



**HAL**  
open science

# Autoassemblage de macromolécules biologiques via des poly(pyrroles) et/ou des nanotubes de carbone fonctionnalisés

Jessica Baur

► **To cite this version:**

Jessica Baur. Autoassemblage de macromolécules biologiques via des poly(pyrroles) et/ou des nanotubes de carbone fonctionnalisés. Chimie. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT: . tel-00540304

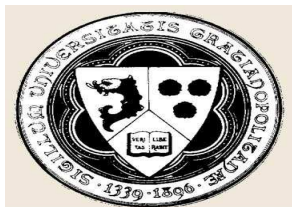
**HAL Id: tel-00540304**

**<https://theses.hal.science/tel-00540304v1>**

Submitted on 26 Nov 2010

**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.



# UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE**

Spécialité Chimie Biologie

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée et soutenue publiquement par

**BAUR JESSICA**

Le 04 Novembre 2010

---

### **AUTOASSEMBLAGE DE MACROMOLECULES BIOLOGIQUES VIA DES POLY(PYRROLES) ET/OU DES NANOTUBES DE CARBONE FONCTIONNALISES.**

---

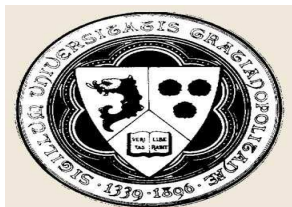
Thèse dirigée par Dr. Holzinger Michael et codirigée par Dr. Cosnier Serge.

## JURY

Dr. Bidan Gérard	DR CEA, Grenoble	Président
Dr. Lojou Elisabeth	CR CNRS, Marseille	Rapporteur
Pr. Kuhn Alexander	Professeur, Bordeaux	Rapporteur
Pr. Gros Pierre	Professeur, Toulouse	Examineur
Dr. Holzinger Michael	CR CNRS, Grenoble	Examineur
Dr. Cosnier Serge	DR CNRS, Grenoble	Examineur

Thèse préparée au sein du laboratoire Biosystèmes Electrochimiques et Analytiques du Département de Chimie Moléculaire (UMR CNRS 5250) de l'Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble (FR 2607) dans l'Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant.





UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE**

Spécialité Chimie Biologie

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée et soutenue publiquement par

**BAUR JESSICA**

Le 04 Novembre 2010

---

**AUTOASSEMBLAGE DE MACROMOLECULES BIOLOGIQUES  
VIA DES POLY(PYRROLES) ET/OU DES NANOTUBES DE  
CARBONE FONCTIONNALISES.**

---

Thèse dirigée par Dr. Holzinger Michael et codirigée par Dr. Cosnier Serge.

## JURY

Dr. Bidan Gérard	DR CEA, Grenoble	Président
Dr. Lojou Elisabeth	CR CNRS, Marseille	Rapporteur
Pr. Kuhn Alexander	Professeur, Bordeaux	Rapporteur
Pr. Gros Pierre	Professeur, Toulouse	Examineur
Dr. Holzinger Michael	CR CNRS, Grenoble	Examineur
Dr. Cosnier Serge	DR CNRS, Grenoble	Examineur

Thèse préparée au sein du laboratoire Biosystèmes Electrochimiques et Analytiques du Département de Chimie Moléculaire (UMR CNRS 5250) de l'Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble (FR 2607) dans l'Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant.



*A la mémoire de ma princesse Pomponette,  
Je ne t'oublierais jamais...*

## Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au Département de Chimie Moléculaire (DCM) de l'Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble (ICMG). Je remercie le Professeur Pascal Dumy, directeur du laboratoire, de m'avoir accueillie et permis de travailler dans de bonnes conditions mais aussi pour avoir accepté de financer mon travail pendant ces trois années.

Je remercie vivement Madame Elisabeth LOJOU, Chargée de recherches au CNRS de Marseille, et Monsieur Alexander KUHN, Professeur à l'Université de Bordeaux, d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je remercie également Monsieur Gérard BIDAN, Directeur de recherches au CEA de Grenoble, d'avoir accepté de présider mon jury de thèse et d'examiner mes travaux.

Je tiens à remercier Monsieur Pierre GROS, Professeur à l'Université de Toulouse, en tant qu'examineur de mon travail.

Je leur exprime toute ma gratitude pour l'intérêt qu'ils ont manifesté à l'égard de ce travail et pour leurs appréciations.

Mes plus vifs remerciements vont à mes directeurs de thèse, Serge COSNIER et Michael HOLZINGER, qui m'ont accueillie au sein du laboratoire Biosystèmes Electrochimiques et Analytiques (directeur : Dr. Serge COSNIER) du DCM. Je les remercie pour la confiance qu'ils m'ont accordée, leur encadrement remarquable, leur soutien au quotidien mais aussi pour les multiples discussions plus ou moins scientifiques. Plus particulièrement, je remercie Serge pour tous les conseils et suggestions qu'il a pu me donner, pour son ingéniosité et l'étendue impressionnante de ses connaissances scientifiques. Je remercie Michael pour l'aide qu'il m'a apporté en synthèse organique mais aussi au sujet des nanotubes de carbone ainsi que pour son enthousiasme permanent.

Je tiens ensuite à remercier Chantal GONDRAN qui a su me remotiver pendant les moments les plus difficiles de ces trois années. Je la remercie pour ses encouragements, son soutien, sa rigueur, ses conseils, sa générosité, sa bonne humeur, sa gentillesse mais aussi pour m'avoir permis de découvrir et aimer la spectroscopie d'impédance électrochimique. Je n'oublierais pas tout ce qu'elle a pu m'apporter que ce soit d'un point de vue scientifique ou personnel.

Au cours de ces trois années, j'ai eu la chance de travailler en collaboration avec d'autres groupes de recherche ; j'ai ainsi pu rencontrer des personnes qualifiées et compétentes. A ce titre-là, je remercie Eric Defrancq, Professeur à l'Université de Grenoble (synthèse et purification d'oligonucléotides), Patrice Marche et Marie Bernadette Villiers à l'Institut Albert Bonniot de

Grenoble (modifications enzymatiques), Marc Rousset et Sébastien Dementin (extraction, purification et modification d'hydrogénases) du laboratoire Bioénergétique et Ingénierie des Protéines du CNRS de Marseille ainsi que Célia M. Silveira et M. Gabriela Almeida (connexion directe d'une nitrite réductase sur les SWCNTs) du laboratoire REQUIMTE au Portugal. Je souhaite aussi remercier les jeunes scientifiques que j'ai pu encadrer au cours de ces trois années : Emeline et Fiona. Je leur souhaite bonne chance pour la suite de leurs vies professionnelle et personnelle.

Je me dois de remercier les Professeurs Maurice Comtat et Pierre Gros de l'Université de Toulouse qui m'ont fait découvrir et aimer l'électrochimie pendant mes études universitaires puis accueillie comme stagiaire dans leur laboratoire ; sans eux je n'en serais peut être pas là aujourd'hui.

Merci à tous ceux du bâtiment Nanobio ainsi que ceux du troisième étage du Bâtiment B qui m'ont aidée ou cotoyée au laboratoire. Merci Arielle, Bruno, Sylvie P., Régine et Véronique pour votre aide au laboratoire ou dans les tracasseries administratives. J'adresse également mes remerciements à Alan et Karine.

Je tiens à remercier maintenant l'ensemble des étudiants du laboratoire que j'ai eu plaisir à côtoyer aux cours de ces trois ans. Dans un premier temps mes colocataires du bureau 359 du Bâtiment B : les anciens Marie, Jean, Aurélien et Ludivine ; ma grande copine et compagne de galère pendant ces trois ans de thèse Adriana (*tu vas beaucoup me manquer...*), Francisco (*merci pour ton amitié et ta gentillesse petit Juan !*), Fabien (*merci pour tout ce que tu fais au labo et tes chants parfois étranges...*), Raoudha (*bonne chance en Allemagne !*), Hajra (*plus que quelques mois... Courage...*), Sébastien, Marc, Thibaut, Andrew, Astrid, Xu, Célia. Je pense aussi aux étudiants que j'ai pu connaître après le déménagement et je les remercie pour leur bonne humeur et leur gentillesse : Pierre (*merci pour ton aide, tes conseils pour les oligos ainsi que les schémas*), Marie-Laure (*on se verra peut être en Angleterre avec nos parapluies roses...*), Julien, Matthieu, Isabelle, Corinne, Seda ainsi qu'aux non-étudiants : Florian (*le roi du frisbee...*), Ludovic, Sélim, Marius, Cédric, Abdel, Garrett, Galina, Matilte, Marcello, Isabel, Neus, Laura, Shou nian, Magda. Bonne chance à toutes et tous pour la suite ; grâce à vous j'ai passé trois années dans une excellente ambiance et j'espère retrouver un tel groupe plus tard dans ma carrière.

Enfin, je tiens à remercier ma famille : mes parents, mes sœurs Christelle et Lisa, mes grands parents qui m'ont encouragée et soutenue jusqu'au bout. Merci d'avoir été compréhensifs et présents à mes côtés. Puis, pour son soutien permanent et pour m'avoir supportée durant la rédaction et la soutenance et surtout pour me supporter tous les jours, je remercie Xavier, je te remercie mon cœur...



## Sommaire

<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
------------------------------------	----------

<b>Chapitre I : Etude bibliographique</b> .....	<b>5</b>
---	----------

<b>I.1. Introduction</b> .....	<b>7</b>
--------------------------------	----------

I.1.1. Définition d'un biocapteur .....	7
---	---

I.1.2. Evolution des biocapteurs électrochimiques dans l'histoire .....	8
---	---

I.1.3. Méthodes d'immobilisation .....	9
--	---

<b>I.2. Les macromolécules biologiques</b> .....	<b>11</b>
--	-----------

I.2.1. Les enzymes.....	12
-------------------------	----

I.2.2. L'ADN (acide désoxyribonucléique).....	20
---	----

<b>I.3. Biocapteurs à base de polymères électrogénérés</b> .....	<b>25</b>
--	-----------

I.3.1. Encapsulation.....	26
---------------------------	----

I.3.2. Adsorption .....	28
-------------------------	----

I.3.3. Greffage chimique .....	28
--------------------------------	----

I.3.4. Ancrage par interactions affines .....	29
---	----

I.3.5. Polymérisation de monomères bio-fonctionnalisés .....	31
--	----

<b>I.4. Biocapteurs à base d'architectures tridimensionnelles</b> .....	<b>32</b>
---	-----------

I.4.1. Fonctionnalisation chimique et solubilisation des nanotubes de carbone.....	32
--	----

I.4.2. Utilisation des nanotubes de carbone dans les biocapteurs.....	34
---	----

<b>Chapitre II : Architectures biomoléculaires d'affinité à base de poly(pyrrole-acide nitrilotriacétique) (NTA)</b> .....	<b>45</b>
--	-----------

<b>II.1. Généralités</b> .....	<b>47</b>
--------------------------------	-----------

II.1.1. L'acide nitrilotriacétique (NTA) et le complexe NTA/Cu <sup>2+</sup> .....	48
--	----

II.1.2. L'interaction NTA/Cu <sup>2+</sup> /Histidine.....	48
--	----

II.1.3. Le poly(pyrrole-NTA).....	49
-----------------------------------	----

<b>II.2. Synthèse et caractérisation du pyrrole-NTA</b> .....	<b>50</b>
---	-----------

II.2.1. Synthèse du monomère pyrrole-NTA.....	50
---	----

II.2.2. Etude électrochimique du pyrrole-NTA .....	51
--	----

II.2.3. Etude de perméabilité .....	54
-------------------------------------	----

<b>II.3. Capteur à ADN basé sur l'interaction NTA/Cu<sup>2+</sup>/Histidine : détection par spectroscopie d'impédance électrochimique.....</b>	<b>58</b>
II.3.1. Présentation du capteur et élaboration.....	58
II.3.2. Caractérisations .....	59
II.3.3. Application à la détection de l'ADN-cible par impédance.....	71
II.3.4. Bilan .....	90
<b>II.4. Immobilisation de biomolécules grâce à l'interaction NTA/Cu<sup>2+</sup>/Biotine.....</b>	<b>91</b>
II.4.1. L'interaction NTA/Cu <sup>2+</sup> /Biotine.....	91
II.4.2. Caractérisation par microscopie à fluorescence.....	94
II.4.3. Etude de l'ancrage de biomolécules biotinylées.....	95
II.4.4. Bilan .....	107
<b>II.5. Conclusions du Chapitre II .....</b>	<b>108</b>

## **Chapitre III : Biocapteurs enzymatiques à base de nanotubes de carbone.**

.....	<b>113</b>
<b>III.1. Généralités .....</b>	<b>115</b>
III.1.1. Les nanotubes de carbone (CNTs) .....	116
III.1.2. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone par $\pi$ -stacking grâce à l'interaction CNTs/pyrène .....	119
<b>III.2. Fonctionnalisation multiple de SWCNTs .....</b>	<b>120</b>
III.2.1. Synthèse des pyrènes fonctionnalisés.....	120
III.2.2. Prétraitement, dispersion et dépôt des nanotubes de carbone mono-paroi.....	123
III.2.3. Marquage enzymatique des électrodes modifiées par un seul pyrène avec une enzyme modèle : la glucose oxydase .....	125
III.2.4. Marquage enzymatique d'électrodes modifiées par un mélange des trois pyrènes avec la glucose oxydase .....	139
III.2.5. Combinaison des trois systèmes affins pour la fonctionnalisation multiple des nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs) .....	156
III.2.6. Bilan .....	165
<b>III.3. Connexion d'une hydrogénase NiFe sur les CNTs .....</b>	<b>166</b>
III.3.1. L'hydrogénase NiFe : synthèse et caractérisation .....	166
III.3.2. Etude du système hybride CNTs/hydrogénase/poly(pyrrole-viologène) .....	173
III.3.3. Etude du système hybride MWCNTs/hydrogénase/pyrène-viologène.....	187

III.3.4. Comparaison des deux voies de connexion de l'hydrogénase .....	195
<b>III.4. Conclusions du Chapitre III .....</b>	<b>196</b>
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>201</b>
<b>Partie expérimentale.....</b>	<b>205</b>
<b>E.1. Organic compounds synthesis .....</b>	<b>207</b>
E.1.1. Synthesis of pyrrole-NTA ( <b>III</b> ) .....	207
E.1.2. Synthesis of pyrene-NTA ( <b>IV</b> ) .....	208
E.1.3. Synthesis of pyrene-adamantane ( <b>V</b> ) .....	209
E.1.4. Synthesis of pyrene-biotin ( <b>VI</b> ) .....	210
E.1.5. Synthesis of pyrrole-viologen ( <b>X</b> ) .....	210
E.1.6. Synthesis of pyrene-viologène ( <b>XIII</b> ).....	212
E.1.7. Synthesis of pyrrole-ammonium ( <b>XV</b> ) .....	214
<b>E.2. Tagged biomolecules synthesis .....</b>	<b>215</b>
E.2.1. Histidine-tagged glucose oxidase (His-GOX) .....	215
E.2.2. $\beta$ -cyclodextrines-tagged glucose oxidase ( $\beta$ -CD-GOX).....	216
E.2.3. Biotin-tagged glucose oxidase (B-GOX).....	217
E.2.4. Biotin-tagged polyphenol oxidase (B-PPO) .....	217
<b>E.3. Apparatus, solvents and reagents.....</b>	<b>218</b>
E.3.1. Solvents .....	218
E.3.2. Biomolecules .....	218
E.3.3. Other reagents.....	219
E.3.4. Apparatus.....	220
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>223</b>
Notations .....	225
Notations en synthèse organique (partie expérimentale).....	226
Noms IUPAC des produits organiques synthétisés (par ordre de numérotation).....	227
<b>Liste des publications .....</b>	<b>229</b>



# Introduction générale



## Introduction générale

Les capteurs sont aujourd'hui primordiaux du fait de leurs applications dans les domaines scientifiques et technologiques mais aussi dans la vie courante domestique et industrielle voire environnementale. Les biocapteurs en sont une classe particulière qui fait intervenir des matériaux biologiques (ADN, protéines, oligosaccharides...) capables de réagir avec spécificité et sensibilité à un stimulus particulier.

Ces biocapteurs permettent de combiner les propriétés des macromolécules biologiques avec ceux des matériaux et il est maintenant clairement établi que l'une des étapes les plus déterminantes pour leur élaboration est l'immobilisation des biorécepteurs sur la surface de ces matériaux. Parmi les différentes stratégies d'immobilisation employées, l'une des plus prometteuses est celle qui consiste à utiliser des polymères électrogénérés. En effet, ceux-ci permettent de préserver l'accessibilité des macromolécules biologiques greffées sur la surface du transducteur tout en alliant une grande précision et une bonne reproductibilité des dépôts dues à leur adressage électrochimique. En raison de leurs propriétés aisément modulables, les films de poly(pyrrole) ont été des acteurs majeurs de ce développement.

