantité totale de motifs monomères, montre que le greffage n'intéresse que la surface du polymère.





## *Chapitre 2*



## Chapitre 2 :

# Elaboration de supports de type polythiophène autorisant la lecture électronique de l'hybridation

Les polymères conducteurs sont d'excellents candidats pour l'élaboration de biocapteurs car ils constituent des supports actifs dans la transduction du signal<sup>26,152-155</sup>. En effet, grâce à l'échange ionique à l'interface film|solution, consécutif aux phénomènes de dopage, les polymères conducteurs sont sensibles aux événements qui entraînent une modification des propriétés de l'interface.

Le travail entrepris consiste à immobiliser des séquences d'ADN à la surface de films polymères conducteurs synthétisés à partir du motif M<sub>1</sub> et de diagnostiquer l'hybridation en étudiant les modifications des propriétés de conduction de la matrice.

Le schéma 6 montre la disposition en série des différents éléments nécessaires à la traduction d'un événement biologique en un signal physique mesurable.

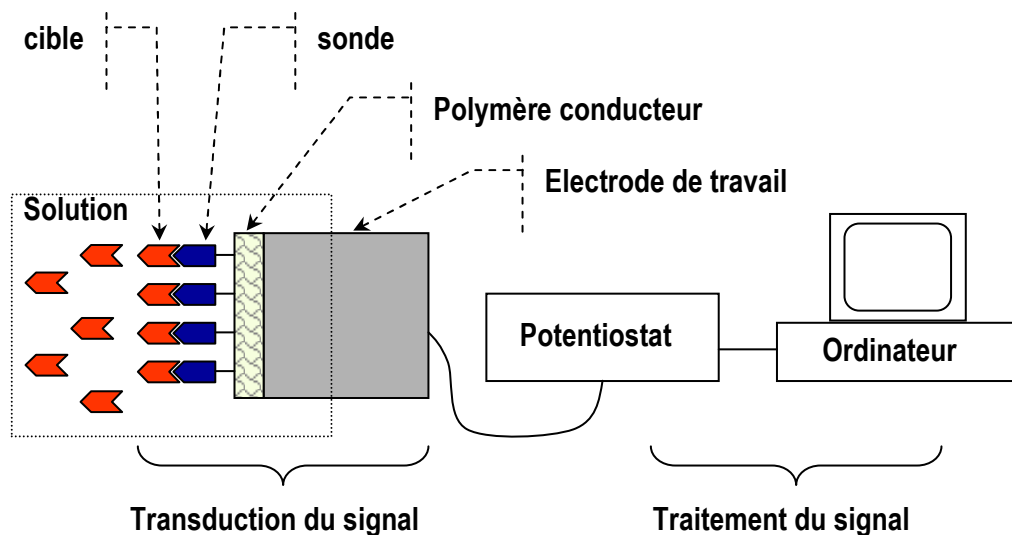
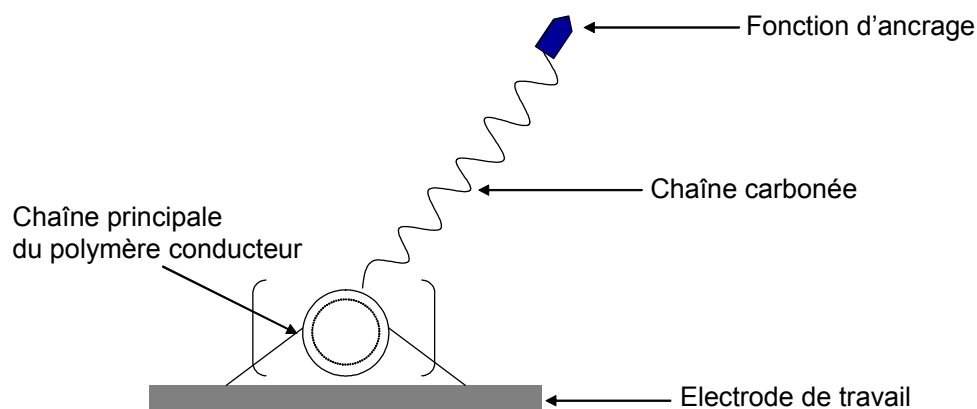


Schéma 6. : Principe de fonctionnement des biocapteurs électrochimiques

L'électrode de travail recouverte du polymère conducteur fonctionnalisé par les brins d'ADN sondes est plongée dans une solution contenant les brins d'ADN cibles complémentaires. La reconnaissance spécifique entre les sondes immobilisées à la surface du polymère et l'analyte cible en solution induit un changement du signal électrochimique traduit en données numériques par l'ordinateur.

Pour permettre la transduction d'évènements biologiques, les motifs de base constituant les chaînes de polymères doivent contenir une unité aromatique polymérisable prolongée par une chaîne carbonée terminée par une fonction d'ancrage (Schéma 7).



**Schéma 7. : Electrode recouverte d'un dépôt polymère conducteur**

L'immobilisation de matériel biologique fragile requiert l'emploi d'une fonction d'ancrage capable de réagir dans des conditions très douces avec le motif sonde.

Comme les propriétés de conduction du support participent à la transduction du signal, la matrice doit également présenter une bonne électroactivité en milieu physiologique. Aussi, pour améliorer le mouillage des chaînes en milieu aqueux, des hétéroatomes sont parfois introduits le long de la chaîne carbonée. Par ailleurs, la structure de la chaîne carbonée conditionne les propriétés physicochimiques de la matrice et de nombreux travaux dans la littérature mentionnent le comportement de motifs spécifiques permettant tour à tour d'améliorer l'accessibilité des fonctions d'ancrage, d'exalter la communication électronique entre le groupe actif terminal et la chaîne principale du polymère<sup>156-158</sup>, d'établir un contact électronique interchaîne<sup>159</sup> ou d'optimiser l'arrangement des chaînes polymères entre elles<sup>160</sup>. Dans le cadre de ce travail, différentes matrices conductrices ont été testées pour le diagnostic électrochimique de l'hybridation et le comportement de chacune d'elle est corrélé au motif moléculaire correspondant.

## **I. Préparation et étude des supports polymères conducteurs**

Dans la première partie du travail, les supports utilisés pour l'immobilisation de l'ADN sont des copolymères formés par oxydation d'une solution contenant le monomère  $M_1$  et le 3-méthylthiophène (MT). Cette copolymérisation permet de diluer les fonctions d'ancrage chlorure de sulfonyle et améliore leur accessibilité vis-à-vis des brins d'ADN. En effet, la proximité des brins d'ADN sondes immobilisés à la surface de la matrice occasionnerait un encombrement stérique important et gênerait l'hybridation avec les brins d'ADN cibles. Dans la littérature, les copolymères sont obtenus par oxydation de solutions contenant le monomère fonctionnel et un motif polymérisable dans un rapport molaire compris entre 1/500 et 1/20000 selon la taille des séquences d'ADN et la sensibilité du dispositif employé<sup>102,161,162</sup>. Le plus souvent, un faible pourcentage en monomère fonctionnel est introduit en solution. Dans notre cas, un rapport molaire  $M_1/MT$  égal à 1/500 a été choisi pour l'élaboration des films copolymères. Cette dilution nous a semblé suffisante pour minimiser la gêne stérique entre les brins d'ADN immobilisés, tout en restant compatible avec la sensibilité de la microbalance à cristal de quartz. En effet, pour rester dans le domaine d'investigation de la microbalance, les variations de masse enregistrées doivent être comprises entre quelques dizaines de nanogrammes et quelques microgrammes. La sensibilité du dispositif donnée par le constructeur est de 5Hz et des prises de masse supérieures à 20 $\mu$ g pourraient conduire à la formation de régions distinctes caractérisées par des fréquences de résonance propres n'autorisant plus l'emploi de la relation de Sauerbrey.

### **I.1. Formation du copolymère**

Le copolymère poly( $M_1$ -co-MT) est synthétisé par électrooxydation d'un mélange des monomères  $M_1$  ( $C=0,04$ mM) et MT ( $C=20$ mM) en proportions molaires 1/500 dans l'acétonitrile avec  $Bu_4NPF_6$  à 0,1M comme électrolyte support. Le film est formé sous atmosphère d'argon au cours de balayages du potentiel à 100mV.s<sup>-1</sup> de -0,1V à +1,4V par rapport à Ag|Ag<sup>+</sup> (Figure I-15).

Les potentiels d'oxydation du MT et du monomère  $M_1$  sont  $E_{ox} = +1,45$ V et  $E_{ox} = +1,53$ V respectivement. Le faible écart de potentiel entre ces valeurs ( $\Delta E=80$ mV) suggère que la composition du copolymère doit être proche de celle du mélange de ses constituants en solution.

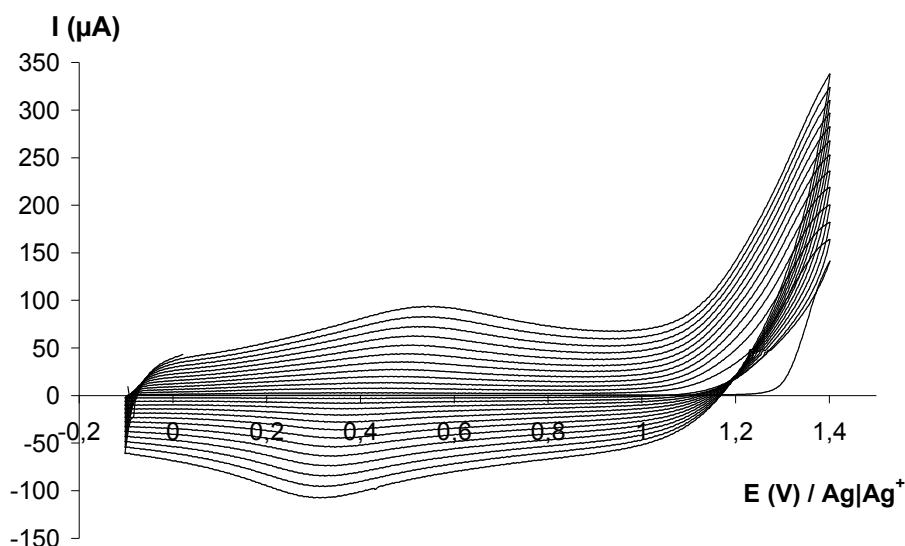


Figure I-15 : Voltamétrie cyclique

13 voltammogrammes cycliques successifs enregistrés sur une électrode de Pt ( $\phi=1\text{mm}$ ) plongée dans un mélange de  $M_1$  et de MT (MT, 20mM) avec un rapport molaire de 1/500 dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  (vitesse de balayage,  $100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ). La charge de synthèse mesurée à l'état neutre est de  $0,87\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

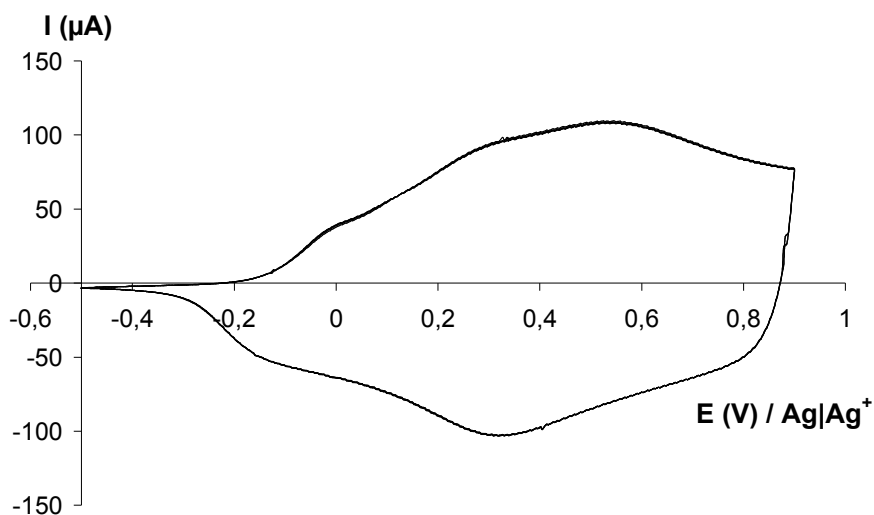
Les voltammogrammes cycliques enregistrés lors de la formation du copolymère poly( $M_1$ -co-MT) à la surface d'une électrode millimétrique de platine sont représentés sur la figure I-15. Au cours du premier balayage du potentiel, l'augmentation d'un courant d'oxydation, correspondant à l'oxydation des monomères en solution, est observé à partir de +1,1V. Dès le second balayage aller, un nouveau système réversible localisé à des potentiels inférieurs à celui de l'oxydation de la solution est observé, en accord avec l'oxydation des chaînes de polymères à la surface de l'électrode. La formation d'un film électroactif qui croît à la surface de l'électrode est mise en évidence lors des balayages suivants, par une augmentation de l'intensité de ce nouveau système attribuable au dopage p.

### I.2. Etude électrochimique du copolymère

L'électroactivité du copolymère précédemment formé est étudiée en milieu organique dans une solution électrolytique ne contenant pas le monomère (acétonitrile et  $\text{Bu}_4\text{NPF}_6$  à 0,1M), sous atmosphère d'argon, après rinçage de l'électrode dans l'acétonitrile.

### I.2.1 Comportement anodique

La figure I-16 montre la superposition de voltammogrammes cycliques enregistrés entre -0,5V et +0,9V durant le processus de dopage p du poly(M<sub>1</sub>-co-MT) formé à la figure I-15.



**Figure I- 16 : Voltamétrie cyclique**

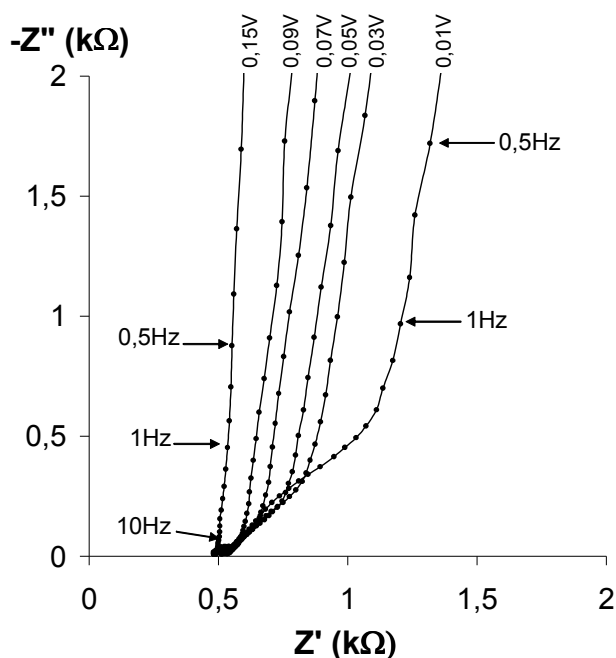
**4 voltammogrammes cycliques enregistrés sur une électrode de Pt ( $\phi=1\text{mm}$ ) recouverte du film poly(M<sub>1</sub>-co-MT) précédemment obtenu. Le film de polymère est plongé dans CH<sub>3</sub>CN + 0,1M Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub> (vitesse de balayage, 100 mV.s<sup>-1</sup>). La charge Q<sub>p</sub> intégrée au cours d'un balayage aller des potentiels est de 0,10C.cm<sup>-2</sup>.**

L'intensité du courant reste stable au cours de quatre balayages successifs du potentiel, en accord avec une bonne stabilité du polymère dans la gamme de potentiel étudiée.

En considérant que le rendement de synthèse du poly(M<sub>1</sub>-co-MT) est de 100%, le taux de dopage p,  $\delta_p$ , calculé à partir de la charge de synthèse Q<sub>s</sub> obtenue lors de la formation du film à l'état neutre, égale à 0,87C.cm<sup>-2</sup>, et de la charge Q<sub>p</sub> intégrée entre -0,5V et +0,9V, est de 0,2. Cette valeur de  $\delta_p$  est voisine de celle obtenue pour le poly(M<sub>1</sub>) et reste proche des valeurs obtenues dans la littérature pour des matrices de ce type<sup>133</sup>.

Des mesures par spectroscopie d'impédance ont été effectuées à différents potentiels situés au début du processus de dopage p du film de poly(M<sub>1</sub>-co-MT), entre +0,01V et 0,15V. Les variations de l'impédance totale du système sont reportées dans le plan complexe sur la figure I-17.





**Figure I-17: Variations de l'impédance totale dans le plan complexe**

**Diagrammes de Nyquist enregistrés à différents potentiels sur une électrode de Pt ( $\phi = 1\text{mm}$ ) recouverte d'un film de poly( $M_1$ -co-MT) plongée dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$ .**

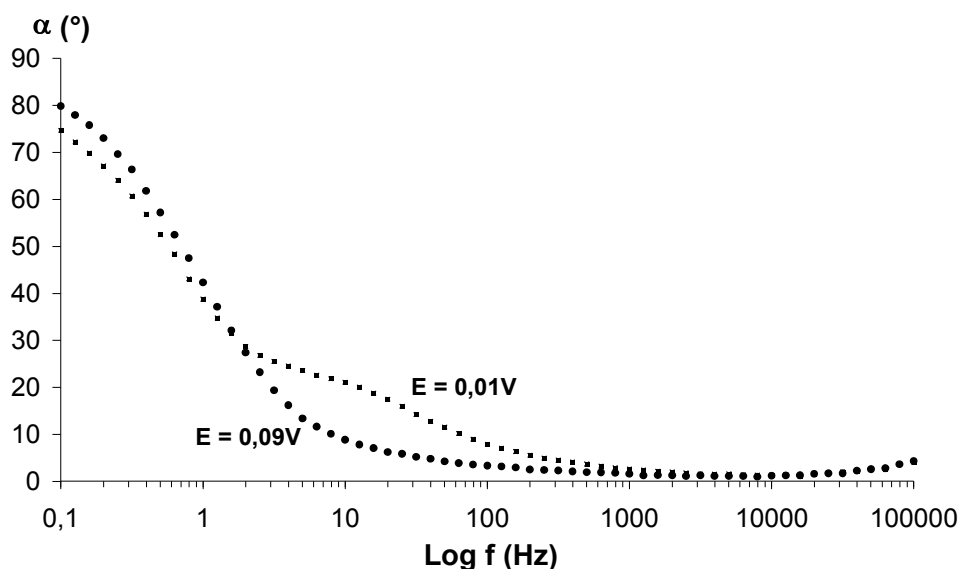
Sur les courbes d'impédance électrochimique, deux domaines peuvent être distingués : un domaine à hautes fréquences qui se présente sous la forme d'une droite de coefficient directeur 1 et un domaine à plus basses fréquences qui se présente sous la forme d'une droite presque verticale.

Selon le modèle décrit par Bisquert et Garcia-Belmonte<sup>138</sup>, la droite de pente 1 à hautes fréquences est compatible avec une impédance de Warburg et correspond à la migration des ions à l'intérieur de la phase polymère. La droite verticale aux basses fréquences est attribuable à un comportement capacitif correspondant à la charge accumulée dans le volume du polymère conducteur polarisé.

Cette allure générale de la variation de l'impédance montre que le poly( $M_1$ -co-MT) conserve la porosité déjà mise en évidence lors de l'étude du poly( $M_1$ ).

Il est à noter que les films de poly(MT) obtenus dans ces conditions ne montrent aucune porosité et se comporte comme des films polymères compacts. Il est remarquable de constater que l'introduction en solution d'une faible quantité de monomère  $M_1$  conditionne la structure de la matrice.

La figure I-18 montre la superposition des valeurs de l'angle de phase  $\alpha$  pour les mesures de l'impédance totale obtenues à 0,01V (pour un taux de dopage faible) et à 0,09V (pour un taux de dopage plus élevé).



**Figure I-18: Diagramme de Bode**

**Variations du déphasage enregistrés à +0,01V (carrés) et à +0,09V (cercles) sur une électrode de Pt ( $\phi=1\text{mm}$ ) recouverte d'un film de poly( $M_1$ -co-MT) plongé dans une solution de  $\text{Bu}_4\text{NPF}_6$  0,1M dans  $\text{CH}_3\text{CN}$ .**

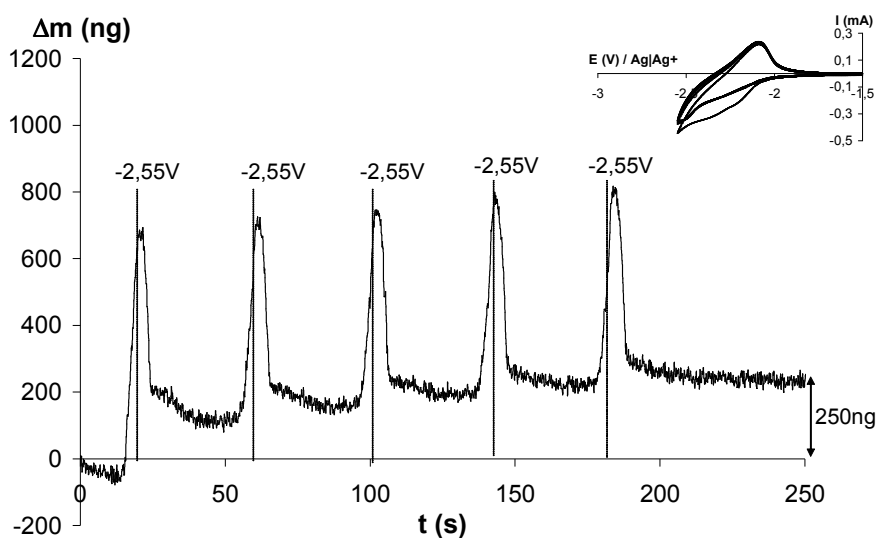
Deux processus de relaxation sont visibles, correspondant à deux contributions différentes au processus de dopage p. Lorsque la mesure de l'impédance est réalisée à  $E=+0,09\text{V}$ , seulement un maximum de l'angle de phase correspondant à un phénomène de relaxation lent, est observable à basse fréquence. Ce processus coïncide avec le dopage p dans l'épaisseur du copolymère, limité par l'échange ionique à l'interface copolymère/électrolyte. Sur la courbe enregistrée à  $E=+0,01\text{V}$  (pour un faible taux de dopage p), un processus de relaxation plus rapide apparaît autour de  $10\text{Hz}$  et est attribuable à un processus de dopage superficiel à l'interface copolymère/solution en accord avec la littérature<sup>146</sup>.

### I.2.2 Comportement cathodique

Les voltammogrammes enregistrés en réduction sur le poly( $M_1$ -co-MT) sont semblables à ceux enregistrés aux mêmes potentiels sur le poly(MT). En effet, l'unité  $M_1$  est présente en trop faible quantité dans le copolymère (1 motif  $M_1$  pour 500 motifs MT en moyenne) pour

que la coupure des liaisons S-N puisse être appréciable sur les voltammogrammes. En revanche, lorsque l'électrode de travail consiste en un cristal de quartz platiné, les variations de la masse sont caractéristiques d'une réduction des fonctions sulfonamide.

Un quartz de platine recouvert d'un dépôt de poly(M<sub>1</sub>-co-MT) de 10900 ng ( $Q_s=302,9\text{mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) est obtenu par oxydation d'une solution d'acétonitrile contenant M<sub>1</sub> et MT dans un rapport molaire 1/500 ([MT]=20mM) au cours de cyclages des potentiels de -0,1V à +1,4V à 100 mV.s<sup>-1</sup>. Après rinçage dans l'acétonitrile, le film est soumis à cinq cycles de potentiel de -0,5V à -2,55V dans une solution électrolytique d'acétonitrile + Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub> 0,1M (insert de la figure I-19). Les variations de la masse enregistrées à partir des variations de fréquence mesurées à l'aide d'un analyseur de fréquence sont représentées à la figure I-19.



**Figure I-19 : Voltamétrie cyclique et variation consécutive de la masse**

Variation de la masse enregistrée simultanément aux voltammogrammes cycliques représentés en insert.

**Insert :** 5 voltammogrammes cycliques enregistrés sur un cristal de quartz platiné ( $\phi=5\text{mm}$ ) recouvert d'un film poly(M<sub>1</sub>-co-MT) de masse 10,9 $\mu\text{g}$ . Le film de polymère est plongé dans CH<sub>3</sub>CN + 0,1M Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub> (vitesse de balayage, 100 mV.s<sup>-1</sup>).

Une prise de masse de 250ng est observable à l'issue des cinq cycles de potentiel. Cette augmentation de la masse est compatible avec le départ des amines terminales (NEt<sub>2</sub>) et l'entrée des cations Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup> plus lourds associés aux anions sulfinate.

## **II. Fonctionnalisation des supports par de l'ADN**

Après formation du copolymère, clivage cathodique et chloration des anions sulfinate en fonctions chlorure de sulfonyle, la matrice ainsi obtenue peut être utilisée comme support pour l'immobilisation de séquences ODN sondes terminées en extrémité 5' par une fonction amine primaire. Les différentes expériences réalisées sur ces substrats ont consisté à hybrider un ODN sonde de 42 bases immobilisé à la surface du film conducteur avec des brins d'ADN cibles complémentaires en solution de 37 bases.

### **II.1. Immobilisation des brins d'ADN sondes**

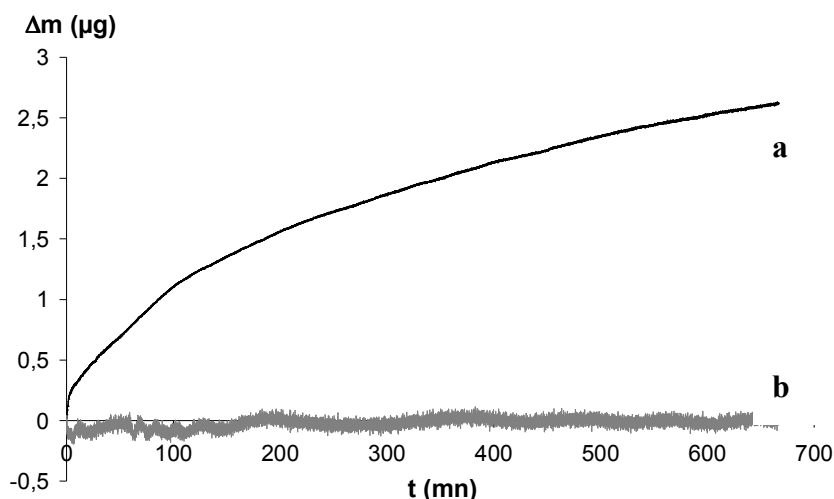
Afin d'activer les fonctions d'ancrage sulfonamide du poly(M<sub>1</sub>-co-MT) de départ en chlorure de sulfonyle, le film est soumis à cinq balayages de potentiel entre -0,5V et -2,55V, puis plongé pendant 15mn à température ambiante dans une solution d'acétonitrile contenant du NCS à  $3,4 \cdot 10^{-2}M$ .

La séquence sonde utilisée est un ODN synthétique monocaténaire de 42 bases modifié en son extrémité 5' par une fonction amine primaire, qui possède la séquence suivante : NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-(5')  
TT GTA AAA TAC CCG AAT TGC AGA ACT TTC TGA CCG CCC CTC G (3')

Le suivi gravimétrique à l'aide de la microbalance à cristal de quartz et la mesure de l'impédance électrochimique ont permis d'analyser le greffage de l'ADN sur les substrats conducteurs. Les mesures gravimétriques ont été effectuées sur des résonateurs à cristal de quartz platinés AT-cut 9MHz connectés à un analyseur de fréquence.

L'étape d'immobilisation est réalisée dans une cellule en téflon d'une capacité maximale de 700 $\mu$ L connectée à la microbalance, et consiste à mettre le film de copolymère activé (modifié par des groupes chlorure de sulfonyle) en contact avec 700 $\mu$ L d'une solution TE/NaCl 0,6M (solution de Tris-EDTA contenant 10mM de Tris-HCl et 1mM d'EDTA, pH=7,6) contenant la séquence sonde à  $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pendant une nuit, à température ambiante, sans agitation. Il est à noter que la position du quartz, placé au fond de la cellule, n'autorise pas une agitation magnétique.

Le suivi de la fréquence au cours de l'étape d'immobilisation de la séquence sonde conduit à la variation de masse montrée à la figure I-20.



**Figure I-20 : Variation de la masse lors de l'étape d'immobilisation des brins sondes**

**Variations de la masse enregistrées sur un cristal de quartz platiné ( $\phi = 5\text{mm}$ ) recouvert d'un film de poly( $M_1$ -co-MT) plongé dans une solution tampon TE/NaCl 0,6M contenant  $1\mu\text{mol.L}^{-1}$  de la séquence sonde.**

**(a) Cas du copolymère terminé par les fonctions d'ancrage  $\text{SO}_2\text{Cl}$ .**

**(b) Cas du copolymère de départ terminé par les fonctions  $\text{SO}_2\text{NEt}_2$ .**

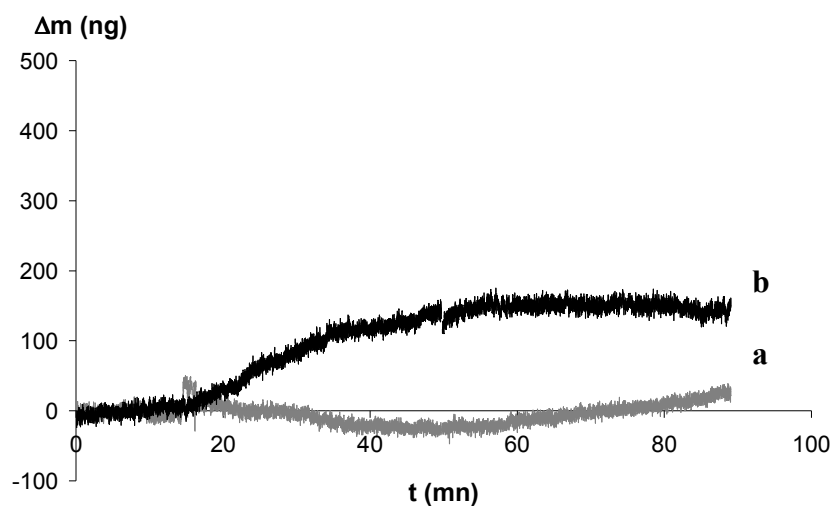
Lorsque le film copolymère, en contact avec les brins d'ADN sondes, est modifié par des fonctions terminales  $\text{SO}_2\text{Cl}$ , une prise de masse d'environ  $2,5\mu\text{g}$  est enregistrée (Figure I-20a). Une expérience témoin a été réalisée au préalable dans les mêmes conditions sur le film non traité, c'est-à-dire possédant toujours les fonctions sulfonamide de départ et a consisté à mettre le film en contact avec une solution tampon TE/NaCl contenant la séquence sonde (Figure I-20b). Aucune prise de masse n'a été enregistrée au cours de cette expérience témoin, en accord avec l'absence d'adsorption non spécifique de l'ADN à la surface du copolymère.

## **II.2. Hybridation avec les brins d'ADN cibles**

La séquence ADN cible totalement complémentaire avec les brins d'ADN sondes immobilisés possède la séquence (5') C GAG GGG CGG TCA GAA AGT TCT GCA ATT CGG GTA TTT (3'). Une séquence ADN cible totalement non complémentaire ((5') A TCT TTT ATT GAC TCC CTG GAG TAC CGG ATT TGC GGG (3')) a été utilisée comme témoin.

Après immobilisation des brins sondes, le copolymère est rincé 1h dans de l'eau ultrapure à 50°C sous agitation magnétique afin d'éliminer les séquences d'ADN n'ayant pas réagi. Ensuite, l'étape d'hybridation est réalisée dans la même cellule en téflon que celle utilisée pour l'étape d'immobilisation. L'hybridation consiste à incuber le copolymère modifié par les brins sondes dans 700 $\mu$ L d'une solution tampon phosphate NaCl 0,5M (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M, pH 7,4), contenant la séquence cible à 2 $\mu$ mol.L<sup>-1</sup> pendant 4h, à 35°C, sans agitation (procédure décrite dans la partie expérimentale).

Dans le but de valider l'étape d'hybridation, des mesures ont été effectuées par microbalance à cristal de quartz (Figure I-21).



**Figure I-21 : Variation de la masse lors de l'étape d'hybridation avec les brins cibles**

Variations de la masse enregistrées sur un cristal de quartz platiné ( $\phi = 5$ mm) recouvert d'un film de poly(M<sub>1</sub>-co-MT) modifié par des brins sondes plongé dans une solution tampon phosphate NaCl 0,5M contenant : (a) la séquence cible non complémentaire et (b) la séquence complémentaire.

Tout d'abord, le copolymère fonctionnalisé par les brins sondes est immergé dans une solution tampon phosphate NaCl 0,5M contenant le brin totalement non complémentaire (Figure I-21a). Après rinçage, le même film est ensuite immergé dans les mêmes conditions dans la solution tampon contenant cette fois la séquence cible complémentaire (Figure I-21b). Au cours de l'expérience témoin, en présence de séquences cibles non complémentaires, aucune variation de masse n'est enregistrée, en accord avec la spécificité du phénomène d'hybridation. En présence des brins cibles complémentaires, la prise de masse enregistrée

correspond à la formation des doubles hélices. Cependant, comme 2500ng de séquences sondes ont été immobilisées, la prise de masse de 150ng observée lors de l'hybridation est inférieure à celle normalement attendue pour une hybridation totale avec les sondes. En effet

le rapport  $\frac{m_{\text{hybridation}}}{m_{\text{immobilisation}}}$ , égal à 0,06, est très inférieur au rapport  $\frac{M_{\text{cible}}}{M_{\text{sonde}}}$ , égal à 0,90 ( $M_{\text{cible}}=12113\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  et  $M_{\text{sonde}}=13507\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

Cet écart avec la valeur attendue peut s'expliquer par la gêne stérique occasionnée par les séquences sondes immobilisées.

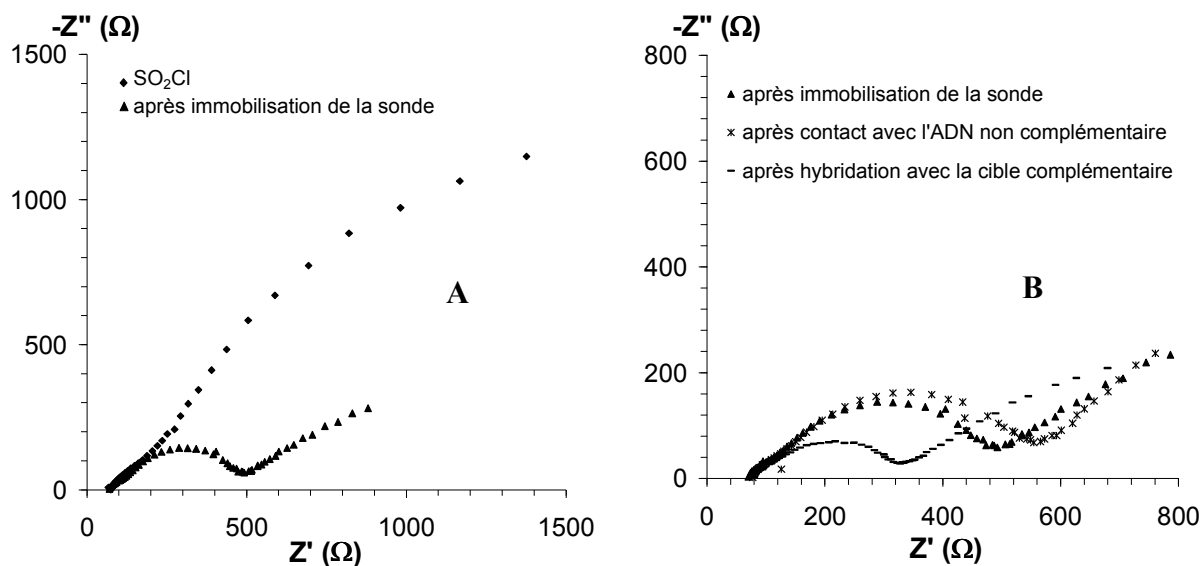
Par ailleurs, les étapes d'immobilisation d'ADN et d'hybridation avec les analytes cibles complémentaires en solution ont été suivies par impédance électrochimique.

### **III. Diagnostic de l'hybridation**

Les mesures de spectroscopie d'impédance électrochimique ont été effectuées dans une cellule en téflon contenant 12mL de solution tampon TE/NaCl 0,6M, lorsque l'électrode de travail consiste en un quartz platiné modifié et dans une cellule trois doigts contenant 10 mL de solution tampon TE/NaCl 0,6M, lorsque l'électrode de travail est une électrode millimétrique de platine modifiée.

Des mesures d'impédance électrochimique ont été réalisées à chaque étape de modification du film de copolymère. L'impédance totale a été mesurée à différents potentiels compris entre +0,2V et +1,2V de 0,1Hz à 100kHz. Seules les courbes d'impédance enregistrées à +1,1V par rapport à l'ECS sont reportées car c'est à ce potentiel que les différences de comportement les plus importantes sont observées entre chaque étape de fonctionnalisation des supports.

La figure I-22A montre les variations de l'impédance totale avant et après immobilisation des brins d'ADN sondes à la surface du support conducteur. La figure I-22B montre les variations de l'impédance totale avant et après hybridation avec les brins d'ADN cibles en solution.



**Figure I-22 : Variations de l'impédance totale dans le plan complexe**

Diagrammes de Nyquist enregistrés à +1,1V par rapport à l'ECS de 100kHz à 0,1Hz avec une amplitude de 10 mV sur un cristal de quartz platiné ( $\phi = 5\text{mm}$ ) recouvert d'un film de poly(M<sub>1</sub>-co-MT) modifié. Le copolymère est plongé dans une solution tampon TE/NaCl 0,6M après activation des fonctions d'ancrage en SO<sub>2</sub>Cl (losanges), immobilisation des sondes (triangles), trempage dans une solution contenant la séquence non complémentaire (astérisques) puis hybridation avec les séquences cibles complémentaires de 37 bases (tirets).

Il apparaît que les propriétés conductrices du film changent fondamentalement après greffage d'ADN. En effet, l'immobilisation des sondes à la surface de la matrice induit une modification importante de la courbe d'impédance.

Après l'étape d'immobilisation de la sonde et avant l'hybridation avec une cible complémentaire, une expérience témoin a été réalisée. Cette mesure consiste en l'étude du comportement électrochimique du film après immersion dans une solution contenant une séquence totalement non complémentaire à la séquence sonde. Les représentations de l'impédance complexe enregistrées avant et après incubation dans une solution contenant la séquence non complémentaire, sont presque superposables. En revanche, l'hybridation avec la séquence cible complémentaire induit une modification significative des propriétés de conduction de la matrice.

Ainsi, l'impédance électrochimique paraît être une méthode appropriée au diagnostic de l'hybridation spécifique de deux brins complémentaires<sup>3,4</sup>. Afin de mieux comprendre les



phénomènes intervenant à l'interface film/solution, nous avons cherché à modéliser le système à l'aide d'un circuit équivalent.

#### IV. Modélisation par un circuit équivalent

Toutes les courbes d'impédance obtenues sont bien modélisées par le circuit équivalent présenté sur le schéma 8.

Le rôle et le sens physique de chaque composant du circuit équivalent sont expliqués ci-dessous.