Depuis quelques années et devant d'autres défis tels que la miniaturisation de ces systèmes ou l'augmentation de leurs performances (sensibilité, stabilité...), une forte compétition s'est focalisée au niveau international sur le développement d'autres matériaux pour l'élaboration de biocapteurs basés sur des nano-objets tels que, par exemple, les nanoparticules, les nanotubes ou encore les quantum dots. Plusieurs architectures ont ainsi pu être obtenues et celles-ci ont permis de repousser toujours plus loin les seuils de détection ou la taille des biocapteurs.

Ce type d'architectures hybrides à l'interface biologie/matériaux a même pu être développé pour d'autres types d'applications telles que les biopiles lorsque la communauté internationale s'est confrontée au problème du développement d'énergies durables (photovoltaïque, hydrogène...) comme alternatives aux énergies fossiles.

Le premier chapitre de ce mémoire est divisé en quatre parties : une brève introduction est d'abord réalisée puis, dans un second temps, nous présentons les macromolécules biologiques. Dans un troisième temps, des exemples significatifs extraits de la bibliographie et illustrant les atouts des polymères électrogénérés pour l'élaboration des biocapteurs sont décrits et discutés. Enfin, la dernière partie concerne des travaux plus récents sur

l'incorporation des nanomatériaux dans ce type de capteurs. Pour tous les exemples exposés, notre attention s'est principalement focalisée sur les stratégies employées dans la suite du mémoire.

Le deuxième chapitre est consacré aux biocapteurs élaborés grâce à un polymère électrogénéré particulier : le poly(pyrrole) fonctionnalisé par un groupement acide nitrilotriacétique (pyrrole-NTA). Ce polymère est tout d'abord présenté (propriétés et caractérisations électrochimiques) puis comparé à différents films de poly(pyrrole) fonctionnalisés. Celui-ci est capable de complexer des ions  $\text{Cu}^{2+}$  et permet par la suite l'immobilisation réversible de macromolécules biologiques étiquetées de groupements histidine. Dans une seconde partie, l'élaboration d'un capteur à ADN basé sur cette interaction affine *via* une liaison de coordination est décrite et examinée. Dans la dernière partie, nous exposerons l'exploitation de ce polymère pour l'élaboration d'un nouveau système d'affinité faisant intervenir des molécules biotinylées *via* une interaction NTA/ $\text{Cu}^{2+}$ /biotine. Cette partie sera illustrée par l'ancrage de biomolécules biotinylées telles que les enzymes ou l'ADN.

Enfin, dans le troisième et dernier chapitre de ce mémoire, nous nous intéressons aux biocapteurs hybrides incorporant des nanotubes de carbone mono- et multi-parois. Dans un premier temps, une description des nanotubes de carbone est réalisée, présentant les principales différences entre les mono- et multi-parois. Dans une deuxième partie, une approche innovante pour la fonctionnalisation multiple et non-covalente des nanotubes de carbone mono-paroi par interaction de type  $\pi$ - $\pi$  combinée aux trois systèmes d'affinité utilisés pour élaborer des biocapteurs est décrite pour la première fois grâce à l'utilisation d'une enzyme modèle : la glucose oxydase. Enfin, des travaux préliminaires concernant la connexion d'une hydrogénase sur des dépôts de nanotubes de carbone fonctionnalisés par un médiateur rédox, le viologène, sont relatés.



# Chapitre I

Etude bibliographique.



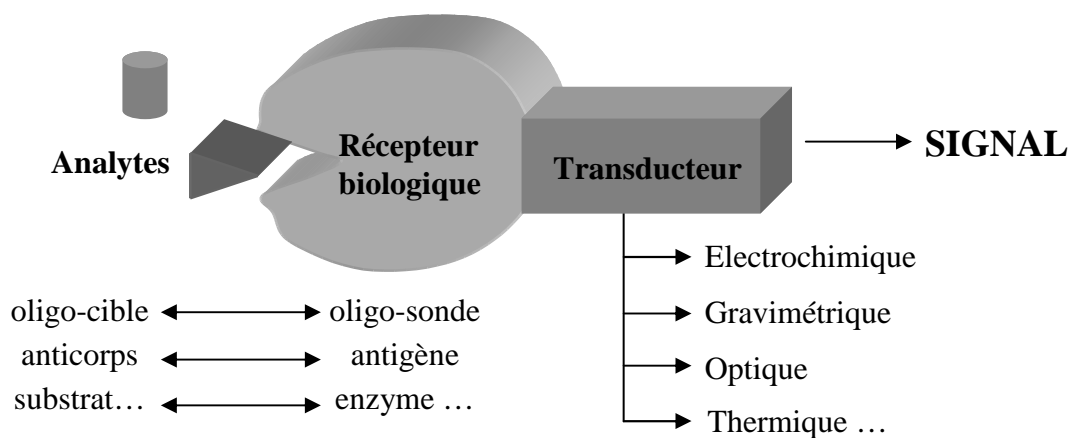
# Chapitre I : Etude bibliographique

## I.1. Introduction

Les biocapteurs représentent un domaine de recherches important depuis plus de 40 années. Ce sont des outils analytiques applicables à de nombreux domaines tels que les sciences de la vie (agroalimentaire<sup>1</sup>, médecine<sup>2</sup>, biologie<sup>3</sup>...), l'environnement<sup>4</sup> (pollution) ou encore le bioterrorisme<sup>5</sup> (prévention d'attaques biologiques). Ces capteurs peuvent être façonnés à demande pourvu que la cible à détecter interagisse avec un système biologique (enzymes, ADN, anticorps...). Un « bon » biocapteur doit cependant être sélectif, sensible, rapide, fiable, portable et bon marché.

### I.1.1. Définition d'un biocapteur

Les biocapteurs sont constitués d'un récepteur biologique, d'un transducteur et d'un système d'analyse des données (**Schéma I-1**).

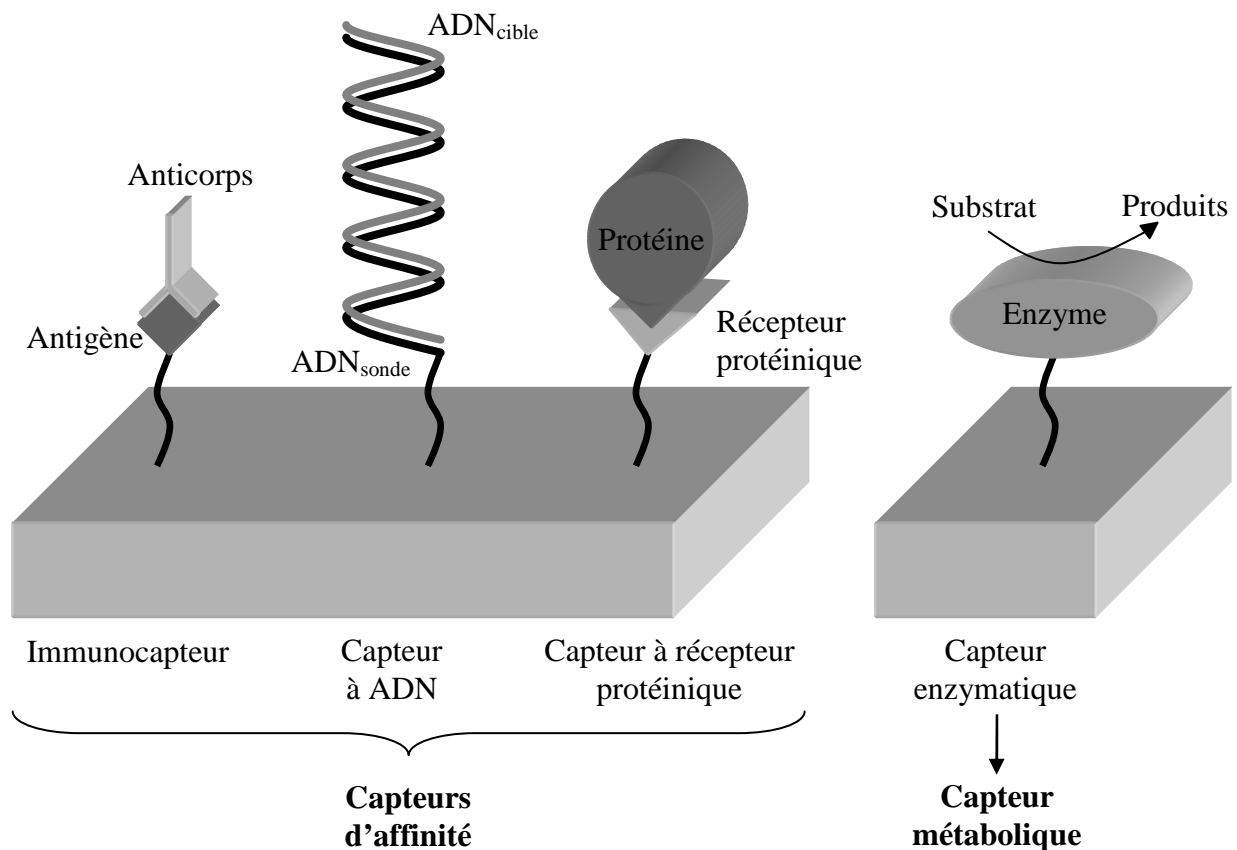


**Schéma I-1** : Représentation schématique d'un biocapteur.

Ces outils combinent donc les performances de reconnaissance des macromolécules biologiques et la sensibilité de détection des transducteurs. Dans un premier temps, le récepteur biologique va interagir spécifiquement avec l'analyte qui lui correspond et cette reconnaissance va être transformée en signal électrique grâce au transducteur dans un second temps. Ce signal électrique va finalement être transmis au système d'analyse de données après avoir éventuellement subi une amplification. Le récepteur biologique peut être de diverses

natures<sup>6</sup> : enzymes, oligonucléotides sondes, anticorps... De même, il existe différents types de transducteurs : électrochimique<sup>7</sup>, optique<sup>8</sup>, gravimétrique<sup>9</sup>, thermique<sup>10</sup>...

Les biocapteurs peuvent être regroupés en deux grandes classes : les biocapteurs d'affinité<sup>11</sup> et les biocapteurs métaboliques<sup>12</sup>. Le premier groupe concerne ceux dans lesquels un phénomène de reconnaissance va s'établir entre le récepteur biologique et l'analyte (exemples : anticorps/antigène, récepteur protéinique/protéine, ADN<sub>sonde</sub>/ADN<sub>cible</sub>). Les biocapteurs métaboliques (enzymatique et bactérien) vont conduire à la destruction de l'analyte par réaction entre ce dernier et, par exemple, l'enzyme immobilisée (**Schéma I-2**).



**Schéma I-2** : Représentation schématique des deux classes de biocapteurs : d'affinité et métabolique.

### I.1.2. Evolution des biocapteurs électrochimiques dans l'histoire

Depuis presque 50 ans, les chercheurs ont porté une grande attention au développement des biocapteurs. Le premier biocapteur fut développé par Clark et Lyons en 1962 en combinant l'électrode de Clark (détection O<sub>2</sub>) et la glucose oxydase (GOX) pour la

détection du glucose dans le sang<sup>13</sup>. En 1967, le premier biocapteur contenant la GOX piégée dans un gel polymérisé est élaboré par Updike et Hicks<sup>14</sup> et va être un point de démarrage important au développement des biocapteurs électrochimiques du fait de sa commercialisation. Le premier biocapteur potentiométrique pour la détection de l'urée est décrit en 1969 par Guilbault et Montalvo<sup>15</sup>. Entre 1970 et 1980, une centaine d'articles sont apparus dans la littérature décrivant de nouveaux biocapteurs principalement enzymatiques<sup>16</sup> et le nombre de travaux concernant ces outils de détection n'a ensuite cessé d'augmenter.

Le développement rapide des biocapteurs dans le monde entier a permis de mettre en évidence une étape clé à considérer lors de leur élaboration qui concerne l'immobilisation des biomolécules sur la surface du transducteur. En effet, les groupes de recherche impliqués dans ce domaine se sont retrouvés face à des défis majeurs afin de réaliser une immobilisation des récepteurs biologiques la plus idéale possible. Dans le cas idéal, il faut tout d'abord assurer un ancrage stable des biomolécules sur la surface du transducteur qui pourra ainsi conférer une bonne stabilité au biocapteur et ceci sans dénaturer la biomolécule utilisée. Il faut comprendre par cela que cette dernière (ou son site actif) doit conserver une bonne accessibilité et être orientée de façon à pouvoir interagir correctement avec la cible à détecter. Le dépôt biomoléculaire doit aussi être compact, homogène et comporter le minimum possible de défauts afin de profiter complètement de la surface ainsi fonctionnalisée et espérer atteindre des limites de détection faibles sur de petites surfaces. Cet aspect combiné à des méthodes de dépôts reproductibles possède aussi un grand intérêt dans la miniaturisation future de ce type de capteurs pour l'élaboration de biopuces dans lesquelles une déposition localisée et contrôlée des récepteurs biologiques est inévitable.

### I.1.3. Méthodes d'immobilisation

Plusieurs méthodes d'immobilisation des biomolécules ont alors été envisagées comme, par exemple, le piégeage dans des matrices (polymères, argiles...), l'adsorption directe sur des surfaces, l'attachement covalent sur support et la réticulation. Certaines de ces techniques peuvent cependant conduire à des biocapteurs qui sont peu stables ou peu performants. D'un autre côté, les travaux pionniers de Diaz et al.<sup>17</sup>, concernant l'élaboration de polymères tels que les poly(pyrroles-N-alkyl), ont entrouvert une nouvelle voie pour l'élaboration des biocapteurs basés sur l'immobilisation de biomolécules grâce à des polymères électrogénérés. Cette stratégie permet de mieux contrôler la disposition spatiale et

ce type de polymères offrent une grande possibilité d'ajustement en fonction des propriétés souhaitées par synthèse de nouveaux monomères fonctionnalisés. Beaucoup de polymères conducteurs peuvent être utilisés pour réaliser l'immobilisation des biomolécules et on peut, par exemple, citer le poly(pyrrole)<sup>18, 19, 20</sup>, la poly(aniline)<sup>21</sup> ou encore le poly(thiophène)<sup>22</sup>. Cependant, le poly(pyrrole) reste le polymère le plus utilisé de part sa versatilité, sa stabilité sa biocompatibilité et ses propriétés de conduction exceptionnelles<sup>23, 24</sup>.

Une autre approche, développée de façon concomitante à celle des polymères électrogénérés, utilise des monocouches de thiols auto-assemblées<sup>25</sup> (SAM pour Self Assembled Monolayers) est apparue intéressante du fait qu'elle permet l'obtention de films fins, compacts et très ordonnés. Les alcanes thiols composant ces architectures peuvent aussi être fonctionnalisés à façon mais l'obstacle principal est que ce genre d'assemblage n'est applicable qu'à des surfaces d'or ce qui restreint beaucoup leurs applications. De plus, la liaison thiolate entre les thiols et la surface d'or peut être réduite de façon électrochimique entraînant alors une limitation supplémentaire pour les électrodes modifiées par ce processus de fonctionnalisation.

Dans le but d'améliorer les performances des biocapteurs, différents groupes de recherches se sont focalisés sur l'élaboration de biocapteurs basés sur des architectures tridimensionnelles. Il existe de nombreux types de micro- et nanomatériaux disponibles actuellement tels que les micro- et nanoparticules, les nanotubes de carbone, les quantum dots, les nanofils, les nanofilms, les nanopoudres, les nanofeuilles, les fullerènes ou encore les nanocristaux... Depuis le début du XXI<sup>ème</sup> siècle, le nombre de revues concernant les nanomatériaux utilisés dans le domaine des biocapteurs<sup>26, 27, 28</sup> n'a cessé de croître et il en existe déjà près d'une centaine. Ceux-ci ont permis l'élaboration d'immunocapteurs<sup>29</sup>, de capteurs à ADN<sup>30</sup> ou encore de capteurs enzymatiques<sup>31, 32</sup>. Du fait de leurs propriétés uniques, plusieurs nanomatériaux ont attiré l'intérêt des scientifiques ; ceux-ci présentent effectivement des propriétés physiques, chimiques, mécaniques, magnétiques et/ou optiques exceptionnelles et peuvent contribuer à l'amélioration de la sensibilité voire de la spécificité du phénomène de détection. Par exemple, les nanotubes de carbone possèdent des propriétés électriques<sup>33</sup> et mécaniques<sup>34</sup> remarquables tandis que les quantum dots représentent un axe de recherche qui est aussi très développé grâce à leur sensibilité photochimique<sup>35, 36</sup>. Tant d'un point de vue scientifique que technologique, l'obtention de biocapteurs de plus en plus sensibles, spécifiques, stables et petits représente un défi majeur pour l'analyse biomédicale,

alimentaire ou encore environnementale ; les architectures hybrides combinant les matériaux et les macromolécules biologiques s'inscrivent alors pleinement dans ce contexte. Dans la littérature, les nanomatériaux les plus utilisés pour l'élaboration de biocapteurs sont : les micro- ou nanoparticules métalliques<sup>37, 38</sup> ou magnétiques<sup>39</sup>, les quantum dots<sup>40</sup> et les nanotubes de carbone<sup>41, 42</sup>.