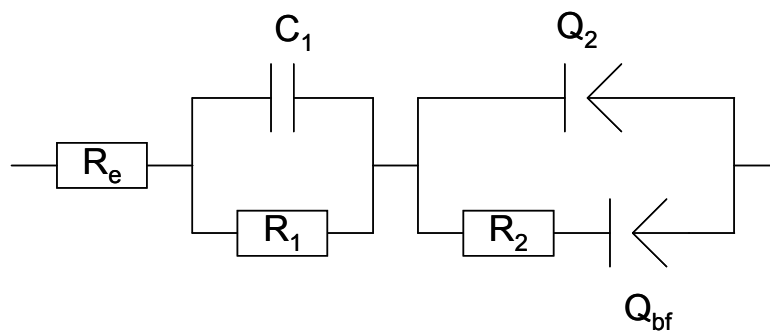


Schéma 8. : Circuit équivalent

Ce circuit est composé d'une résistance  $R_e$  en série avec deux éléments de circuit parallèles, traduisant le comportement électrochimique du système pour les deux domaines de fréquence I et II indiqués sur la figure I-23. Une résistance  $R_e$  est placée en série avec un élément de circuit parallèle ( $C_1, R_1$ ) constitué d'une capacité pure  $C_1$  et d'une résistance  $R_1$ , lui-même en série avec un second élément de circuit parallèle ( $Q_2(R_2, Q_{bf})$ ) qui consiste en une pseudo-capacité  $Q_2$  en parallèle avec une résistance  $R_2$  en série avec une seconde pseudo-capacité  $Q_{bf}$  qui s'exprime à basse fréquence.

Un comportement purement capacitif est attendu aux basses fréquences dans le cas d'une électrode plane idéalement polarisée. Cependant dans la plupart des cas, l'impédance enregistrée à basses fréquences n'est pas purement capacitive. La capacité est alors dépendante de la fréquence et ainsi, pour une fréquence donnée, une dispersion de la capacité est observée<sup>163-165</sup>. Cette dispersion est le résultat d'un écart de comportement par rapport à une capacité idéale. Afin de caractériser cette « dispersion à basse fréquence », la capacité interfaciale est communément décrite par une pseudo-capacité, notée  $Q$ , et dont l'impédance

$$s'écrit : Z(\omega) = \frac{(j\omega)^{-\alpha}}{C_0}.$$

$C_0$  est une constante indépendante de la fréquence,  $\alpha$  un coefficient compris entre 0 et 1 et  $\omega$  la fréquence angulaire. Ainsi, cette expression est le résultat de la dépendance avec la fréquence de la pseudo-capacité inter faciale  $Q$  qui tend vers une capacité pure lorsque  $\alpha$  tend vers 1. Il est à noter qu'une valeur de 0,5 pour  $\alpha$  correspond à une impédance de Warburg.

La composante résistive  $R_e$  correspond à la somme des résistances associées à la solution électrolytique et au matériau de l'électrode.

La modélisation des courbes par le circuit équivalent présenté sur le schéma 8 a permis de calculer les valeurs des différentes composantes capacitives et résistives (Tableau 2).

**Tableau 2 : Valeurs des composantes électroniques du circuit équivalent au cours des différentes étapes de modification du support conducteur.**

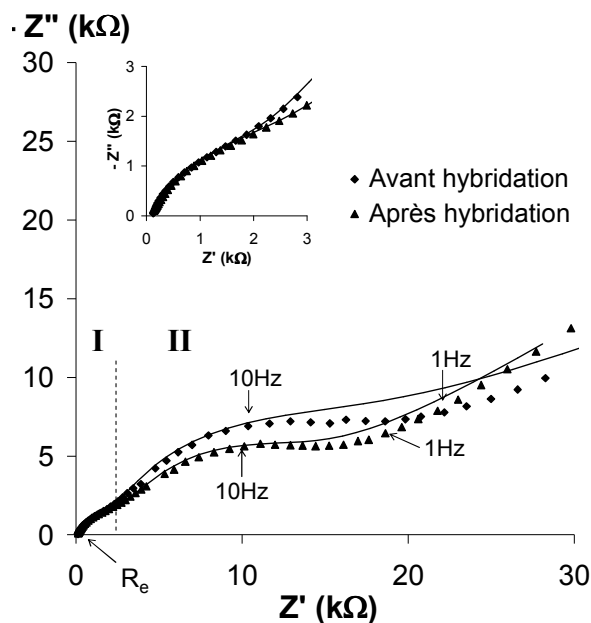
Modification du support	$R_e$ ( $\Omega$ )	$R_1$ ( $\Omega$ )	$C_1$ ( $\mu F$ )	$C_{02}$ ( $\mu\Omega^{-1} \cdot s^{\alpha^2}$ )	$\alpha_2$	$R_2$ ( $\Omega$ )	$C_{0bf}$ ( $\mu\Omega^{-1} \cdot s^{\alpha_{bf}}$ )	$\alpha_{bf}$
Après immobilisation	73,1	39,6	0,52	7,47	0,86	340,5	2,63	0,44
ADN non complémentaire	80,4	41,5	0,54	8,07	0,83	406,4	2,13	0,51
Après hybridation	81,8	28,4	0,58	9,63	0,82	188,5	3,53	0,41

Il apparaît qu'aucun changement significatif des paramètres du circuit équivalent n'est observé lorsque le support conducteur modifié est mis en contact avec les brins d'ADN totalement non complémentaires. Ce résultat est essentiel et constitue un préalable indispensable pour pouvoir donner du sens physique aux changements de conductivité observés lors de l'hybridation.

L'immersion de la matrice modifiée par les brins sondes dans la solution contenant les brins d'ADN cibles totalement complémentaires conduit en revanche à des modifications notables des valeurs des paramètres du circuit.

En ce qui concerne le premier élément de circuit parallèle ( $C_1, R_1$ ), une diminution de la résistance  $R_1$  est observée alors que la capacité  $C_1$  ne varie pas significativement.

Pour le second élément de circuit parallèle ( $Q_2(R_2, Q_{tr})$ ), on observe une augmentation de la pseudo-capacité  $C_{02}$  et une nette diminution de la résistance  $R_2$ . La pseudo-capacité à basse fréquence  $C_{0bf}$  augmente, mais le coefficient  $\alpha_{bf}$  reste proche de 0,5.

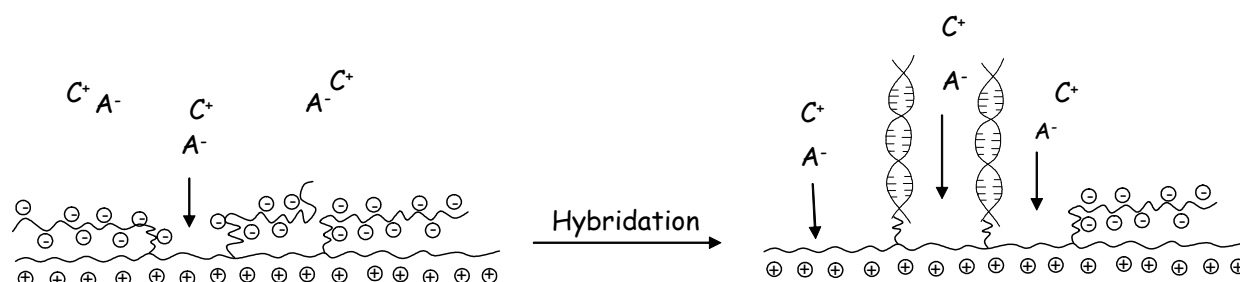


**Figure I-23 : Variations de l'impédance totale dans le plan complexe**

Diagrammes de Nyquist enregistrés à +1,1V par rapport à l'ECS de 100kHz à 0,1Hz avec une amplitude de 10 mV sur une électrode de Pt ( $\phi=1\text{mm}$ ) recouverte d'un film de poly( $M_1$ -co-MT) modifié par des brins d'ADN sondes. Le copolymère est plongé dans une solution tampon TE/NaCl 0,6M avant (losanges) et après hybridation avec les brins cibles complémentaires (triangles). Les courbes en traits pleins correspondent aux modélisations par le circuit équivalent.

Une analyse des paramètres du circuit équivalent et des variations de l'impédance totale du système reportées à la figure I-23 fait apparaître que le demi-cercle localisé dans la région II, correspondant aux valeurs intermédiaires du domaine de fréquences étudié, semble traduire les modifications les plus remarquables de la conduction du film au cours de l'hybridation. Ce demi-cercle correspond au second élément de circuit parallèle ( $Q_2(R_2, Q_{bf})$ ) du circuit équivalent. En première analyse, il pourrait constituer une signature électrochimique de l'hybridation. Le sens physique à donner à cet élément de circuit parallèle semble être étroitement lié à la présence du matériel biologique à l'interface copolymère|solution et aux modifications de l'interface au cours du processus de reconnaissance moléculaire. Ces modifications peuvent être soit conformationnelles, soit consister en une redistribution des charges à l'interface. Dans la littérature, les auteurs évoquent souvent un changement de conformation pour expliquer leurs résultats<sup>166</sup>. Les simples brins d'ADN sondes adoptent en solution une conformation aléatoire partiellement repliée sur la surface du polymère et lors de

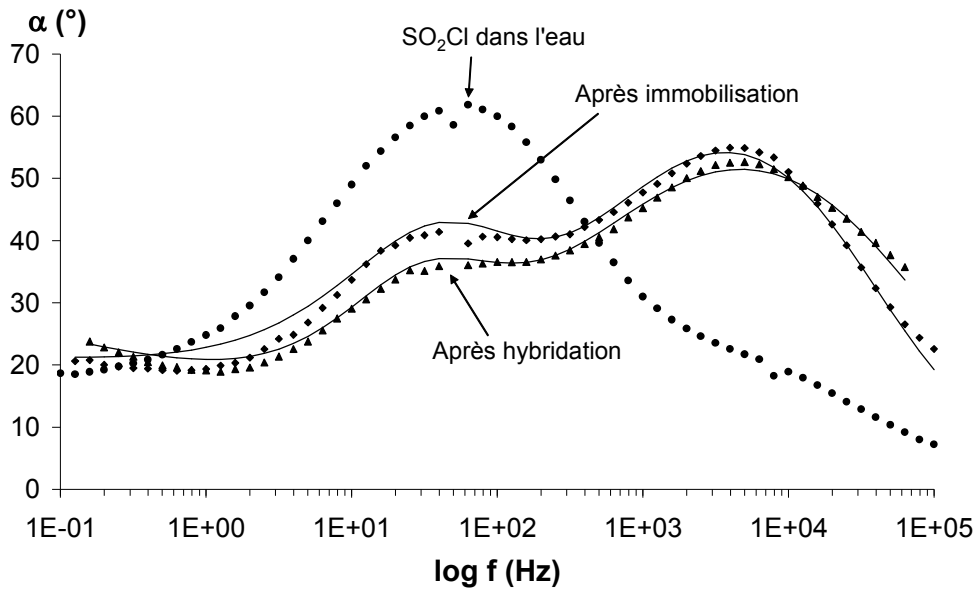
l'hybridation, la formation des doubles hélices induit une rigidité qui tend à libérer la surface (Schéma 9).



**Schéma 9.:** Modélisation de l'interface film/électrolyte avant et après hybridation avec l'ADN cible

Cependant cette vue de l'esprit est d'avantage issue d'un long travail de simulations que d'une analyse électrochimique des modifications des propriétés de conduction. Dans des travaux plus récents, certains auteurs évoquent une participation des brins d'ADN au processus de dopage  $p^{167}$ . Ainsi les anions phosphates des brins d'ADN pourraient compenser en surface les lacunes électroniques créées lors de l'oxydation de la matrice. De tels arguments sont évidemment difficiles à prouver expérimentalement. Cependant il nous semble qu'une telle redistribution de charge à l'interface pourrait rendre compte des modifications observées.

Le diagramme de Bode présenté à la figure I-24 décrit le comportement électrochimique d'un film copolymère étudié dans une solution TE/NaCl avant (ronds) et après immobilisation de brins d'ADN sondes (losanges), et après hybridation avec les brins d'ADN cibles (triangles).



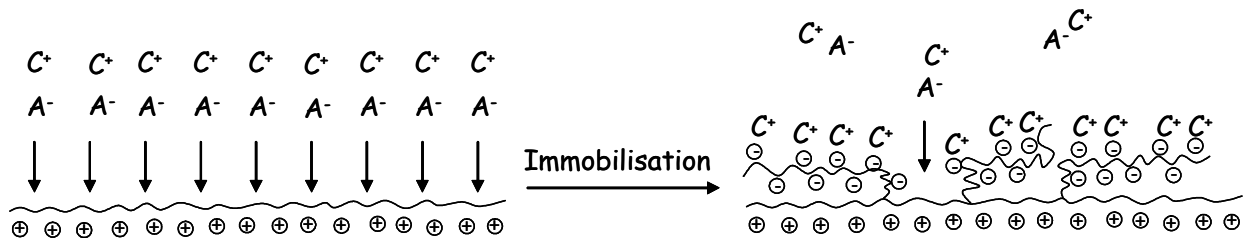
**Figure I- 24 : Diagrammes de Bode**

**Diagrammes de phase de Bode enregistrés à +1,1V par rapport à l'ECS dans une solution tampon TE/NaCl sur une électrode de Pt ( $\phi=1\text{mm}$ ) recouverte d'un film de poly( $M_1\text{-co-MT}$ ) terminé par des fonctions  $\text{SO}_2\text{Cl}$  avant (cercles) et après immobilisation de la sonde (losanges) et après hybridation avec la cible (triangles). Les courbes en traits pleins correspondent aux modélisations par le circuit équivalent.**

La superposition des variations de l'angle de phase  $\alpha$  en fonction de la fréquence fait apparaître deux phénomènes de relaxation intervenant autour de 50Hz et de 5000Hz.

Avant immobilisation d'ADN, seul un phénomène de relaxation à 50Hz est observé, correspondant au dopage superficiel de la matrice. Après immobilisation de la sonde, ce phénomène de relaxation tend à diminuer alors qu'un nouveau maximum pour  $\alpha$  apparaît à des fréquences plus élevées. Ainsi la présence d'ADN immobilisé à la surface du copolymère semble induire une seconde contribution au dopage superficiel. Le maximum observé à hautes fréquences (5000Hz) apparaît également lorsque subsistent à la surface de la matrice des anions  $\text{SO}_2^-$  résiduels n'ayant pas réagi avec le NCS après clivage cathodique. Ainsi, lorsque la matrice modifiée contient des charges négatives immobilisées en surface, un processus de dopage p rapide, induit par la proximité des anions dopants est observé, en accord avec un processus d'autodopage. L'apparition d'un phénomène de relaxation rapide induit par la présence de brins d'ADN sondes en surface suggère la contribution des acides nucléiques au dopage superficiel. En effet, la séquence d'ADN sonde immobilisée à la surface de la matrice adopte une conformation aléatoire et les groupes phosphate présents le long de la chaîne

peuvent jouer le rôle d'anions dopants au cours du processus de dopage p. Par ailleurs, la diminution du maximum du déphasage localisé à 50Hz en présence d'ADN, est attribuable à une diminution du processus de dopage superficiel associé. La présence de simples brins immobilisés en surface peut induire une répulsion électrostatique des anions dopants provenant de la solution électrolytique, dont le mouvement de diffusion est alors limité<sup>106</sup>. Après hybridation avec les séquences cibles, il apparaît que le phénomène de relaxation à 5000Hz ne varie pas significativement alors que le phénomène de relaxation localisé à 50Hz diminue légèrement. Ceci peut être attribué à l'augmentation de la densité de charges négatives localisées à la surface après hybridation, qui entraîne un accroissement de la répulsion électrostatique des anions de la solution électrolytique<sup>106</sup>.



**Schéma 10. : Modélisation de l'interface film/électrolyte avant et après immobilisation d'ADN**



# *Chapitre 3*





# Chapitre 3 :

## Vers des dispositifs à commande électrochimique permettant de délivrer une sonde biologique

De nombreux travaux dans la littérature concernent le développement de nouveaux supports actifs pour la libération contrôlée de substances biologiques<sup>125,168</sup>.

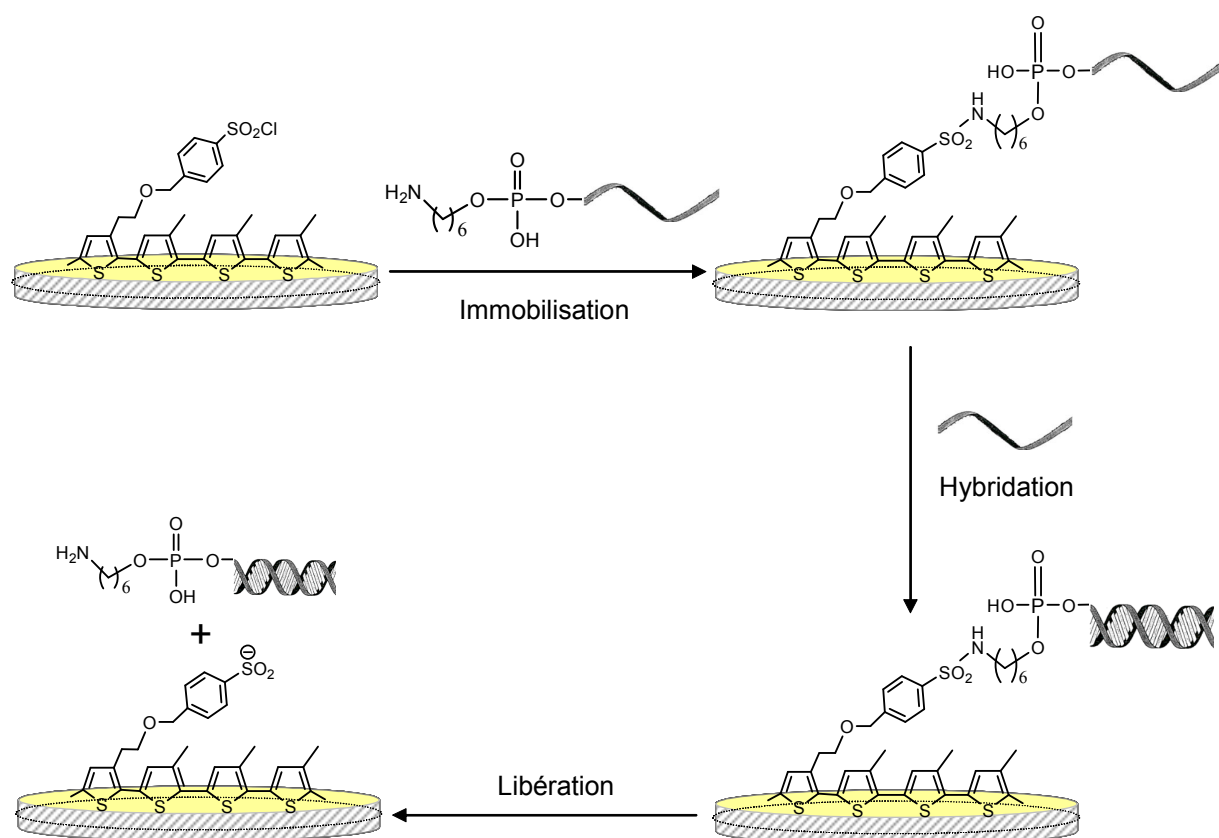
Parmi les stratégies employées, la libération d'une sonde biologique à potentiel imposé semble être une approche prometteuse, reproduisant le plus fidèlement la façon dont certaines substances actives sont délivrées dans le corps humain. La possibilité de stimuler électrochimiquement les polymères conducteurs fait de ces derniers des matériaux remarquables, autorisant une libération contrôlée locale du matériel biologique<sup>126</sup>. Ainsi, le contrôle de la charge introduite électrochimiquement ou par variations du pH<sup>128,129,169</sup>, permet tour à tour de stocker ou d'éjecter des espèces actives chargées.

Par ailleurs, peu de systèmes impliquent un clivage électrochimique en milieu physiologique<sup>10</sup> à cause de la fenêtre d'électroactivité étroite en milieu aqueux. Les travaux réalisés sur nos supports polymères conducteurs peuvent constituer une alternative intéressante pour la libération de matériel biologique à potentiel imposé en milieu physiologique.

### **I. Les difficultés rencontrées**

Les supports poly(M<sub>1</sub>-co-MT) étudiés sont de bons candidats pour l'immobilisation de matériels biologiques fragiles et l'analyse de leurs propriétés de conduction constitue une approche qui permet d'établir un diagnostic moléculaire sans marquer l'analyte cible en solution. Cependant pour de nouvelles applications, il apparaît utile de pouvoir disposer de nouveaux supports actifs jouant à la fois le rôle d'outils d'analyse et d'outils thérapeutiques.

Les supports polymères conducteurs modifiés par une fonction d'ancrage électroclivable sont d'excellents candidats pour de telles applications, puisqu'ils autorisent tour à tour l'immobilisation d'ADN sondes, la lecture électrochimique de l'hybridation et la libération du matériel biologique (Schéma 11).



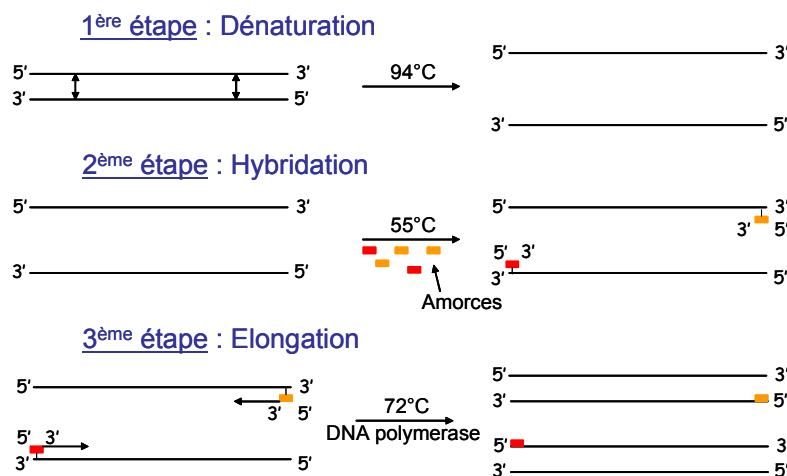
**Schéma 11. : Fonctionnalisation des supports et libération du matériel biologique**

Les premiers essais de libération d'ADN à potentiel imposé ont été réalisés sur des supports poly( $\text{M}_1\text{-co-MT}$ ) préalablement modifiés pour permettre l'immobilisation de séquences ADN sondes et l'hybridation de séquences cibles courtes (37 bases). Lors de ces travaux préliminaires, le matériel biologique délivré en solution par traitement cathodique de la matrice modifiée, est directement engagé, après lavages, dans une électrophorèse sur gel d'agarose pour être détecté. Toutefois, dans ces conditions, l'ADN délivré est présent en trop faible quantité pour pouvoir être détecté et aucun échantillon n'a permis de conclure à une libération d'ADN. Il est ainsi apparu indispensable d'amplifier l'ADN libéré après coupure

par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)\*. Cependant cette amplification par PCR est impossible sur des séquences d'ADN courtes, dont la taille est comparable à celle des amorces. L'emploi de séquences ADN plus longues s'est donc révélé indispensable à la détection des brins d'ADN délivrés.

Contrairement aux fragments de quelques dizaines de bases qui peuvent être facilement synthétisés et qui sont commerciaux, les fragments plus longs (quelques centaines de bases) proposés par certains fournisseurs sont très chers et d'une pureté médiocre. Nous avons donc choisi de les produire à partir d'une séquence d'ADN disponible au Laboratoire de Biologie et Génétique Evolutive (LBGE) avec lequel nous collaborons au Mans. La séquence d'intérêt consiste en un fragment de 675 bases qui provient de la séquence d'un élément transposable *mariner* (numéro d'accèsion AJ496134) isolée d'un ver marin *Alvinella caudata*. La section suivante représente les principales étapes de la préparation de ces brins cibles.

\* Une PCR est une réaction d'amplification qui permet de produire une séquence d'ADN en grosse quantité à partir de cette séquence à l'état de traces. La PCR se déroule en trois étapes. Une étape de dénaturation consiste à chauffer l'échantillon à 94°C pour déshybrider les doubles hélices. L'obtention de deux brins monocaténaire permet l'hybridation des amorces aux extrémités des simples brins issus de la dénaturation (étape 2). Les amorces sont des séquences courtes (20 bases) complémentaires aux extrémités des séquences à dupliquer ; elles permettent d'amorcer la polymérisation de l'ADN. Cette polymérisation est effectuée dans le sens 5'→3' par une enzyme nommée ADN polymérase lors de l'étape d'élongation (étape 3). Durant cette étape, l'ADN polymérase utilise les nucléotides introduits dans le milieu au début de la réaction pour former une chaîne complémentaire à celle sur laquelle s'est fixée l'amorce et qui sert de « matrice modèle » pour la synthèse du nouveau brin. Les trois étapes de la PCR sont ainsi répétées plusieurs fois (dans notre cas, 40 cycles ont été effectués). Chaque double hélice produite permet d'amorcer la synthèse de 2 nouveaux brins et la quantité d'ADN dans l'échantillon croît exponentiellement.



Principe de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

## II. Préparation du matériel biologique

La séquence d'intérêt disponible au laboratoire a été obtenue après extraction d'ADN génomique du ver *A. caudata* (Etape 1). Le gène d'intérêt a été amplifié par PCR (Etape 2) puis introduit dans un plasmide (fragment d'ADN circulaire d'origine bactérienne), correspondant au vecteur pGEM-T easy (Promega, cf partie Matériels et méthode). Cette dernière étape est appelée ligation (Etape 3).

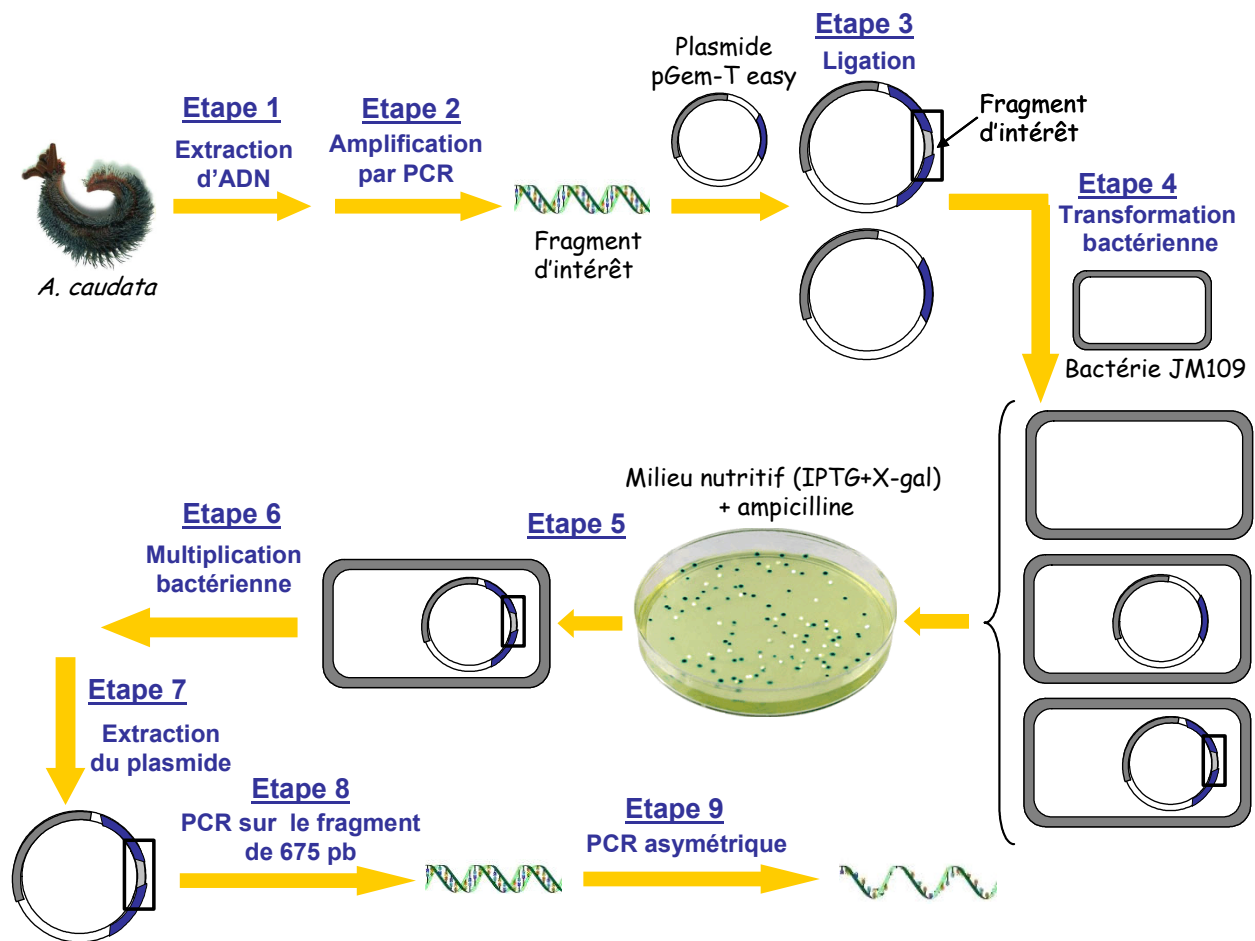


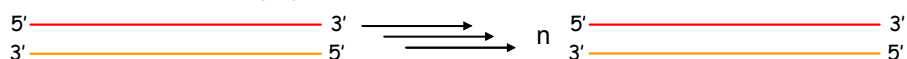
Schéma 12.: Préparation du matériel biologique

La séquence ADN d'intérêt est insérée dans le plasmide au niveau du site de clonage multiple, à l'intérieur du gène lacZ codant la  $\beta$ -galactosidase. Ainsi l'insertion d'ADN au sein du plasmide empêche l'expression du gène au niveau de la traduction et la  $\beta$ -galactosidase n'est plus synthétisée. A l'issue de cette étape, deux cas de figures sont envisageables : soit le plasmide s'est refermé sur lui-même avant que le fragment d'intérêt n'ait pu être inséré (plasmide intact), soit le fragment d'intérêt a été inséré dans le plasmide avant qu'il ne se

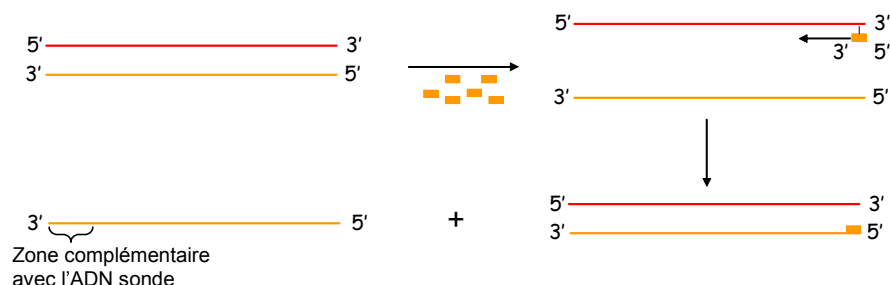
reforme (plasmide recombiné). Les plasmides sont ensuite introduits dans des bactéries (JM109), c'est la transformation bactérienne (Etape 4). L'ensemble des étapes de ligation et de transformation bactérienne constitue le clonage du gène d'intérêt et permet la conservation du plasmide après son introduction en bactérie. Les bactéries obtenues peuvent soit avoir intégré le plasmide intact, soit avoir intégré le plasmide recombiné, soit n'avoir intégré aucun plasmide. Pour différencier les bactéries, elles sont déposées sur un milieu nutritif gélosé contenant de l'ampicilline, un substrat pour la  $\beta$ -galactosidase nommé X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) et un inducteur de la transcription du gène qui code la  $\beta$ -galactosidase nommé IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) (Etape 5). Seules les bactéries ayant intégré un plasmide (intact ou recombiné) vont se développer dans ce milieu de culture car elles possèdent le gène responsable de la résistance à l'antibiotique. Les bactéries qui ont intégré le plasmide intact et qui ne possèdent donc pas le fragment d'intérêt, synthétisent la  $\beta$ -galactosidase qui catalyse l'hydrolyse du substrat X-gal, ce qui libère un produit bleu. Les colonies bactériennes ayant intégré le plasmide recombiné conservent leur couleur blanche d'origine. Après prélèvement, les colonies bactériennes, contenant les plasmides d'intérêt (les colonies blanches), sont mises en culture une nuit à 37°C dans un milieu nutritif contenant de l'ampicilline (Etape 6). Le plasmide contenant le fragment d'ADN est conservé à - 80°C à l'intérieur des bactéries JM109. Les plasmides peuvent être extraits des bactéries grâce à une lyse qui détruit la paroi bactérienne (Etape 7). Une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est ensuite réalisée sur ces plasmides (Etape 8).

Cependant, les fragments résultant de la PCR sont bicaténaires alors que les séquences utilisées comme cibles doivent être monocaténaires. La stratégie envisagée a été d'effectuer sur ces doubles hélices une réaction de PCR asymétrique (Etape 9) dont le principe est présenté sur le schéma 13.

**1<sup>ère</sup> étape : PCR « normale » jusqu'à épuisement de l'amorce présente en défaut (■)**



**2<sup>ème</sup> étape : PCR asymétrique :  
accumulation du brin monocaténaire d'intérêt**



**Schéma 13.: Principe de la PCR asymétrique**

Le principe de base de la PCR asymétrique est le même que celui de la PCR classique, mais elle s'effectue en présence d'une faible quantité de l'une des deux amorces. Ainsi lors des premiers cycles, la réaction conduit à une amplification de l'ADN double brin, jusqu'à épuisement de l'amorce en défaut. Ensuite, l'amorce initialement présente en excès et à présent seule dans le milieu, se fixe exclusivement sur l'un des deux fragments et ne génère plus que le fragment complémentaire. Des brins simples s'accumulent alors dans le milieu. C'est de cette façon que sont préparées les séquences cibles de 675 bases.

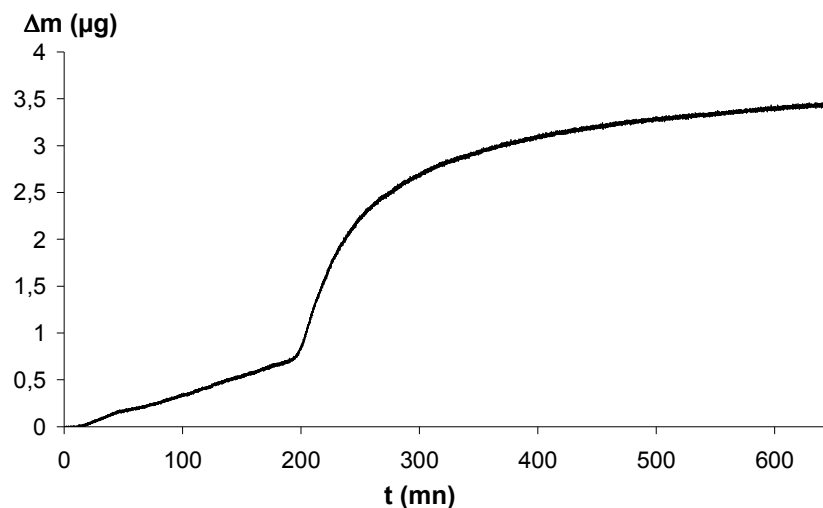
### **III. Préparation et modification des supports**

Le poly( $M_1$ -co-MT) est formé sur quartz platiné en balayant le potentiel entre -0,1V et +1,4V dans 12mL d'acétonitrile contenant les monomères  $M_1$  et MT en proportion molaire 1/500 respectivement (MT, 20mM) et 0,1M  $Bu_4NPF_6$  employé comme électrolyte support. Après clivage cathodique des fonctions sulfonamide et chloration des anions sulfinates obtenus (comme indiqué à la section IV.2 du chapitre B de la partie expérimentale), le copolymère peut être utilisé comme support pour l'immobilisation de brins d'ADN sondes.

#### **III.1. Immobilisation des sondes**

La séquence sonde est un ODN synthétique monocaténaire de 42 bases modifié en son extrémité 5' par une fonction amine primaire. Les brins d'ADN sondes possèdent une séquence complémentaire de l'extrémité 5' des brins cibles de 675 bases.

L'étape d'immobilisation consiste à incuber le copolymère une nuit à température ambiante dans 700 $\mu$ L d'une solution TE/NaCl 0,6M contenant la séquence sonde à 1 $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>. La variation de la masse est reportée à la figure I-25.



**Figure I-25 : Variation de la masse lors de l'étape d'immobilisation des brins sondes**

**Variation de la masse enregistrée sur un cristal de quartz platiné ( $\phi = 5$ mm) recouvert d'un film de poly(M<sub>1</sub>-co-MT) terminé par les fonctions d'ancrage SO<sub>2</sub>Cl plongé dans une solution tampon TE/NaCl 0,6M contenant la séquence sonde à 1 $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>.**

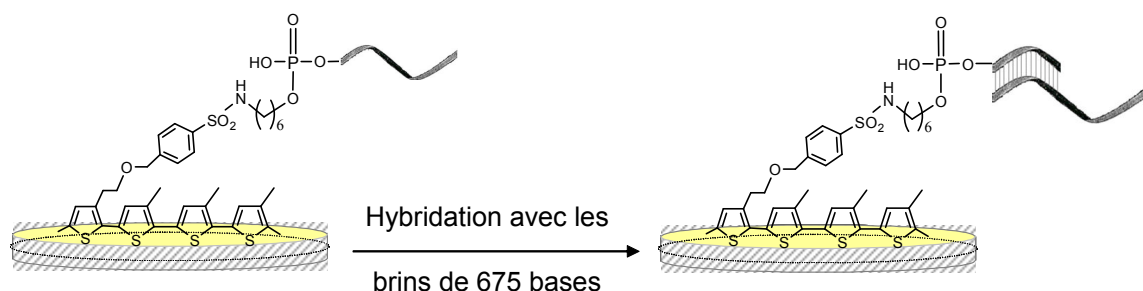
Une prise de masse de 3,5 $\mu$ g, correspondant à l'accrochage covalent des brins sondes par réaction des fonctions amines terminales avec les groupements chlorure de sulfonyle de la matrice, est enregistrée. Une faible prise de masse enregistrée lors des premières heures d'incubation de la matrice est souvent observée. Elle est probablement attribuable au faible volume de la cellule d'immobilisation et à la position du quartz placé au fond de la cellule, qui n'autorisent pas l'agitation de la solution. Après cette première étape d'initialisation, une augmentation rapide de la masse, peut-être due à une évaporation partielle de la solution, est observée.