Dans la suite de ce chapitre bibliographique, nous présenterons tout d'abord les macromolécules biologiques. Dans un second temps, nous nous intéresserons, en premier lieu, aux biocapteurs élaborés sur des films polymères électrogénérés puis, par la suite, à ceux incorporant des nanotubes de carbone. Dans chacune de ces parties, nous nous attarderons plus particulièrement aux systèmes qui ont été utilisés au cours de ce travail.

## **I.2. Les macromolécules biologiques**

Les différentes macromolécules biologiques (protéines, ADN, glucides...) ont une structure commune bâtie grâce à des unités monomériques qui vont ensuite se rejoindre pour former des polymères. Ces unités sont les monosaccharides, les nucléotides et les acides aminés pour les glucides, l'ADN et les protéines respectivement. La polymérisation des monomères va être obtenue grâce à des liaisons glycosidiques pour les glucides, des liaisons de type 3'-5'-phosphodiester pour les polynucléotides (simple brin d'ADN) et des liaisons peptidiques dans le cas des protéines. Cette séquence de monomères constitue la structure primaire des macromolécules biologiques<sup>43</sup>. Leurs structures tridimensionnelles vont, par contre, être différentes en fonction des niveaux d'organisation présents dans chaque macromolécule biologique (structures secondaire et tertiaire voire quaternaire dans le cas de macromolécules constituées de plusieurs chaînes polymériques).

Par la suite, nous nous sommes intéressés principalement aux protéines et aux ADN en laissant de côté les glucides qui n'ont pas été utilisés dans le cadre de ce travail. Pour chaque biomolécule utilisée, nous décrirons tout d'abord leur structure puis leurs propriétés et nous terminerons par la présentation au cas par cas des enzymes et oligonucléotides considérés dans ce travail.

### I.2.1. Les enzymes

Les enzymes sont une classe dans la famille des protéines. Le terme protéine est utilisé pour des macromolécules ayant un poids moléculaire supérieur à 10 kDa environ ; les structures plus petites sont qualifiées de peptides. A partir de la structure primaire décrite au paragraphe précédent, les protéines vont se replier sur elles-mêmes pour former des structures secondaires (principalement hélices  $\alpha$  et feuillets  $\beta$ ) ; ce repliement des protéines va permettre la formation de liaisons hydrogènes permettant de stabiliser la macromolécule. L'agencement de ces structures secondaires les unes par rapport aux autres va permettre de former la structure tertiaire des protéines qui va alors faire intervenir des ponts disulfures pour se stabiliser. Dans le cas de très grosses protéines, composées de plusieurs chaînes d'acides aminés, une structure quaternaire va apparaître et permettre de décrire l'orientation relative de ces chaînes les unes par rapport aux autres.

Les protéines sont des éléments essentiels de la vie et peuvent avoir différents rôles : structurel, moteur, régulateur, catalytique... Dans notre cas, nous avons principalement étudié les enzymes qui en sont une classe particulière et servent de catalyseurs biologiques. Celles-ci sont classées en six grands groupes (oxydo-réductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérasés et ligases) en fonction de leur activité catalytiques. Les plus utilisées dans les biocapteurs électrochimiques sont évidemment les oxydo-réductases<sup>12</sup>.

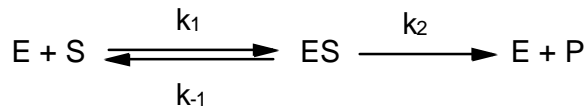
#### *1.2.1.a. Notions de cinétique enzymatique*

La première modélisation de la cinétique d'une réaction enzymatique en phase homogène est apparue en 1913 et décrite par Michaelis et Menten<sup>44</sup>. L'équation de Michaelis-Menten permet de prévoir l'évolution de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat et ainsi de déterminer les constantes cinétiques régissant l'équation. Celle-ci est applicable à de nombreuses enzymes d'où son utilisation fréquente mais elle ne permet pas de rendre compte de comportements enzymatiques complexes tels que la multiplicité des substrats, l'existence de plusieurs sites actifs ou d'éventuels phénomènes de régénération non-enzymatiques du substrat.

Dans le modèle de Michaelis-Menten, l'enzyme E forme tout d'abord le complexe enzyme-substrat ES lors de la reconnaissance du substrat S par l'enzyme. Dans un second



temps, le complexe ES se décompose en produit P de la réaction enzymatique et en enzyme libre E. Ce système peut donc être décrit par le modèle cinétique suivant :



**Équation I-1**

avec  $k_1$  et  $k_{-1}$  qui représentent les constantes cinétiques d'association et de dissociation du complexe ES respectivement et  $k_2$  celle de la décomposition de ce complexe permettant d'obtenir P et E.

### *1.2.1.a.α. Cinétique enzymatique en phase homogène*

L'équation de Michaelis-Menten, décrivant la vitesse de la réaction enzymatique est la suivante :

$$v_i = \frac{v_{\max} \times [S]}{K_M + [S]}$$

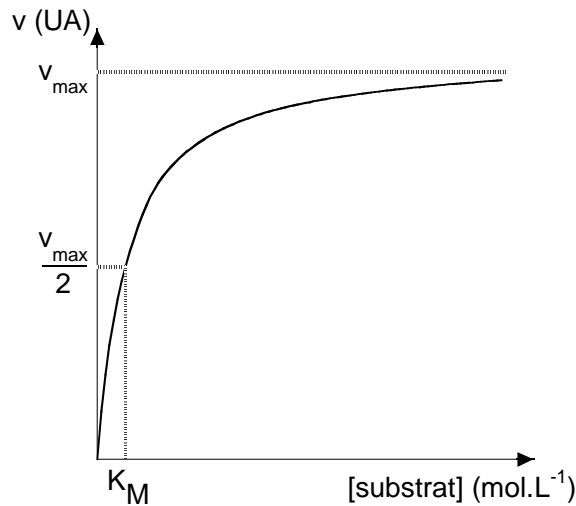
**Équation I-2**

avec  $v_i$  et  $v_{\max}$  : vitesses initiales de la réaction enzymatique pour une concentration [S] en substrat et  $K_M$  : constante de Michaelis-Menten qui est fonction des constantes cinétiques de l'**Équation I-1** et vaut :

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

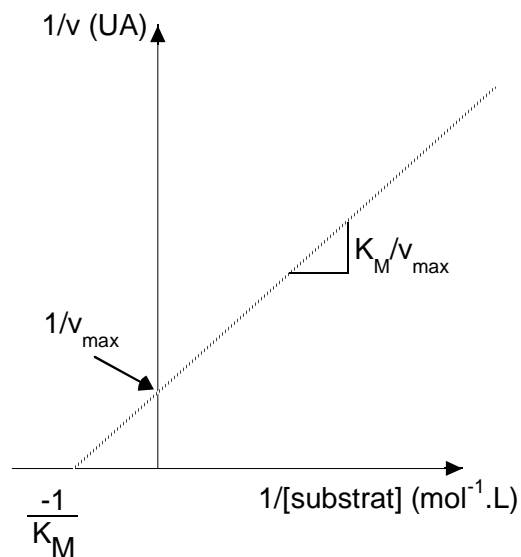
**Équation I-3**

La constante de Michaelis-Menten  $K_M$  correspond à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale (c'est-à-dire en absence de produit) est égale à la moitié de la vitesse initiale maximale  $v_{\max}/2$ . Celle-ci est donc l'inverse de la constante d'affinité du substrat pour l'enzyme. La représentation graphique de l'équation de Michaelis-Menten est une branche d'hyperbole comme représenté sur le **Schéma I-3**.



**Schéma I-3 :** Evolution de la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat.

Comme on peut le voir sur le **Schéma I-3**, il est possible de déterminer la constante de Michaelis-Menten  $K_M$  directement sur la courbe mais cette détermination graphique n'est pas toujours très précise et d'autres méthodes de détermination ont alors été proposées. Ces dernières reposent sur la linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten et la plus utilisée d'entre elles est la linéarisation de Lineweaver-Burk<sup>45</sup> proposée en 1934.



**Schéma I-4 :** Représentation graphique de la linéarisation de Lineweaver-Burk.

Cette représentation de Lineweaver-Burk consiste à tracer l'inverse de la vitesse initiale de la réaction enzymatique ( $1/v_i$ ) en fonction de l'inverse de la concentration en

substrat ( $1/[S]$ ); elle est parfois appelée « représentation en double-inverse » et obéit à l'équation ci-dessous :

$$\frac{1}{v_i} = \left( \frac{K_M}{v_{\max}} \times \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{v_{\max}} \quad \text{Équation I-4}$$

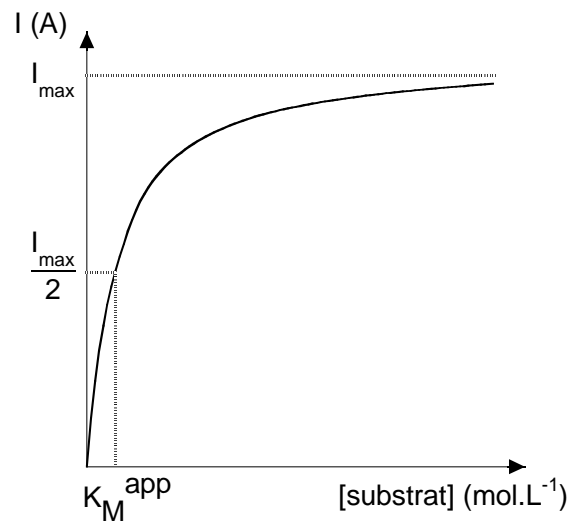
Cette représentation graphique (**Schéma I-4**) permet de déterminer  $K_M$  mais aussi  $v_{\max}$  qui est rarement atteint d'un point de vue expérimental ce qui rend la détermination directe du  $K_M$  à partir de la courbe non-linéarisée (**Schéma I-3**) encore plus imprécise.

#### *1.2.1.a.β. Cinétique enzymatique en phase hétérogène*

Dans le cas d'une enzyme immobilisée, celle-ci va être confinée dans ou sur un matériau qui peut influencer le processus biochimique de catalyse enzymatique et de ce fait modifier la cinétique de la réaction et éventuellement perturber la détection. La cinétique va alors dépendre de nombreux paramètres<sup>46</sup> dans le microenvironnement de la protéine comme la nature du support sur lequel elle est immobilisée (hydrophobie, hydrophilie, caractère ionique...), l'accessibilité du site actif et des phénomènes de transport du substrat et des produits de la réaction enzymatique dans le support d'immobilisation.

La constante déterminée pour la cinétique enzymatique sera alors une constante apparente de Michaelis-Menten notée  $K_M^{\text{app}}$  et ne rendra donc plus uniquement compte des caractéristiques intrinsèques de l'enzyme mais plutôt de son activité dans son nouveau microenvironnement. Plusieurs études ont été menées afin de modéliser la réponse obtenue pour des biocapteurs enzymatiques dans lesquels l'enzyme est immobilisée par réticulation intermoléculaire<sup>47</sup>, liaisons covalentes<sup>48</sup>, piégeage dans des membranes<sup>49, 50</sup> ou encapsulation dans un polymères électrogénéré<sup>51, 52</sup>. Le **Schéma I-5** montre le type de courbes obtenues pour ce type de biocapteurs et on peut noter que l'allure de la courbe correspond de très près à la courbe présentée sur le **Schéma I-3** dans le cas d'une cinétique en phase homogène. Il est alors judicieux de modéliser ce genre de courbes avec l'équation de Michaelis-Menten malgré les limitations nombreuses de cette modélisation simpliste. En effet, plusieurs auteurs<sup>52, 53, 54</sup> ont montré que le processus global n'était pas uniquement limité par la réaction enzymatique et que les constantes cinétiques obtenues étaient dépendantes des conditions expérimentales.

Il est alors délicat de comparer les paramètres cinétiques obtenus par des techniques d'immobilisation différentes.



**Schéma I-5 :** Courbe typique obtenue pour des biocapteurs électrochimiques enzymatiques représentant l'évolution de l'intensité en fonction de la concentration en substrat.

Dans le cas de biocapteurs enzymatiques électrochimiques obéissant à ce modèle, on peut directement relier l'intensité du signal à la vitesse de la réaction selon l'équation suivante :

$$I = \alpha_{corr} nFv = \alpha_{corr} \frac{nFv_{max} [S]}{K_M^{app} + [S]} \quad \text{Équation I-5}$$

avec  $\alpha_{corr}$  : facteur de correction ( $\alpha_{corr} \leq 1$ ),  $n$  : nombre d'électrons échangés au cours du processus électrochimique de détection et  $F$  : constante de Faraday. Il est nécessaire d'introduire le facteur de correction  $\alpha_{corr}$  du fait que dans ce type de système, les espèces P produites lors de la réaction enzymatique vont diffuser dans les trois dimensions de l'espace même si la direction vers l'électrode va être favorisée puisque les espèces vont y être consommées et leur concentration maintenue nulle. Pour des concentrations en substrat largement inférieures à  $K_M^{app}$  ( $[S] \ll K_M^{app}$ ) on va donc avoir une droite correspondant à la sensibilité de l'électrode par simplification de l'Équation I-5 qui devient alors :

$$I = \frac{\alpha_{corr} nFv_{max}}{K_M^{app}} [S] \quad \text{Équation I-6}$$

Tandis que pour les fortes concentrations en substrat ( $[S] \gg K_M^{app}$ ), on observera un plateau d'intensité  $I_{max}$  correspondant à la saturation de l'enzyme en substrat et dont l'équation, obtenue par simplification de l'**Équation I-5**, sera alors :

$$I_{max} = \alpha_{corr} nFv_{max}$$

**Équation I-7**

Dans le cas d'une cinétique en phase hétérogène, la valeur de  $K_M^{app}$  va alors permettre de décrire le comportement de l'enzyme dans son microenvironnement et donc de déterminer la biocompatibilité du matériau. En effet, la perméabilité de la couche permettant l'immobilisation de l'enzyme va jouer sur la diffusion de son substrat, par exemple, le glucose dans le cas de la glucose oxydase et la concentration dans la solution va être plus importante que celle dans le film si celui-ci est peu perméable. Cette différence va alors impliquer une surestimation de la concentration réelle en substrat dans le film et par conséquent une augmentation de la valeur de  $K_M^{app}$ . Toujours pour l'exemple de la glucose oxydase, celle-ci utilise du dioxygène pour réaliser sa régénération et revenir sous sa forme active pour la catalyse de l'oxydation du glucose. Il ne faut donc pas oublier que la concentration en  $O_2$  intervient dans l'expression de  $K_M$  et donc de  $K_M^{app}$  ; en effet on a :

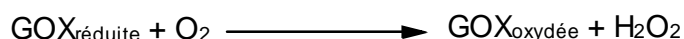
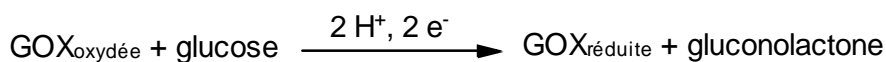
$$k_2 = k_2^0 [O_2]$$

**Équation I-8**

La combinaison de l'équation ci-dessus avec l'**Équation I-3** permet de montrer que si la concentration en  $O_2$  diminue dans le film, la valeur de  $K_M^{app}$  va diminuer elle-aussi.

### ***1.2.1.b. La glucose oxydase (GOX)***

La glucose oxydase (EC 1.1.3.4.) est une enzyme volumineuse ( $\varnothing \sim 8$  nm) de masse moléculaire élevée ( $\sim 160$  kDa) ayant un point isoélectrique d'environ 4,3 ce qui la rend donc globalement anionique à pH neutre<sup>55, 56</sup>. C'est une protéine dimérique dont le site actif est profondément enfoui et contient deux cofacteurs flavine adénine dinucléotide (FAD)<sup>57</sup>. Elle catalyse l'oxydation du  $\beta$ -D-glucose en gluconolactone en captant deux protons et deux électrons pour former la forme réduite de l'enzyme (**Schéma I-6**). La régénération de l'enzyme, c'est-à-dire le retour à la forme oxydée, passe par une réaction avec le dioxygène avec production de peroxyde d'hydrogène.