### **III.2. Hybridation avec les brins cibles**

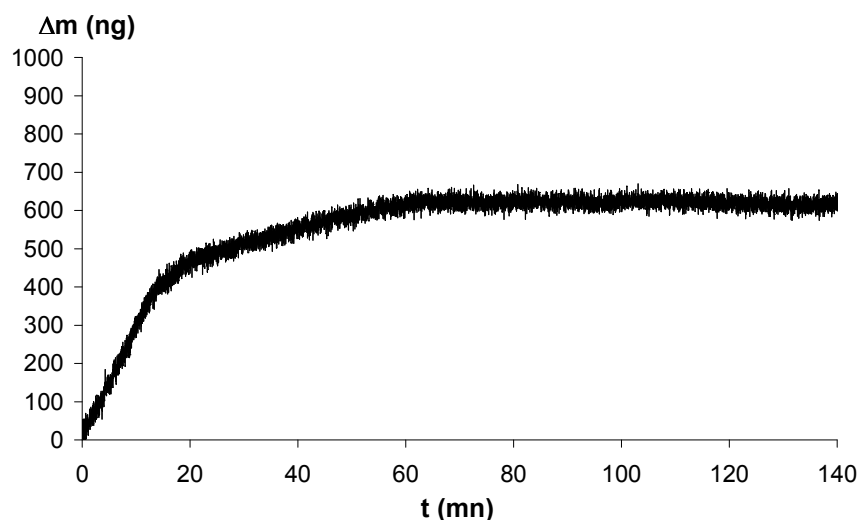
Comme décrit à la section II.6. du chapitre Matériel et méthodes, l'hybridation avec les simples brins de 675 bases s'effectue par incubation du polymère, préalablement modifié par les brins sondes, dans une solution tampon phosphate contenant les brins cibles. Il est à noter que la concentration en brins cibles est inconnue car ces derniers sont obtenus par PCR.



L'extrémité 5' des brins cibles de 675 bases est complémentaire à la séquence ADN sonde immobilisée sur la matrice et une augmentation de la masse de 600ng sur la figure I-26 témoigne de l'hybridation des deux brins d'ADN sur la région complémentaire.



**Schéma 14. : Hybridation entre les ODN sondes (NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>- (5')-TTG TAA AAT ACG AGG GGC GGT CAG AAA GTT ATG TAA TTC TGT-(3')) immobilisés sur la matrice et les brins cibles de 675 bases ((3')-AAC ATT TTA TGC TCC CCG CCA GTC TTT CAA TAC ATT AAG ACA -----(5')) en solution.**



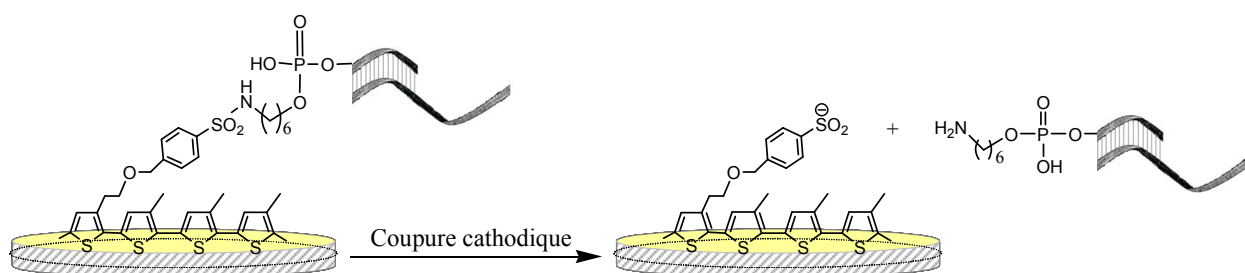
**Figure I-26: Variation de la masse lors de l'étape d'hybridation avec les longs brins d'ADN cibles**

Variation de la masse enregistrée sur un cristal de quartz platiné ( $\phi = 5\text{mm}$ ) recouvert d'un film de poly(M<sub>1</sub>-co-MT) modifié par des brins sondes et plongé dans une solution tampon phosphate NaCl 0,5M contenant la séquence de 675 bases dont l'extrémité 5' est complémentaire avec la sonde immobilisée.

En considérant que le rapport entre la masse molaire des brins cibles et celle des brins sondes est très supérieur à 1, l'augmentation de la masse consécutive à l'hybridation est très inférieure à la valeur attendue. Ceci peut être attribué d'une part à la gêne stérique entre les brins sondes immobilisés et d'autre part à la conformation aléatoire adoptée par les simples brins cibles de 675 bases conduisant à une faible accessibilité des extrémités complémentaires 5'.

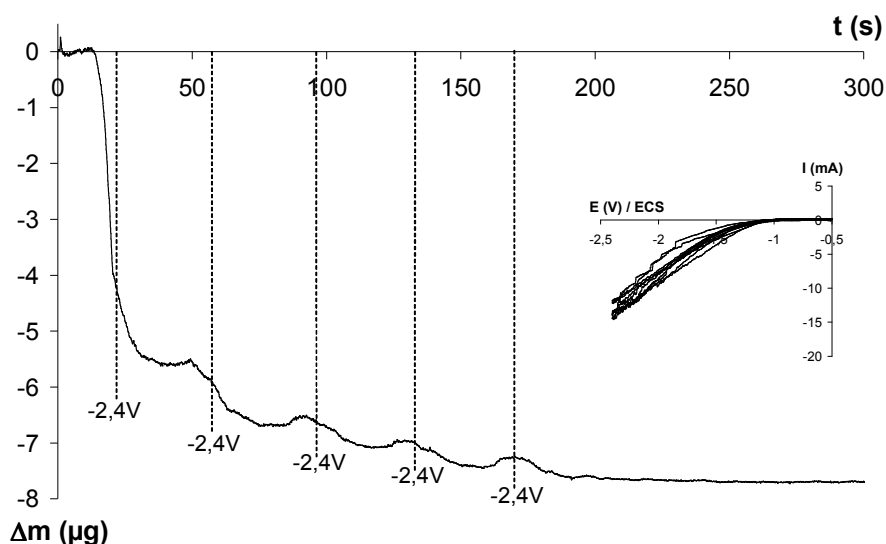
#### **IV. Libération à potentiel imposé du fragment d'ADN préalablement immobilisé**

Après hybridation avec les séquences cibles de 675 bases, le copolymère modifié est réduit par cyclages du potentiel entre -0,5V et -2,4V par rapport à l'ECS dans une cellule en téflon contenant 250 $\mu$ L de solution tampon TE/NaCl 0,6M. Une perte de masse est observée de façon concomitante sur la figure I-27, en accord avec la libération de l'ADN comme illustré sur le schéma 15.



**Schéma 15. : Libération de l'ADN à potentiel imposé**

Cependant, la perte de masse enregistrée est supérieure à la quantité d'ADN préalablement immobilisé (Figure I-27).

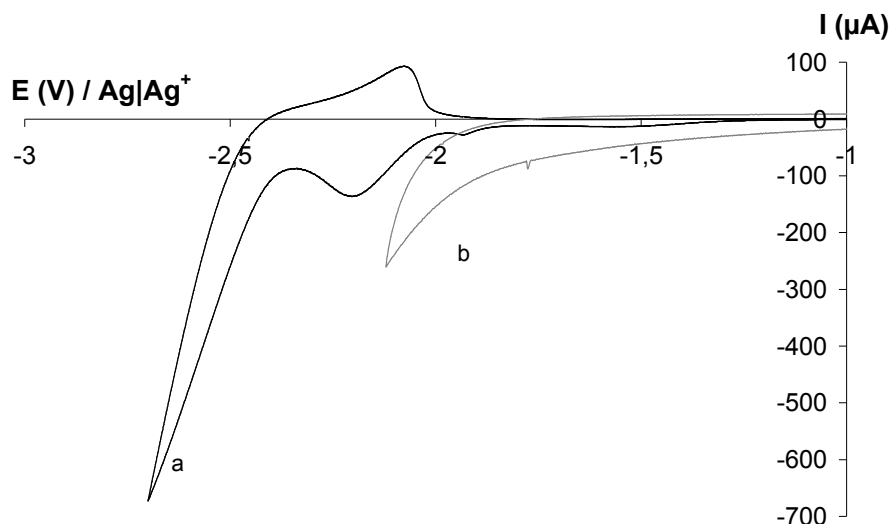


**Figure I- 27 : Variation de la masse lors de la libération d'ADN**

**Variation de la masse mesurée sur un cristal de quartz platiné ( $\phi = 5\text{mm}$ ) recouvert d'un film de poly( $M_1$ -co-MT) fonctionnalisé par de l'ADN simultanément à l'enregistrement de 5 cycles de potentiel effectués à  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  entre  $-0,5\text{V}$  et  $-2,4\text{V}$  par rapport à l'électrode au calomel saturé dans une solution tampon de TE/NaCl  $0,6\text{M}$ .**

En effet, une perte de masse de  $7,5\mu\text{g}$  est mesurée à l'issue des balayages du potentiel comparée aux prises de masses de  $3,5\mu\text{g}$  et de  $0,6\mu\text{g}$  correspondant respectivement à l'immobilisation des brins sondes et à l'hybridation avec les brins cibles. Cette perte de masse importante est attribuable à une dégradation partielle de la matrice. Les voltammogrammes cycliques montrés en insert de la figure I-27 représentent les cycles de potentiels associés aux variations de la masse. Il apparaît que la matrice polymère n'est pas électroactive en milieu TE/NaCl  $0,6\text{M}$ . Le courant cathodique enregistré à partir de  $-1,2\text{V}$  correspond à la réduction des protons de l'eau et produit une décharge d'hydrogène.

A titre indicatif, la figure I-28 montre la superposition d'un voltammogramme cyclique correspondant au comportement cathodique de la matrice poly( $M_1$ ) en milieu organique et de la réponse électrochimique d'une électrode de carbone vitreux non modifiée en milieu aqueux.



**Figure I-28 : Voltamétrie cyclique**

**(a) Voltammogrammes cycliques enregistrés sur un cristal de quartz platiné ( $\phi=5\text{mm}$ ) recouvert d'un film poly( $M_1$ ) plongé dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  (vitesse de balayage,  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , référence des potentiels :  $\text{Ag}|\text{Ag}^+$ ).**

**(b) Voltammogrammes cycliques enregistrés dans  $\text{H}_2\text{O} + 0,5\text{M LiClO}_4$  sur une électrode de carbone vitreux non modifiée (vitesse de balayage,  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , référence des potentiels :  $\text{Ag}|\text{Ag}^+$ ).**

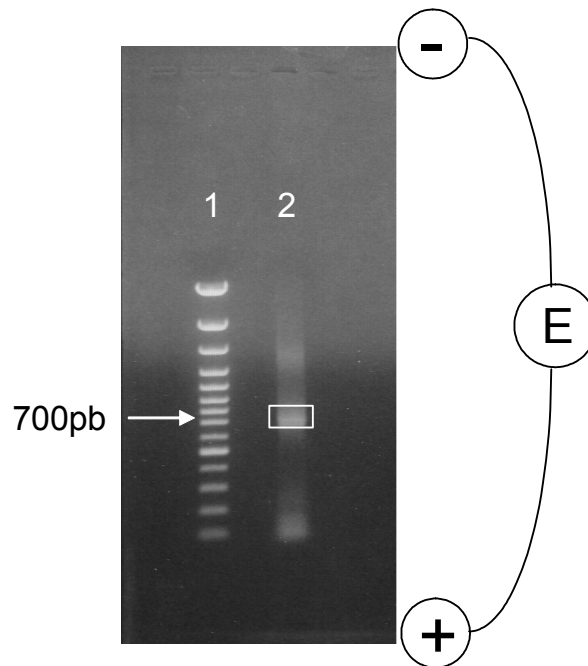
La figure I-28 indique clairement que la coupure de la liaison S-N est inaccessible en milieu aqueux. Il apparaît donc que la perte de masse anormalement élevée enregistrée à la figure I-27 est attribuable à une dégradation partielle du copolymère due à la réduction de l'eau impliquant un dégagement de dihydrogène qui décolle le film déposé à la surface du quartz de platine. Avec l'emploi du film poly( $M_1$ -co-MT), c'est donc la réduction du milieu qui conduit à une libération partielle du dépôt en solution.

Après traitement cathodique du copolymère modifié, la solution contenant l'ADN libéré est récupérée afin de détecter, après traitement, les fragments délivrés.

L'ADN délivré dans  $250\mu\text{L}$  de solution tampon TE/NaCl  $0,6\text{M}$  est précipité à  $-80^\circ\text{C}$  pendant 1h après addition de  $25\mu\text{L}$  d'acétate de sodium  $3\text{M}$  et de  $700\mu\text{L}$  d'éthanol absolu. Après deux lavages avec de l'éthanol  $70$  et séchage sous vide, le résidu est repris dans  $25\mu\text{L}$  d'eau ultrapure. Ces traitements successifs ont pour but d'éliminer le sel de la solution TE/NaCl  $0,6\text{M}$ , et d'augmenter la concentration de l'ADN en solution.

La quantité d'ADN contenu dans la solution finale (25µL) est cependant trop faible pour permettre sa détection par électrophorèse sur gel d'agarose. Ainsi, les fragments d'ADN délivrés ont été amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Le produit issu de la PCR est déposé sur gel d'agarose pour être identifié par électrophorèse.



**Figure I- 29 : Electrophorèse sur gel d'agarose**

**Photographie d'un gel d'agarose après migration de la cible 675 bases électrochimiquement délivrée (puits 2) comparée au marqueur de taille O'GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (puits 1).**

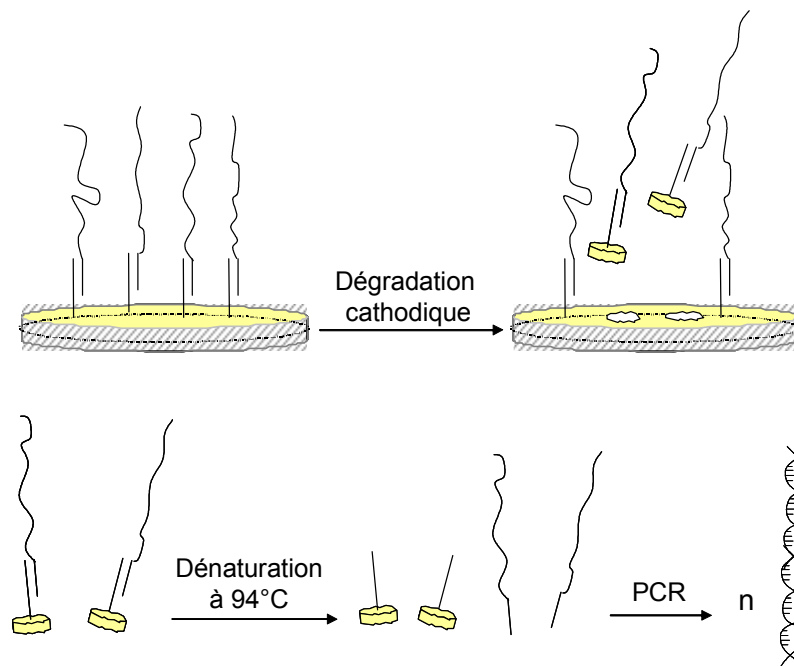
Sur la figure I-29 les puits 1 et 2 dans lesquels ont été déposées les solutions d'ADN sont situés en haut du gel d'agarose et le matériel biologique migre de haut en bas sous l'effet du champ électrique appliqué. En effet, les fragments d'ADN, chargés négativement par la présence de groupements phosphate, sont attirés vers l'anode. Selon leur masse molaire, les fragments déposés migrent à des vitesses différentes dans les « mailles » du gel d'agarose. Ainsi, les petits fragments migrent plus rapidement et sont situés plus bas que les fragments de grande taille.

Le marqueur de taille « O'GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus » (puits 1) est constitué de 14 fragments de tailles différentes comprises entre 100pb et 3000pb. Ce marqueur de taille sert de référence et rend possible l'estimation de la taille d'un fragment inconnu par comparaison. Les brins d'ADN délivrés et amplifiés par PCR ont migrés à partir du puits 2. Sur cette

colonne deux types de fragments de tailles différentes sont discernables. Les fragments les plus courts (en bas du gel) représentent les amorces utilisées pour la PCR. Les fragments situés légèrement plus haut sur le gel d'agarose correspondent aux fragments délivrés après réduction. En effet ces derniers ont migrés à une distance très proche du fragment de 700pb du marqueur de taille. Cette électrophorèse permet ainsi de valider la libération des brins de 675bases. De plus, il apparaît que l'intégrité du matériel biologique est préservée après réduction électrochimique.

## V. Conclusion et perspectives

Le copolymère poly(M<sub>1</sub>-co-MT) a fourni des résultats intéressants car l'immobilisation, l'hybridation et la libération d'ADN ont pu être validées. Cependant, le poly(M<sub>1</sub>) présente un potentiel de coupure trop cathodique, inaccessible en milieu aqueux et le décollement de la matrice qui résulte du traitement électrochimique est un inconvénient majeur pour des applications en milieu physiologique (Schéma 16).



**Schéma 16.: Libération d'ADN par dégradation cathodique de la matrice et amplification par PCR**

Un nouveau monomère a été élaboré pour tenter de palier à ces problèmes. Les propriétés électrochimiques du film résultant et son application comme support pour le diagnostic électrochimique de l'hybridation et pour la libération à potentiel imposé d'ADN en milieu physiologique, font l'objet du chapitre suivant.



## *Partie 2*





## Partie 2

La synthèse d'un nouveau monomère  $M_i$ , dérivé du 4H-cyclopenta[2,1-b ;3,4-b']dithiophène possédant une fonction sulfonamide terminale, et l'étude de son polymère sont présentés dans cette seconde partie.

Une matrice conductrice a été modifiée par des brins d'ADN sondes, capables de reconnaître leur séquence complémentaire en solution. La lecture de l'hybridation a été effectuée par microbalance à cristal de quartz et par spectroscopie d'impédance électrochimique. L'ADN immobilisé a ensuite été libéré à potentiel imposé dans un milieu physiologique.



# *Chapitre 4*



# Chapitre 4 :

## Synthèse et comportement électrochimique du poly(M<sub>i</sub>)

### I. Synthèse du monomère 4-cyclopenta[2,1-b;3,4-b']dithiophène-4-ylidèneméthyl-N,N-diéthyl-benzènesulfonamide (M<sub>i</sub>)

Le monomère M<sub>i</sub> est obtenu par synthèse convergente. Cette synthèse, décrite dans la littérature<sup>170</sup>, nécessite les préparations préalables du 4H-cyclopenta[2,1-b ;3,4-b']dithiophène (CPDT) et du 4-(diéthylsulfonyl)benzaldéhyde.

#### I.1. Synthèse du 4H-cyclopenta[2,1-b ;3,4-b']dithiophène (CPDT)

Le CPDT est obtenu en 5 étapes avec un rendement global de 32%. Les 4 premières étapes présentées sur le schéma 1 sont inspirées de la synthèse déjà décrite par Jeffries et col.<sup>171</sup>.

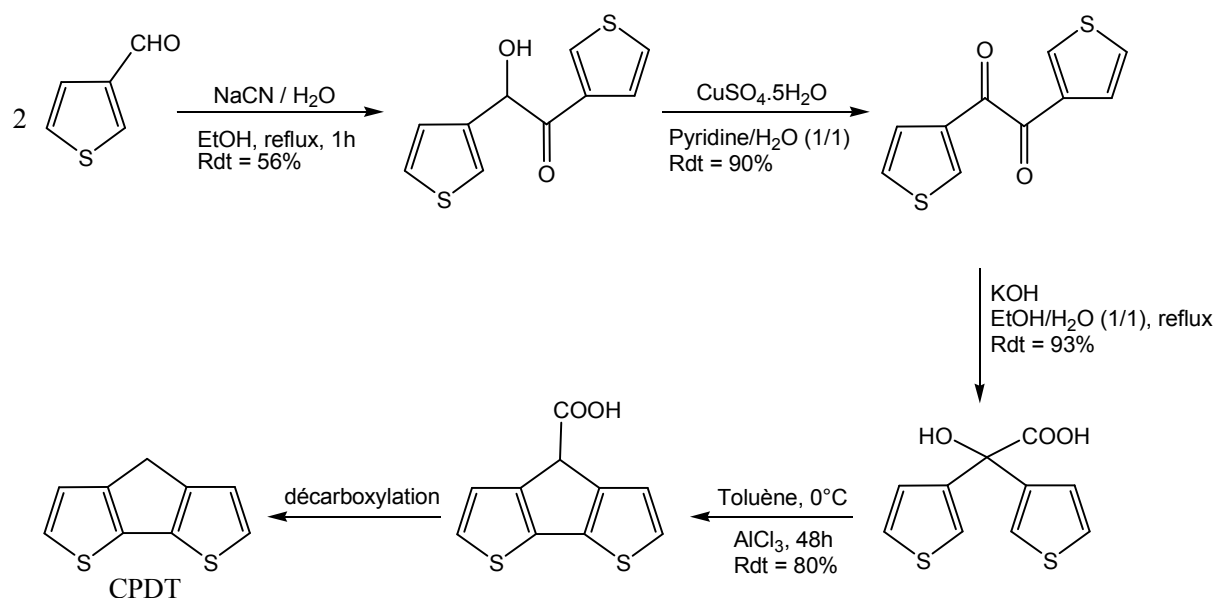
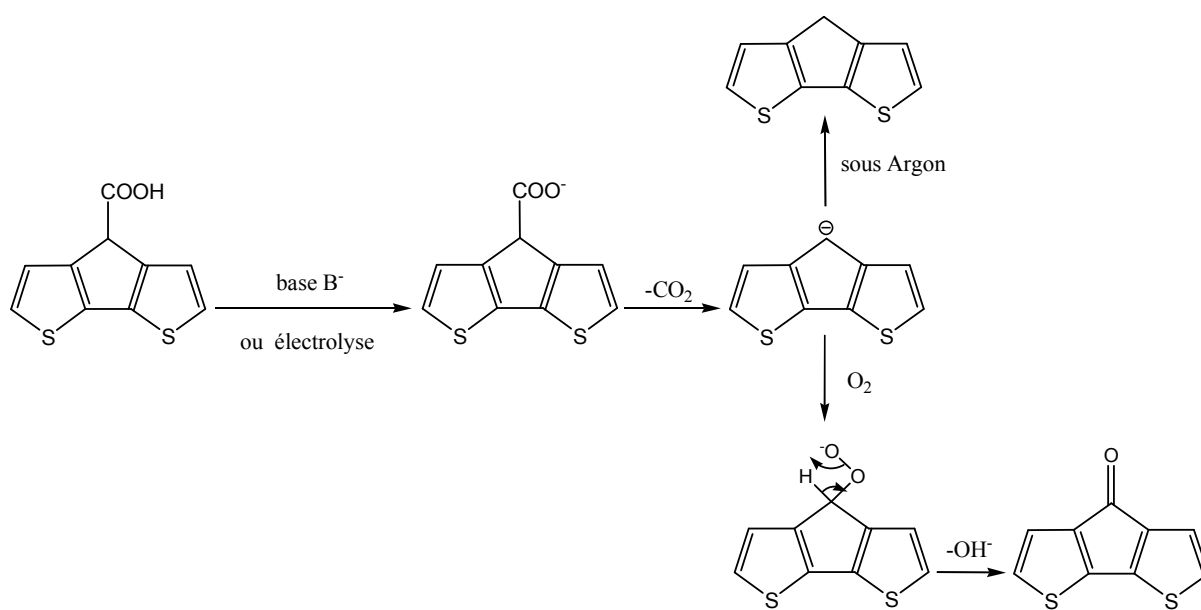


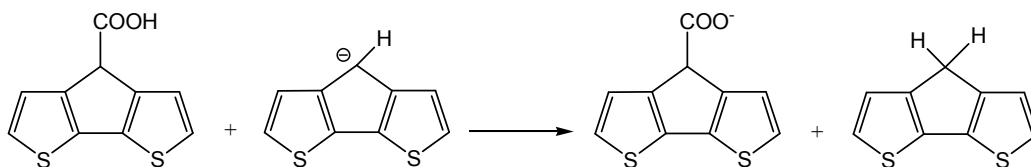
Schéma 1 : Synthèse du 4H-cyclopenta[2,1-b ;3,4-b']dithiophène

La dernière étape en revanche est originale et consiste en une décarboxylation de l'acide 4-(4H-cyclopenta[2,1-b; 3,4-b']dithiophène)carboxylique conduisant au produit hydrogéné sous atmosphère inerte ou à la cétone en position pontée sous atmosphère d'oxygène<sup>172</sup> (Schéma 2). Une décarboxylation similaire est observée avec l'acide 9-fluorène carboxylique. Sur la base de travaux préliminaires, nous avons établi que cette réaction consiste en la décarboxylation spontanée de l'anion carboxylate obtenu par réduction de l'acide carboxylique correspondant ou par l'action d'une base. Des études antérieures semblent indiquer qu'un tel comportement pourrait être observé avec tous les acides diarylacétiques cycliques conjugués<sup>173,174</sup>.

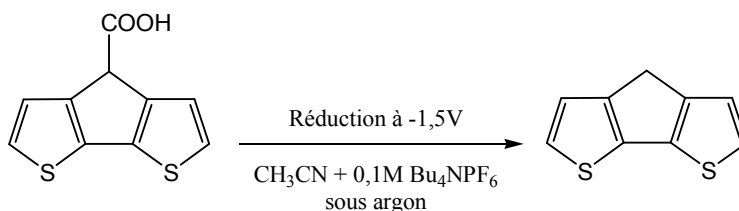


**Schéma 2 : Décarboxylation de l'acide 4-(4H-cyclopenta[2,1-b; 3,4-b']dithiophène)carboxylique**

Par voie électrochimique, la réaction de décarboxylation qui s'effectue via l'anion carboxylate, consomme moins d'un électron par molécule en accord avec un processus catalytique suggérant la participation du carbanion intermédiaire.

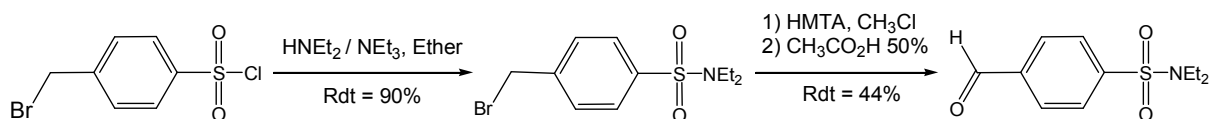


Dans le cas de l'acide 4-(4H-cyclopenta[2,1-b; 3,4-b']dithiophène)carboxylique, une électrolyse à -1,5V par rapport au système  $\text{Ag}|\text{Ag}^+$  consomme 0,2 électron par molécule et conduit quantitativement au produit hydrocarboné correspondant.



### I.2. Synthèse du 4-(diéthylsulfonyl)benzaldéhyde et préparation du composé $\text{M}_i$

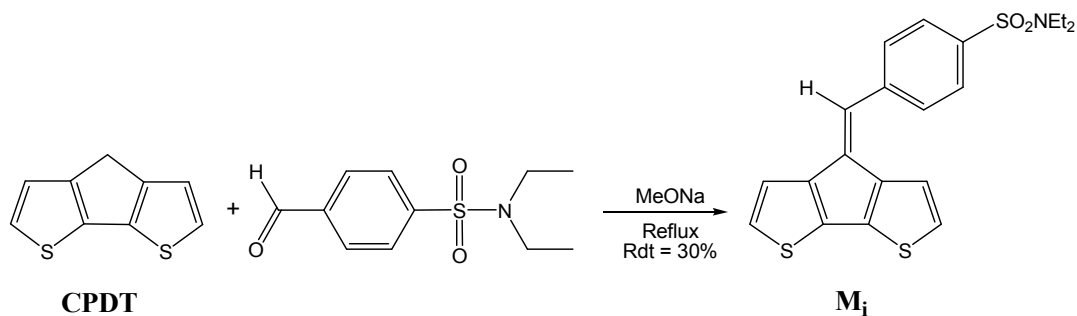
Le 4-(diéthylsulfonyl)benzaldéhyde est synthétisé en 2 étapes avec un rendement global de 43% (Schéma 3). La première étape est une substitution nucléophile du chlore de la fonction chlorure de sulfonyle par la diéthylamine conduisant à un groupe arylsulfonamide avec un rendement de 99%. Cette première réaction constitue une étape de protection du chlorure de sulfonyle. La seconde étape est une oxydation du bromure d'alkyle en aldéhyde avec un rendement de 44%.



**Schéma 3 : Synthèse du 4-(diéthylsulfonyl)benzaldéhyde**

Le monomère  $\text{M}_i$  est obtenu par attaque nucléophile de l'anion du CPDT sur le carbone électrophile de la fonction aldéhyde avec un rendement de 30% après purification par chromatographie sur gel de silice.

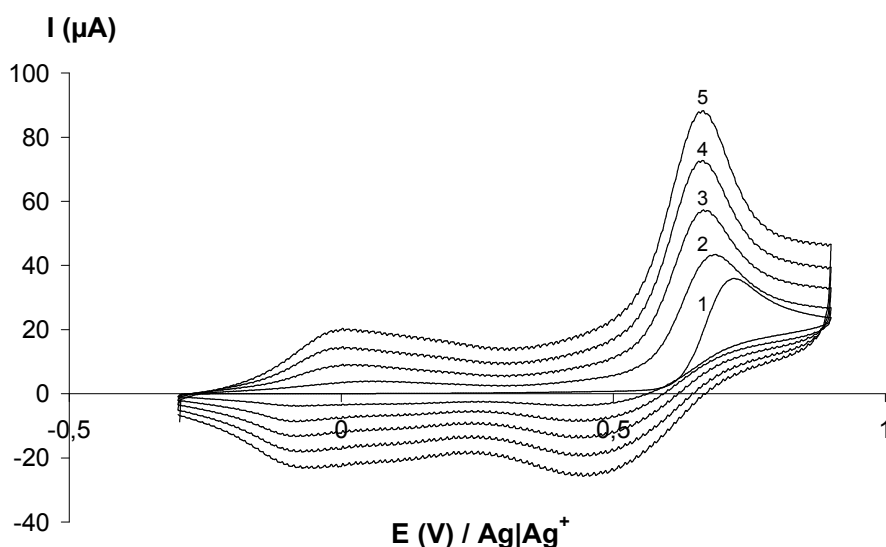



 Schéma 4 : Synthèse du monomère M<sub>i</sub>

## II. Formation et étude électrochimique du poly(M<sub>i</sub>)

### II.1. Formation du poly(M<sub>i</sub>)

Les films de poly(M<sub>i</sub>) sont formés par voltamétrie cyclique au cours de balayages récurrents du potentiel enregistrés entre -0,3V et +0,9V sur une électrode de platine ( $\phi=1\text{mm}$  ou quartz platiné  $\phi=5\text{mm}$ ) plongée dans une solution d'acétonitrile contenant 10mM du monomère M<sub>i</sub> et 0,1M de Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub> employé comme sel de fond. La solution électrolytique est préalablement séchée sur alumine activée et la formation des films polymères est réalisée sous atmosphère inerte.


 Figure II-1 : Voltamétrie cyclique

5 voltammogrammes cycliques enregistrés sur une électrode de Pt ( $\phi=1\text{mm}$ ) plongée dans une solution contenant le monomère M<sub>i</sub> (10mM) dans CH<sub>3</sub>CN + 0,1M Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub> (vitesse de balayage, 100 mV.s<sup>-1</sup>). La charge de synthèse mesurée à l'état neutre est de 85,7mCcm<sup>-2</sup>.

Au premier balayage du potentiel, un pic d'oxydation correspondant à la formation du radical cation  $M_i^{+\bullet}$  au voisinage de l'électrode, est enregistré à +0,7V. Lors du deuxième balayage, un système réversible localisé à des potentiels inférieurs à celui de l'oxydation du monomère  $M_i$  apparaît ; il est attribuable au dopage p du polymère formé. L'augmentation très importante de l'intensité du courant observée à chaque balayage supplémentaire témoigne d'une croissance rapide du film de polymère à l'électrode et un dépôt vert est observé à l'issue des cinq voltammogrammes cycliques.

## II.2. Comportement anodique du poly( $M_i$ ) en milieu organique

Après avoir été soigneusement rincé dans l'acétonitrile, le dépôt réalisé précédemment est étudié dans une cellule ne contenant que l'électrolyte support  $Bu_4NPF_6$  à 0,1M en solution dans de l'acétonitrile préalablement séché sur alumine activée. Les études sont effectuées sous atmosphère d'argon.

La figure II-2 correspond à la superposition de quatre voltammogrammes cycliques enregistrés à  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  de -0,3V à +0,7V, lors du processus de dopage p du poly( $M_i$ ).

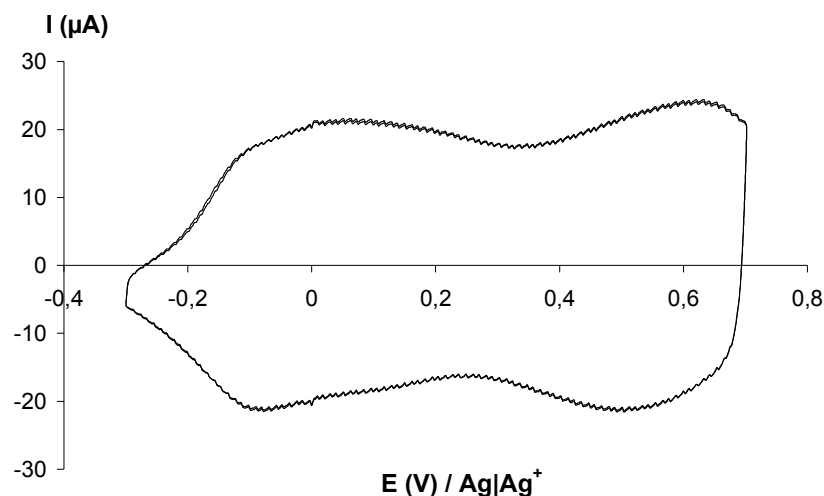


Figure II-2 : Voltamétrie cyclique

**4 voltammogrammes cycliques enregistrés sur une électrode de Pt ( $\phi=1\text{mm}$ ) recouverte du film poly( $M_i$ ) précédemment obtenu. Le film de polymère est plongé dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M } Bu_4NPF_6$  (vitesse de balayage,  $100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ). La charge  $Q_p$  est de  $22,0\text{mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ .**

Le polymère présente une électroactivité sur une large gamme de potentiels à partir de -0,2V avec un taux de dopage  $\delta_p$  important de 40% (pour un rendement d'électrosynthèse estimé à 100%), mesuré à  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  entre -0,3V et +0,7V.

En général, les taux de dopage  $p$  en milieu organique rapportés dans la littérature pour des matrices polythiophène sont voisins de 25 %, indiquant que la répartition statistique des charges positives est de une pour quatre unités monomères. Le taux de dopage  $p$ , anormalement élevé, mesuré pour le poly( $M_i$ ), suggère la participation de la double liaison exocyclique au processus de dopage  $p$  comme Zotti et col. l'ont établi<sup>175</sup>.

### II.3. Comportement cathodique du poly( $M_i$ ) en milieu organique

L'électroactivité du poly( $M_i$ ) est également étudiée dans la fenêtre des potentiels négatifs. Cinq voltammogrammes cycliques sont enregistrés à  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  de  $-0,7\text{V}$  à  $-2\text{V}$  sur une électrode de travail de platine recouverte d'un dépôt de poly( $M_i$ ).

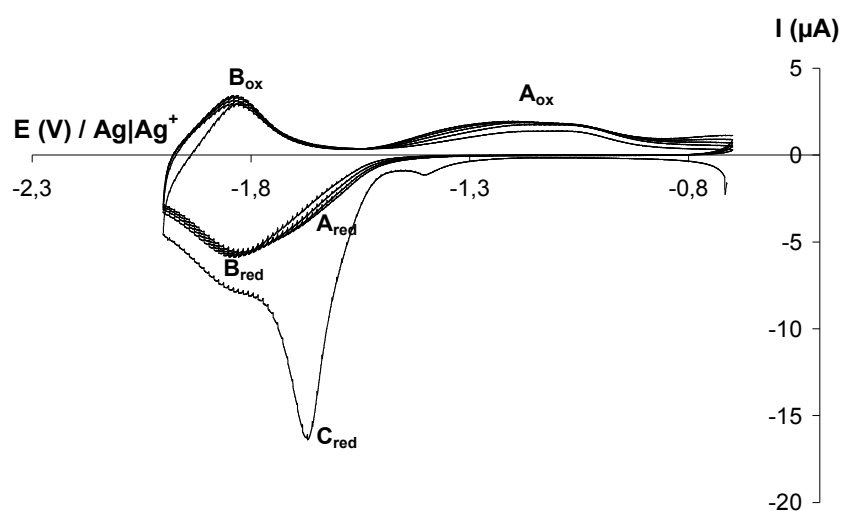


Figure II-3 : Voltamétrie cyclique

**5 voltammogrammes cycliques enregistrés sur une électrode de Pt ( $\phi=1\text{mm}$ ) recouverte d'un film poly( $M_i$ ) ( $Q_s=30,7\text{mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Le film de polymère est plongé dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  (vitesse de balayage,  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ).**

Lors du premier balayage des potentiels, un pic de réduction irréversible ( $C_{\text{red}}$ ) est enregistré à  $-1,7\text{V}$ . Ce signal, qui disparaît dès le second balayage, ne correspond pas à un pic de rémanence souvent observé pour les polymères conducteurs, car il n'est pas restauré après une polarisation positive de la matrice. Ce système serait compatible avec la coupure biélectronique de la liaison S-N en accord avec les résultats présentés aux chapitres précédents.

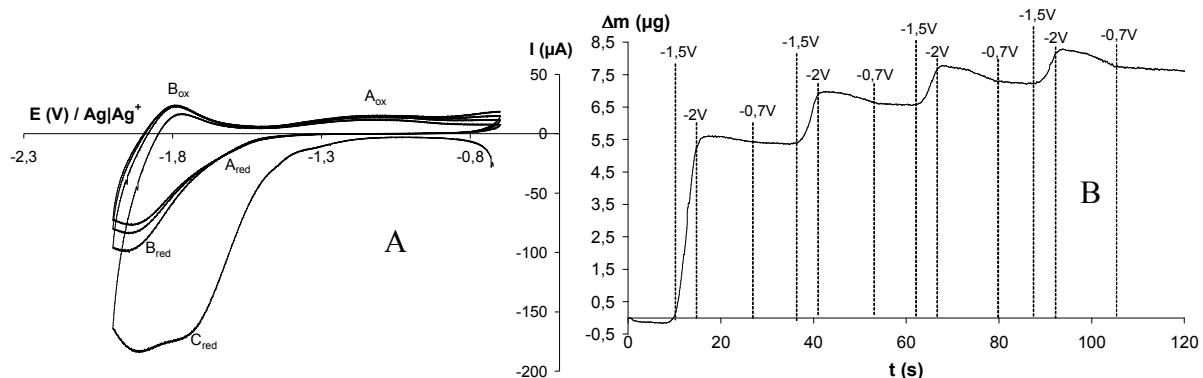
A partir du deuxième balayage, la vague de réduction irréversible notée C n'est plus visible et deux nouveaux systèmes notés A et B peuvent être identifiés.

Le système A consistant en un léger épaulement enregistré à partir de -1,5V lors de l'augmentation du courant cathodique, est associé au courant de réoxydation enregistré entre -1,5V et -0,8V au balayage retour. L'écart en potentiel de pic à pic, voisin de 500mV, est caractéristique d'un système électrochimique quasi-irréversible. Un système comparable a déjà été observé par Zotti et col.<sup>175</sup> au cours de l'étude d'un film de poly(CPDT)-ylidène et a été attribué à un processus de réticulation réversible impliquant une dimérisation des chaînes au niveau du pont méthylidène.

Le système B, localisé vers -1,85V, est réversible et parfaitement symétrique en accord avec le comportement d'un système électrochimique immobilisé. Un tel système est caractéristique du processus de dopage n du film de poly(M<sub>i</sub>) déposé à la surface de l'électrode de travail. Le dopage n apparaît stable sur l'enregistrement de cinq voltammogrammes cycliques et il est remarquable d'observer que la spécificité du motif M<sub>i</sub> permet de conserver l'intégrité de la matrice poly(M<sub>i</sub>) après la coupure des fonctions sulfonamide.

Bien que le système  $A_{red}/A_{ox}$  ne permette pas de déterminer avec précision le début du dopage n, l'écart en potentiel entre les processus de dopage p et n est voisin de 1V, en accord avec une bande d'énergie interdite entre la bande de valence (BV) et la bande de conduction (BC) proche de 1eV. Une bande d'énergie interdite étroite entre la BV et la BC traduit une bonne conductivité intrinsèque du matériau à l'état dopé.

Lorsque l'électrode de travail consiste en un cristal de quartz platiné, il est possible de suivre l'évolution de la masse du film simultanément à l'enregistrement de voltammogrammes cycliques (Figures II-4 A et B).



**Figure II-4 : Voltamétrie cyclique et variation consécutive de la masse**

**4 voltammogrammes cycliques enregistrés sur un cristal de quartz platiné ( $\phi=5\text{mm}$ ) recouvert d'un film de poly( $M_i$ ) ( $14,0\mu\text{g}$ ). Le film de polymère est plongé dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  (vitesse de balayage,  $100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ).**

**B : variation de la masse enregistrée simultanément aux voltammogrammes cycliques.**

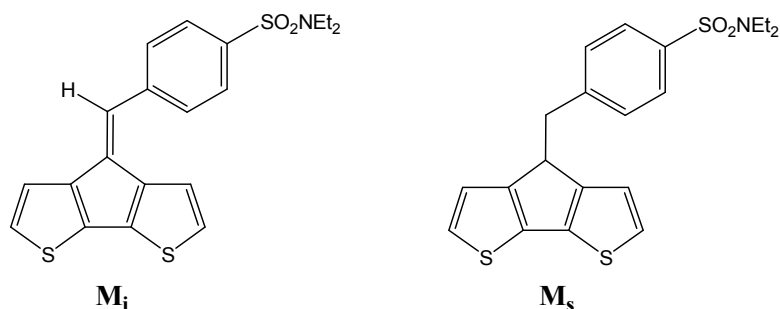
La figure II-4B montre les variations de la masse d'un film de poly( $M_i$ ) au cours de l'enregistrement des voltammogrammes cycliques présentés à la figure II-4A.

Au cours de l'enregistrement du premier cycle du potentiel, on observe une augmentation importante de la masse pour des potentiels correspondant à la vague de réduction C. Ce résultat est compatible avec la coupure cathodique de la liaison S-N des fonctions sulfonamide, associée à l'entrée de cations  $\text{Bu}_4\text{N}^+$  assurant l'électroneutralité. A partir du second cycle du potentiel, les variations de la masse sont attribuables au processus de dopage n. Comparé au comportement électrochimique du poly( $M_i$ ) présenté au chapitre 1, la matrice poly( $M_i$ ) montre des propriétés de conduction très différentes. En raison des analogies de structures présentes dans les composés  $M_i$  et  $M_1$ , il apparaît utile de discuter des changements de comportements entre les matrices correspondantes en terme de relations structure-propriétés. Ainsi, la voltamétrie cyclique appliquée à l'étude du poly( $M_i$ ) montre que la réduction des fonctions arylsulfonamides intervient vers  $-1,7\text{V}$ , au pied du dopage n, contrairement au cas du poly( $M_1$ ) pour lequel la réduction des fonctions arylsulfonamides a lieu vers  $-2,6\text{V}$ , au-delà du processus de dopage n.

Ces modifications du comportement cathodique suggèrent qu'une meilleure communication électronique est établie entre la chaîne principale du poly( $M_i$ ) et les groupes électroactifs par l'intermédiaire d'une chaîne conjuguée<sup>156</sup>.

Pour mieux apprécier et comprendre la contribution de la chaîne latérale à l'exaltation des propriétés de conduction de la matrice poly( $M_i$ ), la synthèse et l'étude d'un polymère obtenu à

partir d'un analogue saturé du monomère  $M_i$  (le monomère  $M_s$ ), nous a semblé intéressante (Schéma 5). Ainsi, nous allons pouvoir comparer le comportement électrochimique du poly( $M_s$ ) avec celui du poly( $M_i$ ) et examiner le changement de comportement en fonction de la nature du contact électronique entre la fonction d'ancrage et la chaîne principale du polymère.



**Schéma 5 : Les monomères  $M_i$  et  $M_s$**

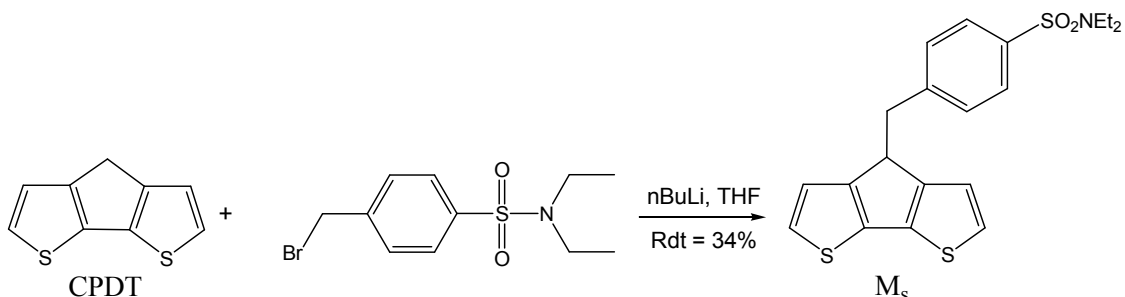
#### **II.4. Apport de la connexion électronique entre la chaîne principale du polymère et la fonction d'ancrage électroactive**

Depuis les années 70, les molécules aromatiques ont investi le domaine des matériaux pour l'électronique<sup>176</sup>. Rapidement, l'apport de la chimie fine a permis l'accès à des motifs fonctionnalisés autorisant le développement de dispositifs moléculaires variés. La plupart des applications visées nécessitent l'emploi de supports conducteurs qui consistent en une chaîne principale aromatique prolongée par une chaîne latérale terminée par un groupe fonctionnel. Le rôle de cette chaîne latérale est essentiel puisqu'elle permet de contrôler la distance entre les chaînes polymères<sup>177</sup>, d'assurer la conduction interchaîne<sup>159</sup> ou d'ajuster la balance hydrophobe-hydrophile de la matrice<sup>132</sup>.

Afin d'optimiser l'utilisation de ces architectures organiques dans le domaine des biocapteurs électrochimiques, la compréhension du transfert électronique à travers cette chaîne carbonée a un intérêt fondamental. Ainsi, les différences de comportement électrochimique entre le poly( $M_i$ ) et le poly( $M_s$ ) seront mises en relation avec la nature de la connexion électronique entre la chaîne principale et la fonction terminale électroactive.

Le monomère  $M_s$  est obtenu par substitution nucléophile du brome du 4-bromométhyl-N,N-diéthylbenzènesulfonamide par l'anion du CPDT avec un rendement de 34%.

Les synthèses du CPDT et du 4-bromométhyl-N,N-diéthylbenzènesulfonamide ont été décrites dans les paragraphes I.1. et I.2., respectivement.



#### II.4.1 Effet de la communication électronique établie par la chaîne latérale sur l'oxydation du polymère

Le poly( $M_s$ ) est formé par oxydation sur électrode de platine d'une solution électrolytique d'acétonitrile contenant le composé  $M_s$  à 10mM. La figure II-5 montre la superposition de 20 voltammogrammes cycliques enregistrés entre -0,4V et +0,8V à  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  lors de la formation d'un film de poly( $M_s$ ).

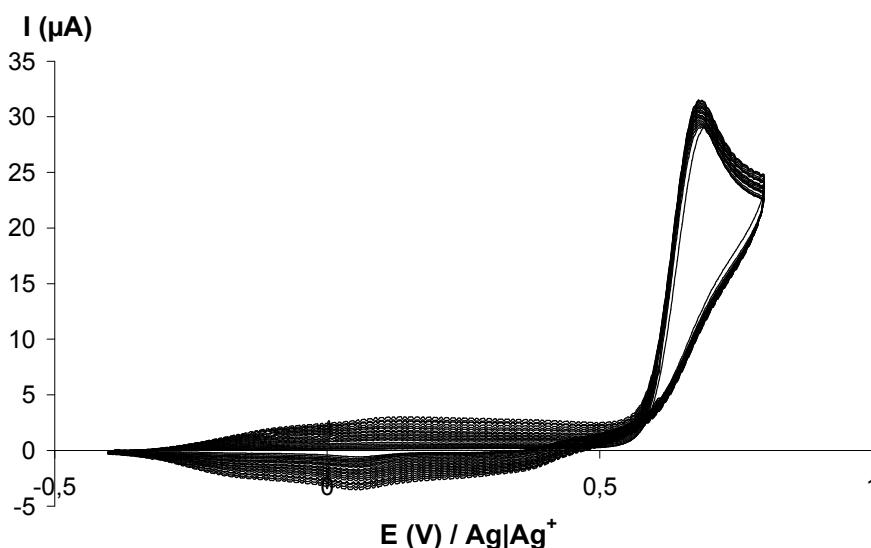


Figure II-5 : Voltamétrie cyclique

20 voltammogrammes cycliques enregistrés sur une électrode de Pt ( $\phi=1\text{mm}$ ) plongée dans une solution contenant le monomère  $M_s$  (10mM) dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  (vitesse de balayage,  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ). La charge de synthèse mesurée à l'état neutre est de  $197\text{mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

Comparée à celle observée sur les voltammogrammes cycliques enregistrés lors de la formation d'un film de poly( $M_i$ ) (Figure II-1), l'efficacité du processus de polymérisation pour le composé  $M_s$  est médiocre, comme l'atteste la très faible croissance du courant d'oxydation au cours des balayages successifs. Une telle différence de comportement indique que les propriétés électrochimiques des composés  $M_s$  et  $M_i$  sont étroitement liées à la structure du bras espaceur. Pour le cas du monomère  $M_i$ , la meilleure efficacité d'électropolymérisation est probablement attribuable à une meilleure organisation des chaînes de polymères due aux interactions interchaînes  $\pi$ - $\pi$  plus importantes en raison du squelette conjugué plus étendu.

Par ailleurs, le pic correspondant à l'oxydation du monomère  $M_s$  (localisé à  $E=+0,69V$ ) intervient à un potentiel légèrement inférieur à celui attribuable à l'oxydation du monomère  $M_i$  (localisé à  $E=+ 0,73V$ ). En effet, pour le cas du composé  $M_i$ , l'unité CPDT est liée au groupement électroattracteur arylsulfonamide par l'intermédiaire d'une chaîne carbonée conjuguée qui exalte le contact électronique et abaisse ainsi la densité de spin sur l'unité polymérisable en accord avec une oxydation plus difficile.

Les effets d'une communication électronique le long de la chaîne latérale conjuguée se font également ressentir sur l'oxydation des chaînes du polymère.

Un voltammogramme cyclique enregistré sur un film de poly( $M_s$ ) entre  $-0,4V$  et  $+0,5V$  dans une solution électrolytique d'acétonitrile ne contenant pas le monomère est superposé à un voltammogramme cyclique enregistré sur un film de poly( $M_i$ ) entre  $-0,3V$  et  $+0,7V$  dans les mêmes conditions (Figure II-6).



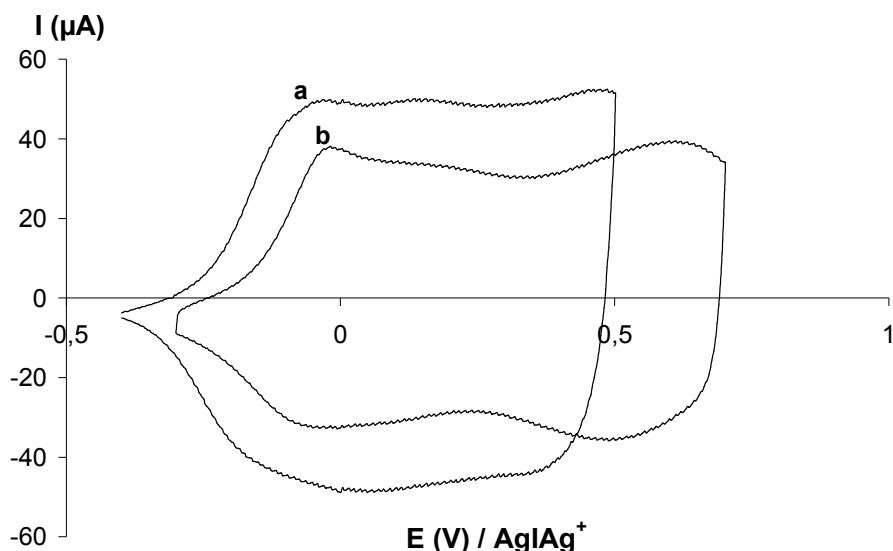


Figure II-6 : Voltamétrie cyclique

Voltammogrammes cycliques enregistrés sur un film de poly( $M_s$ ), courbe a et de poly( $M_i$ ), courbe b, dans une solution de  $Bu_4NPF_6$  ne contenant pas de monomère (vitesse de balayage des potentiels :  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Les électrodes de travail sont des disques de platine ( $\phi=1\text{mm}$ ) modifiés par oxydation de solutions de concentration  $10\text{mM}$  en  $M_s$  (50 cycles de potentiel à  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  entre  $-0,4\text{V}$  et  $+0,8\text{V}$ ) et  $M_i$  (15 cycles de potentiel à  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  entre  $-0,3\text{V}$  et  $+0,9\text{V}$ ).

La figure II-6 montre que le dopage p du poly( $M_i$ ) est déplacé vers les potentiels positifs par rapport au poly( $M_s$ ), en accord avec une densité électronique plus faible sur les chaînes aromatiques principales du poly( $M_i$ ) conduisant à une oxydation plus difficile du polymère. En outre, comme cela a déjà été évoqué, il est remarquable d'observer que la chaîne latérale conjuguée participe également au processus de dopage p et contribue à augmenter le stockage des charges. Ainsi, les taux de dopage p,  $\delta_p$ , pour les films poly( $M_s$ ) et poly( $M_i$ ) ont été évalués pour différents potentiels afin d'apprécier la contribution de la chaîne latérale au stockage des charges (Figure II-7).

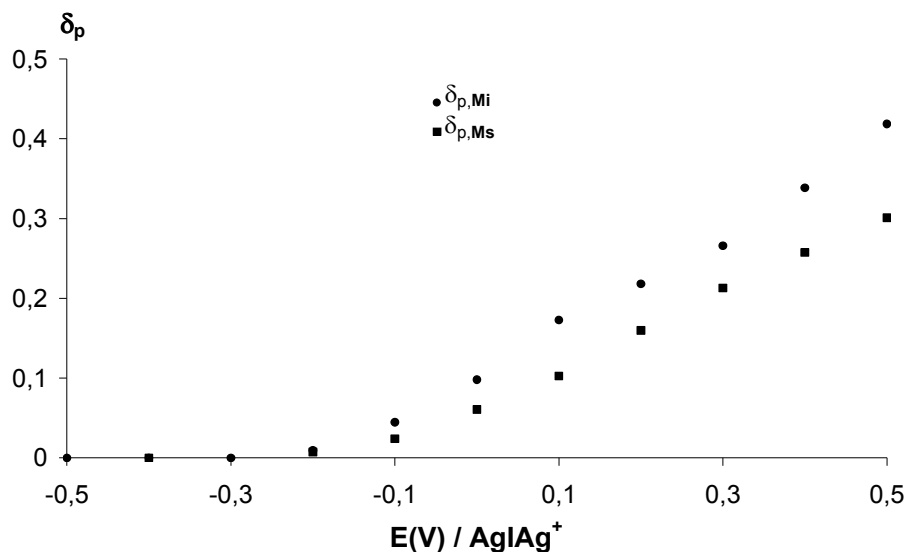


Figure II-7 : Variation du taux de dopage p avec le potentiel

Variation du taux de dopage p,  $\delta_p$ , en fonction de l'augmentation du potentiel à l'intérieur du processus de dopage p des films poly( $M_i$ ) (ronds) et poly( $M_s$ ) (carrés). Les électrodes de travail consistent en des cristaux de quartz platinés modifiés par oxydation de solutions contenant 10mM des monomères  $M_s$  (37 cycles de potentiel à  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  entre -0,4 et +0,8V,  $m=8,57\mu\text{g}$ ) ou  $M_i$  (7 cycles de potentiel à  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  entre -0,3 et +0,9V,  $m=14,04\mu\text{g}$ ).

Pour le calcul des taux de dopage p, deux dépôts sont formés sur des cristaux de quartz platinés par oxydation de solutions contenant 10mM de  $M_s$  (37 cycles de potentiel à  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  entre -0,4V et +0,8V,  $m=8,57\mu\text{g}$ ) ou  $M_i$  (7 cycles de potentiel à  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  entre -0,3 et +0,9V,  $m=14,04\mu\text{g}$ ). Chaque dépôt est oxydé à potentiel imposé pendant un temps suffisamment long pour permettre à la fréquence de se stabiliser. Puis, un potentiel de -0,5V est appliqué pour neutraliser le film avant qu'il soit à nouveau oxydé. Il est à noter que les mesures gravimétriques montrent pour les deux films des processus de dopage p réversibles, puisque la perte de masse enregistrée durant la neutralisation des films à -0,5V correspond exactement à la masse prise durant la polarisation positive du film. Le taux de dopage p,  $\delta_p$ , est calculé en supposant que la prise de masse observée consécutivement à l'oxydation correspond uniquement à l'entrée des anions dopants  $\text{PF}_6^-$  qui permettent d'assurer l'électroneutralité du film dopé. Pour les deux films, il apparaît que le taux de dopage p augmente linéairement avec le potentiel appliqué entre -0,1V et +0,5V, ce qui suggère que les matrices poly(cyclopentadithiophène) ne subissent aucune dégradation anodique dans cet intervalle de potentiels. Cependant les comportements des deux polymères sont différents

selon que le bras espaceur séparant la chaîne principale de la fonction d'ancrage est saturé ou insaturé. Quel que soit le potentiel d'oxydation appliqué, le taux de dopage  $p$  du poly( $M_i$ ) est plus élevé que celui du poly( $M_s$ ) en accord avec la participation de la double liaison méthylidène qui constitue une position oxydable supplémentaire conduisant à une augmentation du taux de dopage  $p$ <sup>175</sup>.

#### II.4.2 Effet de la communication électronique établie par la chaîne latérale sur la réduction du polymère

Comme nous venons de le voir, les comportements anodiques du poly( $M_i$ ) et du poly( $M_s$ ) sont étroitement connectés à la nature du contact électronique établi par la chaîne latérale carbonée. Cependant les changements de comportement les plus remarquables sont observés dans la fenêtre des potentiels négatifs.

La figure II-8 montre la superposition de voltammogrammes cycliques enregistrés sur un film de poly( $M_s$ ), pour deux valeurs différentes du potentiel cathodique de retour et sur un film de poly( $M_i$ ).

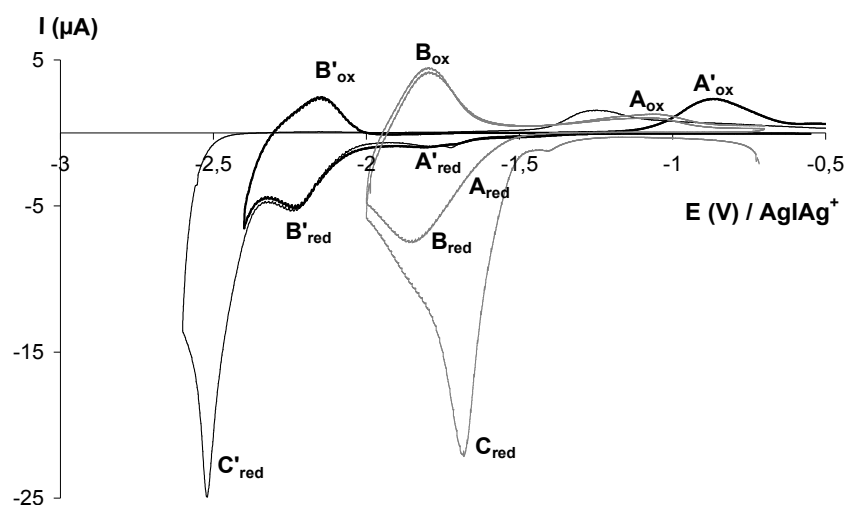


Figure II-8 : Voltamétrie cyclique

Voltammogrammes cycliques enregistrés sur une électrode de Pt ( $\phi=1\text{mm}$ ) recouverte du film poly( $M_s$ ) précédemment obtenu (courbes noires) ou d'un film de poly( $M_i$ ) (courbe grise). Le film de polymère est plongé dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  (vitesse de balayage,  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Ces mesures voltamétriques montrent le comportement cathodique du poly( $M_s$ ) pour deux valeurs du potentiel cathodique de retour :  $-2,4\text{V}$  (courbe noire, trait gras) et  $-2,6\text{V}$  (courbe noire, trait fin), comparé au comportement cathodique du poly( $M_i$ ) (courbe grise).

Pour les deux films, un système quasi réversible (noté A ou A'), un système réversible (noté B ou B') et un système irréversible (noté C ou C') sont observables. Les systèmes électrochimiques primés sont attribuables au poly(M<sub>s</sub>). Le comportement cathodique du poly(M<sub>i</sub>) a été décrit à la section II-3 de ce chapitre et n'est rapporté qu'à titre comparatif.

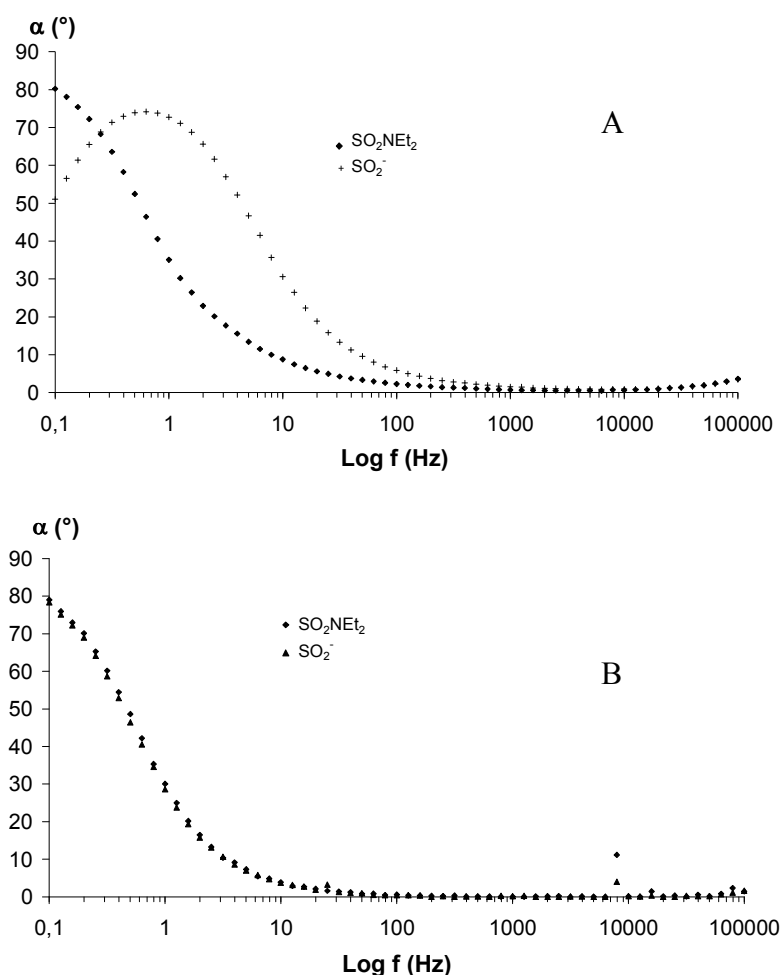
Pour le cas du poly(M<sub>s</sub>), le système quasi-réversible A', localisé avant le système réversible B' attribuable au processus de dopage n, n'est observable que pour des films fins. Ce signal peut être attribué à la réduction ou à l'abstraction de protons acides cyclopentadiénique conduisant à des polyanions comme cela a déjà été évoqué par Zotti et col. au cours de l'étude du comportement électrochimique de matrices poly[(RH)CPDT]<sup>178</sup>.

La figure II-8 montre que la perte de communication électronique entre la chaîne principale du polymère et le groupe réductible a des conséquences dramatiques sur la coupure de la liaison S-N et sur l'intégrité de la matrice, comme l'attestent la diminution du potentiel de coupure et la perte de réversibilité du dopage n au balayage retour pour le cas du poly(M<sub>s</sub>). En effet, la réversibilité du dopage n est conservée uniquement si le potentiel de retour reste supérieur à -2,4V. En revanche, lorsque le sens de balayage des potentiels est inversé à -2,6V, la vague associée à la neutralisation des chaînes de polymères préalablement réduites (B<sub>ox</sub>) disparaît, en accord avec une dégradation cathodique de la matrice.

Par ailleurs, dans le cas du poly(M<sub>s</sub>), le système irréversible C', compatible avec la coupure cathodique de la liaison S-N apparaît après le processus de dopage n, comparé au cas du poly(M<sub>i</sub>) où le système C apparaît au pied du dopage n. Ainsi, lorsque la chaîne latérale est conjuguée, la coupure est déplacée vers les potentiels positifs et la réduction des fonctions sulfonamide semble être induite par la charge introduite au cours du dopage n.

La comparaison des comportements cathodiques du poly(M<sub>s</sub>) et du poly(M<sub>i</sub>) semble indiquer que la connexion électronique établie dans le cas du poly(M<sub>i</sub>) par la chaîne latérale  $\pi$ -conjuguée permet au dopage n de jouer le rôle de médiateur redox pour la réduction des fonctions sulfonamide. Un tel exemple de catalyse par le dopage n constitue à notre connaissance une contribution originale.

Les effets du traitement cathodique sur les propriétés de conduction des matrices poly( $M_s$ ) et poly( $M_i$ ) sont présentés à la figure II-9. Deux mesures d'impédance sont réalisées, l'une sur un film de poly( $M_s$ ) ayant subi un balayage des potentiels de -0,5V à -2,6V (Figure II-9A), et l'autre sur un film de poly( $M_i$ ) ayant subi quatre balayages des potentiels de -0,7V à -2V (Figure II-9B), à  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .



**Figure II-9 : Diagrammes de Bode**

**A :** Variations du déphasage enregistrées à +0,2V sur une électrode de Pt ( $\phi=1\text{mm}$ ) recouverte d'un film de poly( $M_s$ ) et plongée dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  avant (losanges) et après coupure cathodique (croix) des liaisons S-N du polymère (1 cycle de potentiel entre -0,5V et -2,6V).

**B :** Variations du déphasage enregistrées à +0,7V sur un cristal de quartz platiné ( $\phi=5\text{mm}$ ) recouvert d'un film de poly( $M_i$ ) et plongé dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  avant (losanges) et après coupure cathodique (triangles) des liaisons S-N du polymère (4 cycles de potentiel entre -0,7V et -2V).

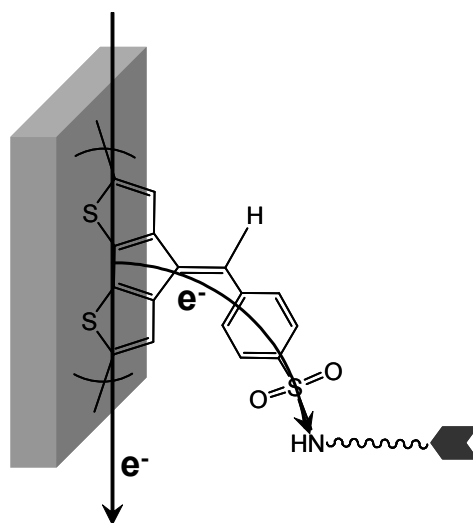
Les courbes du déphasage en fonction de la fréquence montrent, à la figure II-9A, deux comportements différents, selon que le film de poly( $M_s$ ) a été soumis ou non à la réduction des liaisons S-N des fonctions sulfonamide. Le film non modifié (losanges, Figure II-9A) présente un processus de relaxation à basse fréquence correspondant au dopage p dans le volume du poly( $M_s$ ). Après traitement cathodique (croix, Figure II-9A), ce phénomène de charge localisé à 0,1Hz disparaît et un autre processus plus rapide, localisé à 1Hz, apparaît. Ce déplacement du maximum de  $\alpha$  vers les hautes fréquences met en évidence le changement de comportement du poly( $M_s$ ) occasionné par la surréduction de la matrice.

La figure II-9B montre en revanche une courbe de déphasage avant réduction des liaisons S-N identique à celle enregistrée après traitement. Il apparaît ainsi que la formation des anions sulfinate n'entraîne pas de changement des propriétés de conduction de la matrice de poly( $M_i$ ).

Ainsi, la matrice poly( $M_i$ ) semble présenter les caractéristiques requises pour l'immobilisation d'ADN et le diagnostic électrochimique de l'hybridation grâce à sa bonne électroactivité après modification. Par ailleurs, le déplacement de la vague de coupure vers des potentiels plus accessibles laisse entrevoir la possibilité de libérer l'ADN en milieu physiologique.

### **III. Vers de nouveaux actionneurs électrochimiques**

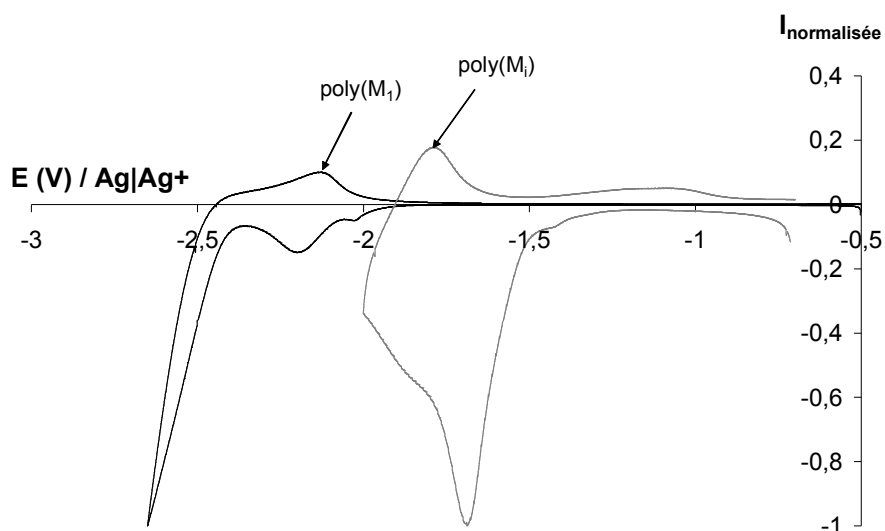
Comme le suggère le Schéma 6, la conduction électronique au sein du poly( $M_i$ ) peut se faire soit le long de la chaîne principale, soit le long de la chaîne latérale conjuguée, communiquant ainsi avec la fonction sulfonamide électroclivable.



**Schéma 7 : Communication électronique au sein du poly( $M_i$ )**

Ce lien sulfonamide, par lequel le matériel génétique est immobilisé, est ainsi très activé puisqu'il est sensible à une introduction d'électrons dans la chaîne principale en raison de la délocalisation électronique sur l'ensemble du motif  $M_i$ .

La superposition des deux voltammogrammes présentés à la figure II-10 met en évidence le déplacement vers les potentiels positifs de la vague de réduction des fonctions sulfonamide du motif  $M_i$  par rapport au motif  $M_1$  présenté dans la première partie du manuscrit.



**Figure II-10 : Voltamétrie cyclique**

**Voltammogrammes cycliques enregistrés sur des électrodes de Pt ( $\phi=1\text{mm}$ ) recouvertes d'un film de poly( $M_1$ ) (courbe noire) ou de poly( $M_i$ ) (courbe grise).**

La comparaison entre les deux voltammogrammes souligne l'importance de la conjugaison entre la chaîne principale et la fonction électroclivable. Pour le cas du poly( $M_i$ ), il est ainsi raisonnable d'attendre une meilleure conservation de la matrice lors de la réduction en milieu physiologique.

# *Chapitre 5*





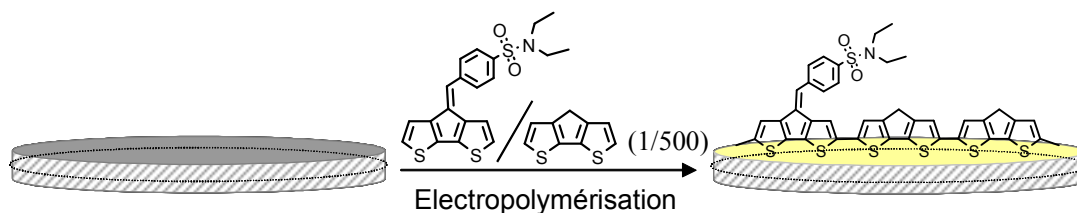
# Chapitre 5 :

## Elaboration de supports de type poly(cyclopentadithiophène) autorisant la lecture électronique de l'hybridation

### I. Préparation et étude des supports polymères conducteurs

#### I.1. Formation du copolymère

Pour l'électrosynthèse des supports conducteurs permettant l'immobilisation d'ADN, le monomère  $M_i$  est copolymérisé avec un monomère de structure proche et ne possédant pas de fonction d'ancrage : le CPDT.

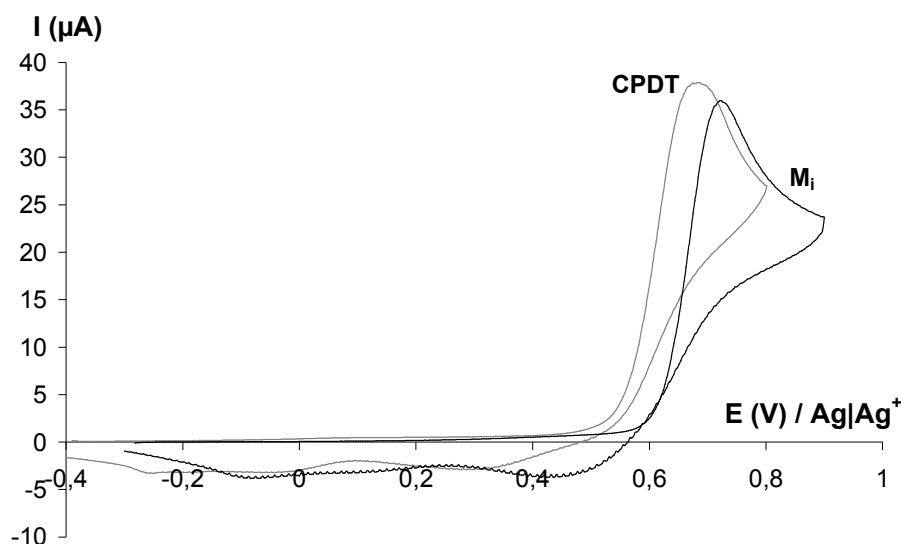


**Schéma 8 : Formation des supports polymères conducteurs**

Une telle dilution des fonctions terminales arylsulfonamides a pour effet de minimiser les contraintes stériques lors de l'étape d'immobilisation des brins d'ADN sondes.

En pratique, le copolymère poly( $M_i$ -co-CPDT) est synthétisé par électrooxydation d'un mélange des monomères  $M_i$  ( $C=0,02\text{mM}$ ) et CPDT ( $C=10\text{mM}$ ) en proportions molaires 1/500. Le film est formé sous atmosphère d'argon en cyclant les potentiels entre  $-0,4\text{V}$  et  $+0,75\text{V}$  par rapport à  $\text{Ag|Ag}^+$  à  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

La composition du copolymère doit être proche de celle du mélange de ses constituants en solution, comme le suggère le faible écart entre les potentiels d'oxydation des co-monomères. En effet, les voltammogrammes cycliques rapportés à la figure II-11 montrent que le CPDT et le monomère  $M_i$  ont des potentiels d'oxydation de  $0,69\text{V}$  et  $0,73\text{V}$ , respectivement.



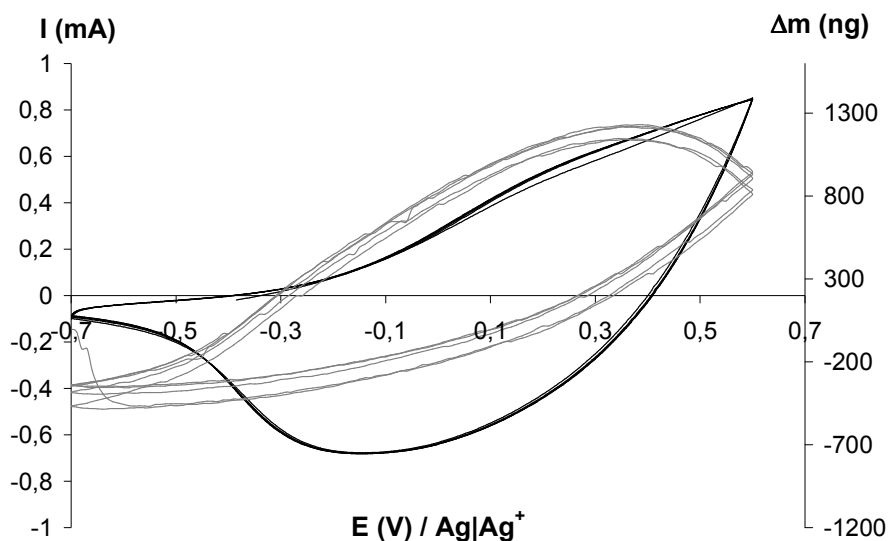
**Figure II-11 : Voltamétrie cyclique**

Superposition de deux voltammogrammes cycliques enregistrés sur une électrode de Pt ( $\phi=1\text{mm}$ ) plongée dans une solution contenant les monomères CPDT (courbes grise) et  $M_i$  (courbe noire) à 10mM dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  (vitesse de balayage,  $100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Lorsque l'électrode de travail consiste en un cristal de quartz platiné, la masse totale de film formé,  $m_{\text{film}}$ , au terme de 30 voltammogrammes cycliques, est de  $10,4\mu\text{g}$ .

### **I.2. Etude du comportement anodique du poly( $M_i$ -co-CPDT)**

Le film préalablement formé sur cristal de quartz platiné est rincé soigneusement dans l'acétonitrile et son comportement anodique est étudié dans une solution électrolytique d'acétonitrile contenant 0,1M de  $\text{Bu}_4\text{NPF}_6$ . La figure II-12 montre quatre voltammogrammes cycliques enregistrés à  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  entre -0,7V et +0,6V, courbes noires, superposés aux variations concomitantes de la masse, courbes grises.



**Figure II-12 : Voltamétrie cyclique et variation consécutive de la masse**

**Courbe noire :** 4 voltammogrammes cycliques enregistrés sur un cristal de quartz platiné ( $\phi=5\text{mm}$ ) recouvert du film poly( $M_i$ -co-CPDT) précédemment obtenu. Le film de polymère est plongé dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  (vitesse de balayage,  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

**Courbe grise :** variation de la masse enregistrée simultanément aux voltammogrammes cycliques.

Le courant d'oxydation enregistré à partir de  $-0,3\text{V}$  au balayage aller et associé au courant de réduction enregistré au balayage retour, correspond au dopage p des chaînes polymères. La bonne stabilité du dopage p du poly( $M_i$ -co-CPDT) dans la gamme de potentiels étudiée est mise en évidence par la stabilité du courant d'oxydation enregistré.