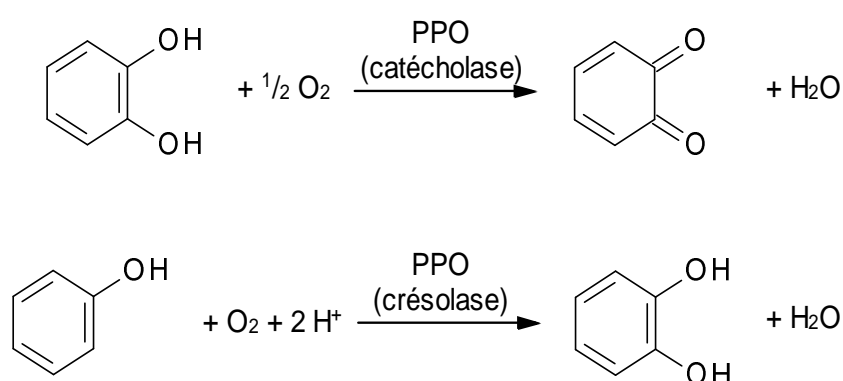


**Schéma I-6 :** *Activité enzymatique de la glucose oxydase (GOX).*

Dans le cas de biocapteurs ampérométriques, les performances sont souvent évaluées grâce à la détection de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à  $E = 0,6 \text{ V vs ECS}^{58}$  sur des électrodes de platine. La valeur du  $K_M$  reportée dans la littérature<sup>57</sup> pour la glucose oxydase extraite du champignon *Aspergillus niger* en solution saturée en air, à  $\text{pH} = 5,6$  et  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$  est de  $33 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ .

### ***1.2.1.c. La polyphénol oxydase (PPO)***

La polyphénol oxydase (EC 1.14.18.1.) est une enzyme de masse moléculaire élevée (~ 130 kDa) présente dans de nombreux végétaux<sup>59</sup> (champignons, pomme de terre, fèves...). Son site actif contient deux ions  $\text{Cu}^{2+}$  qui sont coordonnés à trois acides aminés Histidine chacun. Cette enzyme catalyse, en présence de dioxygène, deux types de réaction qui peuvent être successives ; son activité de crésolase permet l'oxydation de phénols en *ortho*-diphénols tandis que l'activité de catécholase permet l'oxydation d'*ortho*-diphénols en *ortho*-quinones (**Schéma I-7**). Dans notre cas, nous nous sommes intéressés à la détection du catéchol (*ortho*-diphénol) et donc à son activité de catécholase.



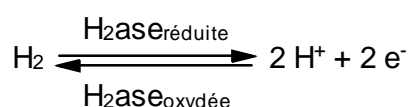
**Schéma I-7 :** *Activités enzymatiques de la polyphénol oxydase (PPO). L'activité de catécholase permet l'oxydation d'*ortho*-diphénol en *ortho*-quinone et l'activité de crésolase permet l'hydroxylation du phénol en *ortho*-diphénol.*

Les biocapteurs ampérométriques à base de PPO (activité de catécholase) sont, eux aussi, largement décrits dans la littérature<sup>60, 61</sup>. Ceux-ci sont basés sur la détection

électrochimique de l'*ortho*-quinone qui peut être réduite directement à l'électrode (carbone vitreux) à un potentiel  $E = -0,2 \text{ V vs ECS}$  mais aussi indirectement par l'ajout de médiateurs rédox. La valeur du  $K_M$  reportée dans la littérature<sup>59</sup> pour la polyphénol oxydase extraite des champignons en solution saturée en  $O_2$ , à  $pH = 7,02$  et  $T = 25 \text{ °C}$  est de  $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ .

#### ***1.2.1.d. Les hydrogénases***

Les hydrogénases sont des enzymes qui catalysent de façon réversible la conversion des protons en dihydrogène (**Schéma I-8**).



**Schéma I-8** : *Activités enzymatiques de l'hydrogénase ( $H_2ase$ ) qui catalyse de façon réversible la conversion des protons ( $H^+$ ) en dihydrogène ( $H_2$ ).*

Il existe deux grandes classes d'hydrogénases qui se distinguent par leurs sites actifs très originaux : en effet, ces sites actifs présentent des sites organométalliques possédant des ligands carbonyle et cyanure<sup>62</sup> qui peuvent être qualifiés d'« exotiques » pour le monde biologique. Cette caractéristique est unique chez les enzymes du fait de l'habituelle toxicité de ce type de ligands pour la cellule<sup>63</sup>. Les sites actifs de ce type d'enzyme contiennent deux atomes métalliques et les deux classes ont alors été nommées selon la composition de ce dernier : FeFe et NiFe.

Les hydrogénases à centre Nickel-Fer (NiFe) sont les plus nombreuses des hydrogénases et se retrouvent essentiellement chez les procaryotes (bactéries et archées). Ce sont les premières dont les structures cristallographiques ont été connues<sup>64</sup> et aussi les plus étudiées<sup>65</sup> des hydrogénases. Les hydrogénases NiFeSe forment une sous-classe des hydrogénases NiFe ; ces dernières contiennent un atome de Sélénium par protéine d'où leur nom. Dans ce cas, une des cystéines parmi les quatre qui coordinent l'atome de nickel est remplacée par une sélénocystéine. Les hydrogénases à Fer (FeFe) ne sont présentes que chez les eubactéries et les eucaryotes et sont souvent moins fonctionnelles. Enfin, il existe aussi les hydrogénases sans cluster Fe-S qui sont un peu particulières ; celles-ci n'utilisent pas de protons pour former le dihydrogène d'où les difficultés à leur donner la dénomination d'hydrogénases. Elles sont peu connues et plus récentes puisque leur structure n'a été

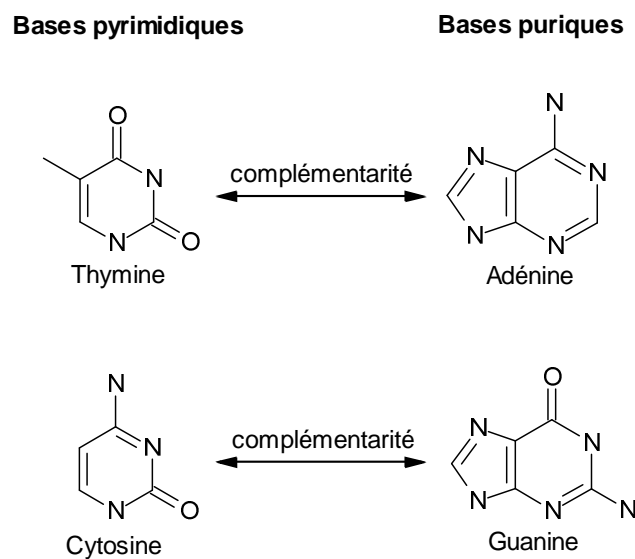
clairement identifiée que dans les années 2000<sup>66, 67</sup> mais elles possèdent des propriétés similaires à celles des hydrogénases d'où cette appellation.

Ce type d'enzyme apparaît de nos jours comme une alternative prometteuse à la production d'énergie<sup>68</sup> à partir du dihydrogène puisqu'elles permettent de consommer H<sub>2</sub> mais aussi d'en réaliser le stockage du fait de la réversibilité de la réaction qu'elles catalysent. Cependant, un obstacle majeur à leur utilisation réside dans leur grande sensibilité au dioxygène présent en quantité suffisante dans l'air pour les désactiver<sup>69,70</sup>.

Dans le cadre de ce travail, nous avons choisi de travailler avec une hydrogénase NiFe de la bactérie *Desulfovibrio fructosovorans* (EC 1.12.1.3.) car c'est l'une des plus connues et elle combine une activité élevée et une réactivation aisée malgré sa grande sensibilité au dioxygène.

### I.2.2. L'ADN (acide désoxyribonucléique)

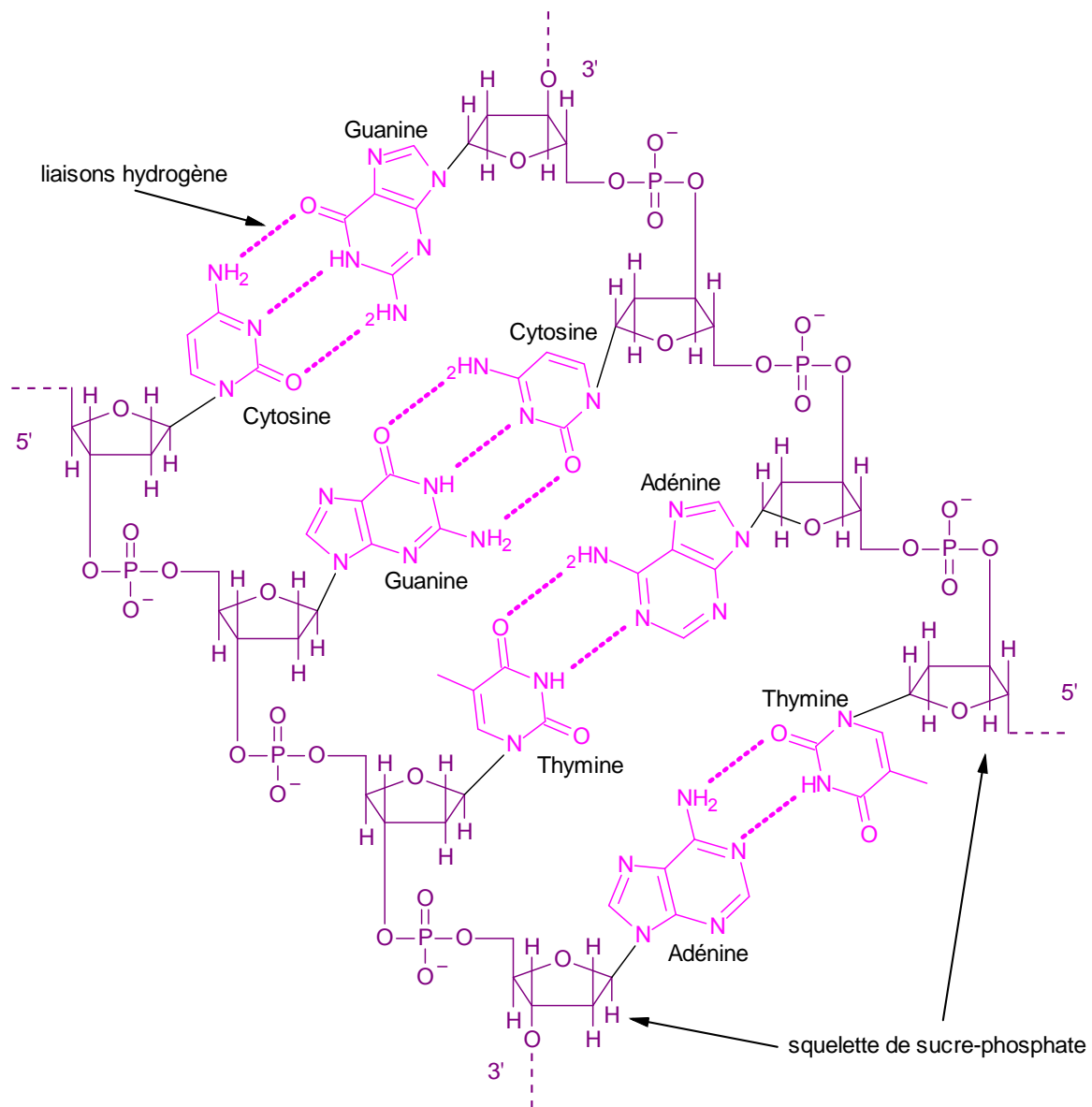
L'ADN ou acide désoxyribonucléique a, comme nous l'avons vu précédemment, une structure primaire composée d'un enchaînement de nucléotides. Ces derniers sont constitués d'un groupement phosphate, d'un sucre et d'une base azotée parmi les quatre principales représentées sur le **Schéma I-9**.



**Schéma I-9** : Les quatre bases principales de l'ADN : la Thymine (T), l'Adénine (A), la Cytosine (C) et la Guanine (G) et leur complémentarité deux à deux (A-T et G-C).

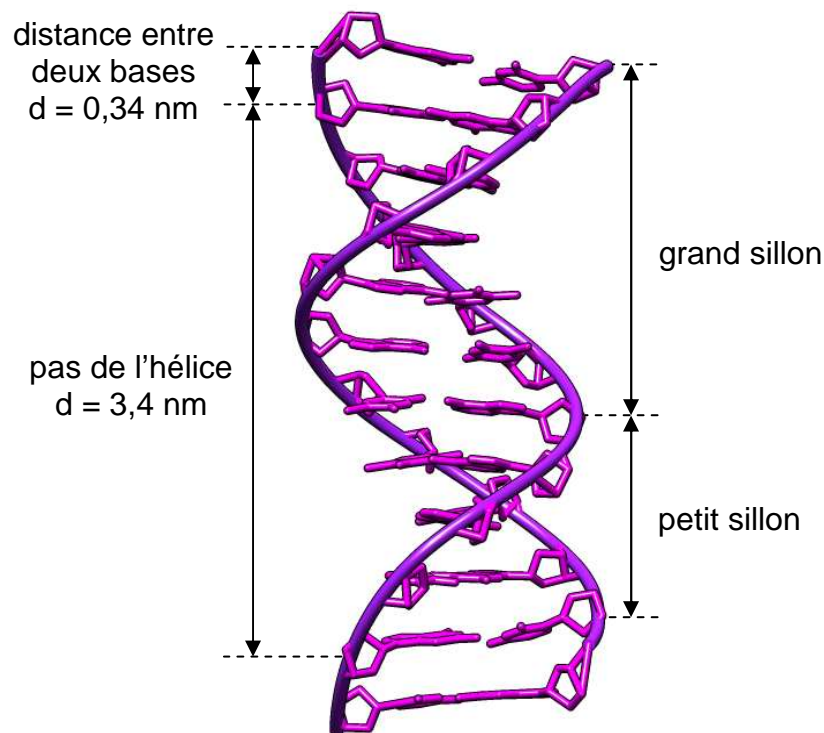


La structure complète de l'ADN a été décrite pour la première fois en 1953 par Watson et Crick<sup>71</sup>. Pour former la structure secondaire de l'ADN, deux polynucléotides vont se lier grâce à des liaisons hydrogènes entre les différentes bases azotées (A-T, G-C) comme représenté sur le **Schéma I-10**. Les unités sucre-phosphate qui relient les bases azotées vont former alors une enveloppe extérieure, les bases azotées étant orientées vers l'intérieur du double brin d'ADN.



**Schéma I-10** : Représentation schématique de la complémentarité de deux brins d'ADN. La partie violette représente le squelette et est composé d'un enchaînement de sucre-phosphate tandis que la partie rose illustre le phénomène d'hybridation par complémentarité des bases azotées.

Afin de former la structure secondaire de l'ADN, ces deux polynucléotides appariés vont s'enrouler l'un sur l'autre en double hélice comme représenté sur le **Schéma I-11**. Le diamètre de l'hélice ainsi formée est de 2 nm tandis que la distance pour effectuer un tour (pas de l'hélice) est de 3,4 nm étant donné qu'il contient 10 paires de bases espacées de 0,34 nm chacune. Cette structure présente deux sillons (petit et grand) qui vont jouer un rôle dans les interactions ADN-protéines.



**Schéma I-11** : Représentation schématique de la structure secondaire de l'ADN-B formant la double hélice (code PDB : 1BNA).

La structure tertiaire de l'ADN est obtenue par repliement de la double hélice sur elle-même mais elle peut aussi concerner des ADN plus originaux tels que les structures triplexes ou quadruplexes. Finalement, la structure quaternaire contenue dans le noyau des cellules concerne l'association de l'ADN avec des protéines basiques, les histones, pour former des bandes. Les chromosomes sont constitués par l'arrangement d'environ un million de ces bandes.

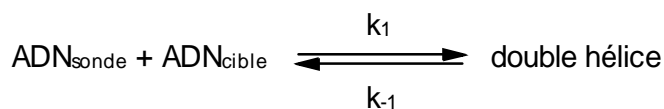
Cette description réalisée pour les polynucléotides reste valable dans le cas des oligonucléotides qui ont des chaînes nucléotidiques plus courtes mais ont un comportement similaire.

### ***1.2.2.a. Propriétés de la double hélice d'ADN***

Les caractéristiques concernant la structure de l'ADN présentées au paragraphe précédent correspondent à la structure B de l'ADN qui est une hélice droite et présente des plateaux de base perpendiculaires à l'axe qui passe au centre de l'hélice. Il existe cependant d'autres formes de l'ADN telles que les structures A et Z mais elles sont moins présentes *in vivo* et donc moins connues. La forme que va adopter la double hélice va dépendre du pourcentage en eau dans le milieu extérieur, en effet la forme B sera obtenue pour environ 95 % en eau tandis que les formes A et Z le seront pour environ 70 et 50 % respectivement. La forme A a toujours une hélice droite mais présente des plateaux de base très inclinés. Du fait du changement de conformation des sucres du squelette sucre-phosphate, le diamètre de l'hélice va être plus grand que pour l'ADN-B et sa longueur plus petite ; l'ADN-A possède une paire de bases de plus par tour de l'hélice. La forme Z a, quant à elle, une hélice gauche et possède une forme en zig-zag ne présentant qu'un seul sillon et 12 nucléotides par tour de l'hélice.