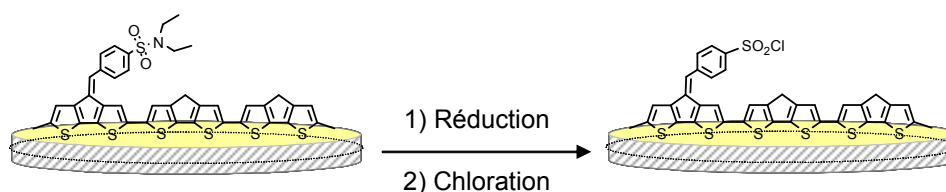
L'augmentation de la masse observée au balayage aller et la perte de masse enregistrée au balayage retour correspondent à l'entrée puis à la sortie d'agents dopants provenant de la solution électrolytique. En outre, les variations réversibles de la masse enregistrées aux balayages aller et retour sont en accord avec une bonne réversibilité du dopage p.

Par ailleurs, ces variations de la masse permettent également d'avoir accès au taux de dopage p. Ainsi, puisqu'il a été établi que seuls les anions  $\text{PF}_6^-$  assurent l'électroneutralité des chaînes,  $\delta_p$  peut être déterminé comme suit :

$$\delta_p = \frac{\frac{m_{\text{PF}_6^-}}{M_{\text{PF}_6^-}}}{\frac{m_{\text{film}}}{M_{\text{moy}}}} = 15\%$$

## II. Fonctionnalisation des supports par de l'ADN

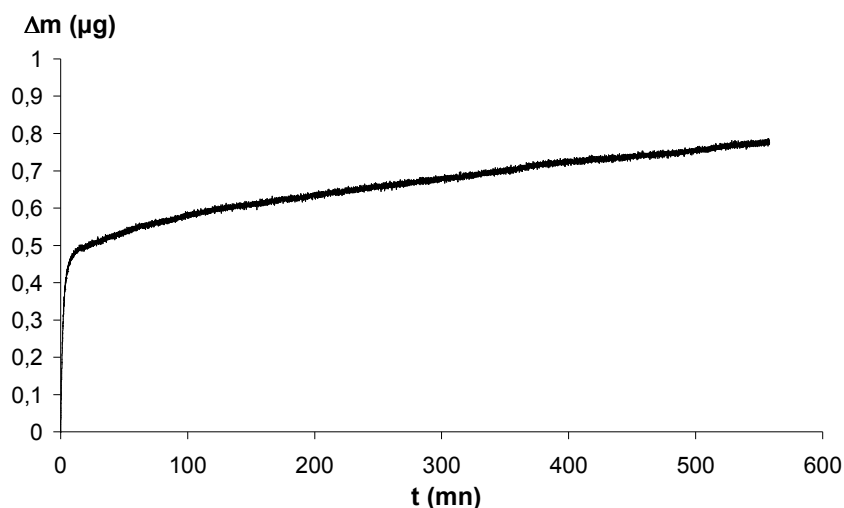
Les matrices poly( $M_1$ -co-CPDT) préparées comme décrit à la section I de ce chapitre sont traitées électrochimiquement puis chimiquement, afin d'activer les fonctions prérequis pour l'immobilisation des brins d'ADN sondes. Le traitement électrochimique consiste en une réduction des fonctions sulfonamide par cyclage du potentiel à  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  de  $-0,5\text{V}$  à  $-2\text{V}$  par rapport au système  $\text{Ag}|\text{Ag}^+$  dans une solution électrolytique d'acétonitrile contenant  $\text{Bu}_4\text{NPF}_6$  à  $0,1\text{M}$ . Après réduction, le film est mis en contact avec une solution d'acétonitrile contenant  $3,4\cdot 10^{-2}\text{M}$  de N-chlorosuccinimide. Les anions sulfinate obtenus par réduction sont ainsi chlorés en chlorure de sulfonyle capables de former des liaisons covalentes avec les brins d'ADN sondes terminés par des fonctions amines primaires.



**Schéma 9 : Préparation des supports pour l'immobilisation d'ADN**

### II.1. Immobilisation des brins d'ADN sondes

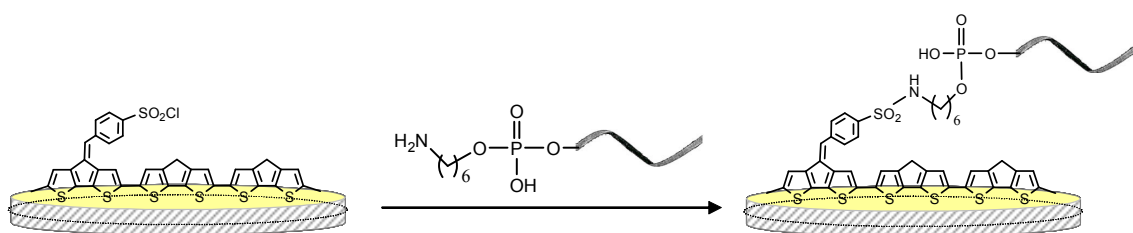
Après activation des fonctions sulfonamide d'un film de poly( $M_1$ -co-CPDT) ( $m_{\text{film}}=10,2\mu\text{g}$ ), le cristal de quartz modifié est immergé une nuit à température ambiante dans  $700\mu\text{L}$  de solution tampon TE/ $\text{NaCl}$   $0,6\text{M}$  contenant les brins d'ADN sondes  $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-}(5')$  TT GTA AAA TAC CCG AAT TGC AGA ACT TTC TGA CCG CCC CTC G ( $3'$ ) à  $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . La figure II-13 montre la variation de masse mesurée lors de l'étape d'immobilisation des sondes.



**Figure II-13 : Variation de la masse lors de l'étape d'immobilisation des brins sondes**

Variation de la masse enregistrée sur un cristal de quartz platiné ( $\phi = 5\text{mm}$ ) recouvert d'un film de poly( $M_i$ -co-CPDT) terminé par les fonctions d'ancrage  $\text{SO}_2\text{Cl}$  plongé dans une solution tampon TE/NaCl 0,6M contenant la séquence sonde.

Une prise de masse brutale est visible au cours des premières minutes de l'enregistrement, puis la masse augmente plus lentement après 15mn d'incubation jusqu'à se stabiliser au bout d'une dizaine d'heures. Cette augmentation de la masse est compatible avec l'immobilisation covalente des brins d'ADN sondes par réaction des fonctions amines primaires terminales avec les groupes chlorure de sulfonyle, sur la matrice.



**Schéma 10 : Immobilisation des brins d'ADN sondes sur le support**

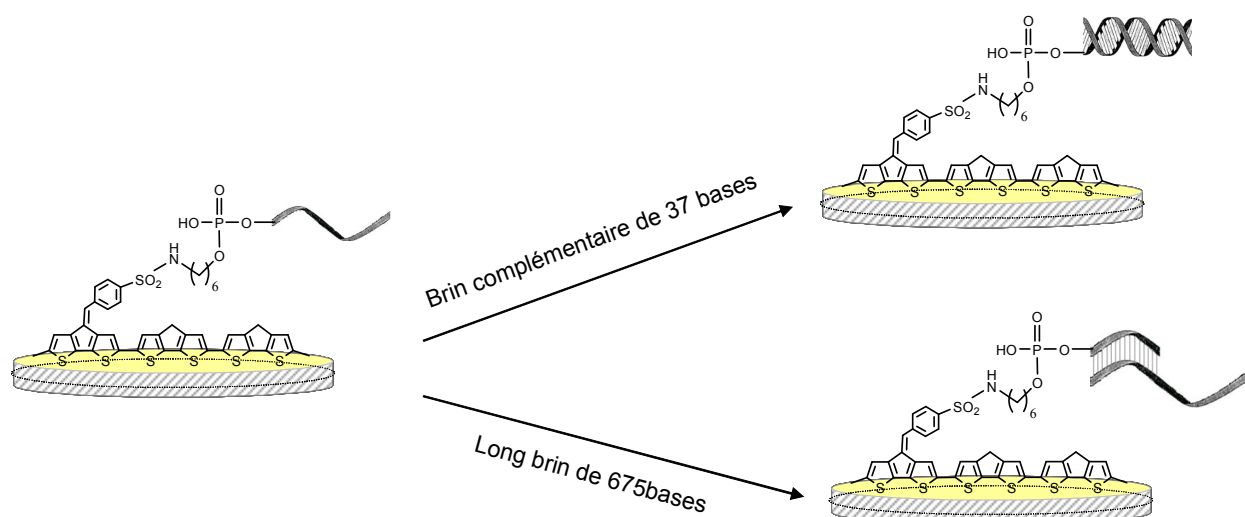
La masse totale de séquences d'ADN sondes immobilisées à la surface du copolymère est de  $0,78\mu\text{g}$ . Sachant que les brins d'ADN sondes ont une masse molaire de  $13507\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , la prise de masse obtenue lors de cette étape correspond à l'immobilisation de  $5,77\cdot 10^{-11}\text{mol}$  de séquences. Cette valeur, comparée au nombre de moles de motifs  $M_i$  dans le copolymère, égal à  $1,40\cdot 10^{-10}\text{mol}$ , semble indiquer qu'une forte proportion des fonctions sulfonamide (voisine

de 40%) a été activée et modifiée par de l'ADN, si l'on excepte tout phénomène d'adsorption non spécifique de l'ADN.

## II.2. Hybridation avec les brins d'ADN cibles

La matrice poly( $M_i$ -co-CPDT) préalablement modifiée par les brins d'ADN sondes est ensuite incubée à 35°C pendant 4h dans une solution tampon phosphate contenant les séquences ADN cibles.

Des brins d'ADN cibles de deux longueurs différentes sont testés pour l'étape d'hybridation : des brins courts de 37 bases, commerciaux, et des brins plus longs de 675 bases, produits au Mans, dans le laboratoire de Biologie et de Génétique Evolutive.

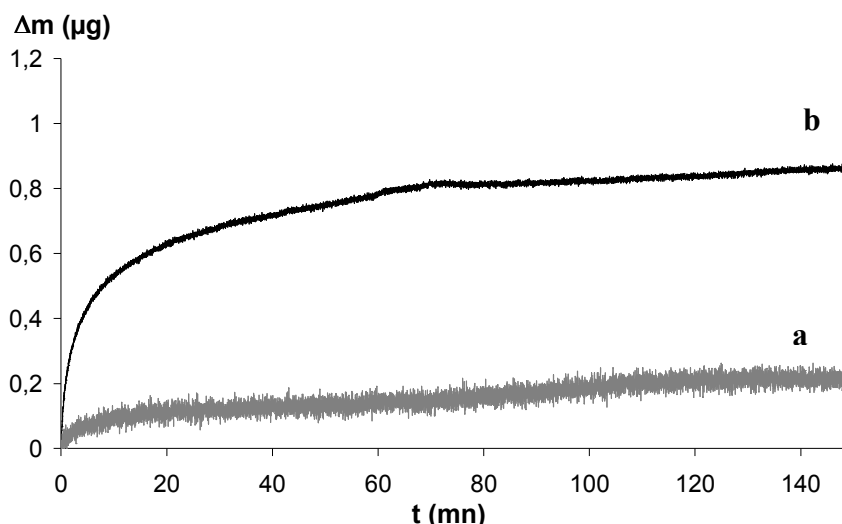


**Schéma 11 : Hybridation des brins d'ADN immobilisés avec des brins cibles de 37 ou 675 bases**

### II.2.1 Hybridation avec les brins d'ADN cibles de 37 bases

L'étape d'hybridation consiste à incuber le film modifié à 35°C pendant 4h dans une solution tampon phosphate 0,5M NaCl ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1M, pH 7,4) contenant  $2\mu\text{mol.L}^{-1}$  du brin d'ADN complémentaire de 37 bases.

Au préalable, une expérience témoin a consisté à incuber la matrice modifiée par les brins d'ADN sondes dans une solution tampon phosphate contenant  $2\mu\text{mol.L}^{-1}$  d'une séquence ADN totalement non complémentaire.



**Figure II-14 : Variation de la masse lors de l'étape d'hybridation avec les brins cibles de 37 bases**

Variations de la masse enregistrées sur un cristal de quartz platiné ( $\phi = 5\text{mm}$ ) recouvert d'un film de poly( $M_1$ -co-CPDT) modifié par un brin sonde plongé dans une solution tampon phosphate NaCl 0,5M contenant : (a) la séquence cible non complémentaire et (b) la séquence complémentaire.

La figure II-14 montre les variations de la masse consécutives à l'étape d'hybridation avec les brins cibles totalement non complémentaires, courbe a, puis totalement complémentaires, courbe b.

Une augmentation de masse, égale à 150ng, mesurée lors de l'expérience témoin, courbe a, suggère qu'une faible quantité d'ADN non complémentaire est adsorbé à la surface du copolymère. En revanche, une prise de masse beaucoup plus importante est attribuable à l'hybridation avec la cible totalement complémentaire (courbe b). Cette prise de masse de 0,86 $\mu\text{g}$  correspond à l'hybridation de  $7,10 \cdot 10^{-11}$  mol de séquences cibles ( $M_{\text{cible}} = 12113 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ). Comparée aux  $5,77 \cdot 10^{-11}$  moles de séquences ADN sondes immobilisées, cette valeur montre que même si une faible proportion des séquences cibles est adsorbée, les brins d'ADN sondes immobilisés se sont pratiquement tous hybridés avec leur complémentaire en solution.

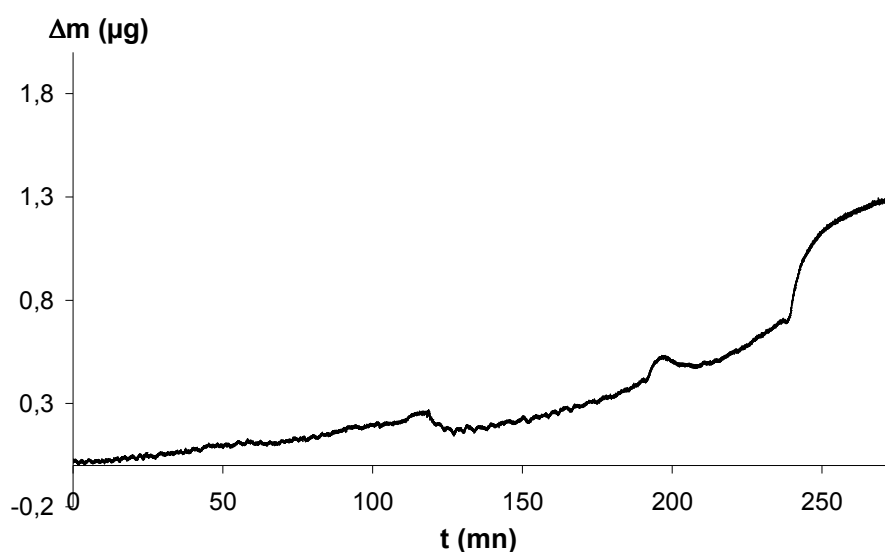
### II.2.2 Hybridation avec les brins d'ADN cibles de 675 bases

L'étape d'hybridation avec les brins de 675 bases consiste à incuber le film modifié par des séquences sondes appropriées ( $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-(5')} \text{TT GTA AAA TAC GAG GGG CGG TCA GAA AGT TAT GTA ATT CTG T (3')} \text{'})$  à 35°C pendant 4h dans une solution tampon phosphate 0,5M NaCl (pH=7,4) contenant le brin cible de 675 bases dont l'extrémité 5' est



complémentaire à la sonde immobilisée. La concentration en brins cibles de 675 bases, produits par PCR, est inconnue car les différentes étapes qui ont conduit à leur obtention ne permettent pas de les quantifier. Cependant, les essais les plus concluants ont été obtenus en introduisant dans la solution tampon phosphate 10 $\mu$ L du produit de la PCR asymétrique.

La figure II-15 montre la variation de masse mesurée au cours de l'étape d'hybridation, pour une matrice de poly(M<sub>i</sub>-co-CPDT) de 10,4 $\mu$ g modifiée par les brins d'ADN sondes. La prise de masse préalablement enregistrée lors de l'étape d'immobilisation des sondes sur ce support est de 3,1 $\mu$ g.



**Figure II-15 : Variation de la masse lors de l'étape d'hybridation avec les brins cibles de 675 bases**

**Variation de la masse enregistrée sur un cristal de quartz platiné ( $\phi = 5$ mm) recouvert d'un film de poly(M<sub>i</sub>-co-CPDT) modifié par un brin sonde plongé dans une solution tampon phosphate NaCl 0,5M contenant la séquence de 675 bases dont l'extrémité 5' est complémentaire avec la sonde immobilisée.**

Une augmentation de masse de 1,3 $\mu$ g est mesurée durant l'étape d'hybridation avec les cibles. Comme le rapport entre la masse molaire des brins sondes et celle des brins cibles est très inférieur à 1 ( $\cong 0,05$ ), la prise de masse enregistrée durant cette étape traduit une hybridation partielle des brins sondes immobilisés. La faible accessibilité des extrémités complémentaires 5' des brins cibles, ainsi que la gêne stérique entre les brins sondes immobilisés peuvent expliquer une hybridation partielle. Par ailleurs, il est à noter que les séquences cibles de 675 bases adoptent après appariement avec les brins sondes, une conformation aléatoire et

interagissent fortement avec le milieu. Dans ces conditions, les variations de fréquences enregistrées en microbalance à cristal de quartz ne satisfont peut-être plus aux conditions de la relation de Sauerbrey, ce qui complique l'analyse de ces résultats.

### **III. Diagnostic de l'hybridation**

Après modification des supports par des brins d'ADN, les matrices sont interrogées par électrochimie afin de lire l'empreinte d'hybridation par analyse des modifications des propriétés de conduction.

#### **III.1. Lecture électronique de l'hybridation par SIE**

Les mesures de spectroscopie d'impédance électrochimique sont effectuées dans une cellule en téflon contenant 12mL de solution tampon TE/NaCl 0,6M, sur un cristal quartz platiné recouvert d'un film de poly( $M_1$ -co-CPDT) modifié. Les variations de l'impédance totale sont mesurées tous les 100mV, entre -0,5V et +0,5V par rapport à l'ECS, de 0,1Hz à 100kHz. Cette technique électrochimique est appliquée à l'étude de chaque étape de modification du copolymère.

Seules les courbes d'impédance enregistrées à +0,5V sont présentées, car c'est à ce potentiel que les différences de comportement les plus importantes sont observées pour chaque étape de fonctionnalisation des supports. La figure II-16 montre les variations de l'impédance totale mesurées sur un film de poly( $M_1$ -co-CPDT), avant et après immobilisation d'ADN sonde, et après hybridation avec les brins d'ADN cibles de 675 bases.

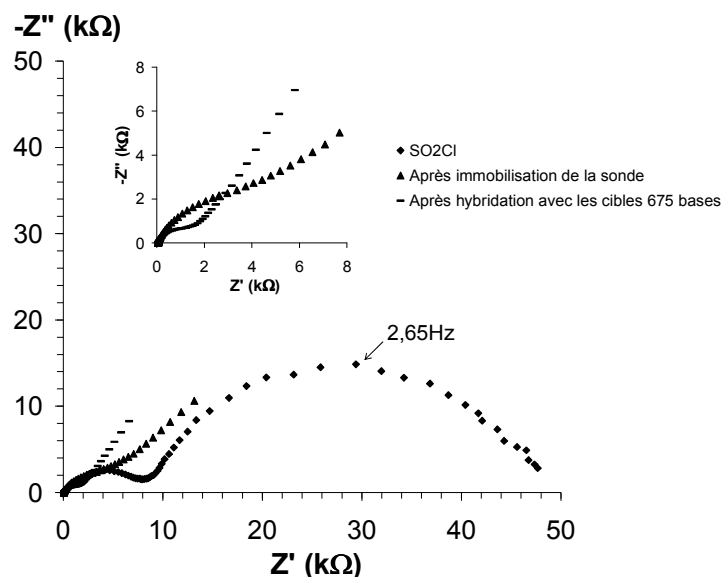


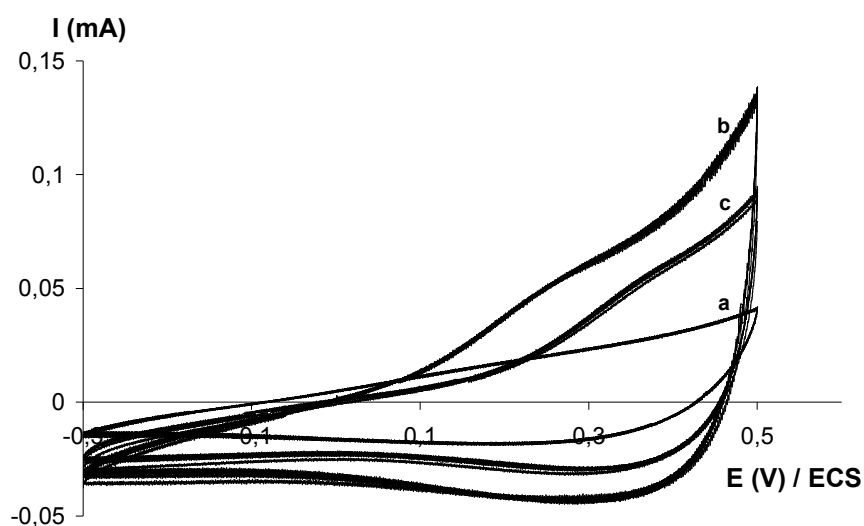
Figure II-16 : Variations de l'impédance totale dans le plan complexe

Diagrammes de Nyquist enregistrés à +0,5V par rapport à l'ECS de 100kHz à 0,1Hz avec une amplitude de 10 mV sur un cristal de quartz platiné ( $\phi = 5\text{mm}$ ) recouvert d'un film de poly(M<sub>1</sub>-co-CPDT) modifié. Le copolymère est plongé dans une solution tampon TE/NaCl 0,6M après activation des fonctions d'ancrage en SO<sub>2</sub>Cl (losanges), immobilisation des sondes (triangles) puis hybridation avec les séquences cibles de 675 bases (tirets).

Avant immobilisation d'ADN sonde, le comportement de la matrice modifiée par des groupes SO<sub>2</sub>Cl est décrit en impédance électrochimique par la combinaison de deux demi-cercles en série (Figure I-16, losanges). Aux basses fréquences, l'impédance totale tend vers une valeur réelle (la contribution imaginaire tend vers zéro), en accord avec l'apparition d'une résistance. Il est à noter qu'en milieu organique, un comportement purement capacitif est observé aux basses fréquences, correspondant à la charge du film. Un tel comportement est compatible avec une faible électroactivité en milieu aqueux. Dans ces conditions, le film semble imperméable aux anions dopants provenant de la solution.

Après immobilisation d'ADN sonde, le comportement électrochimique du film post-fonctionnalisé change fondamentalement (Figure II-16, triangles). Un comportement capacitif est restauré aux basses fréquences, suggérant une exaltation du dopage p en présence d'ADN à la surface du film. Lorsque les brins d'ADN sondes sont hybridés avec les brins cibles de 675 bases, le phénomène de charge du film aux basses fréquences semble exalté et se rapproche d'un comportement purement capacitif en accord avec l'apparition d'une droite quasi-verticale (Figure II-16, tirets).

Une étude par voltamétrie cyclique a permis de mettre en évidence cette exaltation du dopage p en présence d'ADN. La figure II-17 montre la superposition de voltammogrammes cycliques enregistrés avant, courbes a, et après immobilisation d'ADN sondes, courbes b, puis après hybridation avec les brins cibles de 675 bases, courbes c. Les voltammogrammes cycliques sont enregistrés dans le milieu TE/NaCl 0,6M à  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .



**Figure II-17 : Voltamétrie cyclique**

**Voltammogrammes cycliques enregistrés dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  sur un cristal de quartz platiné ( $\phi=5\text{mm}$ ) recouvert d'un film de poly( $\text{M}_i\text{-co-CPDT}$ ) après activation des fonctions d'ancrage en  $\text{SO}_2\text{Cl}$  (a), immobilisation des sondes (b) puis hybridation avec les séquences cibles de 675 bases (c). (vitesse de balayage,  $100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ).**

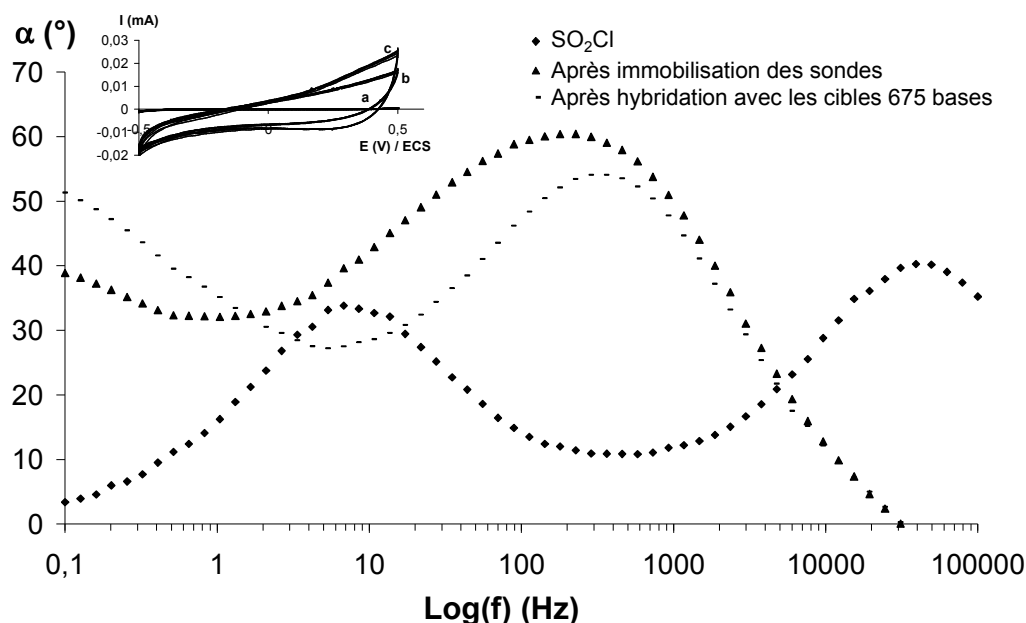
Il est remarquable d'observer une telle exaltation du dopage p en présence d'ADN. Quelques travaux dans la littérature suspectent la participation des brins ADN au processus dopage et évoquent cette contribution au dopage p pour rendre compte des changements de conduction observés lors de l'hybridation<sup>167</sup>. Les modifications de conductivité enregistrées lors de l'immobilisation des brins d'ADN sondes et lors de l'hybridation, font du support testé un transducteur particulièrement sensible pour la lecture de l'hybridation de brins d'ADN non marqués.

Le comportement du support poly( $\text{M}_i\text{-co-CPDT}$ ) testé suggère la participation du matériel biologique au dopage p. Par conséquent, il nous a semblé opportun d'appliquer les techniques classiques de l'électrochimie et la microbalance à l'étude de ce phénomène.

### III.2. Mise en évidence de la participation des brins d'ADN au dopage p

#### III.2.1 Etude par SIE

La figure II-18 présente les variations de l'impédance totale montrées à la figure II-16 dans la représentation de Bode. Les voltammogrammes cycliques correspondant aux différentes étapes de modification du support sont montrés en insert.



**Figure II-18 : Diagramme de Bode et voltamétrie cyclique**

Variations du déphasage enregistrées à +0,5V par rapport à l'ECS sur un cristal de quartz platiné ( $\phi = 5\text{mm}$ ) recouvert d'un film de poly( $M_1$ -co-CPDT) modifié. Le copolymère est plongé dans une solution tampon TE/NaCl 0,6M après activation des fonctions d'ancrage en  $\text{SO}_2\text{Cl}$  (losanges), immobilisation des sondes (triangles) puis hybridation avec les séquences cibles de 675 bases (tirets).

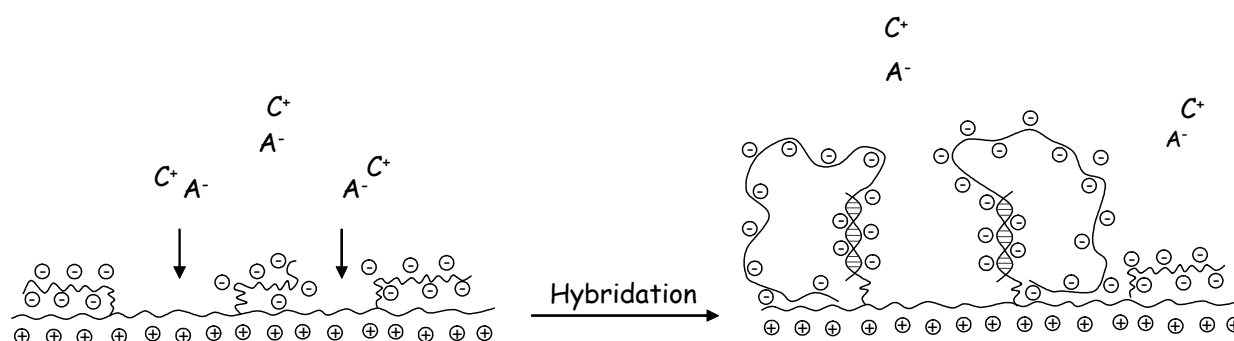
Insert : Voltammogrammes cycliques enregistrés sur un cristal de quartz platiné ( $\phi=5\text{mm}$ ) recouvert d'un film de poly( $M_1$ -co-CPDT). Le copolymère est plongé dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M}$   $\text{Bu}_4\text{NPF}_6$  (vitesse de balayage,  $100 \text{ mV.s}^{-1}$ ) après activation des fonctions d'ancrage en  $\text{SO}_2\text{Cl}$  (a), immobilisation des sondes (b) puis hybridation avec les séquences cibles de 675 bases (c).

Sur la figure II-18, quatre phénomènes de relaxation localisés autour de 0,1Hz, 7Hz, 200Hz et de 50000Hz sont visibles.

Avant immobilisation d'ADN (Figure II-18, losanges), la surface du copolymère semble bloquée à l'entrée des anions dopants, en accord avec une valeur de  $\alpha$  proche de zéro à 0,1Hz.

Par ailleurs, la matrice non modifiée par l'ADN présente un maximum pour  $\alpha$  à 7Hz correspondant à un phénomène de relaxation rapide déjà évoqué et attribuable à un processus de dopage superficiel par les anions  $\text{Cl}^-$  de l'électrolyte à l'interface film/solution. En l'absence d'ADN, un deuxième processus de relaxation est observable à hautes fréquences vers 50kHz. Par analogie avec le comportement de la matrice poly( $\text{M}_1$ -co-MT) rapporté à la section IV du chapitre 2, ce maximum pour  $\alpha$  pourrait correspondre à un processus de dopage superficiel par les anions  $\text{SO}_2^-$  résiduels, non refunctionalisés par le NCS après clivage cathodique, qui assurent grâce à leur proximité, un autodopage rapide de la matrice.

Après modification de la matrice par de l'ADN, un nouveau phénomène de relaxation étendu apparaît vers 200Hz (Figure II-18, triangles). Ce maximum pour  $\alpha$  est associé au demi-cercle présenté en insert à la figure II-16. Un examen des figures II-16 et II-18 fait apparaître que le phénomène de relaxation localisé à 200Hz traduit à lui seul l'essentiel des changements induits lors de l'hybridation. Ainsi, en première analyse, les variations de la relaxation observée à 200Hz sont caractéristiques des modifications des propriétés de l'interface film|solution au cours de l'hybridation. Ce résultat est compatible avec la contribution des acides nucléiques immobilisés au dopage superficiel du film. La conformation aléatoire adoptée par les sondes ou les séquences cibles monocaténaire autorise le repliement des brins d'ADN qui pourraient jouer alors le rôle de polyanions dopants au cours du processus de dopage p.

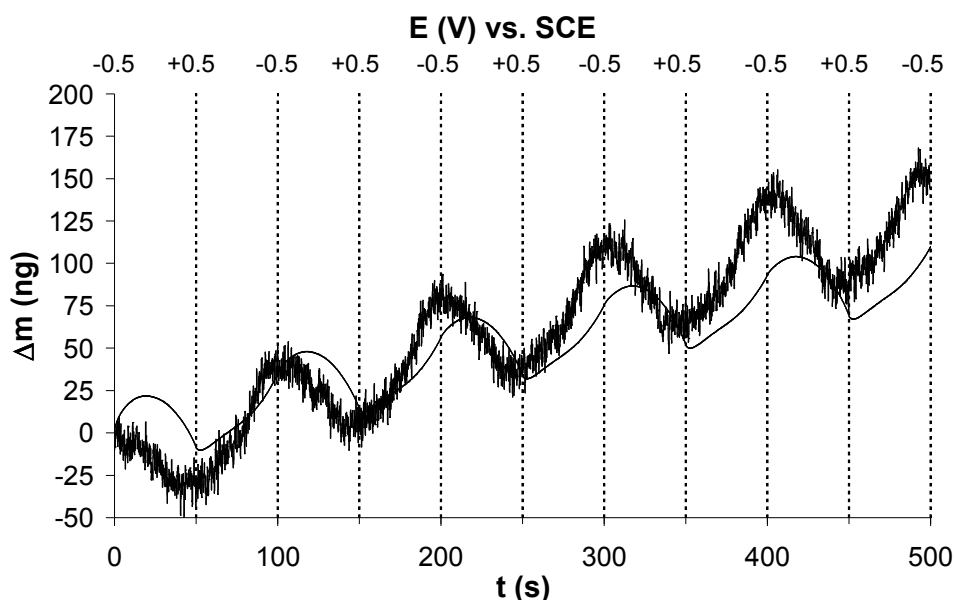


**Schéma 12 : Modélisation de l'interface film/électrolyte après hybridation avec les ADN cibles**

Cette exaltation du dopage p par la présence d'ADN est mise en évidence également par la superposition des voltammogrammes cycliques enregistrés entre -0,5V et +0,5V (Figure II-17, insert) sur le copolymère avant (a) et après immobilisation (b) puis après hybridation (c). En effet, les voltammogrammes b et c ont une intensité bien supérieure à celle des voltammogrammes a.

### III.2.2 Etude par microbalance à cristal de quartz

La figure II-19 montre l'enregistrement de cinq voltammogrammes cycliques de  $-0,5\text{V}$  à  $+0,5\text{V}$ , à  $20\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , sur le film de poly( $M_i$ -co-CPDT) préalablement modifié par des brins cibles de 675 bases, dans une solution tampon TE/NaCl.



**Figure II-19 : Variation de la masse**

Variation de la masse mesurée simultanément à 5 voltammogrammes cycliques enregistrés entre  $-0,5\text{V}$  et  $+0,5\text{V}$  sur un cristal de quartz platiné ( $\phi=5\text{mm}$ ) recouvert du film poly( $M_i$ -co-CPDT) modifié par des brins d'ADN sondes hybridés avec des brins d'ADN cibles de 675 bases. Le film de polymère est plongé dans TE/NaCl  $0,6\text{M}$  (vitesse de balayage,  $20\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

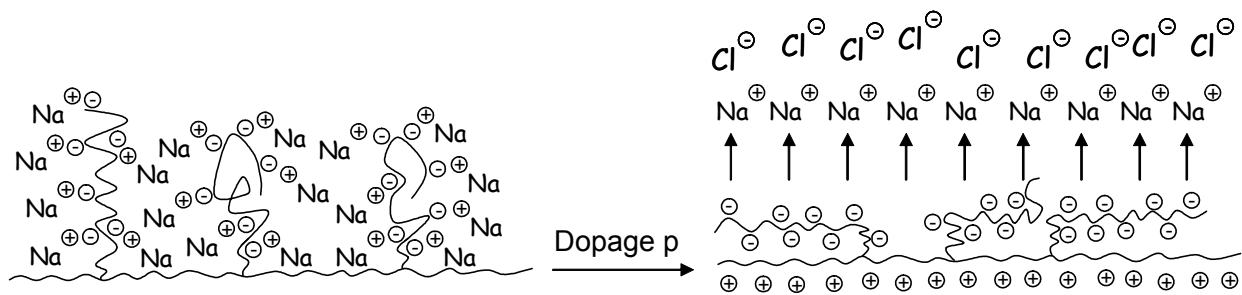
La courbe en trait fin correspond à la variation de masse calculée

La figure II-19 montre cinq oscillations successives de la masse, correspondant aux variations de masse associées à l'oxydation de la matrice.

Normalement, l'oxydation d'un polymère conducteur est compensée par l'entrée d'anions dopants provenant de la solution, ce qui se traduit par une augmentation de masse du film. De même, la neutralisation des charges positives induit une perte de masse due à la sortie des anions dopants. Un examen de la figure II-19 montre que l'évolution de la masse va à l'encontre des variations de masse généralement obtenues lors du dopage p. En effet, au cours du balayage aller du potentiel, la masse diminue, puis augmente au balayage retour. Ces variations inversées de la masse témoignent de la présence des brins d'ADN cibles de 675 bases monocaténaux à la surface du film. Ainsi, l'oxydation de la matrice est compensée en

surface par les chaînes polyanioniques d'ADN, et les cations  $\text{Na}^+$  associés aux unités phosphate sont expulsés. C'est ce départ des cations sodium qui implique la perte de masse observée lors du balayage aller des potentiels. La prise de masse observée lors du balayage retour est attribuable à une accumulation des cations sodium associés aux anions phosphates qui n'interagissent plus avec la matrice.

Afin de valider cette argumentation, une courbe théorique modélisant les variations de la masse du support calculées à partir du courant mesuré en voltamétrie cyclique, (trait fin) est superposée à la courbe expérimentale. Les valeurs théoriques de la masse sont calculées en considérant que chaque lacune électronique créée lors de l'oxydation de la matrice entraîne la perte d'un cation sodium. La bonne corrélation entre la courbe calculée et la courbe expérimentale montre que les brins d'ADN monocaténaire assurent l'électroneutralité de la matrice polarisée positivement (Schéma 13).



**Schéma 13 : Contribution des brins d'ADN au dopage de la matrice polarisée**





# *Chapitre 6*



# Chapitre 6 :

## Etude d'un dispositif organique à commande électrochimique appliqué à la libération d'ADN en milieu physiologique

Comme nous l'avons vu au chapitre 3, l'emploi d'une matrice organique conductrice modifiée par des groupements électroclivables permet le développement de dispositifs appliqués à la libération électrochimiquement contrôlée de substances. Les recherches actuellement entreprises dans ce domaine offrent une alternative non-virale à la thérapie génique et ouvrent des perspectives intéressantes pour la libération contrôlée d'espèces actives<sup>129</sup>. Parmi les nombreux dispositifs organiques issus des progrès de la chimie, les supports polymères conducteurs électrochimiquement sensibles permettent une libération contrôlée qui se rapproche le plus fidèlement de la façon dont les substances actives sont délivrées dans l'organisme humain<sup>125</sup>. Cependant, le domaine étroit d'électroinactivité disponible en milieu aqueux limite le domaine de potentiel accessible. Pour cette raison, c'est essentiellement le processus d'échange anionique consécutif au dopage p du polymère conducteur qui est mis à profit pour stocker ou éjecter « à la demande » des substances chargées négativement<sup>128,169,179,180</sup>. A notre connaissance, en dehors des films polystyrène portant des unités isonicotamide développés par L. Miller<sup>10</sup>, aucun support polymère conducteur n'a permis de délivrer une substance en milieu physiologique consécutivement à la coupure électrochimique d'une liaison covalente. En effet, la réduction de l'eau sur carbone vitreux intervient pour des potentiels inférieurs à -1,5V par rapport au système de référence Ag|Ag<sup>+</sup> et seule une fonction électroclivable particulièrement activée autoriserait la coupure à potentiel imposé en milieu physiologique (Schéma 14).

Si le potentiel de coupure est localisé dans le domaine de potentiel correspondant à la réduction de l'eau (domaine noté 1 sur le schéma 14), la libération d'espèces se fait, comme nous l'avons vu, par dégradation du support organique au cours de la décharge de dihydrogène en surface.

En revanche, si la spécificité du polymère fonctionnel autorisait la coupure électrochimique à un potentiel pour lequel la réduction de l'eau n'intervient pas (domaine noté 2 sur le schéma 14), la libération pourrait consister en une réduction du lien covalent permettant l'immobilisation, en accord avec une libération électrochimiquement contrôlée.

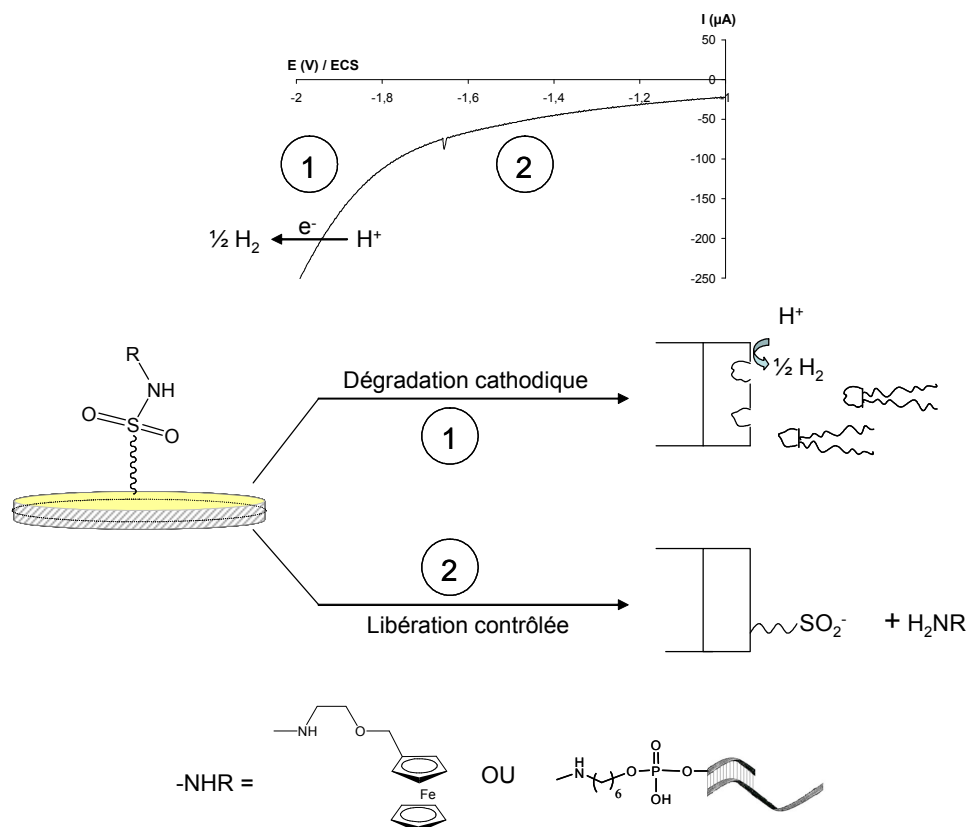


Schéma 14 : Libération à potentiel imposé de l'espèce immobilisée en surface

Dans un premier temps, afin de vérifier l'accessibilité de la coupure des liaisons S-N en milieu aqueux, le comportement cathodique de la matrice poly( $\text{M}_i$ ) est étudié dans l'eau.

Par ailleurs pour valider l'emploi du poly( $\text{M}_i$ ) comme support pour la libération contrôlée de substances actives, une sonde redox a été immobilisée et libérée ensuite sous l'effet d'un stimulus électrique. Enfin, un support copolymère dérivé a été testé pour la libération contrôlée de brins d'ADN.

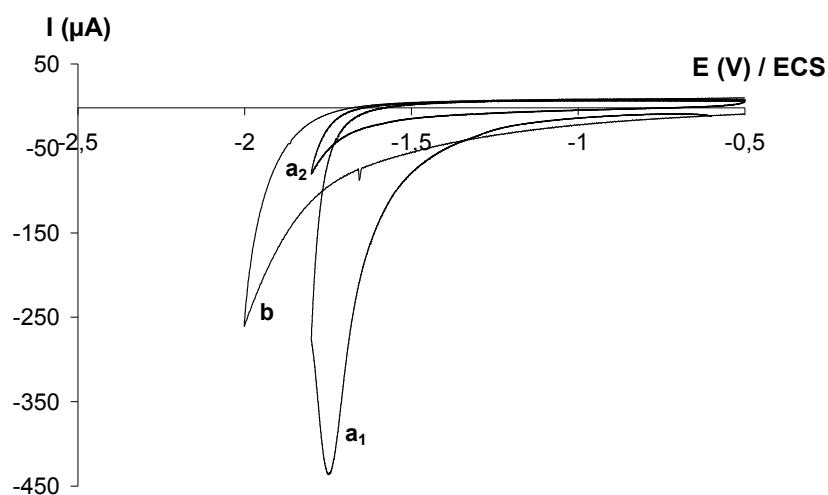
## I. Comportement cathodique du poly( $\text{M}_i$ ) en milieu aqueux

Un dépôt de poly( $\text{M}_i$ ) est étudié dans une cellule contenant une solution électrolytique  $\text{LiClO}_4$  0,5M dans  $\text{H}_2\text{O}$  distillée. Le film de poly( $\text{M}_i$ ) étudié est préalablement formé par oxydation sur carbone vitreux d'une solution électrolytique d'acétonitrile contenant  $\text{Bu}_4\text{NPF}_6$

0,1M et le composé  $M_i$  à 10mM. L'électropolymérisation est réalisée par balayages du potentiel à  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  entre -0,7V et +0,9V par rapport au système  $\text{Ag}|\text{Ag}^+$ . La croissance du film est suivie par l'augmentation du courant attribuable au dopage p et le dépôt formé est obtenu à l'état neutre pour une charge consommée égale à  $35,52\text{mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

Avant d'étudier le comportement cathodique du  $\text{poly}(M_i)$  en milieu aqueux, des voltammogrammes cycliques sont enregistrés à  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  de 0V à +0,85V par rapport à l'ECS jusqu'à ce que la réponse électrochimique soit stationnaire dans le milieu d'étude et que l'échange ionique se soit établi.

La figure II-20 décrit le comportement cathodique en milieu aqueux du film  $\text{poly}(M_i)$  préalablement formé sur électrode de carbone vitreux (courbes a) comparé à la réponse électrochimique d'une électrode de carbone vitreux non modifiée (courbe b).

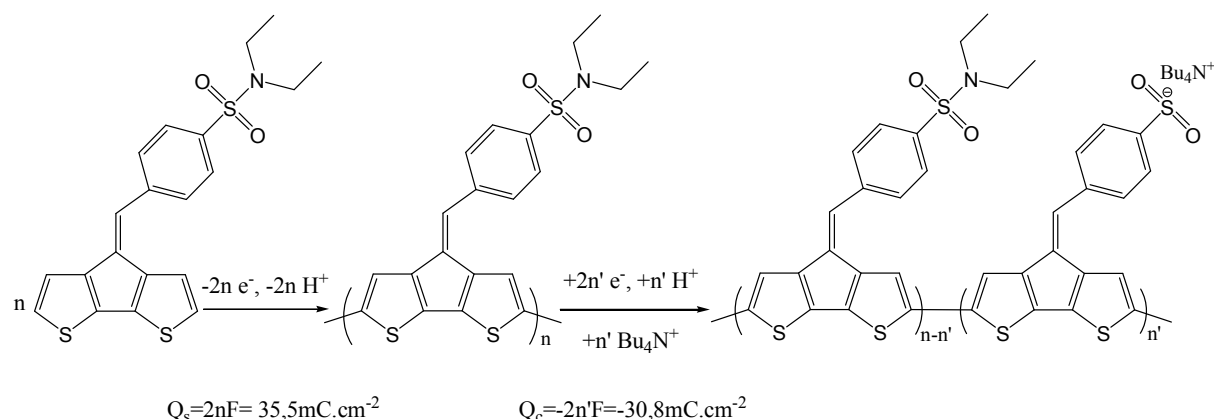


**Figure II-20 : Voltamétrie cyclique**

- (a) Voltammogrammes cycliques enregistrés sur une électrode de carbone vitreux ( $\phi=2\text{mm}$ ) recouverte d'un film  $\text{poly}(M_i)$  plongée dans  $\text{H}_2\text{O} + 0,5\text{M LiClO}_4$  (vitesse de balayage,  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ).**
- (b) Voltammogramme cyclique enregistré dans les mêmes conditions sur une électrode de carbone vitreux non modifiée.**

A la figure II-20, les voltammogrammes cycliques obtenus sur électrode de carbone vitreux modifiée montrent au premier balayage une vague irréversible localisée à -1,7V par rapport à l'ECS, qui disparaît au second balayage. La charge cathodique  $Q_c$ , intégrée au premier balayage entre -1V et -1,8V correspond à 87% de la charge consommée lors de la

formation du poly( $M_i$ ) à l'état neutre, en accord avec une réduction biélectronique compatible avec la coupure des liaisons S-N des fonctions sulfonamide.



Ce résultat indique que le support poly( $M_i$ ), sensible en réduction, autorise une libération en milieu physiologique puisque le potentiel de coupure est accessible en milieu aqueux. Ce résultat constitue à notre connaissance une contribution originale et il est tout à fait raisonnable de penser que les films obtenus par copolymérisation des motifs  $M_i$  et CPDT, testés au chapitre 5 pour l'immobilisation d'ADN, permettront de délivrer le matériel biologique greffé tout en préservant l'intégrité de la matrice polymère.

## II. Libération contrôlée d'une sonde électroactive greffée en surface

### II.1. Immobilisation de la sonde électroactive

Afin de valider l'immobilisation et la libération contrôlée d'amines primaires sur le support poly( $M_i$ ), les films ont été testés avec une sonde électrochimique de type ferrocènealkylamine (FcA). La sonde FcA est immobilisée selon la procédure décrite à la section IV.4. du chapitre 1. Le film polymère est obtenu à l'état neutre par cyclage du potentiel de -0,3V à +0,9V dans une solution d'acétonitrile contenant  $\text{Bu}_4\text{NPF}_6$  0,1M et le composé  $M_i$  à 10mM, pour une charge  $Q_s$  consommée égale à  $103,6 \text{mC.cm}^{-2}$ . Après réduction des fonctions sulfonamide et chloration des anions sulfinate comme indiqué à la section IV.4. du chapitre 1, le film modifié par les fonctions  $\text{SO}_2\text{Cl}$  prérequisés pour l'immobilisation d'amines primaires, est plongé dans une solution contenant la sonde à 0,01M dans l'acétonitrile.

La figure II-21 montrent la superposition de deux voltammogrammes cycliques enregistrés avant (courbe grise) et après (courbe noire) immobilisation covalente de la sonde redox.

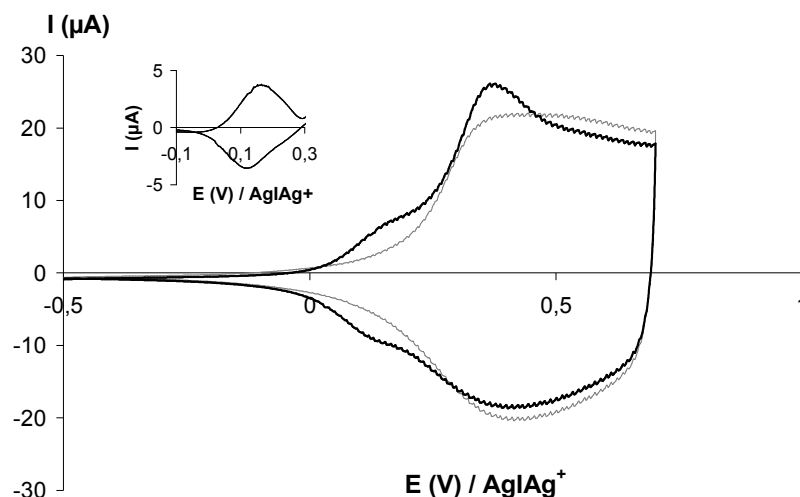


Figure II-21 : Voltamétrie cyclique

Voltammogrammes cycliques enregistrés sur une électrode de Pt ( $\phi=1\text{mm}$ ) recouverte d'un film poly( $M_i$ ) plongée dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  (vitesse de balayage,  $100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Le film de départ a tout d'abord subi un clivage cathodique (3 cycles de potentiel à  $100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  entre  $-0,5$  et  $-2\text{V}$ ) dans  $\text{CH}_3\text{CN}$  contenant  $0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$ , puis une chloration. Ces voltammogrammes cycliques superposés correspondent à la réponse électrochimique enregistrée avant (courbe grise) et après (courbe noire) immobilisation de la sonde redox par trempage dans une solution de ferrocènealkylamine à  $10^{-2}\text{M}$  dans  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

L'insert montre le voltammogramme cyclique (VC) obtenu par la soustraction (VC noir-VCgris).

Après immersion du polymère pendant 15mn dans la solution organique contenant 10mM de la sonde FcA et après rinçage dans l'acétonitrile du film modifié, un système réversible caractéristique de l'oxydation et de la réduction d'unités ferrocène immobilisées est observé à  $0,13\text{V}$  par rapport au couple  $\text{Ag}|\text{Ag}^+$ . L'écart en potentiel de pic à pic est inférieur à  $60\text{mV}$  ( $\Delta E=+42\text{mV}$ ), en accord avec un simple transfert monoélectronique réversible associé à une espèce électroactive immobilisée<sup>148,149</sup>. La différence en potentiel de pic à pic normalement attendue pour une sonde redox parfaitement immobilisée à la surface d'une électrode est nulle. La valeur intermédiaire mesurée pour  $\Delta E$  ( $0\text{mV}<\Delta E<60\text{mV}$ ) est compatible avec une diffusion locale de la sonde électrochimique induite par la flexibilité de la chaîne carbonée qui la retient à la matrice<sup>147</sup>.

L'insert de la figure II-21 représente le graphe intensité-potentiel correspondant à la soustraction des voltammogrammes enregistrés après et avant immobilisation. La charge positive intégrée à partir de ce signal est de  $0,7\text{mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Cette charge est très faible, comparée



à celle consommée lors de la formation du film poly( $M_1$ ) à l'état neutre ( $Q_s=103,6\text{mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Il est à noter qu'un processus impliquant à la fois le polymère conducteur et les groupes redox peut être envisagé<sup>150,151</sup>, ce qui complique le calcul de la réponse électrochimique attribuable aux unités ferrocène. En effet, une fois oxydé, le ferrocène peut jouer le rôle de médiateur redox et arracher des électrons à la matrice. Cependant, la faible valeur de la charge consommée au cours de l'oxydation des unités ferrocènes, comparée à celle intégrée lors de la formation du film à l'état neutre, indique que l'immobilisation n'intervient vraisemblablement qu'en surface.

## **II.2. Libération de la sonde redox immobilisée**

Après immobilisation de la sonde FcA, le film est réduit à un potentiel imposé de  $-1,7\text{V}$  par rapport à  $\text{Ag}|\text{Ag}^+$  dans une solution d'acétonitrile contenant  $\text{Bu}_4\text{NPF}_6$   $0,1\text{M}$ . Après chaque pulse de potentiel, la réponse électrochimique du système est enregistrée. Ainsi, la figure II-22 montre la superposition de trois voltammogrammes cycliques enregistrés sur le film modifié avant (courbe a) et après réduction à  $-1,7\text{V}$  pendant 30s (courbe b) et pendant 60s supplémentaires (courbe c). L'insert de la figure II-22 montre la décroissance de la charge anodique  $Q_a$ , attribuée au processus redox localisé à  $+0,13\text{V}$ , au cours de la polarisation cathodique.

Il est à noter que les voltammogrammes représentés à la figure II-22 ne correspondent pas aux premiers cycles de balayage du potentiel, mais aux seconds balayages, correspondant ainsi aux signaux obtenus après stabilisation de la réponse électrochimique.

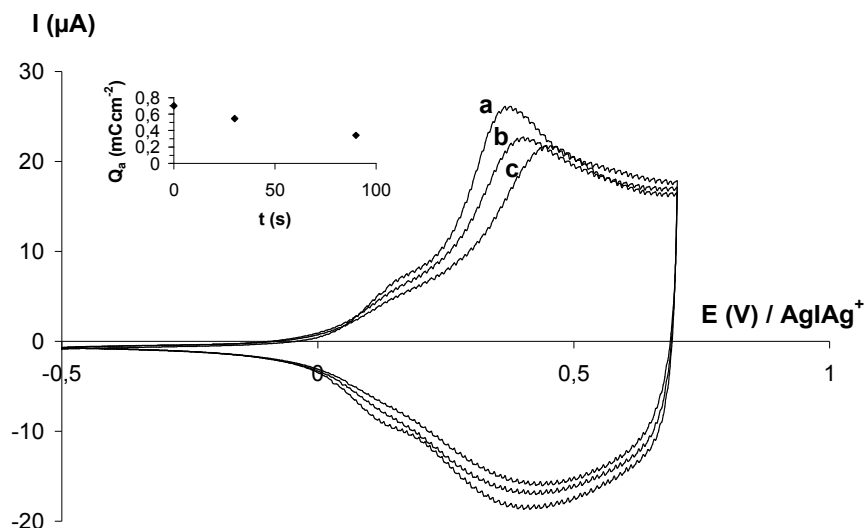


Figure II-22 : Voltamétrie cyclique

Voltammogrammes cycliques enregistrés sur une électrode de Pt ( $\phi=1\text{mm}$ ) recouverte d'un film poly( $M_1$ ) modifié par la sonde ferrocènealkylamine plongée dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1\text{M Bu}_4\text{NPF}_6$  (vitesse de balayage,  $100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Ces voltammogrammes cycliques superposés correspondent respectivement au comportement anodique du film enregistré avant (a) et après une polarisation cathodique à  $-1,7\text{V}$  par rapport à  $\text{Ag}|\text{Ag}^+$  pendant 30s (b) et 90s (c). Les courbes représentées correspondent aux voltammogrammes cycliques stabilisés.

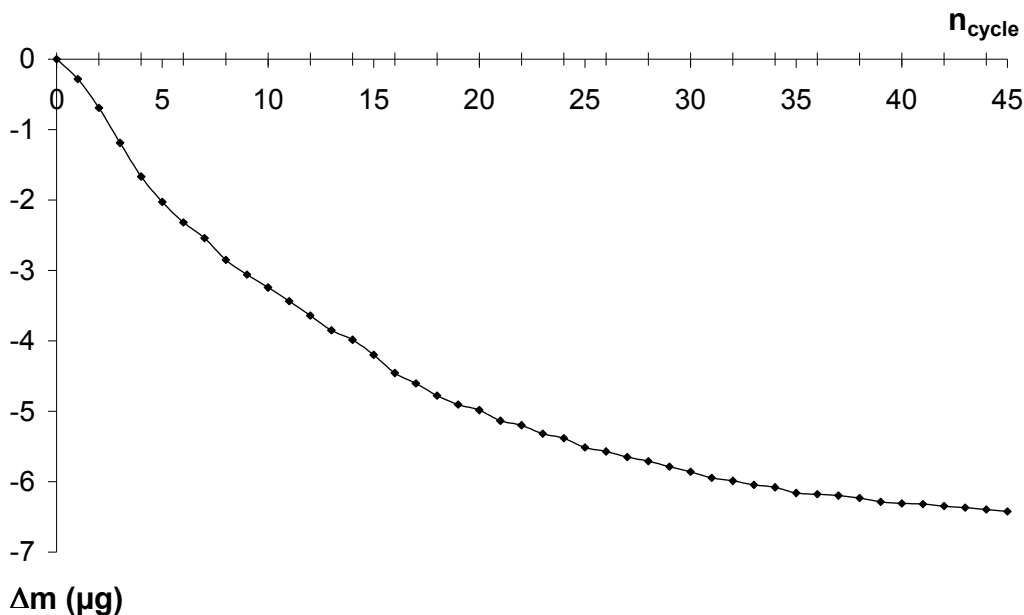
L'insert montre la décroissance de la charge anodique  $Q_a$  intégrée entre  $0\text{V}$  et  $+0,22\text{V}$  en fonction de la durée de polarisation à  $-1,7\text{V}$ .

Le système réversible attribué à la sonde redox décroît comme le montre la figure II-22. Cette diminution est en accord avec la libération de la sonde FcA en solution. Il est cependant impossible de calculer le pourcentage d'unités ferrocène délivrées en raison d'un processus d'échange électronique possible entre la sonde et la matrice, comme cela a déjà été évoqué. Seule une expérience menée avec une quatrième électrode ou une électrode disque-anneau permettrait de mettre en évidence la diffusion de la sonde électrochimique du film vers la solution après clivage cathodique<sup>169</sup>. Cependant, même si l'oxydation des unités ferrocène est étroitement couplée à celle du film, la décroissance de la charge anodique  $Q_a$  intégrée entre  $0$  et  $0,22\text{V}$  est compatible avec la disparition progressive de la sonde redox à la surface de la matrice.

Les résultats obtenus sur la matrice poly( $M_i$ ) modifiée par une sonde redox montrent qu'il est, non seulement possible d'immobiliser un groupement aminé à la surface du polymère, mais qu'il est en outre possible de libérer à potentiel imposé et en milieu aqueux l'espèce greffée.

### **III. Etat d'une matrice poly(cyclopentadithiophène) modifiée permettant la libération électrochimiquement contrôlée d'ADN**

Afin de valider l'utilisation du motif  $M_i$  pour la préparation de supports actifs appliqués à la libération contrôlée d'ADN, un film de poly( $M_i$ -co-CPDT) est formé sur cristal de quartz platiné par oxydation d'un mélange  $M_i$ /CPDT en proportion molaire 1/500. Un dépôt de 10,4 $\mu$ g de copolymère est obtenu consécutivement au balayage du potentiel comme indiqué à la section I.1. du chapitre 5. Le film de copolymère est ensuite réduit dans une solution électrolytique d'acétonitrile pour conduire aux fonctions chlorure de sulfonyle après chloration, en présence de NCS, comme indiqué à la section II du chapitre 5. L'étape d'immobilisation consiste à immerger l'électrode de travail pendant une nuit dans une solution tampon TE/NaCl 0,6M contenant 1 $\mu$ mol.L<sup>-1</sup> de brins d'ADN sondes possédant la séquence : NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-(5') TT GTA AAA TAC GAG GGG CGG TCA GAA AGT TAT GTA ATT CTG T (3'). Au bout de 10 heures, une augmentation de masse de 3,1 $\mu$ g est enregistrée, en accord avec l'immobilisation d'ADN sondes. L'étape d'hybridation avec les séquences cibles de 675 bases possédant une extrémité 5' complémentaire est décrite à la section II.2.2 du chapitre 5 et la variation consécutive de la masse du support est montrée à la figure II-15 du chapitre 5. Après hybridation, le copolymère modifié est soigneusement rincé pendant 1h dans de l'eau ultrapure à 50°C sous agitation, puis il est ensuite réduit par 45 cycles de potentiel enregistrés à 100mV.s<sup>-1</sup> entre -0,5V et -1,7V par rapport à l'ECS dans une cellule en téflon contenant 250 $\mu$ L de solution tampon TE/NaCl 0,6M.



**Figure II-23 : Variation de la masse consécutive à la libération d'ADN**

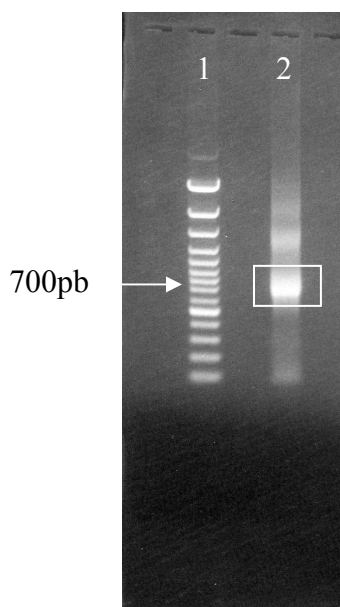
**Variations globales de la masse mesurée sur un cristal de quartz platiné ( $\phi = 5\text{mm}$ ) recouvert d'un film de poly( $M_i$ -co-CPDT) modifié par de l'ADN pour chaque cycle de potentiel effectué à  $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  entre  $-0,5\text{V}$  et  $-1,7\text{V}$  par rapport à l'électrode au calomel saturé dans une solution tampon de TE/NaCl  $0,6\text{M}$ .**

La figure II-23 montre les variations globales de la masse enregistrées pour chaque voltammogramme cyclique réalisé sur le film de poly( $M_i$ -co-CPDT) modifié. Les balayages du potentiel s'accompagnent d'une perte de masse importante au cours des premiers cycles, qui se stabilise progressivement. Cette stabilisation de la masse suggère que la totalité de l'ADN immobilisé est délivré à l'issue du traitement électrochimique.

La perte de masse totale enregistrée au terme des voltammogrammes cycliques est de  $6\mu\text{g}$ , ce qui est légèrement plus important en valeur absolue que la somme des prises de masse consécutives aux étapes d'immobilisation et d'hybridation. La perte de masse normalement attendue pour le cas où seul le matériel génétique serait délivré devrait être égale à  $4,4\mu\text{g}$ . Cet écart de  $1,6\mu\text{g}$  entre la valeur attendue et la valeur obtenue peut s'expliquer par une légère dégradation du poly( $M_i$ -co-CPDT) au cours du traitement cathodique. La matrice est cependant bien conservée, comparée à la matrice ( $M_1$ -co-MT) présentée dans la première partie.

La solution TE/NaCl  $0,6\text{M}$  contenant l'ADN délivré est traitée selon la procédure décrite dans le chapitre 3, par précipitation à  $-80^\circ\text{C}$  après addition de  $25\mu\text{L}$  d'acétate de sodium  $3\text{M}$  et de

700 $\mu$ L d'éthanol absolu. Le résidu est ensuite lavé avec de l'éthanol 70 et repris dans 25 $\mu$ L d'eau ultrapure. Les fragments d'ADN délivrés sont amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Le produit issu de la PCR est déposé sur gel d'agarose pour être identifié par électrophorèse.



**Figure II-24 : Electrophorèse sur gel d'agarose**

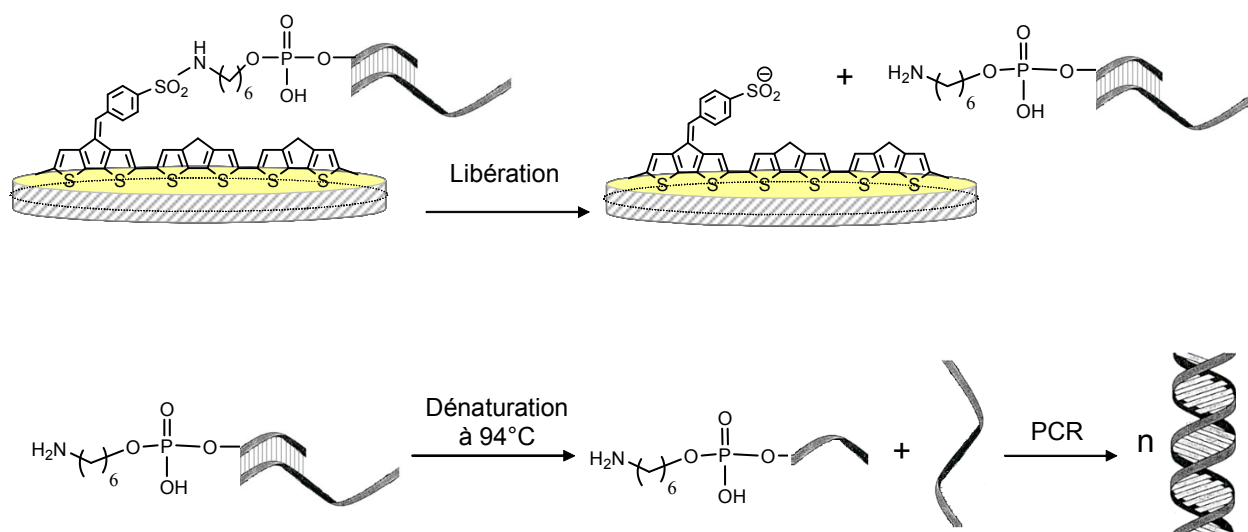
**Photographie d'un gel d'agarose de la cible 675 bases (rectangle blanc) obtenue après coupure électrochimiquement contrôlée et amplification par PCR (puits 2) comparée au marqueur de taille O'GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (puits 1).**

La figure II-24 représente la photographie d'un gel d'agarose révélé sous lampe UV, après migration des fragments délivrés et amplifiés par PCR (puits 2) et du marqueur de taille « O'GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus » (puits 1) utilisé comme référence.

Sur la colonne 2, la présence de fragments dont la taille est proche de 700 pb est révélée, en accord avec la libération des brins cibles de 675 bases délivrés après réduction de la matrice. Comme l'intensité d'un spot fluorescent est proportionnelle à la quantité d'ADN déposé dans le puits, il apparaît que la quantité d'ADN délivrée au cours de la réduction du poly( $M_i$ -co-CPDT) modifié est supérieure à celle obtenue après réduction du poly( $M_1$ -co-MT) modifié, comme le suggère la comparaison des figures II-24 et I-29. De plus, l'étalement des fragments de 675 bases sur le gel d'agarose témoigne également de la grande quantité d'ADN initialement déposé. Les fragments plus courts (en bas du gel, colonne 2) représentent les amorces utilisées lors de la PCR.

Ainsi, la perte de masse enregistrée lors de la réduction de la matrice correspond bien à la libération des brins d'ADN après clivage électrochimique. En outre, les brins d'ADN délivrés semblent avoir été bien préservés du traitement cathodique.

La matrice de poly( $M_1$ -co-CPDT) modifiée subit une légère dégradation lors de la libération de l'ADN immobilisé à sa surface à potentiel cathodique. L'intégrité de la matrice est cependant bien préservée par rapport au cas du poly( $M_1$ -co-MT) étudié au chapitre 3. Il apparaît ainsi que la majorité des brins d'ADN ont été libérés par coupure de la liaison S-N, comme le suggère le schéma ci-dessous, et non par dégradation du film comme cela est le cas pour le support poly( $M_1$ -co-MT).





## *Conclusion générale*





## Conclusion générale

Le travail rapporté concerne l'étude de matrices polythiophène modifiées, appliquées à l'immobilisation d'oligonucléotides, au diagnostic électrochimique de l'hybridation et à la libération contrôlée de séquences génomiques d'intérêt. Pour mener à bien cette étude, deux motifs électropolymérisables dérivés du thiophène,  $M_1$  et  $M_i$ , ont été synthétisés et l'étude des films  $\text{poly}(M_1)$  et  $\text{poly}(M_i)$  obtenus par voltamétrie cyclique a été entreprise par spectroscopie d'impédance électrochimique. Les études menées sur matrices ont permis de souligner les différences de propriétés électrochimiques et d'anticiper leurs comportements comme supports pour l'immobilisation, la détection et la libération de matériel biologique.

Concernant les films de  $\text{poly}(M_1)$ , ces premières investigations ont permis d'établir la structure méso poreuse de la matrice, l'augmentation brutale de la conductivité ionique au cours du processus de dopage p et la coupure biélectronique de la liaison SN de la fonction sulfonamide. Une attention toute particulière a été portée aux modifications des propriétés de conduction après réduction des groupes électroclivables. L'emploi de techniques électrochimiques couplées à la microbalance à cristal de quartz a permis de conclure que le film  $\text{poly}(M_1)$  subissait une dégradation cathodique lors de la coupure des liaisons S-N. L'examen des diagrammes de Bode en variation de phase indique la présence d'un phénomène de relaxation localisé vers 50Hz, en accord avec l'apparition d'un processus de dopage p superficiel après réduction des films. Cette conclusion est supportée par les variations de la masse recueillies en fonction de la fréquence et superposées au diagramme de Bode.

Concernant les films de  $\text{poly}(M_i)$ , ces premières investigations ont mis en évidence le comportement cathodique remarquable de cette matrice. La synthèse et l'étude comparative d'un film obtenu par oxydation d'un analogue saturé du dérivé  $M_i$  ont permis de conclure que la chaîne latérale  $\pi$ -conjuguée exaltait les propriétés de conduction du  $\text{poly}(M_i)$ , conduisant à une catalyse de la coupure des liaisons SN par le dopage n de la matrice. L'étude en milieu aqueux a montré l'accessibilité du potentiel de coupure en milieu physiologique.

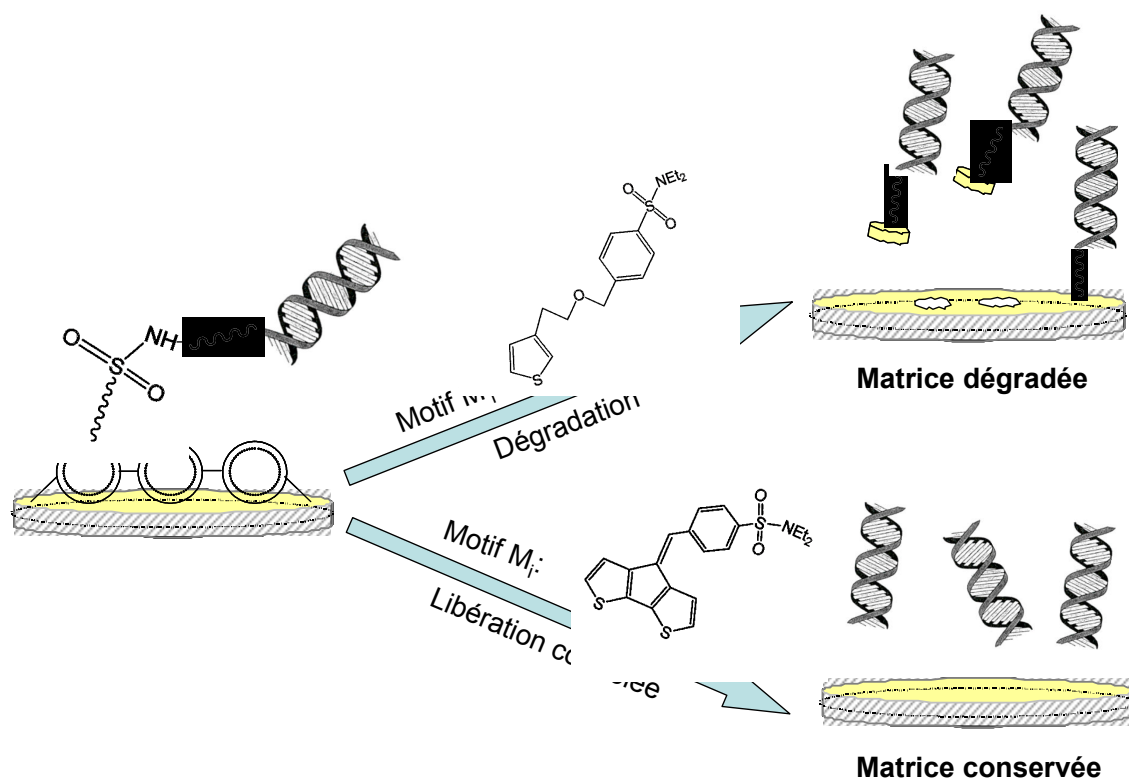
Des supports copolymères  $\text{poly}(M_1\text{-co-MT})$  et  $\text{poly}(M_i\text{-co-CPDT})$  ont été testés pour l'immobilisation de brins d'ADN sondes et le diagnostic électrochimique de l'hybridation. Ces études ont montré que la réactivité des fonctions chlorure de sulfonyl était compatible avec l'immobilisation de matériels biologiques fragiles et autorisait l'immobilisation de brins

d'ADN sondes modifiés par une amine primaire en extrémité 5'. L'emploi de la spectroscopie d'impédance électrochimique appliquée à l'étude du support modifié par de l'ADN a permis de mieux comprendre les événements localisés à l'interface film|solution et le rôle joué par l'ADN lors du dopage p du polymère conducteur. Un nouveau phénomène de charge, induit par la présence d'ADN en surface a pu être identifié. La participation de l'ADN au dopage p, en tant que polyanion dopant a été clairement mise en évidence par microbalance à cristal de quartz.

Par ailleurs, l'examen des résultats obtenus par impédance électrochimique a montré que les modifications des propriétés de conduction lors de l'hybridation permettaient un diagnostic électrochimique de l'hybridation. Dans le cas du support poly( $M_1$ -co-MT), les variations de l'impédance totale ont été modélisées par le comportement d'un circuit équivalent. Les valeurs des paramètres électroniques du circuit et leurs variations au cours des différentes étapes de modifications des supports conducteurs ont permis de modéliser les phénomènes localisés à l'interface film|solution. Ces résultats permettent de conclure que les brins d'ADN immobilisés en surface créent un écran électrostatique qui gêne le dopage de la matrice par les agents dopant provenant de la solution. En première analyse, il apparaît donc que c'est essentiellement la densité de charge négative portée par les anions phosphate de l'ADN qui constitue l'empreinte électrochimique de l'hybridation.

Par ailleurs, la présence d'une chaîne latérale  $\pi$ -conjuguée assurant une bonne communication électronique entre la chaîne principale du copolymère et la fonction d'ancrage électroactive a permis l'emploi de ces supports comme dispositifs appliqués à la libération contrôlée du matériel biologique immobilisé. En effet, la connexion électronique établie par la chaîne carbonée insaturée présente dans le motif  $M_1$ , a rendu la coupure du lien covalent entre la matrice et le matériel biologique, accessible en milieu aqueux.

Concernant les films de poly( $M_1$ -co-MT), le potentiel de coupure est localisé au-delà de la réduction de l'eau et il a été établi que la libération du matériel biologique résultait de la dégradation du film modifié par la décharge de dihydrogène à sa surface (Schéma).



En revanche, concernant les films de poly(M<sub>i</sub>-co-CPDT), le potentiel de coupure est localisé au début de la réduction de l'eau et il apparaît que la matrice modifiée est relativement bien conservée après libération de l'ADN. Ainsi l'emploi du support poly(M<sub>i</sub>-co-CPDT) semble autoriser une libération électrochimiquement contrôlée du matériel biologique par réduction du lien covalent (Schéma). Un tel résultat permet d'entrevoir des perspectives intéressantes pour la matrice poly(M<sub>i</sub>), capable de délivrer « à la demande » des substances actives fragiles par simple stimulus électrique en milieu physiologique.