Malgré la forte complémentarité qui existe entre deux brins d'ADN, celui-ci peut subir des modifications lors du phénomène de réplication de l'ADN. Si cette modification intervient uniquement au niveau d'un nucléotide, on parle de mutation mais si un fragment entier est modifié, il s'agit alors d'une recombinaison génétique. Ces phénomènes sont à l'origine de la biodiversité actuelle et peuvent être naturels ou engendrés par des agents extérieurs provenant de l'environnement. Ces modifications des brins d'ADN vont entraîner des mésappariements entre les deux brins et donc déstabiliser la double hélice.

Le phénomène d'hybridation en solution peut, comme dans le cas des enzymes, être représenté par un modèle cinétique :



**Équation I-9**

avec  $k_1$  et  $k_{-1}$  qui représentent les constantes cinétiques d'association et de dissociation du double brin respectivement. On peut ainsi définir une constante  $K = k_1/k_{-1}$  correspondant à la constante thermodynamique de la formation de double brin d'ADN. Afin de moduler le phénomène d'hybridation, on peut faire varier plusieurs paramètres tels que la température ou la concentration en sels dans la solution contenant les ADN ; le processus de séparation de deux brins d'ADN hybridés est appelé la dénaturation. Le chauffage permet de rompre les liaisons hydrogènes qui lient les brins d'ADN rendant alors la double hélice instable. La stabilité de cette dernière peut alors être déterminée par la mesure de la température de fusion  $T_m$  qui correspond à la température pour laquelle 50 % des brins sont désappariés et donc à un équilibre parfait entre les deux formes (dissociée et appariée) de l'ADN représentées dans l'**Équation I-9**. Plusieurs paramètres influencent la valeur de  $T_m$ , les plus importants étant la longueur de l'ADN, la composition de l'ADN (pourcentage des différentes bases), la concentration en sels dans la solution, l'acidité du milieu et la présence éventuelle de mésappariements. En effet, la longueur et la composition de l'ADN ou la présence éventuelle de mésappariements font varier le nombre de liaisons hydrogènes entre les deux brins ; plus ce nombre de liaisons est faible, plus la température  $T_m$  est faible. Une forte concentration en sels dans la solution ou la présence d'acide ou de base forts provoque l'ionisation des bases et crée des répulsions électrostatiques entre les deux brins favorisant leur dissociation. Ainsi, la valeur de  $T_m$  permet de décrire la stabilité d'un double brin d'ADN ; plus celui-ci est stable, plus la valeur de  $T_m$  est élevée.

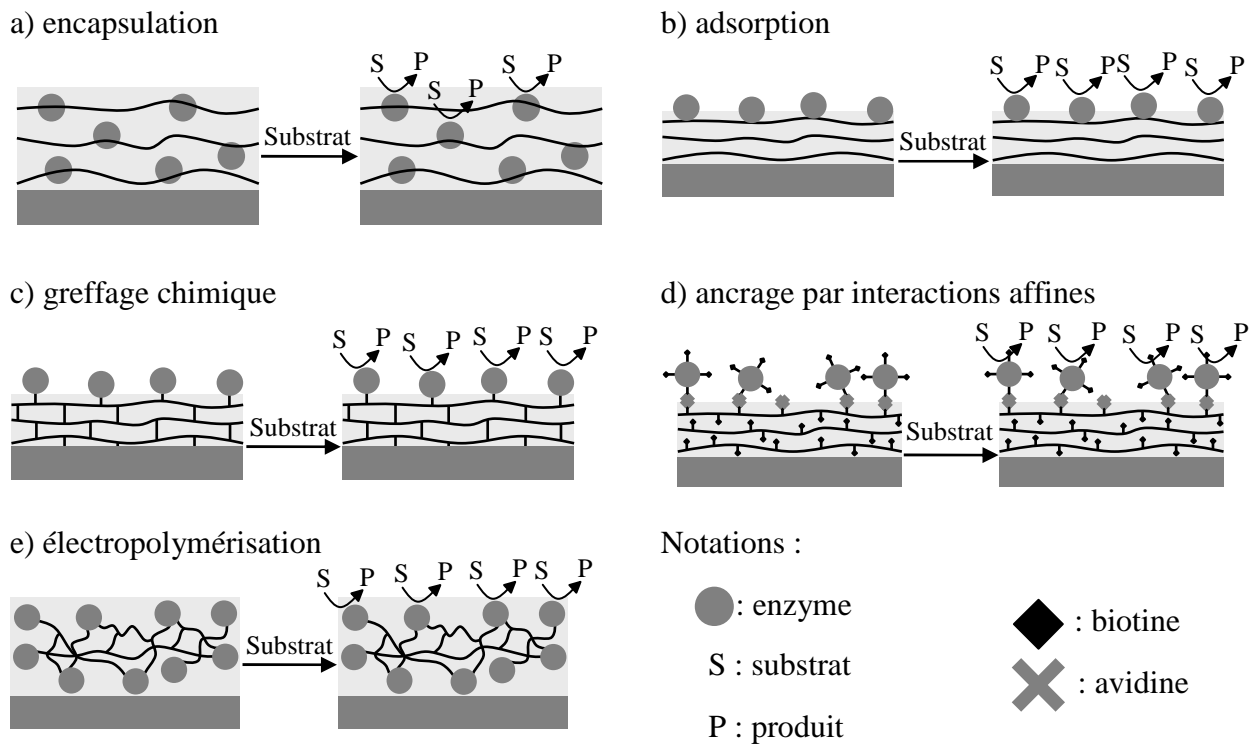
### ***1.2.2.b. Les oligonucléotides***

Les oligonucléotides sont de courtes séquences de nucléotides qui ont les mêmes propriétés que les polynucléotides décrits précédemment. Ils sont, en général, longs de quelques dizaines de bases et obtenus par synthèse chimique. Dans les années 1970, Letsinger et al. ont décrit la première synthèse automatisée sur support solide d'oligonucléotides<sup>72, 73, 74</sup> mais les oligonucléotides étaient alors limités à une vingtaine de bases azotées et leur synthèse demandait beaucoup de temps. Ce n'est que dans les années 1980 qu'apparaît une technique rapide permettant la synthèse d'oligonucléotides plus longs et très stables ; celle-ci a été décrite par Caruthers et al.<sup>75, 76</sup>. A partir de cette date, de nombreux synthétiseurs à oligonucléotides commerciaux ont été développés. Les oligonucléotides utilisés dans ce

travail ont été synthétisés par la chimie des oximes (formation d'une liaison entre un aldéhyde et une oxyamine) selon un protocole décrit au laboratoire par Defrancq et al.<sup>77,78</sup>.

### I.3. Biocapteurs à base de polymères électrogénérés

Comme nous l'avons suggéré un peu plus tôt, les films polymères électrogénérés permettent l'immobilisation de biomolécules et ils présentent des propriétés exceptionnelles comme une bonne stabilité chimique, la possibilité de travailler sur différents matériaux d'électrode, une bonne reproductibilité et précision des dépôts ou encore la possibilité illimitée de les façonner.



**Schéma I-12** : Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation à base de polymères électrogénérés illustrées pour un biocapteur enzymatique.

Différentes stratégies peuvent être envisagées pour immobiliser des biomolécules grâce à des polymères électrogénérés<sup>79,80</sup> ; les principales techniques employées de nos jours sont représentées sur le **Schéma I-12** en prenant pour exemple un biocapteur enzymatique et sont les suivantes : l'encapsulation, l'adsorption, le greffage chimique, l'ancrage par interactions affines (par exemple : avidine/biotine, NTA/Cu<sup>2+</sup>/Histidine, adamantane/ $\beta$ -cyclodextrine...) ou encore l'électropolymérisation directe des biorécepteurs.

Ces techniques ainsi que leurs applications tirées de la littérature seront décrites par la suite et nous nous intéresserons principalement et plus en détail à celles correspondant à l'ancrage de biomolécules par interactions affines et par encapsulation puisque ce sont les deux qui ont été utilisées dans le cadre de ce travail.

### I.3.1. Encapsulation

L'immobilisation par encapsulation (**Schéma I-12-a**) est une méthode simple, réalisée en une seule étape, et applicable à de nombreuses macromolécules biologiques ; c'est aussi la plus populaire de nos jours. Cette technique permet d'éviter un étiquetage préalable des biorécepteurs et l'immobilisation d'une quantité importante de biomolécules en comparaison avec une monocouche puisque celle-ci va se faire dans le volume de polymère déposé.

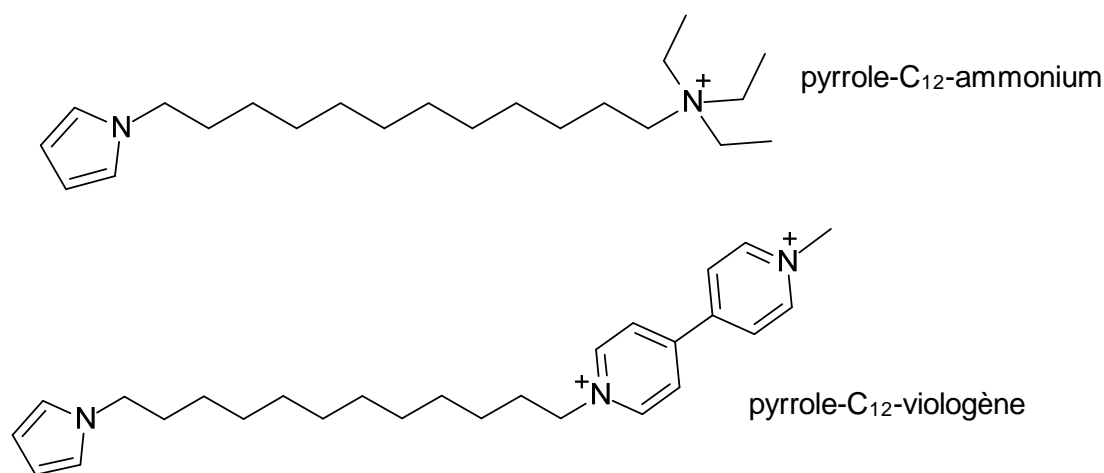
Dans ce cas, deux méthodes sont possibles : la biomolécule est tout d'abord mélangée avec le monomère et une électrode est ensuite plongée dans cette solution pour faire la polymérisation ou on peut effectuer un dépôt de cette solution sur une électrode et réaliser la polymérisation après séchage. La première méthode utilise beaucoup de biomolécules et de monomères et paraît alors très coûteuse tandis que la seconde l'est beaucoup moins et donc plus prometteuse. Cette deuxième procédure pour réaliser l'encapsulation de biomolécules dans des films polymères a été développée par Cosnier et al. en 1997<sup>60</sup>. La méthode d'encapsulation des biomolécules peut cependant souffrir d'une faible accessibilité des récepteurs pour interagir avec l'analyte correspondant.

Les premiers auteurs décrivant ce processus d'immobilisation sont Umana et Waller<sup>81</sup> ainsi que Foulds et Lowe<sup>82</sup> en 1986 en immobilisant la glucose oxydase dans des films de poly(pyrrole). Dès 1987, Bartlett et Whitaker<sup>52</sup> publient des résultats concernant l'immobilisation de cette même enzyme dans un film de poly(pyrrole-N-méthyl) plus conducteur permettant d'obtenir de meilleures performances.

Les films de poly(pyrrole) ont ensuite connu un essor considérable pour réaliser l'immobilisation de cellules tout en conservant leur activité biologique<sup>83, 84</sup> ou encore pour l'élaboration d'immunocapteurs<sup>85, 86, 87</sup> ou de capteurs à ADN<sup>88, 89</sup>. Depuis le début de ce type de biocapteurs élaborés par encapsulation, les différents groupes de recherche ont essayé de

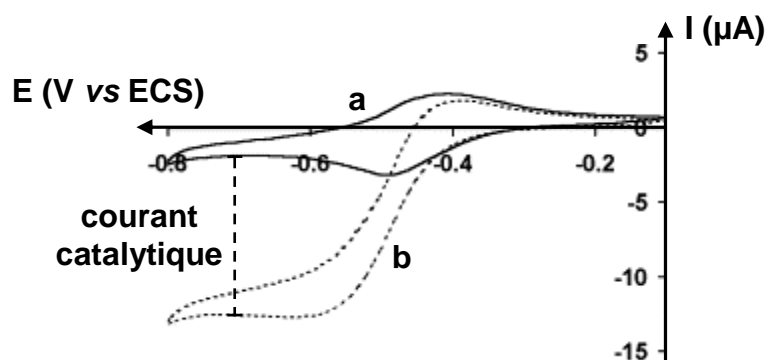
trouver des films de poly(pyrrole) les plus hydrophiles possibles malgré le caractère organique de ce type de polymères.

Des monomères de pyrrole-fonctionnalisés avec des groupements à caractère amphiphile ont donc été mis au point. Par exemple, Cosnier a publié une revue décrivant des pyrroles N-fonctionnalisés amphiphiles<sup>60</sup> portant des groupements alkylammonium ou pyridinium (**Schéma I-13**). Ce n'est que plus tard, en 2005, qu'apparaît un autre type de monomère amphiphile, le pyrrole-NTA<sup>90</sup>. Tous ces polymères ont été utilisés dans différents type de biocapteurs avec succès.



**Schéma I-13** : Structure de pyrroles amphiphiles élaborés dans le groupe Cosnier<sup>60</sup>. Les exemples présentés ici sont le pyrrole-C<sub>12</sub>-ammonium et le pyrrole-C<sub>12</sub>-viologène.

Cette technique d'encapsulation est beaucoup utilisée dans le cas de biocapteurs nécessitant l'incorporation d'un médiateur rédox, ce dernier peut être directement incorporé au polymère en greffant le médiateur sur le monomère avant polymérisation. Si la cible arrive à diffuser dans la couche de polymère, cette technique est très avantageuse puisque les médiateurs nécessaires au transfert d'électrons sont situés à proximité immédiate de la biomolécule. De nombreux exemples sont présents dans la littérature en utilisant, par exemple, le poly(pyrrole-viologène) et la nitrite réductase<sup>91</sup> (**Schéma I-14**) ou la nitrate réductase<sup>92</sup>. Cette technique d'ancrage peut aussi servir à retenir la biomolécule à la surface du transducteur et alors lui conférer une excellente stabilité<sup>93</sup>.



**Schéma I-14** : Courbes de voltammétrie cyclique d'une électrode modifiée par du poly(pyrrole- $C_{12}$ -viologène) incorporant la nitrite réductase en absence (a) et en présence (b) de nitrites en solution. Le courant catalytique obtenu grâce au transfert d'électrons passant par les motifs viologènes est très visible.

### I.3.2. Adsorption

L'adsorption des macromolécules biologiques (**Schéma I-12-b**) à la surface d'un polymère électrogénéré permet une bonne accessibilité des sites actifs des récepteurs par rapport à l'analyte mais ne permet pas d'immobiliser une grande quantité de biomolécules et souffre souvent d'une faible stabilité.

Cependant, l'utilisation de polymères conducteurs tels que la polyaniline dopée électrochimiquement a déjà permis l'élaboration d'un biocapteur à glucose performant<sup>94</sup>. Ce type de polymère a pu être utilisé avec succès dans d'autres types de biocapteurs tels que les capteurs à ADN<sup>89</sup> ou les immunocapteurs<sup>95</sup>. De même, il existe plusieurs exemples de biocapteurs élaborés par adsorption sur des films de poly(pyrrole) dans la littérature que ce soit pour des enzymes, des ADN<sup>96, 97</sup> ou encore des anticorps<sup>98</sup>.

### I.3.3. Greffage chimique

Le greffage chimique (**Schéma I-12-c**) offre une meilleure stabilité que l'immobilisation par adsorption mais la création d'une liaison covalente entre la biomolécule et le polymère électrogénéré peut conduire à une mauvaise orientation du biorécepteur et/ou une partielle dénaturation de ce dernier due à l'utilisation de composés chimiques ; de plus le temps nécessaire à la formation de la liaison covalente peut être long et représenter un obstacle majeur.