# *Partie expérimentale*



# Partie A :

## Synthèse et caractérisation des molécules organiques

### I. Solvants et réactifs

#### I.1. Solvants

Le dichlorométhane ( $E_{b760\text{mmHg}} = 40^\circ\text{C}$ ), le méthanol ( $E_{b760\text{mmHg}} = 65^\circ\text{C}$ ), l'éthanol ( $E_{b760\text{mmHg}} = 78^\circ\text{C}$ ), l'éther diéthylique ( $E_{b760\text{mmHg}} = 35^\circ\text{C}$ ), le toluène ( $E_{b760\text{mmHg}} = 111^\circ\text{C}$ ) et l'eau ( $E_{b760\text{mmHg}} = 100^\circ\text{C}$ ) sont distillés selon les procédures classiques. Le tétrahydrofurane (THF) ( $E_{b760\text{mmHg}} = 66^\circ\text{C}$ ) et le chloroforme ( $E_{b760\text{mmHg}} = 61^\circ\text{C}$ ) sont fraîchement distillés sous azote. Le chloroforme deutéré utilisé pour les analyses en Résonance Magnétique Nucléaire est un solvant commercial utilisé sans purification préalable.

#### I.2. Réactifs

Réactifs et produits chimiques utilisés	Abréviation /formule	Origine	Pureté (%)
Acide acétique glacial	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$	ACROS	/
Acide chlorhydrique concentré (37 %)	HCl	ACROS	/
Butyllithium 1,6 M dans l'hexane	$\text{C}_4\text{H}_9\text{Li}$	ACROS	/
Carbonate de sodium	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	ACROS	/
Chlorure d'aluminium	$\text{AlCl}_3$	ACROS	98,5
Chlorure de 4-bromométhylbenzènesulfonyl	$\text{C}_7\text{H}_6\text{SO}_2\text{ClBr}$	LANCASTER	97
Cyanure de sodium	NaCN	ACROS	/
Diéthylamine	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}$	ACROS	/
Ethanolamine	$\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}$	ACROS	99
Hexaméthylène tétramine	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4$	ACROS	98,5
Hydroxyde de potassium	KOH	ACROS	/
Iodure de (ferrocénylméthyl)triméthylammonium	$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NFeI}$	LANCASTER	/
Pyridine	$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$	ACROS	99
Silice 60-200 mesh	$\text{SiO}_2$	ACROS	99,7
Sulfate de calcium	$\text{CaSO}_4$	PROLABO	/
Sulfate de cuivre pentahydraté	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	ACROS	/
Sulfate de magnésium	$\text{MgSO}_4$	FISCHER CHEMICALS	/
Tertiobutylate de potassium	tBuOK	MERCK	/
2-(3-thiényle)éthanol	$\text{C}_6\text{H}_8\text{OS}$	ACROS	99
Thiophène-3-carboxaldéhyde	$\text{C}_5\text{H}_4\text{OS}$	ACROS	98
Triéthylamine	$\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$	ACROS	/



## **II. Techniques de caractérisation**

### **II.1. Résonance Magnétique Nucléaire**

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton (200 MHz ou 400 MHz) des échantillons en solution dans le chloroforme deutéré ont été enregistrés sur des spectromètres à transformée de Fourier BRUKER AC 400 et DPX 200.

Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en parties par millions (ppm) par rapport au singulet du tétraméthylsilane (TMS ;  $\delta = 0$ ) pris comme référence interne.

Les constantes de couplage ( $^nJ$ ) sont exprimées en Hertz (Hz).

Les abréviations suivantes sont utilisées pour décrire la multiplicité des signaux : s : singulet ; d : doublet ; t : triplet ; q : quadruplet ; quint : quintuplet ; m : multiplet ; dd : doublet de doublet

### **II.2. Points de fusion**

Les points de fusion ont été déterminés sur un appareil BÜCHI Melting Point B-540.

### **II.3. Chromatographies**

- Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de silice Merck 60F<sub>254</sub>. Les révélateurs employés sont l'UV et la vanilline.

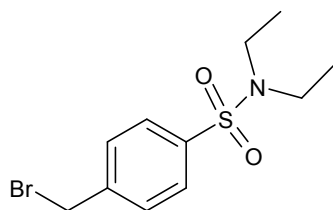
- Les chromatographies sur colonne ont été effectuées sur gel de silice (60-200 mesh-Acros).

## **III. Modes opératoires des synthèses organiques**

### **III.1. Synthèse du monomère M<sub>1</sub> (N,N-diéthyl-4-(2-thiophén-3-yl-éthoxyméthyl)-benzènesulfonamide)**

#### 4-bromométhyl-N,N-diéthylbenzènesulfonamide :

A une solution bien agitée de chlorure de 4-(bromométhyl)benzènesulfonyl (3,7 mmol) dans 6 mL d'éther, est additionnée une solution étherée (6 mL) de triéthylamine (4,1 mmol) et de diéthylamine (4,1 mmol). Après deux heures d'agitation à température ambiante sous atmosphère d'azote, le mélange est hydrolysé puis extrait trois fois à l'éther. Les phases organiques réunies sont ensuite séchées sur sulfate de magnésium anhydre, filtrées et évaporées sous pression réduite. Un solide blanc correspondant au produit recherché est alors obtenu. Le produit est utilisé sans purification ultérieure pour l'étape suivante.

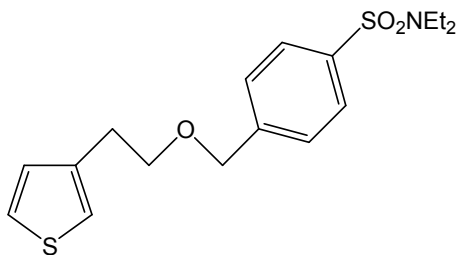


$C_{11}H_{16}NO_2SBr$   
 $M = 306,22 \text{ g.mol}^{-1}$   
 Solide blanc  
 Rendement: 90%

RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  en ppm/TMS): 7,79-7,81 (2H, système AB,  $^3J_{HH}=8,46 \text{ Hz}$ ,  $H_{arom}$ ); 7,75-7,77 (2H, système AB,  $^3J_{HH}=8,52 \text{ Hz}$ ,  $H_{arom}$ ); 4,50 (2H, s,  $CH_2-Br$ ); 3,25 (4H, q,  $^3J_{HH} = 7,14 \text{ Hz}$ , N- $CH_2$ ); 1,14 (6H, t,  $^3J_{HH} = 7,14 \text{ Hz}$ ,  $CH_3$ ).

Monomère  $M_1$  (N,N-diéthyl-4-(2-thiophén-3-yl-éthoxyméthyl)-benzènesulfonamide) :

A une solution bien agitée de 2-thiophén-3-yl-éthanolate de potassium (14,8 mmol) sous atmosphère inerte, préparée à partir de tertibutylate de potassium (16,2 mmol) et de 2-thiophén-3-yl-éthanol (14,8 mmol) dans 68 mL de THF anhydre, on additionne lentement à température ambiante une solution de 4-bromométhyl-N,N-diéthyl-benzènesulfonamide (14,7 mmol) dans 17 mL de THF anhydre. Après 20 h d'agitation à température ambiante, la solution jaune-orangée est hydrolysée par 60 mL d'eau et extraite deux fois avec 100 mL de dichlorométhane. Les phases organiques recombinaées sont lavées à l'eau et séchées sur sulfate de magnésium. Après filtration, le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif. Une huile incolore correspondant au produit recherché est alors obtenue après purification sur colonne de gel de silice (éluant : éther/éther de pétrole : 1/2).



$C_{17}H_{23}NO_3S_2$   
 $M = 353,51 \text{ g.mol}^{-1}$   
 Huile incolore  
 $Rf = 0,29$  (éther/éther de pétrole:1/2)  
 Rendement: 65%

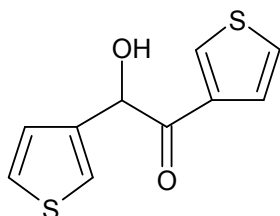
RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  en ppm/TMS): 7,71-7,79 (2H, système AB,  $^3J_{HH}=8,3 \text{ Hz}$ ,  $H_{arom}$ ); 7,32-7,40 (2H, système AB,  $^3J_{HH}=8,3 \text{ Hz}$ ,  $H_{arom}$ ); 7,25 (1H, dd,  $^4J_{HH}=2,9 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{HH}=4,9 \text{ Hz}$ ,  $H_{thioph}$ ); 7,03 (1H, dd,  $^4J_{HH}=2,9 \text{ Hz}$ ,  $^4J_{HH}=1,1 \text{ Hz}$ ,  $H_{thioph}$ ); 6,98 (1H, dd,  $^4J_{HH}=1,1 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{HH}=4,9 \text{ Hz}$ ,  $H_{thioph}$ ); 4,58 (2H, s, O- $CH_2-Ph$ ); 3,73 (2H, t,  $^3J_{HH}=6,8 \text{ Hz}$ ,  $CH_2-O$ ); 3,23 (4H, q,  $^3J_{HH}=7,1 \text{ Hz}$ ,  $CH_2-N$ ); 2,97 (2H, t,  $^3J_{HH}=6,8 \text{ Hz}$ ,  $CH_2-thioph$ ); 1,14 (6H, t,  $^3J_{HH}=7,1 \text{ Hz}$ ,  $CH_3$ ).

### III.2. Synthèse du monomère $M_i$ (4-cyclopenta[1,2-b ; 3,4-b']dithiophène-4-ylidèneméthyl-N,N-diéthylbenzènesulfonamide)

#### Synthèse du 4H-cyclopenta[2,1-b ; 3,4-b']dithiophène (CPDT)

##### 3,3'-thénoïne :

A une solution de thiophène-3-carboxaldéhyde (54 mmol) dans 9 mL d'éthanol absolu est additionnée goutte à goutte une solution aqueuse de cyanure de sodium (19 mmol dans 4,5 mL). Le mélange est chauffé une heure à 100°C puis refroidi à 0°C. On obtient un liquide orange foncé. Une hydrolyse avec 0,9 mL d'acide chlorhydrique concentré laisse précipiter un solide ocre qui est filtré et lavé plusieurs fois avec un mélange eau/éthanol (1/1). Le solide est mis à sécher une nuit au dessiccateur. Le produit est utilisé sans purification ultérieure pour l'étape suivante.



$$M = 224,30 \text{ g.mol}^{-1}$$

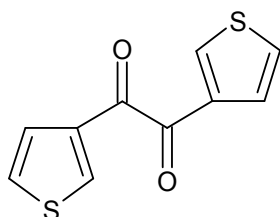
Solide jaune, point de fusion : 117°C

Rendement: 56%

RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  en ppm/TMS): 8,05 (1H, dd,  $^4J_{HH}=2,91$  Hz,  $^4J_{HH}=1,29$  Hz,  $H_{thioph}$ ) ; 7,52 (1H, dd,  $^4J_{HH}=1,29$  Hz,  $^3J_{HH}=5,18$  Hz,  $H_{thioph}$ ) ; 7,25-7,35 (3H, m,  $H_{thioph}$ ) ; 7,00 (1H, dd,  $^4J_{HH}=1,45$  Hz,  $^3J_{HH}=4,93$  Hz,  $H_{thioph}$ ) ; 5,84 (1H, s, CH-O) ; 4,35 (1H, s, OH).

##### 3,3'-thénile :

A une solution de sulfate de cuivre pentahydraté (27 mmol) dans 11 mL d'un mélange eau/pyridine (1/1) chauffée à 60°C est additionnée la 3,3'-thénoïne (12 mmol). Après 3h de chauffage à 80°C, la solution est refroidie dans un bain de glace et acidifiée avec un volume suffisant d'acide chlorhydrique à 10% jusqu'à pH = 2. Le mélange est alors extrait plusieurs fois à l'éther. Les phases organiques réunies sont lavées à l'eau puis séchées sur sulfate de magnésium anhydre, filtrées et évaporées sous pression réduite. Un solide jaune est obtenu. Le produit est utilisé sans purification ultérieure pour l'étape suivante.



$$M = 222,29 \text{ g.mol}^{-1}$$

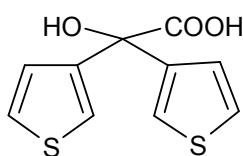
Solide jaune, point de fusion : 76°C

Rendement: 90%

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm/TMS): 8,36 (2H, dd,  $^4J_{\text{HH}}=2,84$  Hz,  $^4J_{\text{HH}}=1,23$  Hz,  $\text{H}_{\text{thioph}}$ ); 7,70 (2H, dd,  $^4J_{\text{HH}}=1,23$  Hz,  $^3J_{\text{HH}}=5,18$  Hz,  $\text{H}_{\text{thioph}}$ ); 7,39 (2H, dd,  $^4J_{\text{HH}}=2,87$  Hz,  $^3J_{\text{HH}}=5,24$  Hz,  $\text{H}_{\text{thioph}}$ ).

Acide-3,3'-thénilique :

Le 3,3'-thénile (10,5 mmol) est mis en suspension dans 11 mL d'une solution hydroalcoolique (1/1) de potasse (43 mmol). Le tout est porté à reflux pendant 15 mn puis refroidi à  $0^\circ\text{C}$ . Le mélange est alors hydrolysé à l'acide chlorhydrique concentré jusqu'à  $\text{pH}=1$  et laissé 15 min sous agitation à température ambiante. Le précipité de chlorure de potassium est filtré, puis les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le solide obtenu est repris à l'éther et la phase organique est lavée plusieurs fois à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium anhydre, filtrée et évaporée sous pression réduite. On recueille un solide ocre. Le produit est utilisé sans purification ultérieure pour l'étape suivante.



$$M = 240,30 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

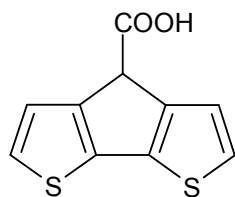
Solide ocre, point de fusion :  $111^\circ\text{C}$

Rendement: 93%

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm/TMS): 7,53-8,25 (1H, m,  $\text{H}_{\text{thioph}}$ ); 7,39 (1H, dd,  $^4J_{\text{HH}}=1,35$  Hz,  $^3J_{\text{HH}}=3,09$  Hz,  $\text{H}_{\text{thioph}}$ ); 7,25-7,36 (2H, m,  $\text{H}_{\text{thioph}}$ ); 7,18 (1H, dd,  $^4J_{\text{HH}}=1,35$  Hz,  $^3J_{\text{HH}}=5,18$  Hz,  $\text{H}_{\text{thioph}}$ ).

Acide 4-(4H-cyclopenta[2,1-b; 3,4-b']dithiophène)carboxylique :

A une solution d'acide 3,3'-thiénilique (10 mmol) dissous dans le toluène (76 mL) à  $0^\circ\text{C}$  sous atmosphère d'azote, est additionnée du chlorure d'aluminium (33 mmol). La solution qui vire du jaune au violet foncé est laissée sous agitation magnétique pendant 48h à température ambiante. Le mélange est ensuite hydrolysé à l'acide chlorhydrique 1 M. Les sels d'aluminium précipitent et un solide brun tapisse le fond du ballon. Les sels sont filtrés sur fritté et la solution est extraite plusieurs fois à l'éther (jusqu'à dissolution totale du solide). Les phases organiques réunies sont ensuite séchées sur sulfate de magnésium anhydre, filtrées et évaporées sous pression réduite. Un solide brun est obtenu. Le produit est utilisé sans purification ultérieure pour l'étape suivante.



$$M = 222,29 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Solide brun, point de fusion : 165°C

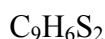
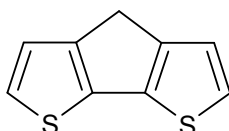
Rendement: 80%

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm/TMS): 7,23-7,30 (2H, système AB,  $^3J_{\text{HH}}=4,93$  Hz,  $\text{H}_{\text{bithioph}}$ ) ; 7,10-7,17 (2H, système AB,  $^3J_{\text{HH}}=4,93$  Hz,  $\text{H}_{\text{bithioph}}$ ) ; 4,64 (1H, s, CH).

4H-cyclopenta[2,1-b ;3,4-b']dithiophène :

Dans une cellule électrochimique, l'acide 4-(4H-cyclopenta[2,1-b; 3,4-b']dithiophène)carboxylique à la concentration de 68 mmol dans l'acétonitrile est réduit à -1,5V par rapport au couple de référence Ag/AgNO<sub>3</sub> (0,1M dans CH<sub>3</sub>CN) sur une cathode de platine (surface = 2 cm<sup>2</sup>) en présence de 0,5 % d'eau en volume. Le potentiel d'électrolyse a été déterminé après une étude en voltamétrie cyclique.

Après diminution du courant d'électrolyse et contrôle par CCM, l'électrolyse est arrêtée. L'acétonitrile contenu dans la cellule de travail est évaporé à l'évaporateur rotatif. Le solide obtenu est repris à l'éther pour éliminer le sel de fond. Après plusieurs rinçages du sel de fond à l'éther, les phases étherées sont évaporées à l'évaporateur rotatif. On obtient un solide blanc après chromatographie sur gel de silice (éluant : dichlorométhane/éther de pétrole : 2/8)



$$M = 178,28 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Solide blanc, point de fusion : 75°C

Rf= 0,77 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/éther de pétrole:8/2)

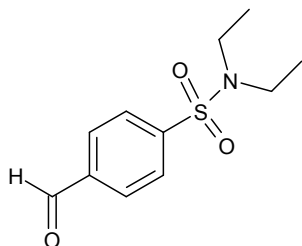
Rendement: 85%

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm/TMS): 7,14-7,19 (2H, système AB,  $^3J_{\text{HH}}=4,93$  Hz,  $\text{H}_{\text{bithioph}}$ ) ; 7,05-7,10 (2H, système AB,  $^3J_{\text{HH}}=4,93$  Hz,  $\text{H}_{\text{bithioph}}$ ) ; 3,53 (2H, s, CH<sub>2</sub>).

4-(diéthylsulfonyl)benzaldehyde :

Une solution de 4-bromométhyl-N,N-diéthylbenzènesulfonamide (3,7 mmol) et d'hexaméthylènetétramine (7,4 mmol) dans du chloroforme (19 mL) est portée à reflux pendant 90 mn. Le mélange, refroidi à 0°C, laisse précipiter le sel d'ammonium qui est récupéré par filtration puis dissous dans 12 mL d'acide acétique à 50%. La solution est portée à reflux pendant 2 heures et demie, refroidie à 0°C, hydrolysée, et extraite plusieurs fois au dichlorométhane. Les phases organiques sont lavées à l'eau, puis séchées sur Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solide,

pour chasser l'acide acétique, filtrées, puis évaporées sous pression réduite. On obtient un solide blanc.

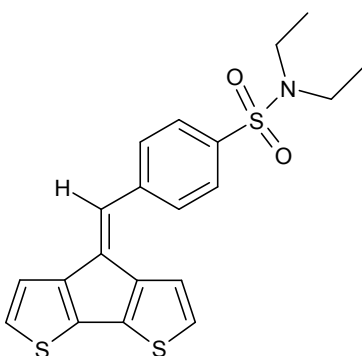


$C_{11}H_{15}NO_3S$   
 $M = 241,31 \text{ g.mol}^{-1}$   
 Solide blanc  
 Rendement: 44%

RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  en ppm/TMS): 10,10 (1H, s,  $H_{ald}$ ) ; 7,99-8,01 (4H, m,  $H_{arom}$ ); 3,25 (4H, q,  $^3J_{HH} = 7,01 \text{ Hz}$ ,  $CH_2N$ ) ; 1,13 (6H, t,  $^3J_{HH} = 7,01 \text{ Hz}$ ,  $CH_3$ ).

Monomère  $M_i$  (4-cyclopenta[1,2-b ; 3,4-b']dithiophène-4-ylidène-méthyl-N,N-diéthylbenzènesulfonamide):

Le CPDT (1,74 mmol) est mis en solution sous azote dans 6 mL de méthanol (fraîchement distillé sous azote sur  $CaSO_4$ ). Une solution 0,6 M de méthanolate de sodium (2,1 éq.) est additionnée goutte à goutte à la solution précédente. Après 30 min d'agitation à température ambiante, le 4-(diéthylsulfonyl)benzaldéhyde 10 est additionné en solution dans 12 mL de méthanol et le tout est porté à reflux pendant deux heures. Le mélange est extrait au dichlorométhane (3x10 mL). Les phases organiques réunies sont lavées à l'eau, séchées sur sulfate de magnésium anhydre, filtrées et évaporées sous pression réduite. Une poudre rouge correspondant au produit recherché est alors obtenue après purification sur colonne de gel de silice (éluant : dichlorométhane/ n-pentane : 7/3).

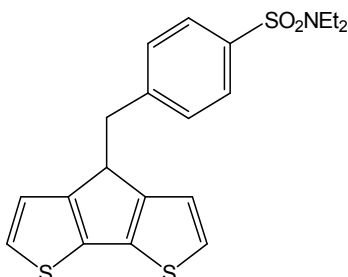


$C_{20}H_{19}NO_2S_3$   
 $M = 401,57 \text{ g.mol}^{-1}$   
 Solide rouge, point de fusion : 139°C  
 $R_f = 0,35$  ( $CH_2Cl_2$ /pentane:7/3)  
 Rendement: 30%

RMN  $^1H$  (200MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  en ppm/TMS): 7,84-7,91 (2H, système AB,  $^3J_{HH} = 8,34 \text{ Hz}$ ,  $H_{arom}$ ); 7,67-7,74 (2H, système AB,  $^3J_{HH} = 8,34 \text{ Hz}$ ,  $H_{arom}$ ); 7,26 (1H, s, CH); 7,18-7,22 (2H, système AB,  $^3J_{HH} = 5,02 \text{ Hz}$ ,  $H_{bithioph}$ ); 7,11-7,15 (2H, système AB,  $^3J_{HH} = 5,02 \text{ Hz}$ ,  $H_{bithioph}$ ); 3,30 (4H, q,  $^3J_{HH} = 7,07 \text{ Hz}$ ,  $CH_2N$ ); 1,17 (6H, t,  $^3J_{HH} = 7,07 \text{ Hz}$ ,  $CH_3$ ).

### III.3. Synthèse du monomère M<sub>3</sub>

A une solution bien agitée de 4H-cyclopenta[2,1-b;3,4-b']dithiophène dans 2 mL de THF anhydre sous atmosphère d'azote, est additionné à -80 °C, goutte à goutte, 0,73 mL de butyllithium (1,6 M en solution dans l'hexane). Après augmentation de la température jusqu'à la température ambiante, le mélange est agité 1 h à cette même température. Une solution de 4-bromométhyl-N,N-diéthylbenzènesulfonamide (1,05 mmol) dans 1,5 mL de THF anhydre est alors additionnée à -20 °C puis le mélange est agité à température ambiante pendant une nuit. Le mélange réactionnel est ensuite hydrolysé avec de l'acide chlorhydrique 1M (volume équivalent au volume du mélange réactionnel) et extrait 2 fois avec 50 mL de dichlorométhane. Les phases organiques recombinaées sont lavées à l'eau et séchées sur sulfate de magnésium anhydre. Après évaporation des solvants à l'évaporateur rotatif, l'huile jaune obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/éther de pétrole 1/3) pour conduire à un solide jaune.



$C_{20}H_{21}NO_2S_3$

$M = 403,59 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Solide jaune

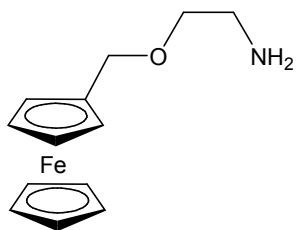
Rf= 0,60 (AcOEt/éther de pétrole:1/3)

Rendement: 34%

RMN  $^1\text{H}$  (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm/TMS): 7,68-7,77 (2H, système AB,  $^3J_{\text{HH}}=8,34 \text{ Hz}$ ,  $H_{\text{phényl}}$ ); 7,26-7,35 (2H, système AB,  $^3J_{\text{HH}}=8,34 \text{ Hz}$ ,  $H_{\text{phényl}}$ ); 7,08-7,14 (2H, système AB,  $^3J_{\text{HH}}=4,94 \text{ Hz}$ ,  $H_{\text{bithioph}}$ ); 6,67-6,73 (2H, système AB,  $^3J_{\text{HH}}=4,94 \text{ Hz}$ ,  $H_{\text{bithioph}}$ ); 3,93 (1H, t,  $^3J_{\text{HH}}=7,70 \text{ Hz}$ , CH); 3,25 (4H, q,  $^3J_{\text{HH}}=7,20 \text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_2\text{N}$ ); 3,09 (2H, d,  $^3J_{\text{HH}}=7,83 \text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ); 1,11 (6H, t,  $^3J_{\text{HH}}=7,20 \text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_3$ ).

### III.4. Synthèse de la sonde ferrocenalkylamine (2-aminoéthyl ferrocénylméthyl éther)

L'iodure de (ferrocénylméthyl)triméthylammonium (1,3 mmol) est additionné à une solution d'aminoéthanoate de sodium dans de l'éthanolamine (obtenue à partir de 40 mg (1,7 mmol) de sodium dans 3,25 mL d'éthanolamine). La suspension orange est chauffée à 100 °C pendant 20 h pour donner une solution marron foncée. Après ajout d'eau, le mélange réactionnel est extrait de nombreuses fois à l'éther. Les phases étherées sont réunies, lavées à l'eau et séchées sur sulfate de magnésium anhydre. Après filtration, l'éther est évaporé à l'évaporateur rotatif. Un solide orangé est obtenu.

 $C_{13}H_{17}NOFe$  $M = 259,13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Solide orangé, point de fusion : 85°C

Rendement: 68%

RMN <sup>1</sup>H (200MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm/TMS): 4,08-4,22 (9H, m, H<sub>ferrocène</sub>); 3,64 (2H, t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=5,05 Hz, OCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>N); 3,53 (1H, s, Ferroc-CH<sub>2</sub>O); 2,80 (2H, t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=5,10 Hz, CH<sub>2</sub>N); 2,01 (2H, s, NH<sub>2</sub>)





# Partie B :

## Instrumentation et procédures électrochimiques

### I. Milieu électrolytique

#### I.1. Milieu organique

##### *Solvants et sel de fond*

L'acétonitrile, commandé chez SDS, est de qualité anhydre (teneur en eau < 0,01 %) et est prélevé sous argon.

L'hexafluoroborate de tétrabutylammonium ( $\text{Bu}_4\text{NPF}_6$ ) commandé chez Fluka, est utilisé comme électrolyte support sans purification préalable à 0,1 M dans l'acétonitrile.

##### *Alumine*

L'eau résiduelle des solutions électrolytiques est éliminée par addition d'alumine neutre  $\text{Al}_2\text{O}_3$  activée par chauffage à 300°C sous vide pendant 5 heures.

#### I.2. Milieu aqueux

Les copolymères ont été étudiés dans un milieu tampon TE/NaCl (solution de Tris-EDTA contenant du Tris-HCl 10mM et de l'EDTA 1mM, pH 7,6) avant et après modification avec de l'ADN.

D'autres mesures ont été effectuées avec le sel  $\text{LiClO}_4$ , commandé chez Acros, utilisé comme électrolyte support à 0,5 M dans l'eau.

### II. Cellules électrochimiques

Toutes les études électrochimiques sont réalisées sous argon (qualité Arcal).

La cellule électrochimique est connectée à un potentiostat / galvanostat EG&PAR modèle VMP2/Z-40 piloté par le logiciel EG&G ZsimpWin version 3.10.

#### II.1. A l'échelle analytique

##### *Mesures non couplées à la microbalance à cristal de quartz*

Lorsqu'elles ne sont pas couplées avec des mesures gravimétriques, les investigations électrochimiques sont réalisées dans une cellule trois doigts d'une capacité de 10 mL équipée de trois électrodes :

- une électrode de travail constituée d'un disque de platine de 1 mm de diamètre,
- une électrode auxiliaire constituée d'un fil de platine
- un système de référence des potentiels différent selon le milieu d'étude, organique ou aqueux:

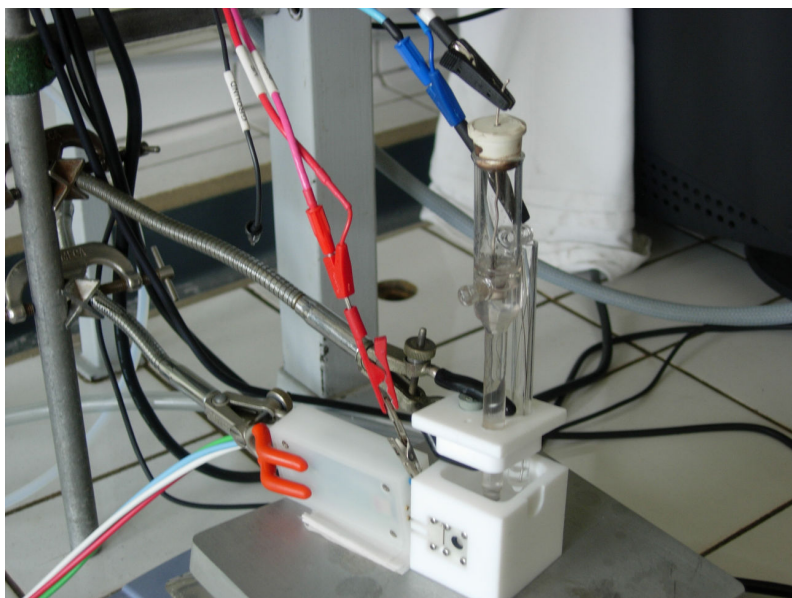
\*milieu organique : fil d'argent plongé dans un compartiment isolé contenant une solution de nitrate d'argent 0,1 M dans l'acétonitrile

\*milieu aqueux : électrode au calomel saturé (ECS).

#### Mesures couplées à la microbalance à cristal de quartz

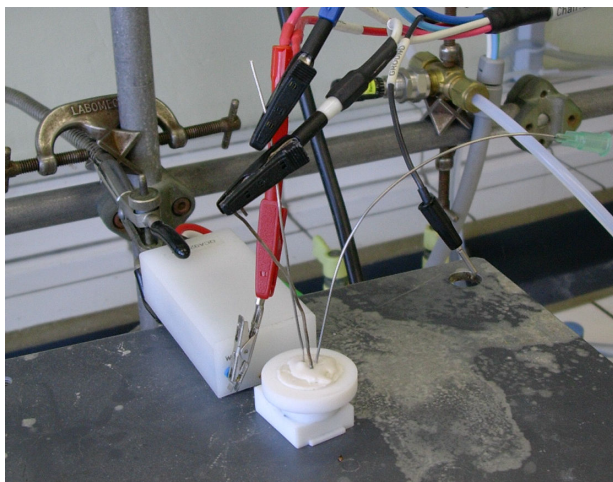
Lorsqu'elles sont couplées avec des mesures gravimétriques, les investigations électrochimiques sont réalisées dans une cellule en Téflon. Deux types de cellules ont été utilisées selon le volume de solution d'étude.

La cellule de plus grande capacité est de forme cubique et est utilisée avec 12 mL de solution électrolytique. Les systèmes de références et auxiliaire sont les mêmes que ceux utilisés dans une cellule trois doigts et l'électrode de travail est un cristal de quartz AT-cut 9 MHz recouverts de platine. Ce cristal de quartz est fixé sur un côté de la cellule.



L'intérêt de la seconde cellule est qu'elle permet d'effectuer des mesures dans des petits volumes compris entre 250 et 700  $\mu\text{L}$ . Lors des mesures électrochimiques, le cristal de quartz

platiné, situé au fond de la cellule constitue l'électrode de travail, un fil de platine et un fil d'argent constituent respectivement l'électrode auxiliaire et l'électrode de référence.



## **II.2. A l'échelle préparative**

Les macroélectrolyses préparatives sont effectuées dans une solution d'acétonitrile contenant 0,1M de  $\text{Bu}_4\text{NPF}_6$ , sur une plaque de platine de surface  $4\text{cm}^2$  utilisée comme électrode de travail. Les cellules utilisées ont une géométrie en forme de H et une capacité de 100mL. Elles sont constituées de deux compartiments séparés par un fritté. L'électrode auxiliaire est une plaque de carbone vitreux. L'électrode de référence est constituée de deux compartiments séparés par un fritté dont l'un contient la solution électrolytique et l'autre une solution  $\text{AgNO}_3$  0,1 M dans l'acétonitrile au contact avec un fil d'argent. La cellule est maintenue sous courant d'argon et sous agitation pendant le temps de l'électrolyse.

## **III. Mesures électrochimiques**

### **III.1. Microbalance à cristal de quartz**

Les études par microbalance à quartz ont été effectuées sur des cristaux de quartz AT-cut 9 MHz recouverts de platine de surface apparente  $0,2\text{cm}^2$  connectés à une microbalance à cristal de quartz PAR modèle QCM922 pilotée par le logiciel WinEchem Seiko EG&G. Les mesures des variations de la fréquence de vibration du quartz sont traduites en variations de masse  $\Delta m$  calculées à partir de la relation de Sauerbrey qui relie la fréquence de résonance à la variation de masse du quartz. Cette relation est établie en supposant que la variation de

fréquence du cristal de quartz ( $\Delta f$  en Hz) est entièrement due à la variation de masse ( $\Delta m$  en g) du matériau chimisorbé ou inséré :

$$\Delta f = \frac{-2f_0^2 \cdot \Delta m}{A \sqrt{\mu_q \cdot \rho_q}}$$

A représente la surface du quartz ( $A = 0,2 \text{ cm}^2$ ) et  $f_0$  est la fréquence de résonance propre de vibration du cristal de quartz ( $f_0 = 8,9 \text{ Hz}$ ).

### **III.2. Spectroscopie d'impédance électrochimique**

Les mesures d'impédance ont été effectuées soit sur électrode millimétrique de platine, soit sur quartz platiné, utilisés comme électrodes de travail respectivement dans une cellule trois doigts ou dans une cellule connectée à la microbalance.

L'amplitude du signal ac est de 10 mV et la fréquence varie entre 100 kHz et 0,1 Hz. Les spectres d'impédance sont analysés au moyen du programme EG&G ZSimpWin utilisant le principe des moindres carrés non linéaires.

## **IV. Préparation et refonctionnalisation des polymères**

### **IV.1. Polymérisation anodique des monomères**

Toutes les polymérisations électrochimiques des monomères ont été réalisées soit dans la cellule en Téflon cubique soit dans une cellule trois doigts selon que les études ont été couplées ou non à la microbalance à cristal de quartz. Dans tous les cas, le milieu réactionnel dégazé par bullage d'argon contenait  $\text{Bu}_4\text{NPF}_6$  0,1 M dans l'acétonitrile et le monomère ( $5 \text{ mM} < C < 28 \text{ mM}$ ). Après polymérisation, les films ont été rincés avec le solvant dans lequel il ont été formés et étudiés dans une cellule ne contenant que le milieu électrolytique.

### **IV.2. Refonctionnalisation des polymères en chlorure de sulfonyle**

Après polymérisation anodique, le polymère porteur de fonctions sulfonamide est rincé avec de l'acétonitrile et transféré dans une cellule électrochimique contenant la solution électrolytique ( $\text{Bu}_4\text{NPF}_6$  0,1 M dans l'acétonitrile). La libération de la diéthylamine par coupure cathodique sélective de la liaison S-N de la fonction sulfonamide a été réalisée par voltamétrie cyclique ou à potentiel imposé. Le film possédant à ce stade du traitement des anions sulfinate terminaux est alors lavé avec de l'acétonitrile. La chloration est réalisée en plongeant l'électrode modifiée dans une solution de N-chlorosuccinimide de concentration  $3,4 \cdot 10^{-2} \text{ M}$  dans l'acétonitrile. Lorsque l'électrode de travail est un cristal de quartz connecté à

la microbalance, la chloration a été réalisée par ajout de 55 mg de N-chlorosuccinimide dans les 12 mL de solution électrolytique (Concentration de N-chlorosuccinimide de  $3,4 \cdot 10^{-2}$  M) de façon à pouvoir suivre directement la variation de masse occasionnée par l'ajout du réactif. Le polymère est ensuite rincé avec de l'acétonitrile. A ce stade, le polymère peut être modifié par une amine primaire par simple trempage dans une solution contenant le réactif.



## Partie C :

# Biologie moléculaire : matériel et méthodes

## I. Matériel biologique

### I.1. Les séquences d'ADN synthétiques

Les oligonucléotides (ODN) proviennent de chez Biofidal.

Deux ODN 42-mer monocaténaire synthétiques terminés en leur extrémité 5' par une fonction amine primaire sont utilisés comme sondes. Les séquences cibles ont chacune une séquence sonde complémentaire, ainsi nous avons utilisé :

1) La sonde : NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-(5') TT GTA AAA TAC CCG AAT TGC AGA ACT TTC TGA CCG CCC CTC G (3') (M = 13507 g.mol<sup>-1</sup>) pour la cible 37-mer : (5') C GAG GGG CGG TCA GAA AGT TCT GCA ATT CGG GTA TTT (3') (M = 12113 g.mol<sup>-1</sup>).

Un simple brin 37-mer d'ODN cible non complémentaire à la sonde décrite ci-dessus a été utilisé comme témoin. Il possède la séquence suivante : (5') A TCT TTT ATT GAC TCC CTG GAG TAC CGG ATT TGC GGG (3') (M = 11990 g.mol<sup>-1</sup>).

2) La sonde : NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-(5') TT GTA AAA TAC GAG GGG CGG TCA GAA AGT TAT GTA ATT CTG T (3') (M = 13252 g.mol<sup>-1</sup>) pour la cible 675-mer : numéro d'accès AJ496134 dans la banque d'ADN EMBL. La cible correspond à la séquence de la base 1 à la base 675.

### I.2. Les séquences d'ADN issues du milieu naturel

Les brins simples de 675 bases utilisés comme séquences cibles ont été obtenus à partir de brins doubles de même taille par PCR asymétrique (paragraphe II.5.).

Le double brin 675-mer est produit à partir d'une séquence ADN d'un élément transposable *mariner* (numéro d'accès AJ496134) cloné dans un plasmide (fragment d'ADN circulaire d'origine bactérienne) pGEM-T easy (Promega) (Figure) introduit dans des bactéries JM 109.



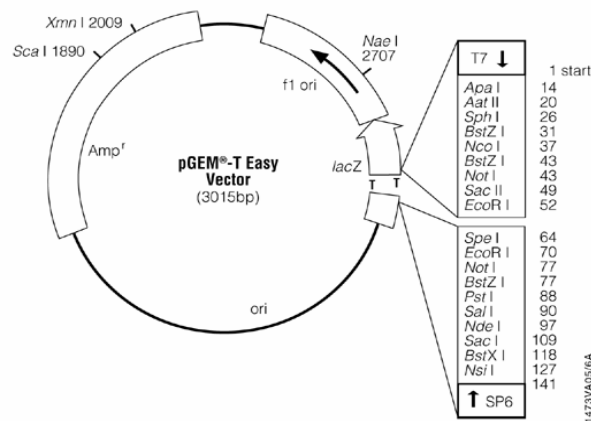


Figure: vecteur pGEM-T easy (3015pb)

## II. Méthodes

### II.1. Purification des plasmides

Les clones bactériens contenant les plasmides d'intérêt sont mis en culture dans 2,5 mL de milieu Luria-Broth contenant 2,5 µL d'ampicilline (100 µg/mL) toute une nuit à 37°C.

Les plasmides inclus dans les bactéries sont extraits à l'aide du kit Wizard Plus Miniprep (Promega). Après la multiplication bactérienne, une centrifugation à 10000 g permet de récupérer le culot bactérien qui est repris dans 200 µL de solution de suspension qui contient de la RNase A, ce qui permet d'éliminer sélectivement les ARN pour ne conserver que l'ADN. Les bactéries sont resuspendues dans 200 µL de solution de lyse (contenant du lysozyme qui détruit la paroi bactérienne) pendant 5 min. La réaction est stoppée par ajout de 200 µL de solution de neutralisation. Après centrifugation pendant 10 minutes à 10 000 g à 4°C, les plasmides sont filtrés sous vide. L'ADN isolé est précipité une heure à -80°C, lavé, séché puis repris dans 20 µL d'eau ultra pure.

### II.2. Amplification d'un fragment d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La technique de PCR permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter considérablement la fraction d'ADN d'intérêt. L'amplification a été réalisée sur les brins doubles de 675 pb et sur les brins cibles monocaténares de même taille.

La réaction se déroule dans un microtube de 0,2 mL. Le milieu réactionnel contient :

- 100 ng du fragment d'ADN,

- 3  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  à 25 mM,
- 3,7  $\mu\text{L}$  de dNTP à 2 mM,
- 1  $\mu\text{L}$  d'amorce (5') GGA GGG GCG GTC AGA AAG TTA TGT AA (3') à 25  $\mu\text{M}$ ,
- 1  $\mu\text{L}$  d'amorce (5') GAA CCC ACG TTT CAT CGC CTG T (3') à 25  $\mu\text{M}$ ,
- 1 unité de Taq polymérase (Promega),
- 5  $\mu\text{L}$  de tampon de réaction de la Taq polymérase (50 mM Tris-HCL (pH 8 à 25°C), 50 mM KCL et 0,1% Triton X-100).

Le volume final est ajusté à 50  $\mu\text{L}$  avec de l'eau ultra pure.

L'amplification a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur « Mastercycler personal » (Eppendorf). Les conditions de PCR sont les suivantes : une première étape de dénaturation à 94°C, 40 cycles de : dénaturation à 94°C pendant 1 minute, hybridation à 59°C pendant 1 min ; élongation à 72°C pendant 1 min. A l'issue des 40 cycles, une extension de 5 min à 72°C est effectuée.

Dans un tube témoin négatif, l'ADN matrice est remplacé par de l'eau ultra pure. Le résultat attendu de la PCR dans ce tube est une absence d'amplification.

### **II.3. Electrophorèse sur gel d'agarose**

Pour vérifier la qualité et la quantité d'ADN obtenu par PCR, une fraction de celui-ci est déposée sur un gel d'électrophorèse. Une électrophorèse permet de séparer des fragments d'ADN en fonction de leur taille. Les fragments les plus longs migrent moins loin que les petits. Un marqueur de taille dont la longueur des fragments est connue permet d'estimer la taille de l'ADN extrait. Le marqueur utilisé ici est « Generuler Ladder Plus » (Fermentas), il correspond à une échelle adaptée pour estimer la taille des fragments.

Les électrophorèses de contrôle sont effectuées sur un gel composé d'agarose (1%), de tampon de migration TAE 1X (Tris Acétate 40 mM - EDTA 1 mM, pH 8) et de bromure d'éthidium (BET, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Ce dernier s'intercale entre les bases de l'ADN et émet de la fluorescence sous irradiation en lumière ultra-violette ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) ce qui permet l'observation des fragments.

### **II.4. Elution des fragments d'ADN à partir d'un gel d'agarose**

A l'issue de la migration, les fragments d'ADN d'intérêt sont découpés sur gel d'agarose 0,8% à bas point de fusion (low-melting), placés dans un microtube puis élués à l'aide du kit Wizard Plus Minipreps (Promega). Dix microlitres de solution de Membrane Binding sont ajoutés pour 10 mg d'agarose puis le mélange est fondu à 65°C pendant 10

minutes. Le mélange est incubé 2 min dans une minicolonne puis centrifugé à 16 000 g pendant 2 min. La minicolonne est lavée deux fois avec la solution de lavage fournie avec le kit. L'ADN est ensuite élué deux fois par 50  $\mu\text{L}$  d'eau ultra pure stérile. L'éluat est précipité avec de l'acétate de sodium 3 M (1/10<sup>ème</sup> du volume) et de l'éthanol absolu (2,5 fois le volume total). Après une incubation de 1 heure à  $-80^{\circ}\text{C}$  et une centrifugation de 15 minutes à 15 000 g à  $4^{\circ}\text{C}$ , le culot est lavé deux fois avec de l'éthanol  $70^{\circ}$ , séché 15 minutes dans la cloche à vide et repris dans 20  $\mu\text{L}$  d'eau ultra pure.

### **II.5. Synthèse d'ADN simple brin par PCR asymétrique**

Cette technique a été utilisée pour produire l'ADN simple brin de 675 bases utilisé comme cible.

La réaction se déroule toujours dans un microtube de 0,2 mL dans les mêmes conditions que la PCR classique (paragraphe II.2) mais la proportion des deux amorces est différente.

Les quantités d'amorces mises en jeu sont :

- 1  $\mu\text{L}$  d'amorce (5') GGA GGG GCG GTC AGA AAG TTA TGT AA (3') à 1  $\mu\text{M}$ ,
- 1  $\mu\text{L}$  d'amorce (5') GAA CCC ACG TTT CAT CGC CTG T (3') à 25  $\mu\text{M}$ ,

Le  $T_m$  utilisé pour cette PCR est de  $59^{\circ}\text{C}$ .

Dans un tube témoin négatif, l'ADN matrice est remplacé par de l'eau ultra pure. Le résultat attendu de la PCR dans ce tube est une absence d'amplification.

### **II.6. Refonctionnalisation des polymères par de l'ADN**

#### *Immobilisation du brin sonde*

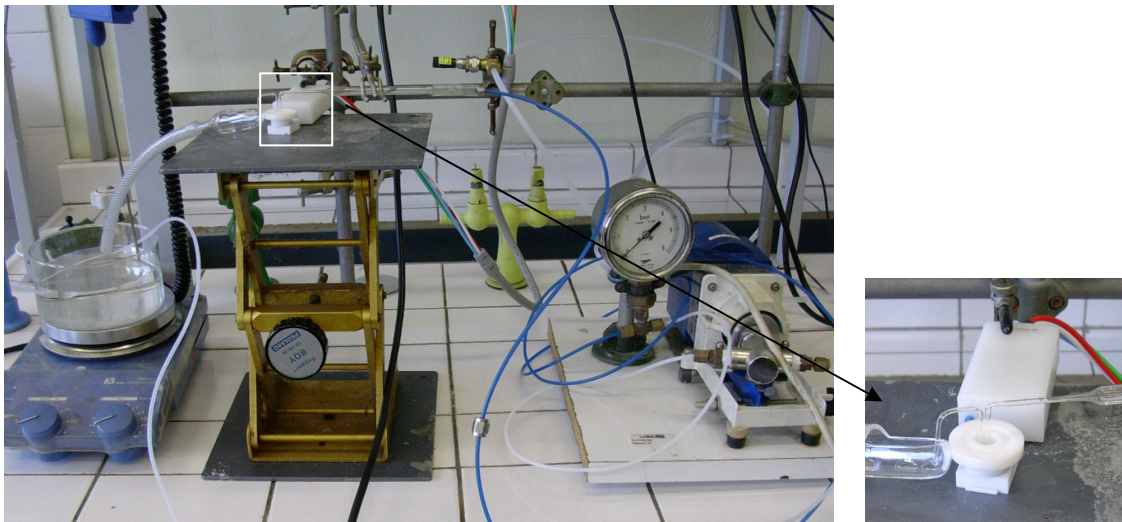
La variation de masse résultant de la fixation de l'ADN à la surface de la matrice polymère durant l'étape d'immobilisation du brin d'ADN sonde modifié en 5' par une fonction amine primaire est suivie in situ au moyen de la microbalance à cristal de quartz.

Tout d'abord, le quartz est monté dans la petite cellule en Téflon (capacité 700  $\mu\text{L}$ ) qui est ensuite connectée vide à la microbalance puis l'acquisition est lancée. Afin de ne pas perdre les premiers points de la mesure, 350  $\mu\text{L}$  de solution TE/NaCl 0,6M (solution de Tris-EDTA contenant du Tris-HCl 10mM et de l'EDTA 1mM, pH 7,6) sont tout d'abord injectés, et quand le signal est stationnaire, 350  $\mu\text{L}$  de solution contenant de l'ADN sonde de concentration 2  $\mu\text{M}$  dans TE/NaCl 0,6M sont injectés (dans le volume total la concentration en ADN est donc de 1  $\mu\text{M}$ ).

### Hybridation avec le brin cible

Lors de cette étape également, la variation de masse résultant de la reconnaissance spécifique entre le brin d'ADN sonde fixé sur la matrice et son complémentaire en solution est suivie in situ au moyen de la microbalance à cristal de quartz.

Le quartz est tout d'abord monté dans la petite cellule en Téflon puis cette cellule est connectée vide à la microbalance. Pour une efficacité maximum, l'hybridation entre la sonde fixée sur le polymère et la cible en solution doit s'effectuer à une température proche de 40°C. Comme la cellule que nous utilisons n'est pas thermostatée, un système « artisanal » est mis en œuvre afin d'obtenir une solution d'hybridation à 35°C. Ce système consiste en une circulation permanente d'eau à 70°C à l'intérieur d'un petit coude de verre plongé dans la cellule en téflon (Photo). Une fois ce système mis en place, l'acquisition est lancée. 350µL d'une solution composée de 315 µL de tampon phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1M, pH 7,4) et de 35 µL de NaCl 5 M sont tout d'abord injectés, et quand le signal est stationnaire, 350µL de la même solution contenant de l'ADN non complémentaire ou cible de concentration 4µM sont injectés (dans le volume total la concentration en ADN est donc de 2µM).



### **II.7. Traitement des brins d'ADN délivrés en solution après clivage électrochimique**

Les brins d'ADN fixés sur la matrice sont libérés dans 250µL de solution TE/NaCl 0,6M. L'ADN est précipité 1h à -80°C après ajout de 25µL d'acétate de sodium 3M et de 700µL d'éthanol absolu. Après 15mn de centrifugation et 2 lavages avec 1mL d'éthanol 70, le culot est séché sous vide et repris dans 25µL d'eau ultrapure puis les brins d'ADN sont amplifiés par PCR selon le procédé décrit dans le paragraphe II.2.



## *Références Bibliographiques*



## Références bibliographiques

- (1) Mello, L. D.; Kubota, L. T. *Food Chemistry* 2002, 77, 237-256.
- (2) Adhikari, B.; Majumdar, S. *Progress in Polymer Science* 2004, 29, 699-766.
- (3) Katz, E.; Willner, I. *Electroanalysis* 2003, 15, 913-947.
- (4) Pejcic, B.; De Marco, R. *Electrochimica Acta* 2006, 51, 6217-6229.
- (5) Tlili, C.; Korri-Youssoufi, H.; Ponsonnet, L.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N. J. *Talanta* 2005, 68, 131-137.
- (6) Korri-Youssoufi, H.; Garnier, F.; Srivastava, P.; Godillot, P.; Yassar, A. *Journal of the American Chemical Society* 1997, 119, 7388-7389.
- (7) Gautier, C.; Cougnon, C.; Pilard, J.-F.; Casse, N. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2006, 587, 276-283.
- (8) Gautier, C.; Cougnon, C.; Pilard, J.-F. *Electrochemistry communications* 2006, 8, 1045-1054.
- (9) Gautier, C.; Cougnon, C.; Pilard, J.-F.; Casse, N.; Chénais, B.; Laulier, M. *Biosensors and Bioelectronics* 2006, sous presse.
- (10) Lau, A. N. K.; Miller, L. L. *Journal of the American Chemical Society* 1983, 105, 5271-5277.
- (11) Malhotra, B. D.; Chaubey, A. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2003, 91, 117-127.
- (12) Stetter, J. R.; Jurs, P. C.; Rose, S. L. *Analytical Chemistry* 1986, 58, 860-866.
- (13) Rosler, S.; Lucklum, R.; Borngraber, R.; Hartmann, J.; Hauptmann, P. *Sensors and Actuators B: Chemical* 1998, 48, 415-424.
- (14) Patel, P. D. *Trends in analytical chemistry* 2002, 21, 96-115.
- (15) de Boer, E.; Beumer, R. R. *International Journal of Food Microbiology* 1999, 50, 119-130.
- (16) Su, X.; Robelek, R.; Wu, Y.; Wang, G.; Knoll, W. *Analytical Chemistry* 2004, 76, 489-494.
- (17) Gerhold, D.; Rushmore, T.; Caskey, C. T. *Trends in Biochemical Sciences* 1999, 24, 168-173.
- (18) Swanson, P.; Gelbart, R.; Atlas, E.; Yang, L.; Grogan, T.; Butler, W. F.; Ackley, D. E.; Sheldon, E. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2000, 64, 22-30.
- (19) Wen, J.-K.; Zhang, X.-E.; Cheng, Z.; Liu, H.; Zhou, Y.-F.; Zhang, Z.-P.; Yang, J.-H.; Deng, J.-Y. *Biosensors and Bioelectronics* 2004, 19, 685-692.
- (20) Schena, M.; Shalon, D.; Heller, R.; Chai, A.; Brown, P. O.; Davis, R. W. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, 93, 10614-10619.
- (21) Harrington, C. A.; Rosenow, C.; Retief, J. *Current Opinion in Microbiology* 2000, 3, 285-291.
- (22) Van Hal, N. L. W.; Vorst, O.; van Houwelingen, A. M. M. L.; Kok, E. J.; Peijnenburg, A.; Aharoni, A.; van Tunen, A. J.; Keijer, J. *Journal of Biotechnology* 2000, 78, 271-280.
- (23) Souteyrand, E. *Analisis* 1999, 27, 639-646.
- (24) Pirrung, M. C. *Angewandte Chemie International Edition* 2002, 41, 1276-1289.
- (25) Dufva, M. *Biomolecular Engineering* 2005, 22, 173-184.
- (26) Gerard, M.; Chaubey, A.; Malhotra, B. D. *Biosensors and Bioelectronics* 2002, 17, 345-359.
- (27) Pirrung, M. C. *Chemical Reviews* 1997, 97, 473-488.



- (28) Fodor, S. P. A.; Read, J. L.; Pirrung, M. C.; Stryer, L.; Lu, A. T.; Solas, D. *Science* 1991, 251, 767-773.
- (29) Lipshutz, R. J.; Fodor, S. P. A.; Gingeras, T. R.; Lockhart, D. J. *Nature genetics supplement* 1999, 21, 20-24.
- (30) Pirrung, M. C.; Bradley, J.-C. *Journal of Organic Chemistry* 1995, 60, 6270-6276.
- (31) McGall, G. H.; Barone, A. D.; Diggelmann, M.; Fodor, S. P. A.; Gentalen, E.; Ngo, N. *Journal of the American Chemical Society* 1997, 119, 5081-5090.
- (32) Pirrung, M. C.; Fallon, L.; McGall, G. *Journal of Organic Chemistry* 1998, 63, 241-246.
- (33) Beier, M.; Hoheisel, J. D. *Nucleic Acids Research* 2000, 28, e11.
- (34) Singh-Gasson, S.; Green, R. D.; Yue, Y.; Nelson, C.; Blattner, F.; Sussman, M. R.; Cerrina, F. *Nature Biotechnology* 1999, 17, 974-978.
- (35) Nuwaysir, E. F.; Huang, W.; Albert, T. J.; Singh, J.; Nuwaysir, K.; Pitas, A.; Richmond, T.; Gorski, T.; Berg, J. P.; Ballin, J.; McCormick, M.; Norton, J.; Pollock, T.; Sumwalt, T.; Butcher, L.; Porter, D.; Molla, M.; Hall, C.; Blattner, F.; Sussman, M. R.; Wallace, R. L.; Cerrina, F.; Green, R. D. *Genome Research* 2002, 12, 1749-1755.
- (36) Blanchard, A. P.; Kaiser, R. J.; Hood, L. E. *Biosensors and Bioelectronics* 1996, 11, 687-690.
- (37) Lausted, C.; Dahl, T.; Warren, C.; King, K.; Smith, K.; Johnson, M.; Saleem, R.; Aitchison, J.; Hood, L.; Lasky, S. R. *Genome Biology* 2004, 5, R58.
- (38) Oleinikov, A. V.; Gray, M. D.; Zhao, J.; Montgomery, D. D.; Ghindilis, A. L.; Dill, K. *Journal of Proteome Research* 2003, 2, 313-319.
- (39) Roget, A.; Livache, T. *Mikrochimica Acta* 1999, 131, 3.
- (40) Beier, M.; Hoheisel, J. D. *Journal of Biotechnology* 2002, 94, 15-22.
- (41) Kumar, A.; Larsson, O.; Parodi, D.; Liang, Z. *Nucleic Acids Research* 2000, 28, e71.
- (42) DeRisi, J. L.; Iyer, V. R.; Brown, P. O. *Science* 1997, 278, 680-686.
- (43) Chu, S.; DeRisi, J.; Eisen, M.; Mulholland, J.; Botstein, D.; Brown, P. O.; Herskowitz, I. *Science* 1998, 282, 699-705.
- (44) Belosludtsev, Y.; Iverson, B.; Lemeshko, S.; Eggers, R.; Wiese, R.; Lee, S.; Powdrill, T.; Hogan, M. *Analytical Biochemistry* 2001, 292, 250-256.
- (45) Zhou, X.; Wu, L.; Zhou, J. *Langmuir* 2004, 20, 8877-8885.
- (46) Sastry, M.; Ramakrishnan, V.; Pattarkine, M.; Ganesh, K. N. *Journal of Physical Chemistry B* 2001, 105, 4409-4414.
- (47) Sastry, M. *Trends in Biotechnology* 2002, 20, 185-188.
- (48) Ye, Y.-K.; Zhao, J.-H.; Yan, F.; Zhu, Y.-L.; Ju, H.-X. *Biosensors and Bioelectronics* 2003, 18, 1501-1508.
- (49) Ju, H.-X.; Ye, Y.-K.; Zhao, J.-H.; Zhu, Y.-L. *Analytical Biochemistry* 2003, 313, 255-261.
- (50) Dolan, P. L.; Wu, Y.; Ista, L. K.; Metzenberg, R. L.; Nelson, M. A.; Lopez, G. P. *Nucleic Acids Research* 2001, 29, e107-.
- (51) Chiu, S.-K.; Hsu, M.; Ku, W.-C.; Tu, C.-Y.; Tseng, Y.-T.; Lau, W.-K.; Yan, R.-Y.; Ma, J.-T.; Tzeng, C.-M. *Biochemical Journal* 2003, 374, 625-632.
- (52) Zammattéo, N.; Jeanmart, L.; Hamels, S.; Courtois, S.; Louette, P.; Hevesi, L.; Remacle, J. *Analytical Biochemistry* 2000, 280, 143-150.
- (53) Joos, B.; Kuster, H.; Cone, R. *Analytical Biochemistry* 1997, 247, 96-101.
- (54) Cha, J.; Han, J. I.; Choi, Y.; Yoon, D. S.; Oh, K. W.; Lim, G. *Biosensors and Bioelectronics* 2003, 18, 1241-1247.

- (55) Fixe, F.; Dufva, M.; Telleman, P.; Christensen, C. B. V. *Nucleic Acids Research* 2004, 32, e9.
- (56) Le Berre, V.; Trévisiol, E.; Dagkessamanskaia, A.; Sokol, S.; Caminade, A.-M.; Majoral, J. P.; Meunier, B.; François, J. *Nucleic Acids Research* 2003, 31, e88.
- (57) Preininger, C.; Bodrossy, L.; Sauer, U.; Pichler, R.; Weilharter, A. *Analytical Biochemistry* 2004, 330, 29-36.
- (58) Beier, M.; Hoheisel, J. D. *Nucleic Acids Research* 1999, 27, 1970-1977.
- (59) Csáki, A.; Möller, R.; Straube, W.; Köhler, J. M.; Fritzsche, W. *Nucleic Acids Research* 2001, 29, e81.
- (60) Chrisey, L. A.; Lee, G. U.; O'Ferrall, C. E. *Nucleic Acids Research* 1996, 24, 3031-3039.
- (61) Rogers, Y.-H.; Jiang-Baucom, P.; Huang, Z.-J.; Bogdanov, V.; Anderson, S.; Boyce-Jacino, M. T. *Analytical Biochemistry* 1999, 266, 23-30.
- (62) Dupont-Filliard, A.; Roget, A.; Livache, T.; Billon, M. *Analytica Chimica Acta* 2001, 449, 45-50.
- (63) Marie, R.; Schmid, S.; Johansson, A.; Ejsing, L.; Nordstrom, M.; Hafliger, D.; Christensen, C. B.; Boisen, A.; Dufva, M. *Biosensors and Bioelectronics* 2006, 21, 1327-1332.
- (64) Rasmussen, S. R.; Larsen, M. R.; Rasmussen, S. E. *Analytical Biochemistry* 1991, 198, 138-142.
- (65) Sabanayagam, C. R.; Smith, C. L.; Cantor, C. R. *Nucleic Acids Research* 2000, 28, e33-.
- (66) Vainrub, A.; Pettitt, B. M. *Physical Review E* 2002, 66, 041905.
- (67) Shchepinov, M.; Case-Green, S.; Southern, E. *Nucleic Acids Research* 1997, 25, 1155-1161.
- (68) Benters, R.; Niemeyer, C. M.; Drutschmann, D.; Blohm, D.; Wöhrle, D. *Nucleic Acids Research* 2002, 30, e10.
- (69) Su, H.; Kallury, K. M. R.; Thompson, M. *Analytical Chemistry* 1994, 66, 769-777.
- (70) Pease, A.; Solas, D.; Sullivan, E.; Cronin, M.; Holmes, C.; Fodor, S. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, 91, 5022-5026.
- (71) Campas, M.; Katakis, I. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2004, 23, 49-62.
- (72) *Yole micronews* 2002, 2.
- (73) Abel, A. P.; Weller, M. G.; Duvencck, G. L.; Ehrat, M.; Widmer, H. M. *Analytical Chemistry* 1996, 68, 2905-2912.
- (74) Ihara, T.; Nakayama, M.; Murata, M.; Nakano, K.; Maeda, M. *Chemical Communications* 1997, 17, 1609-1610.
- (75) Nakayama, M.; Ihara, T.; Nakano, K.; Maeda, M. *Talanta* 2002, 56, 857-866.
- (76) Yu, C. J.; Wan, Y.; Yowanto, H.; Li, J.; Tao, C.; James, M. D.; Tan, C. L.; Blackburn, G. F.; Meade, T. J. *Journal of the American Chemical Society* 2001, 123, 11155-11161.
- (77) Wang, J.; Polsky, R.; Merkoci, A.; Turner, K. L. *Langmuir* 2003, 19, 989-991.
- (78) Hashimoto, K.; Ito, K.; Ishimori, Y. *Analytica Chimica Acta* 1994, 286, 219-224.
- (79) Marrazza, G.; Chianella, I.; Mascini, M. *Biosensors and Bioelectronics* 1999, 14, 43-51.
- (80) Wang, J.; Cai, X.; Rivas, G.; Shiraishi, H.; Farias, P. A. M.; Dontha, N. *Analytical Chemistry* 1996, 68, 2629-2634.

- (81) Wang, J.; Rivas, G.; Cai, X.; Dontha, N.; Shiraishi, H.; Luo, D.; Valera, F. S. *Analytica Chimica Acta* 1997, 337, 41-48.
- (82) Hashimoto, K.; Ito, K.; Ishimori, Y. *Analytical Chemistry* 1994, 66, 3830-3833.
- (83) Takenaka, S.; Yamashita, K.; Takagi, M.; Uto, Y.; Kondo, H. *Analytical Chemistry* 2000, 72, 1334-1341.
- (84) Korri-Youssoufi, H.; Makrouf, B. *Analytica Chimica Acta* 2002, 469, 85-92.
- (85) Sauerbrey, G. *Z. Phys.* 1959, 155, 206.
- (86) Okahata, Y.; Matsunobu, Y.; Ijio, K.; Mukae, M.; Murakami, A.; Makino, K. *Journal of the American Chemical Society* 1992, 114, 8299-8300.
- (87) Okahata, Y.; Kawase, M.; Niikura, K.; Ohtake, F.; Furusawa, H.; Ebara, Y. *Analytical Chemistry* 1998, 70, 1288-1296.
- (88) Han, S.; Lin, J.; Satjapipat, M.; Baca, A. J.; Zhou, F. *Chemical Communications* 2001, 609-610.
- (89) Cho, Y.-K.; Kim, S.; Kim, Y. A.; Lim, H. K.; Lee, K.; Yoon, D.; Lim, G.; Pak, Y. E.; Ha, T. H.; Kim, K. *Journal of Colloid and Interface Science* 2004, 278, 44-52.
- (90) Patolsky, F.; Lichtenstein, A.; Willner, I. *Journal of the American Chemical Society* 2000, 122, 418-419.
- (91) Zhou, X. C.; O'Shea, S. J.; Li, S. F. Y. *Chemical Communications* 2000, 953-954.
- (92) Patolsky, F.; Ranjit, K. T.; Lichtenstein, A.; Willner, I. *Chemical Communications* 2000, 1025-1026.
- (93) Namira, E.; Hayashida, T.; Arakawa, T. *Sensors and Actuators B: Chemical* 1995, 24, 142-144.
- (94) Häussling, L.; Ringsdorf, H.; Schmitt, F.-J.; Knoll, W. *Langmuir* 1991, 7, 1837-1840.
- (95) Brockman, J. M.; Frutos, A. G.; Corn, R. M. *Journal of the American Chemical Society* 1999, 121, 8044-8051.
- (96) Lin, S.; Long, S.; Ramirez, S. M.; Cotter, R. J.; Woods, A. S. *Analytical Chemistry* 2000, 72, 2635-2640.
- (97) Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundstrom, I. *Biosensors and Bioelectronics* 1995, 10, i-ix.
- (98) Wink, T.; van Zuilen, S. J.; Bult, A.; van Bennekom, W. P. *Analytical Chemistry* 1998, 70, 827-832.
- (99) Jordan, C. E.; Frutos, A. G.; Thiel, A. J.; Corn, R. M. *Analytical Chemistry* 1997, 69, 4939-4947.
- (100) Peterlinz, K. A.; Georgiadis, R. M.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J. *Journal of the American Chemical Society* 1997, 119, 3401-3402.
- (101) Guedon, P.; Livache, T.; Martin, F.; Lesbre, F.; Roget, A.; Bidan, G.; Levy, Y. *Analytical Chemistry* 2000, 72, 6003-6009.
- (102) Livache, T.; Maillart, E.; Lassalle, N.; Mailley, P.; Corso, B.; Guedon, P.; Roget, A.; Levy, Y. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2003, 32, 687-696.
- (103) Thiel, A. J.; Frutos, A. G.; Jordan, C. E.; Corn, R. M.; Smith, L. M. *Analytical Chemistry* 1997, 69, 4948-4956.
- (104) Bard, A. J.; Fan, F.-R. F.; Kwak, J.; Lev, O. *Analytical Chemistry* 1989, 61, 132-138.
- (105) Turcu, F.; Schulte, A.; Hartwich, G.; Schuhmann, W. *Biosensors and Bioelectronics* 2004, 20, 925-932.
- (106) Turcu, F.; Schulte, A.; Hartwich, G.; Schuhmann, W. *Angewandte Chemie International Edition* 2004, 43, 3482-3485.

- (107) Goyal, R. N.; Jain, N.; Garg, D. K. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 1997, 43, 105-114.
- (108) Bi, S.; Liu, B.; Fan, F.-R. F.; Bard, A. J. *Journal of the American Chemical Society* 2005, 127, 3690-3691.
- (109) Napier, M. E.; Thorp, H. H. *Langmuir* 1997, 13, 6342-6344.
- (110) Popovich, N. D.; Eckhardt, A. E.; Mikulecky, J. C.; Napier, M. E.; Thomas, R. S. *Talanta* 2002, 56, 821-828.
- (111) Prado, C.; Flechsig, G.-U.; Gründler, P.; Foord, J. S.; Marken, F.; Compton, R. G. *The Analyst* 2002, 127, 329-332.
- (112) Fortin, E.; Chane-Tune, J.; Mailley, P.; Szunerits, S.; Marcus, B.; Petit, J.-P.; Mermoux, M.; Vieil, E. *Bioelectrochemistry* 2004, 63, 303-306.
- (113) Wang, J.; Rivas, G.; Fernandes, J. R.; Lopez Paz, J. L.; Jiang, M.; Waymire, R. *Analytica Chimica Acta* 1998, 375, 197-203.
- (114) Thorp, H. H. *Trends in Biotechnology* 1998, 16, 117-121.
- (115) Bardea, A.; Patolsky, F.; Dagan, A.; Willner, I. *Chemical Communications* 1999, 21-22.
- (116) Patolsky, F.; Lichtenstein, A.; Willner, I. *Angewandte Chemie International Edition* 2000, 39, 940-943.
- (117) Patolsky, F.; Lichtenstein, A.; Willner, I. *Journal of the American Chemical Society* 2001, 123, 5194-5205.
- (118) Patolsky, F.; Filanovsky, B.; Katz, E.; Willner, I. *Journal of Physical Chemistry B* 1998, 102, 10359-10367.
- (119) Hang, T. C.; Guiseppi-Elie, A. *Biosensors and Bioelectronics* 2004, 19, 1537-1548.
- (120) Lee, T.-Y.; Shim, Y.-B. *Analytical Chemistry* 2001, 73, 5629-5632.
- (121) Geetha, S.; Rao, C. R. K.; Vijayan, M.; Trivedi, D. C. *Analytica Chimica Acta Molecular Electronics and Analytical Chemistry - Molecular Electronics and Analytical Chemistry* 2006, 568, 119-125.
- (122) Moriyama, K.; Yui, N. *Journal of Controlled Release* 1996, 42.
- (123) Qiu, L. Y.; Zhu, K. J. *International Journal of Pharmaceutics* 2001, 219, 151-160.
- (124) Wuthrich, P.; Ng, S. Y.; Fritzing, B. K.; Roskos, K. V.; Heller, J. *Journal of Controlled Release* 1992, 21, 191-200.
- (125) Santini, J. T.; Richards, A. C.; Scheidt, R.; Cima, M. J.; Langer, R. *Angewandte Chemie International Edition* 2000, 39, 2396-2407.
- (126) Lira, L. M.; Cordoba de Torresi, S. I. *Electrochemistry Communications* 2005, 7, 717-723.
- (127) Recksiedler, C. L.; Deore, B. A.; Freund, M. S. *Langmuir* 2006, 22, 2811-2815.
- (128) Pernaut, J.-M.; Reynolds, J. R. *Journal of Physical Chemistry B* 2000, 104, 4080-4090.
- (129) Rungsardthong, U.; Ehtezazi, T.; Bailey, L.; Armes, S. P.; Garnett, M. C.; Stolnik, S. *Biomacromolecules* 2003, 4, 683-690.
- (130) Pilard, J.-F.; Marchand, G.; Simonet, J. *Tetrahedron* 1998, 54, 9401-9414.
- (131) Marchand, G. *Thèse de doctorat* 2000, Université de Rennes 1.
- (132) Roncali, J.; Shi, L. H.; Garreau, R.; Garnier, F.; Lemaire, M. *Synthetic Metals* 1990, 36, 267-273.
- (133) Zotti, G.; Zecchin, S.; Schiavon, G.; Vercelli, B.; Berlin, A.; Dalcanale, E.; Groenendaal, L. B. *Chemistry of materials* 2003, 15, 4642-4650.

- (134) Gabrielli, C.; Keddami, M.; Nadi, N.; Perrot, H. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2000, 485, 101-113.
- (135) Bohnke, O.; Vuillemin, B.; Gabrielli, C.; Keddami, M.; Perrot, H.; Takenouti, H.; Torresi, R. *Electrochimica Acta* 1995, 40, 2755-2764.
- (136) Ren, X.; Pickup, P. G. *Journal of Physical Chemistry* 1993, 97, 3941-3943.
- (137) Garcia-Belmonte, G.; Pomerantz, Z.; Bisquert, J.; Lellouche, J.-P.; Zaban, A. *Electrochimica Acta* 2004, 49, 3413-3417.
- (138) Bisquert, J.; Garcia-Belmonte, G.; Fabregat-Santiago, F.; Ferriols, N. S.; Bogdanoff, P.; Pereira, E. C. *Journal of Physical Chemistry B* 2000, 104, 2287-2298.
- (139) Garcia-Belmonte, G. *Electrochemistry communications* 2003, 5, 236-240.
- (140) Ren, X.; Pickup, P. G. *Journal of Physical Chemistry* 1993, 97, 5356-5362.
- (141) Aubert, P.-H.; Groenendaal, L.; Louwet, F.; Lutsen, L.; Vanderzande, D.; Zotti, G. *Synthetic Metals* 2002, 126, 193-198.
- (142) Dubey, S.; Fabre, B.; Marchand, G.; Pilard, J.-F.; Simonet, J. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1999, 477, 121-129.
- (143) Rault-Berthelot, J.; Roze, C. *Synthetic Metals* 1996, 83, 153-157.
- (144) Lota, K.; Khomenko, V.; Frackowiak, E. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 2004, 65, 295-301.
- (145) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Editions Masson* 1983, *Electrochimie Principes, méthodes et application*.
- (146) Refaey, S. A. M.; Schwitzgebel, G.; Schneider, O. *Synthetic Metals* 1999, 98, 183-192.
- (147) Hiller, M.; Kranz, C.; Huber, J.; Bäuerle, P.; Schuhmann, W. *Advanced Materials* 1996, 8, 219-222.
- (148) Anne, A.; Demaille, C.; Moiroux, J. *Macromolecules* 2002, 35, 5578-5586.
- (149) Abbou, J.; Anne, A.; Demaille, C. *Journal of the American Chemical Society* 2004, 126, 10095-10108.
- (150) Bobacka, J.; Grzeszczuk, M.; Ivaska, A. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1997, 427, 63-69.
- (151) Tan, L.; Curtis, M. D.; Francis, A. H. *Macromolecules* 2002, 35, 4628-4635.
- (152) Peng, H.; Soeller, C.; Vigar, N.; Kilmartin, P. A.; Cannell, M. B.; Bowmaker, G. A.; Cooney, R. P.; Travas-Sejdic, J. *Biosensors and Bioelectronics* 2005, 20, 1821-1828.
- (153) Garnier, F.; Korri-Youssoufi, H.; Srivastava, P.; Mandrand, B.; Delair, T. *Synthetic Metals* 1999, 100, 89-94.
- (154) Wang, J.; Jiang, M.; Mukherjee, B. *Analytical Chemistry* 1999, 71, 4095-4099.
- (155) Malhotra, B. D.; Chaubey, A.; Singh, S. P. *Analytica Chimica Acta* 2006, 578, 59-74.
- (156) Mangeney, C.; Lacroix, J.-C.; Chane-Ching, K. I.; Jouini, M.; Aeiyaich, S.; Lacaze, P.-C. *Physical Chemistry Chemical Physics* 1999, 1, 2755-2760.
- (157) Rault-Berthelot, J.; Raoult, E.; Pilard, J.-F.; Aoun, R.; Le Floch, F. *Electrochemistry communications* 2001, 3, 91-96.
- (158) Mangeney, C.; Lacroix, J.-C.; Chane-Ching, K. I.; Aeiyaich, S.; Jouini, M.; Adenier, A.; Lacaze, P.-C. *Synthetic Metals* 2000, 108, 237-243.
- (159) Just, P. E.; Chane-Ching, K. I.; Lacroix, J. C.; Lacaze, P. C. *Electrochimica Acta* 2001, 46, 3279-3285.
- (160) Chen, S.-A.; Tsai, C.-C. *Macromolecules* 1993, 26, 2234-2239.
- (161) Lassalle, N.; Mailley, P.; Vieil, E.; Livache, T.; Roget, A.; Correia, J. P.; Abrantes, L. M. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2001, 509, 48-57.

- (162) Lassalle, N.; Roget, A.; Livache, T.; Mailley, P.; Vieil, E. *Talanta* 2001, 55, 993-1004.
- (163) Bates, J. B.; Chu, Y. T.; Stribling, W. T. *Phys. Rev. Lett.* 1988, 60, 627-630.
- (164) Kerner, Z.; Pajkossy, T. *Electrochimica Acta* 2000, 46, 207-211.
- (165) Bisquert, J.; Garcia-Belmonte, G.; Fabregat-Santiago, F.; Bueno, P. R. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1999, 475, 152-163.
- (166) Piro, B.; Haccoun, J.; Pham, M. C.; Tran, L. D.; Rubin, A.; Perrot, H.; Gabrielli, C. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2005, 577, 155-165.
- (167) Dawn, A.; Nandi, A. K. *Macromolecular Bioscience* 2005, 5, 441-450.
- (168) Stiriba, S.-E.; Frey, H.; Haag, R. *Angewandte Chemie International Edition* 2002, 41, 1329-1334.
- (169) Zinger, B.; Miller, L. L. *Journal of the American Chemical Society* 1984, 106, 6861-6863.
- (170) Pilard, J.-F.; Cougnon, C.; Rault-Berthelot, J.; Berthelot, A.; Hubert, C.; Tran, K. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2004, 568, 195-201.
- (171) Jeffries, A. T.; Moore, K. C.; Ondeyka, D. M.; Springsteen, A. W.; MacDowell, D. W. H. *Journal of Organic Chemistry* 1981, 46, 2885-2889.
- (172) Cougnon, C.; Gautier, C.; Pilard, J.-F.; Raoult, E.; Rault-Berthelot, J. *Electrochemistry Communications* 2006, 8, 143-147.
- (173) Wan, P.; Krogh, E. *Journal of the American Chemical Society* 1989, 111, 4887-4895.
- (174) Krogh, E.; Wan, P. *Journal of the American Chemical Society* 1992, 114, 705-712.
- (175) Zotti, G.; Schiavon, G.; Zecchin, S.; Berlin, A.; Pagani, G. *Synthetic Metals* 1994, 66, 149-155.
- (176) Mizuseki, H.; Igarashi, N.; Belosludov, R. V.; Farajian, A. A.; Kawazoe, Y. *Materials Science and Engineering: C Current Trends in Nanoscience - From Materials to Application Proceedings of Symposium A, E-MRS Spring Meeting 2003*, 2003, 23, 807-809.
- (177) Collard, D. M.; Fox, M. A. *Journal of the American Chemical Society* 1991, 113, 9414-9415.
- (178) Zotti, G.; Schiavon, G.; Berlin, A.; Fontana, G.; Pagani, G. *Macromolecules* 1994, 27, 1938-1942.
- (179) Kontturi, K.; Pentti, P.; Sundholm, G. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1998, 453, 231-238.
- (180) Huang, H.; Liu, C.; Liu, B.; Cheng, G.; Dong, S. *Electrochimica Acta* 1998, 43, 999-1004.