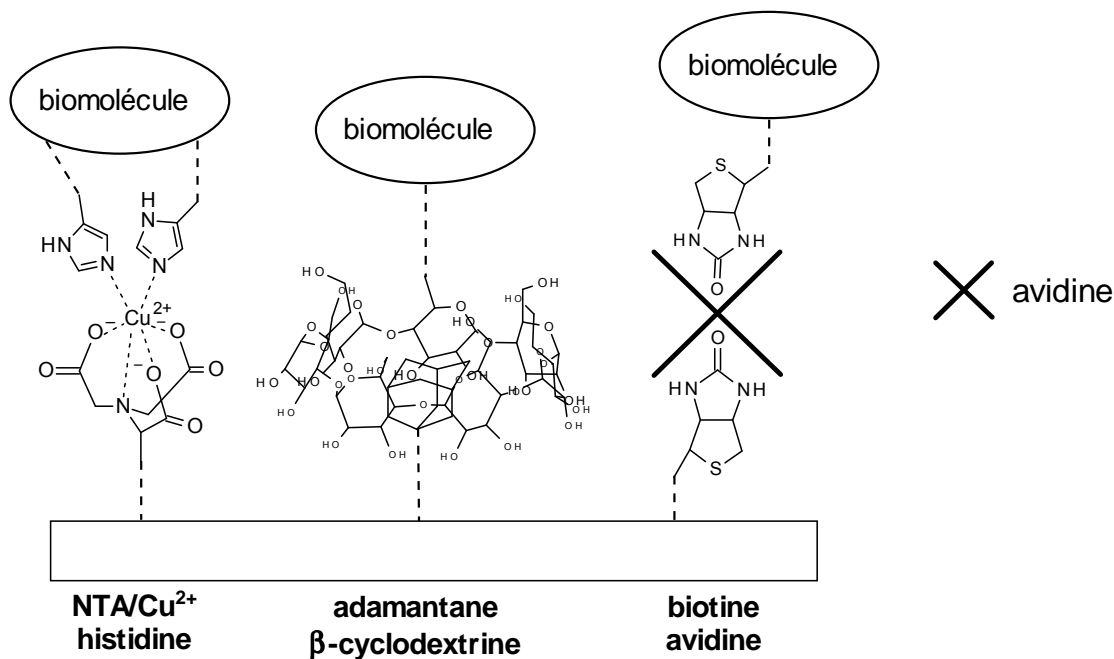


Le premier biocapteur de ce type fut élaboré en 1990 par Schuhmann et al.<sup>99</sup> pour l'ancrage de la glucose oxydase sur un film de poly(pyrrole) en présence d'agents de couplage tels que l'EDC. Ce même groupe a alors continué à développer ce type de biocapteurs avec d'autres polymères tels que le poly(azulène)<sup>100</sup> ou le poly(thiophène)<sup>101</sup>. Plusieurs groupes de recherches ont ensuite voulu incorporer le groupement réactif permettant de réaliser la liaison entre la biomolécule et le polymère directement lors de l'électropolymérisation d'un monomère portant ce groupement chimique. On peut, par exemple, citer l'utilisation de polymères fonctionnalisés avec le N-hydroxysuccinimide<sup>102, 103</sup>.

Une autre approche pour l'immobilisation de biomolécules par greffage covalent sur des polymères électrogénérés réside dans l'utilisation de polymères photoactivables. Dans ce cas, le couplage est rapide et peut être précisément localisé par irradiation. Cosnier et al. ont réalisé des travaux pionniers dans ce domaine en ancrant, pour la première fois, des protéines<sup>104</sup> sur un film de poly(pyrrole-benzophénone) par irradiation à une longueur d'onde  $\lambda = 345$  nm. Ce même polymère a ensuite été utilisé seul<sup>105</sup> ou dans des matériaux composites<sup>106</sup> dans le domaine des immunocapteurs mais aussi pour la détection d'analytes multiples<sup>107</sup>.

#### I.3.4. Ancrage par interactions affines

L'ancrage par interactions affines (**Schéma I-12-d**) permet de conserver une bonne accessibilité des biomolécules puisqu'elle permet l'ancrage de la biomolécule par un point d'attache unique. Le seul obstacle reste la nécessité d'étiqueter les biomolécules au préalable mais cela peut aussi être un avantage puisque l'étiquetage peut être réalisé de façon à obtenir une bonne orientation du biorécepteur. Les systèmes d'affinité les plus utilisés de nos jours sont les suivants : avidine/biotine, adamantane/ $\beta$ -cyclodextrine et NTA/Me<sup>2+</sup>/histidine (**Schéma I-15**).



**Schéma I-15 :** Représentations schématiques des trois systèmes affins les plus utilisés de nos jours : acide nitrilotriacétique/Cu<sup>2+</sup>/Histidine, adamantane/β-cyclodextrine et avidine/biotine.

Les biocapteurs basés sur l'interaction avidine/biotine sont les plus nombreux dans la littérature du fait de la forte constante d'association ( $K_a = 10^{15} \text{ mol.L}^{-1}$ )<sup>108, 109</sup> entre ces deux molécules mais aussi de la grande disponibilité commerciale de biomolécules marquées avec des biotines ou des avidines. De plus, ce complexe est stable chimiquement et la réaction d'association est très rapide ( $k = 7.10^7 \text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{s}^{-1}$ ). L'avidine est une glycoprotéine de masse moléculaire élevée qui est composée de quatre sous unités qui peuvent interagir chacune avec une biotine. Les premiers exemples de biocapteurs enzymatiques élaborés sur des polymères modifiés avec des groupements biotine ont été publiés en 1998 avec des films de poly(pyrrole-biotine)<sup>110, 111</sup> ou de poly(phénol-biotine)<sup>112</sup>. Par la suite, d'autres polymères tels que le poly(dicarbazole-biotine) ont été décrits<sup>113</sup> et les biocapteurs à base de poly(pyrrole-biotine) ont été étendus aux capteurs à ADN et aux immunocapteurs<sup>79</sup>. Une autre approche intéressante réside aussi dans le fait que l'étiquetage des biomolécules par des groupements biotine ne permet pas de mettre une seule mais plusieurs biotines à la surface des biomolécules. Ceci est alors apparu comme un avantage permettant de réaliser des assemblages multi-couches en alternant les incubations avec les molécules biotinylées et l'avidine. Cette approche a été utilisée pour immobiliser différentes enzymes ayant des activités complémentaires sur une même électrode en 2001 par Mousty et al.<sup>114</sup>. Par la suite et dans le but de conférer des caractéristiques particulières telles qu'un meilleur caractère

hydrophile<sup>115</sup>, des propriétés rédox<sup>116</sup> ou encore une sensibilité photochimique<sup>117</sup>, d'autres polymères biotinylés ont été élaborés. Cependant, le principal problème du système avidine/biotine vient du fait que, comparé aux autres systèmes, celui-ci nécessite une couche protéinique supplémentaire d'avidine pour réaliser l'ancrage de molécules biotinylées sur des films polymère aux aussi biotinylés. Cette couche de protéine a souvent un effet néfaste sur la sensibilité des biocapteurs et donc leurs performances électrochimiques.

Deux autres systèmes, adamantane/ $\beta$ -cyclodextrine et NTA/ $\text{Me}^{2+}$ /histidine, ont alors été développés ; le premier est basé sur des interactions hydrophobes qui existent entre la cavité intérieure de la  $\beta$ -cyclodextrine et l'adamantane tandis que le second est basé sur une liaison de coordination entre l'acide nitrilotriacétique (NTA) et les molécules histidine autour d'un ion métallique ( $\text{Me}^{2+}$ ) tel que  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$ . Le système adamantane/ $\beta$ -cyclodextrine a été récemment décrit dans la littérature pour l'immobilisation de la glucose oxydase marquée avec des  $\beta$ -cyclodextrines sur un film de poly(pyrrole-adamantane)<sup>118</sup>. Quant au système NTA/ $\text{Me}^{2+}$ /histidine, celui-ci était utilisé depuis de nombreuses années pour réaliser la purification de protéines marquées avec des histidines par chromatographie d'affinité IMAC<sup>119</sup>. Deux polymères différents ont ensuite put être synthétisés et utilisés pour l'immobilisation de biomolécules histidinylées sur des électrodes : le poly(pyrrole-NTA)<sup>90</sup> grâce à des ions  $\text{Cu}^{2+}$  en 2005 et un copolymère poly(aniline)-poly(vinylsulfonate)<sup>120</sup> à l'aide d'ions  $\text{Ni}^{2+}$  en 2006.

### I.3.5. Polymérisation de monomères bio-fonctionnalisés

Enfin, l'électropolymérisation directe (**Schéma I-12-e**) de monomères fonctionnalisés avec des macromolécules biologiques est aussi une méthode simple d'immobilisation mais requiert la synthèse d'un monomère électropolymérisable modifié par une biomolécule. Cette technique souffre des mêmes problèmes que l'immobilisation par greffage chimique.

Les premiers biocapteurs élaborés par cette technique ont concerné l'immobilisation de la glucose oxydase grâce à la modification du pyrrole par cette enzyme<sup>121, 122, 123</sup>. Cependant, les trois systèmes rapportés sont soumis à controverse du fait qu'il s'agit, en réalité, d'une co-polymérisation en présence de pyrrole non-fonctionnalisé du fait de la taille de cette enzyme ; il est donc difficile dans ce cas de discriminer la partie immobilisée par

encapsulation et celle réellement due à l'immobilisation par polymérisation d'un monomère bio-fonctionnalisé. Des biocapteurs à ADN sont ensuite apparus dans la littérature par polymérisation de dérivés du pyrrole fonctionnalisés par des oligonucléotides<sup>124, 125, 126</sup> mais étaient toujours élaborés par co-polymérisation en présence de pyrrole. Le premier immunocapteur élaboré ainsi a été décrit en 1996 par Heiduschka et al.<sup>127</sup> en réalisant la polymérisation de films de poly(pyrrole) et poly(phénol) fonctionnalisés par un antigène et permettant de détecter les anticorps correspondants. Ce n'est qu'en 2008 que les biocapteurs basés sur la reconnaissance oligosaccharide/lectine ont fait leur apparition<sup>128, 129</sup> ; dans ceux-ci le monomère pyrrolique est alors fonctionnalisé par des structures oligosaccharidiques.

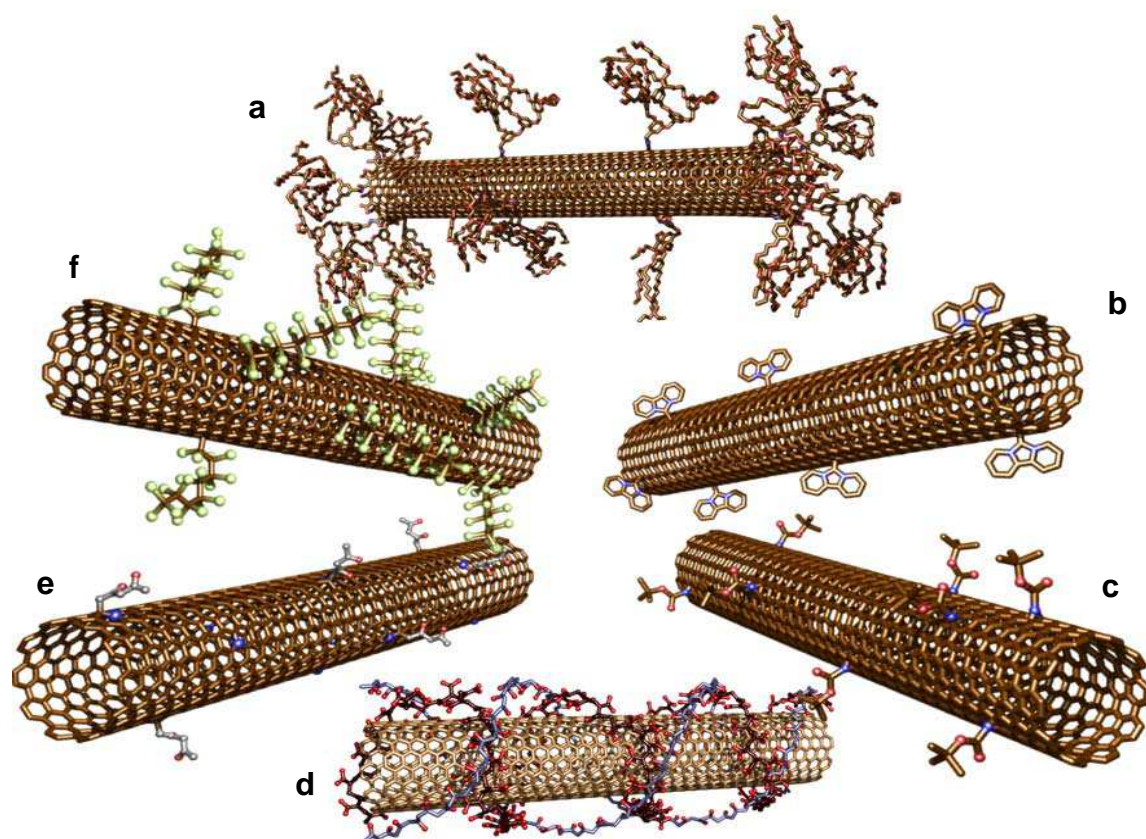
#### **I.4. Biocapteurs à base d'architectures tridimensionnelles**

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés uniquement aux nanotubes de carbone qui vont donc être ici décrits plus en détail. Dans un premier temps, leurs fonctionnalisation et solubilisation seront décrites tandis que dans un second temps, nous décrirons les biocapteurs à base de nanotubes de carbone.

##### **I.4.1. Fonctionnalisation chimique et solubilisation des nanotubes de carbone**

La fonctionnalisation des nanotubes de carbone a donné lieu à de nombreuses publications scientifiques dans la littérature ces dix dernières années ; en effet, celle-ci permet de mieux les solubiliser mais aussi de combiner leurs propriétés à celles des groupements fonctionnels les modifiant<sup>130, 131, 132</sup>. Les nanotubes de carbone présentent souvent des défauts ponctuels de surface où les atomes de carbone ne sont plus dans leur état  $sp^2$  habituel mais dans un état  $sp^3$  ; dans ce cas, la quatrième liaison peut exhiber un atome d'hydrogène, une fonction alcool ou encore un acide carboxylique. Ces défauts créent des trous dans la paroi du nanotube qui, s'ils sont présents en trop grand nombre, peuvent lui faire perdre son caractère conducteur. Bekyarova et al. ont d'ailleurs publié en 2005 une étude de l'évolution de leurs propriétés conductrices avant et après fonctionnalisation<sup>133</sup>. Cependant, ces défauts peuvent servir pour la fonctionnalisation ultérieure des nanotubes de carbone qui utilise surtout les fonctions acides carboxyliques. Cette fonction peut aussi être introduite par oxydation chimique des nanotubes afin de disposer de plus de points d'ancrage sur leur surface<sup>134, 135</sup>. Chen et al. ont été les premiers à décrire la fonctionnalisation de ces fonctions  $-COOH$  en formant des liaisons amides par réaction avec une amine en 1998<sup>136</sup>. Ensuite, plusieurs

modifications covalentes des nanotubes ont été réalisées grâce à l'utilisation d'espèces chimiques très réactives<sup>137</sup> comme présenté sur le **Schéma I-16**. Cependant, il reste difficile de réaliser une fonctionnalisation homogène des nanotubes de carbone sans les solubiliser au préalable. En effet, ceux-ci forment de nombreux agrégats en solutions aqueuse ou organique et il faut donc tout d'abord réussir à les disperser. Plusieurs méthodes ont été mises au point comme l'utilisation de tensioactifs<sup>138</sup> ou de méthodes chimiques permettant de doper les nanotubes de carbone avec des électrons et donc d'engendrer des phénomènes de répulsions électrostatiques<sup>139</sup>.



**Schéma I-16** : Différentes voies utilisées pour la fonctionnalisation des nanotubes de carbone mono-paroi développées par Holzinger et al. : **a)** formation d'esters et d'amides par couplage en présence d'EDC, **b)** réaction avec des carbènes nucléophiles, **c)** réaction avec des nitrènes, **d)** Fonctionnalisation par des couches de poly(acrylate) par interaction hydrogènes, **e)** fonctionnalisation de nanotubes dopés avec des hétéroatomes et **f)** fonctionnalisation covalente par des radicaux.

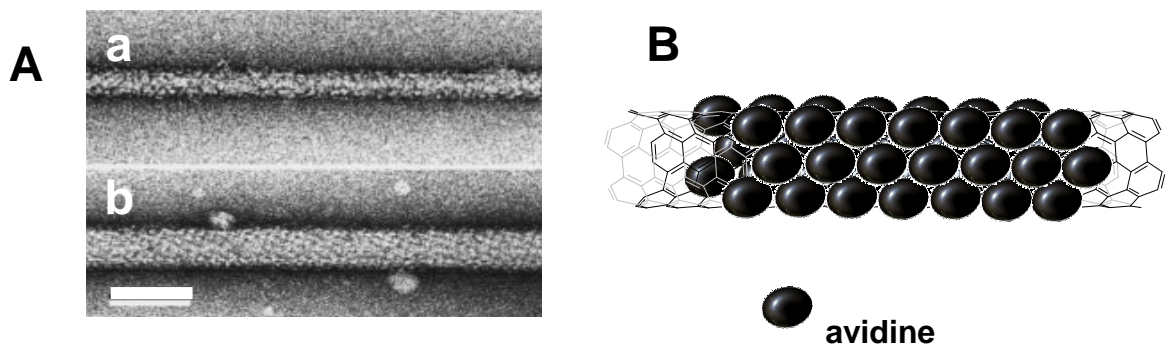
Afin d'envisager leur utilisation dans des matériaux composites dans des domaines tels que l'électronique ou les biocapteurs, une étape importante reste l'obtention de solutions de nanotubes de carbone stables et reproductibles ; de plus dans le cas des biocapteurs, le solvant utilisé ne doit pas être trop agressif afin de ne pas endommager les macromolécules biologiques qui sont très sensibles. En 2008, Cosnier et al.<sup>140</sup> ont réussi à disperser des

nanotubes de carbone mono-paroi en solution aqueuse en présence d'un polymère amphiphile : le poly(pyrrole-triéthylammonium) de façon stable, reproductible et permettant l'élaboration de biocapteurs enzymatiques. Un an plus tard, ce même groupe a réussi à mettre au point une méthode rapide et efficace pour disperser les nanotubes de carbone mono-paroi dans le THF en 15 minutes seulement<sup>141</sup>. Cette solution a ensuite été déposée goutte à goutte sur des électrodes et, après séchage afin d'éliminer le THF, ont permis l'élaboration de biocapteurs par ancrage de la glucose oxydase sur les nanotubes de carbone *via* le système d'affinité classique avidine/biotine.

#### I.4.2. Utilisation des nanotubes de carbone dans les biocapteurs

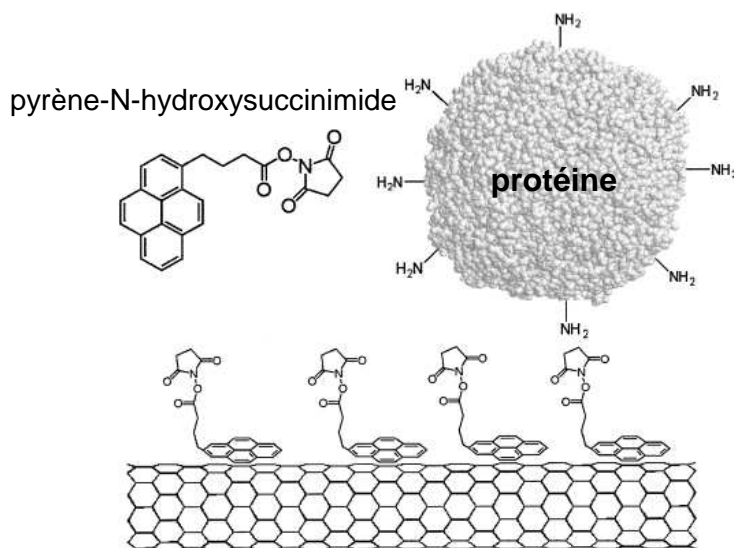
Les nanotubes de carbone sont apparus très rapidement comme un matériau d'exception pour l'élaboration de biocapteurs du fait de leur haute surface spécifique<sup>142</sup>, de leurs propriétés physiques singulières<sup>33, 34</sup> et de leur structure poreuse. En effet, plusieurs techniques ont été utilisées pour l'élaboration de biocapteurs comme la fonctionnalisation des défauts ponctuels ou créés par oxydation chimique des nanotubes de façon covalente<sup>143</sup> ou l'utilisation de polymères électrogénérés<sup>144</sup>. Dans le cas de la fonctionnalisation des défauts de surface des nanotubes, plusieurs méthodes ont été envisagées telles que l'adsorption électrostatique<sup>145, 146</sup>, le greffage covalent<sup>143</sup> ou encore l'utilisation de systèmes affins en ancrant un des partenaires affins sur les nanotubes de carbone<sup>147</sup>. Les polymères électrogénérés offrent quant à eux une possibilité supplémentaire qui est l'encapsulation des biomolécules<sup>148</sup> et permettent toujours d'utiliser les techniques exposées précédemment : adsorption<sup>149</sup>, greffage par liaisons covalentes<sup>150</sup> ou interactions affines<sup>118, 151</sup>. Une autre possibilité offerte par ce type de structure correspond au fait que la plupart des macrocycles possédant des carbones de type  $sp^2$  vont pouvoir s'ancrer par interactions  $\pi$ - $\pi$  sur la paroi des nanotubes de carbone. Notre travail ayant utilisé ces deux dernières voies de fonctionnalisation, nous allons principalement nous concentrer sur celles-ci.

En 1999, des travaux publiés par Balavoine et al. décrivaient l'immobilisation de la streptavidine sur des nanotubes de carbone multi-parois (MWCNTs) par interactions hydrophobes entre la protéine et la paroi des MWCNTs. Le **Schéma I-17-A** montre les clichés de MWCNTs obtenus par microscopie électronique à balayage avant (**a**) et après (**b**) leur fonctionnalisation tandis que la méthode de modification des MWCNTs est schématiquement représentée sur le **Schéma I-17-B**.



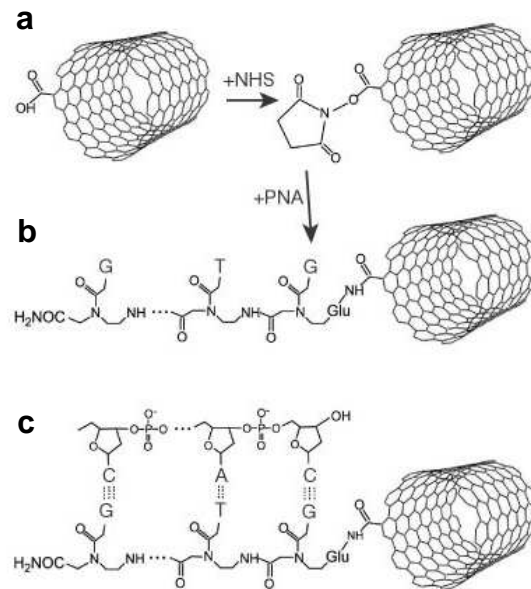
**Schéma I-17 :** *A - Clichés de microscopie électronique à balayage obtenues par Balavoine et al.<sup>152</sup> pour a) des nanotubes de carbone multi-parois (MWCNTs) et b) des MWCNTs fonctionnalisés par des molécules de streptavidine adsorbées par interactions hydrophobes. La barre d'échelle représente 50 nm. B – Représentation schématique des MWCNTs fonctionnalisés par les molécules de streptavidine (pour des raisons de clarté seule une paroi des MWCNTs a été représentée).*

Ce n'est que deux ans plus tard, en 2001, que les nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs) ont pu être utilisés avec succès pour l'immobilisation d'une protéine par Chen et al.<sup>153</sup> via des interactions non-covalentes de type  $\pi$ - $\pi$  entre les nanotubes de carbone et la molécule de pyrène (N-succinimidyl-1-pyrènebutanoate). Le groupement succinimide a ensuite permis le greffage covalent des biomolécules à la surface des nanotubes de carbone par réaction chimique avec les fonctions amine périphériques de la protéine (**Schéma I-18**).



**Schéma I-18 :** *Représentation schématique du premier biocapteur décrivant l'immobilisation de protéines (ferritine et streptavidine) sur des nanotubes de carbone mono-paroi grâce à leur capacité à interagir de façon non covalente (interaction  $\pi$ - $\pi$ ) avec le groupement pyrène du pyrène-N-hydroxysuccinimide permettant par la suite de former une liaison covalente avec les fonctions amines situées en périphérie présentes dans toutes les protéines. Extrait des travaux de Chen et al. publiés en 2001<sup>153</sup>.*

En 2003, Besteman et al.<sup>154</sup> ont repris la technique d'immobilisation décrite ci-dessus afin d'immobiliser la glucose oxydase sur des nanotubes uniques et créer un biocapteur à effet de champ. Un des premiers biocapteurs à ADN à base de nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs) est apparu en 2002 lorsque Williams et al.<sup>155</sup> ont réussi à lier de façon covalente un analogue de l'ADN (PNA : acide nucléique peptidique) sur les SWCNTs (**Schéma I-19**).



**Schéma I-19** : Principe de la stratégie employée par Besteman et al.<sup>154</sup> pour réaliser un biocapteur à ADN : **a)** fonctionnalisation des défauts ponctuels (-COOH) des nanotubes de carbone mono-paroi par un groupement N-hydroxysuccinimide (NHS), **b)** formation d'une liaison amide entre les SWCNTs et un acide nucléique peptidique (PNA) et **c)** hybridation avec un brin d'ADN complémentaire.

La méthode la plus facile d'immobilisation des macromolécules biologiques est basée sur leur incorporation dans ou sur des des polymères électrogénérés. Celle-ci combine alors les propriétés de ce type de films polymères qui ont été exposées précédemment (stabilité chimique, diversité des matériaux utilisables, reproductibilité et précision des dépôts et possibilité de façonner les monomères utilisés illimitée) et la structure tridimensionnelle des nanotubes de carbone.

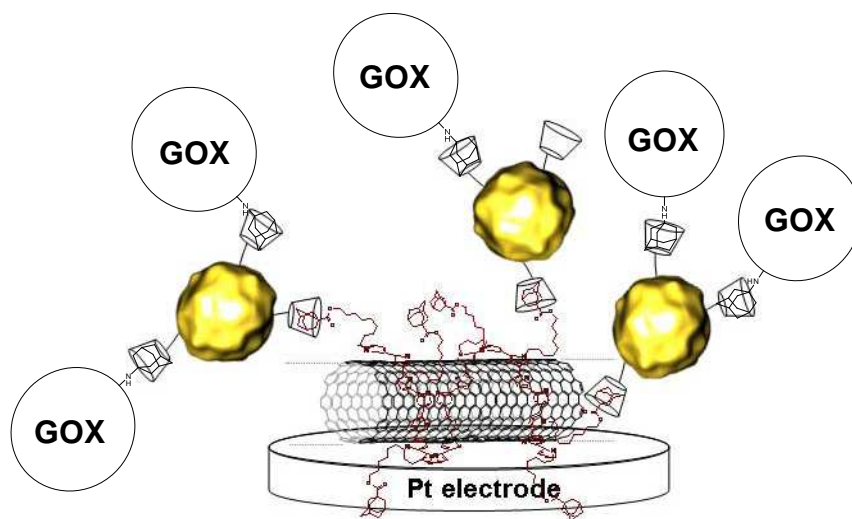
En 2003, les premiers biocapteurs de ce type apparaissent dans la littérature décrivant principalement des biocapteurs à glucose par immobilisation de la glucose oxydase<sup>156</sup>, <sup>157</sup> mais aussi un biocapteur à ADN<sup>158</sup>. Par exemple, cette année-là, Gao et al.<sup>157</sup> ont publié des résultats intéressants concernant un nouveau matériau obtenu par synthèse de nanotubes de carbone (CNTs) sur une surface en quartz et permettant alors d'obtenir des CNTs verticaux



sur la surface qui peuvent être décrits comme une forêt de CNTs. Ce type de matériau a alors été mis à profit pour l'immobilisation d'une enzyme modèle, la glucose oxydase, par encapsulation dans du poly(pyrrole) électrogénéré.

En 2005, Wang et al.<sup>159</sup> ont développé et optimisé un biocapteur à glucose très sensible basé sur des nanotubes de carbone multi-parois et des films de poly(pyrrole) conducteurs et ceci a permis de confirmer les possibilités offertes par ces matériaux composites.

Une nouvelle génération de biocapteurs faisant intervenir les systèmes d'affinité a été finalement développée dès 2009 par Holzinger et al. en utilisant des monomères pyrroliques fonctionnalisés par un des partenaires des systèmes d'affinité avidine/biotine<sup>151</sup> et adamantane/ $\beta$ -cyclodextrine<sup>118</sup>. Ces derniers ont permis d'obtenir des biocapteurs très performants. En particulier, dans le cas du système adamantane/ $\beta$ -cyclodextrine<sup>118</sup>, le biocapteur décrit combinait les propriétés des nanotubes de carbone mono-paroi, du poly(pyrrole-adamantane) et de microparticules d'or fonctionnalisées par des groupements fonctionnels  $\beta$ -cyclodextrine comme représenté sur le **Schéma I-20** pour l'élaboration d'un biocapteur à glucose.



**Schéma I-20** : Représentation schématique de l'architecture hybride à base de nanotubes de carbone mono-paroi, de poly(pyrrole-adamantane), de microparticules d'or marquées avec des  $\beta$ -cyclodextrines et d'enzymes (glucose oxydase : GOX) marquées avec des adamantanes développée par Holzinger et al.<sup>118</sup>.

## Bibliographie

- (1) Viswanathan, S. ; Radecka, H. ; Radecki, J. *Monatsh. Chem.* **2009**, *140*, 891-899.
- (2) Vaddiraju, S. ; Tomazos, I. ; Burgess, D. J. ; Jain, F. C. ; Papadimitrakopoulos, F. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1553-1565.
- (3) Rasooly, A. ; Herold, K. E. *Biosensors and Biodetection*, Éd. Humana Press, **2009**, Vol. 504.
- (4) Bilitewski, U. ; Turner, A. P. F. *Biosensors for environmental monitoring*, Éd. Taylor & Francis, **2000**.
- (5) Paddle, B. M. *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 1079-1113.
- (6) Diamond, D. *Principles of Chemical and Biological Sensors*, 1er éd., Wiley-Interscience, **1998**.
- (7) Ronkainen, N. J. ; Halsall, H. B. ; Heineman, W. R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1747.
- (8) Borisov, S. M. ; Wolfbeis, O. S. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 423-461.
- (9) Erokhin, V. V. ; Kayushina, R. L. ; Gorkin, P. N. ; Kurochkin, I. N. ; Popov, B. N. ; Chernov, S. F. *J. Anal. Chem. USSR* **1990**, *45*, 1049-1053.
- (10) Bhatia, P. K. ; Danielsson, B. ; Gemeiner, P. ; Grabley, S. ; Lammers, F. ; Mukhopadhyay, A. ; Ramanathan, K. ; Saleemuddin, M. ; Scheper, T. ; Stefuca, V. ; Thiericke, R. ; Xie, B. *Thermal Biosensors, Bioactivity, Bioaffinity*, Éd. Springer Berlin Heidelberg, **1999**, Vol. 64.
- (11) Rogers, K. R. ; Mulchandani, A. *Affinity biosensors: techniques and protocols* Éd. Humana Press, **1998**.
- (12) Newman, J. D. ; Setford, S. J. *Mol. Biotechnol.* **2006**, *32*, 249-268.
- (13) Clark, L. C. J. ; Lyons, C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *102*, 29-45.
- (14) Updike, S. J. ; Hicks, G. P. *Science* **1967**, *158*, 270-272.
- (15) Guilbault, G. G. ; Montalvo, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 2164-2165.
- (16) Guilbault, G. G. *Analytical uses of immobilized enzymes*; M. Dekker, **1984**.
- (17) Diaz, A. F. ; Castillo, J. ; Kanazawa, K. K. ; Logan, J. A. ; Salmon, M. ; Fajardo, O. J. *Electroanal. Chem.* **1982**, *133*, 233-239.
- (18) Deronzier, A. ; Moutet, J. C. *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 249-255.
- (19) Bidan, G. *Sens. Actuators, B* **1992**, *6*, 45-56.
- (20) Cosnier, S. *Can. J. Chem. Eng.* **1998**, *76*, 1000-1007.
- (21) Shaolin, M. *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *370*, 135-139.
- (22) Fabiano, S. ; Tran-Minh, C. ; Piro, B. ; Dang, L. A. ; Pham, M. C. ; Vittori, O. *Mater. Sci. Eng., C* **2002**, *21*, 61-67.

- (23) Skotheim, T. A. ; Reynolds, J. R. *Handbook of conducting polymers: Theory, synthesis, properties, and characterization*, CRC Press, **2007**.
- (24) Heinze, J. ; Frontana-Uribe, B. A. ; Ludwigs, S. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 4724-4771.
- (25) Li, C. *Electrochemical sensors for biomedical applications: proceedings of a symposium held at the May 1986 Meeting of the Electrochemical society* ; **1986**.
- (26) Jianrong, C. ; Yuqing, M. ; Nongyue, H. ; Xiaohua, W. ; Sijiao, L. *Biotechnol. Adv.* **2004**, *22*, 505-518.
- (27) Pumera, M. ; Sánchez, S. ; Ichinose, I. ; Tang, J. *Sens. Actuators, B* **2007**, *123*, 1195-1205.
- (28) Zhang, X. ; Guo, Q. ; Cui, D. *Sensors* **2009**, *9*, 1033-1053.
- (29) Liu, G. ; Lin, Y. *Talanta* **2007**, *74*, 308-317.
- (30) Erdem, A. *Talanta* **2007**, *74*, 318-325.
- (31) Wang, J. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 769-776.
- (32) Sarma, A. K. ; Vatsyayan, P. ; Goswami, P. ; Minter, S. D. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2313-2322.
- (33) Saito, R. ; Fujita, M. ; Dresselhaus, G. ; Dresselhaus, M. S. *Appl. Phys. Lett.* **1992**, *60*, 2204.
- (34) Popov, V. N. ; Van Doren, V. E. ; Balkanski, M. *Phys. Rev. B* **2000**, *61*, 3078.
- (35) Li, X. ; Wu, Y. ; Steel, D. ; Gammon, D. ; Stievater, T. H. ; Katzer, D. S. ; Park, D. ; Piermarocchi, C. ; Sham, L. J. *Science* **2003**, *301*, 809-811.
- (36) Lu, W. ; Ji, Z. ; Pfeiffer, L. ; West, K. W. ; Rimberg, A. J. *Nature* **2003**, *423*, 422-425.
- (37) Pan, B. ; Cui, D. ; Xu, P. ; Li, Q. ; Huang, T. ; He, R. ; Gao, F. *Colloids Surf., A* **2007**, *295*, 217-222.
- (38) Ruiz-Hitzky, E. ; Darder, M. ; Aranda, P. ; Ariga, K. *Adv. Mat.* **2010**, *22*, 323-336.
- (39) Pan, B. ; Cui, D. ; Sheng, Y. ; Ozkan, C. ; Gao, F. ; He, R. ; Li, Q. ; Xu, P. ; Huang, T. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 8156-8163.
- (40) Medintz, I. L. ; Uyeda, H. T. ; Goldman, E. R. ; Mattoussi, H. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 435-446.
- (41) Rivas, G. A. ; Rubianes, M. D. ; Rodríguez, M. C. ; Ferreyra, N. F. ; Luque, G. L. ; Pedano, M. L. ; Miscoria, S. A. ; Parrado, C. *Talanta* **2007**, *74*, 291-307.
- (42) Siqueira Jr., J. R. ; Caseli, L. ; Crespilho, F. N. ; Zucolotto, V. ; Oliveira Jr., O. N. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1254-1263.
- (43) Voet, D. ; Voet, J. G. ; Rousseau, G. *Biochimie*, Éd. De Boeck Université, **2005**.
- (44) Michaelis, L. ; Menten, M. *Biochem. Z.* **1913**, *49*, 333-369.
- (45) Lineweaver, H. ; Burk, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 658-666.
- (46) Poluiquen-Sonaglia, I. ; Lesgards, G. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1989**, *1*, 73.

- (47) Bille, V. ; Plainchamp, D. ; Lavielle, S. ; Chassaing, G. ; Remacle, J. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *180*, 41-47.
- (48) Bacha, S. ; Bergel, A. ; Comtat, M. *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *359*, 21-38.
- (49) Iliev, I. ; Atanasov, P. ; Gamburgzev, S. ; Kaisheva, A. ; Tonchev, V. *Sens. Actuators, B* **1992**, *8*, 65-72.
- (50) Andrieux, C. ; Audebert, P. ; Divisia-Blohorn, B. ; Linquette-Maillet, S. *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *353*, 289-296.
- (51) Bartlett, P. N. ; Whitaker, R. G. *J. Electroanal. Chem.* **1987**, *224*, 27-35.
- (52) Bartlett, P. N. ; Whitaker, R. G. *J. Electroanal. Chem.* **1987**, *224*, 37-48.
- (53) Kamin, R. A. ; Wilson, G. S. *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 1198-1205.
- (54) Turner, A. P. F. ; Karube, I. ; Wilson, G. S. *Biosensors: fundamentals and applications*, Éd. Oxford University Press, **1987**.
- (55) Hecht, H. ; Schomburg, D. ; Kalisz, H. ; Schmid, R. *Biosens. Bioelectron.* **1993**, *8*, 197-203.
- (56) Schomburg, D. ; Salzman, M. ; Stephan, D. *Enzyme handbook*, Éd. Springer, **1998**.
- (57) Swoboda, B. ; Massey, V. *J. Biol. Chem.* **1964**, *240*, 2209-2215.
- (58) Wang, J. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 814-825.
- (59) Duckworth, H. W. ; Coleman, J. E. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 1613-1625.
- (60) Cosnier, S. *Electroanalysis* **1997**, *9*, 894-902.
- (61) Mousty, C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *396*, 315-325.
- (62) Volbeda, A. ; Garcin, E. ; Piras, C. ; de Lacey, A. L. ; Fernandez, V. M. ; Hatchikian, E. C. ; Frey, M. ; Fontecilla-Camps, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12989-12996.
- (63) Pelmont, J. *Biodégradations et métabolismes: les bactéries pour les technologies de l'environnement*, Éd. EDP Sciences, **2005**.
- (64) Volbeda, A. ; Charon, M. ; Piras, C. ; Hatchikian, E. C. ; Frey, M. ; Fontecilla-Camps, J. C. *Nature* **1995**, *373*, 580-587.
- (65) Vignais, P. M. ; Billoud, B. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4206-4272.
- (66) Vignais, P. M. ; Billoud, B. ; Meyer, J. *FEMS Microbiol. Rev.* **2001**, *25*, 455-501.
- (67) Pilak, O. ; Mamat, B. ; Vogt, S. ; Hagemeyer, C. H. ; Thauer, R. K. ; Shima, S. ; Vorrhein, C. ; Warkentin, E. ; Ermler, U. *J. Mol. Biol.* **2006**, *358*, 798-809.
- (68) Armaroli, N. ; Balzani, V. *Angew., Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 52-66.
- (69) Hallahan, D. L. ; Fernandez, V. M. ; Hatchikian, E. C. ; Hall, D. O. *Biochimie* **1986**, *68*, 49-54.
- (70) De Lacey, A. L. ; Fernández, V. M. ; Rousset, M. ; Cammack, R. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4304-4330.

- (71) Watson, J. D. ; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- (72) Letsinger, R. L. ; Ogilvie, K. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 3350-3355.
- (73) Letsinger, R. L. ; Miller, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 3356-3359.
- (74) Letsinger, R. L. ; Ogilvie, K. K. ; Miller, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 3360-3365.
- (75) Beaucage, S. L. ; Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862.
- (76) McBride, L. J. ; Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 245-248.
- (77) Forget, D. ; Boturyn, D. ; Defrancq, E. ; Lhomme, J. ; Dumy, P. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3976-3984.
- (78) Edupuganti, O. P. ; Singh, Y. ; Defrancq, E. ; Dumy, P. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5988-5995.
- (79) Cosnier, S. *Anal. Lett.* **2007**, *40*, 1260.
- (80) Cosnier, S. ; Karyakin, A. *Electropolymerization: Concepts, Materials and Applications*, Éd. Wiley & Sons, **2010**.
- (81) Umana, M. ; Waller, J. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 2979-2983.
- (82) Foulds, N. C. ; Lowe, C. R. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1986**, *82*, 1259.
- (83) Deshpande, M. V. ; Hall, E. A. *Biosens. Bioelectron.* **1990**, *5*, 431-448.
- (84) Campbell, T. E. ; Hodgson, A. J. ; Wallace, G. *Electroanalysis* **1999**, *11*, 215-222.
- (85) John, R. ; Spencer, M. ; Wallace, G. G. ; Smyth, M. R. *Anal. Chim. Acta* **1991**, *249*, 381-385.
- (86) Martelet, C. ; Ameer, S. ; Maupas, H. ; Jaffrezic-Renault, N. ; Ben Ouada, H. ; Cosnier, S. ; Labbe, P. *Mat. Sci. Eng., C* **1997**, *5*, 111-119.
- (87) Grant, S. ; Davis, F. ; Pritchard, J. A. ; Law, K. A. ; Higson, S. P. J. ; Gibson, T. D. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *495*, 21-32.
- (88) Wang, J. ; Jiang, M. *Langmuir* **2000**, *16*, 2269-2274.
- (89) Davis, F. ; Nabok, A. V. ; Higson, S. P.J. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 1531-1538.
- (90) Haddour, N. ; Cosnier, S. ; Gondran, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5752-5753.
- (91) Da Silva, S. ; Cosnier, S. ; Almeida, M. ; Moura, J. *Electrochem. Commun.* **2004**, *6*, 404-408.
- (92) Ramsay, G. ; Wolpert, S. M. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 504-506.
- (93) Yasuzawa, M. ; Fujii, S. ; Kunugi, A. ; Nakaya, T. *Anal. Sci.* **1999**, *15*, 1175-1176.
- (94) Shaolin, M. ; Huaiguo, X. ; Bidong, Q. *J. Electroanal. Chem.* **1991**, *304*, 7-16.
- (95) Grennan, K. ; Strachan, G. ; Porter, A. J. ; Killard, A. J. ; Smyth, M. R. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *500*, 287-298.
- (96) Wang, J. ; Jiang, M. ; Mukherjee, B. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4095-4099.
- (97) Ghanbari, K. ; Bathaie, S. ; Mousavi, M. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23*, 1825-1831.
- (98) Purvis, D. ; Leonardova, O. ; Farmakovskiy, D. ; Cherkasov, V. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 1385-1390.

- (99) Schuhmann, W. ; Lammert, R. ; Uhe, B. ; Schmidt, H. *Sens. Actuators, B* **1990**, *1*, 537-541.
- (100) Schuhmann, W. ; Huber, J. ; Mirlach, A. ; Daub, J. *Adv. Mater.* **1993**, *5*, 124-126.
- (101) Hiller, M. ; Kranz, C. ; Huber, J. ; Bäuerle, P. ; Schuhmann, W. *Adv. Mater.* **1996**, *8*, 219-222.
- (102) Bäuerle, P. ; Hiller, M. ; Scheib, S. ; Sokolowski, M. ; Umbach, E. *Adv. Mater.* **1996**, *8*, 214-218.
- (103) Giroud, F. ; Gorgy, K. ; Gondran, C. ; Cosnier, S. ; Pinacho, D. G. ; Marco, M. ; Sánchez-Baeza, F. J. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 8405-8409.
- (104) Cosnier, S. ; Senillou, A. *Chem. Commun.* **2003**, 414-415.
- (105) Konry, T. ; Novoa, A. ; Shemer-Avni, Y. ; Hanuka, N. ; Cosnier, S. ; Le Pellec, A. ; Marks, R. S. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1771-1779.
- (106) Goldberg-Oppenheimer, P. ; Cosnier, S. ; Marks, R. S. ; Regev, O. *Talanta* **2008**, *75*, 1324-1331.
- (107) Konry, T. ; Hadad, B. ; Shemer-Avni, Y. ; Cosnier, S. ; Marks, R. S. *Talanta* **2008**, *75*, 564-571.
- (108) Green, N. M. *Adv. Protein Chem.* **1975**, *29*, 85-133.
- (109) Wilchek, M. ; Bayer, E. A. *Anal. Biochem.* **1988**, *171*, 1-32.
- (110) Cosnier, S. ; Galland, B. ; Gondran, C. ; Le Pellec, A. *Electroanalysis* **1998**, *10*, 808-813.
- (111) Torres-Rodriguez, L. M. ; Roget, A. ; Billon, M. ; Bidan, G. ; Livache, T. *Chem. Commun.* **1998**, 1993-1994.
- (112) Yang, S. ; Witkowski, A. ; Hutchins, R. ; Scott, D. ; Bachas, L. *Electroanalysis* **1998**, *10*, 58-60.
- (113) Cosnier, S. ; Le Pellec, A. ; Marks, R. S. ; Périé, K. ; Lellouche, J. *Electrochem. Commun.* **2003**, *5*, 973-977.
- (114) Mousty, C. ; Bergamasco, J. ; Wessel, R. ; Perrot, H. ; Cosnier, S. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2890-2897.
- (115) Ionescu, R. E. ; Gondran, C. ; Gheber, L. A. ; Cosnier, S. ; Marks, R. S. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6808-6813.
- (116) Haddour, N. ; Gondran, C. ; Cosnier, S. *Chem. Commun.* **2004**, 324.
- (117) Haddour, N. ; Chauvin, J. ; Gondran, C. ; Cosnier, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9693-9698.
- (118) Holzinger, M. ; Bouffier, L. ; Villalonga, R. ; Cosnier, S. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1128-1134.
- (119) Porath, J. ; Carlsson, J. ; Olsson, I. ; Belfrage, G. *Nature* **1975**, *258*, 598-599.
- (120) Lori, J. ; Morrin, A. ; Killard, A. ; Smyth, M. *Electroanalysis* **2006**, *18*, 77-81.

- (121) Wolowacz, S. E. ; Yon Hin, B. F. Y. ; Lowe, C. R. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1541-1545.
- (122) Schuhmann, W. ; Kranz, C. ; Huber, J. ; Wohlschläger, H. *Synth. Met.* **1993**, *61*, 31-35.
- (123) Yon-Hin, B. F. Y. ; Smolander, M. ; Crompton, T. ; Lowe, C. R. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2067-2071.
- (124) Livache, T. ; Roget, A. ; Dejean, E. ; Barthet, C. ; Bidan, G. ; Teoule, R. *Nucl. Acids Res.* **1994**, *22*, 2915-2921.
- (125) Guedon, P. ; Livache, T. ; Martin, F. ; Lesbre, F. ; Roget, A. ; Bidan, G. ; Levy, Y. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 6003-6009.
- (126) Fiche, J. B. ; Fuchs, J. ; Buhot, A. ; Calemczuk, R. ; Livache, T. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1049-1057.
- (127) Heiduschka, P. ; Göpel, W. ; Beck, W. ; Kraas, W. ; Kienle, S. ; Jung, G. *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 667-672.
- (128) Gondran, C. ; Dubois, M. ; Fort, S. ; Cosnier, S. ; Szunerits, S. *Analyst* **2008**, *133*, 206.
- (129) Mercey, E. ; Sadir, R. ; Maillart, E. ; Roget, A. ; Baleux, F. ; Lortat-Jacob, H. ; Livache, T. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 3476-3482.
- (130) Niyogi, S. ; Hamon, M. A. ; Hu, H. ; Zhao, B. ; Bhowmik, P. ; Sen, R. ; Itkis, M. E. ; Haddon, R. C. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 1105-1113.
- (131) Bahr, J. L. ; Tour, J. M. *J. Mater. Chem.* **2002**, *12*, 1952-1958.
- (132) Dyke, C. A. ; Tour, J. M. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1215-1218.
- (133) Bekyarova, E. ; Itkis, M. E. ; Cabrera, N. ; Zhao, B. ; Yu, A. ; Gao, J. ; Haddon, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5990-5995.
- (134) Hiura, H. ; Ebbesen, T. W. ; Tanigaki, K. *Adv. Mater.* **1995**, *7*, 275-276.
- (135) Hu, H. ; Bhowmik, P. ; Zhao, B. ; Hamon, M. ; Itkis, M. ; Haddon, R. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *345*, 25-28.
- (136) Chen, J. ; Hamon, M. A. ; Hu, H. ; Chen, Y. ; Rao, A. M. ; Eklund, P. C. ; Haddon, R. C. *Science* **1998**, *282*, 95-98.
- (137) Hirsch, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1853-1859.
- (138) O'Connell, M. J. ; Bachilo, S. M. ; Huffman, C. B. ; Moore, V. C. ; Strano, M. S. ; Haroz, E. H. ; Rialon, K. L. ; Boul, P. J. ; Noon, W. H. ; Kittrell, C. ; Ma, J. ; Hauge, R. H. ; Weisman, R. B. ; Smalley, R. E. *Science* **2002**, *297*, 593-596.
- (139) Liang, F. ; Sadana, A. K. ; Peera, A. ; Chattopadhyay, J. ; Gu, Z. ; Hauge, R. H. ; Billups, W. *E. Nano Lett.* **2004**, *4*, 1257-1260.
- (140) Cosnier, S. ; Ionescu, R. ; Holzinger, M. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 5129-5133.
- (141) Haddad, R. ; Cosnier, S. ; Maaref, A. ; Holzinger, M. *Analyst* **2009**, *134*, 2412.

- (142) Peigney, A. ; Laurent, C. ; Flahaut, E. ; Bacsa, R. R. ; Rousset, A. *Carbon* **2001**, *39*, 507.
- (143) Davis, J. ; Coleman, K. ; Azamian, B. ; Bagshaw, C. ; Green, M. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3732-3739.
- (144) Cosnier, S. ; Holzinger, M. *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 3948-3954.
- (145) Guiseppi-Elie, A. ; Lei, C. ; Baughman, R. H. *Nanotechnol.* **2002**, *13*, 559-564.
- (146) Staii, C. ; Johnson, A. T. ; Chen, M. ; Gelperin, A. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1774-1778.
- (147) Shi Kam, N. W. ; Jessop, T. C. ; Wender, P. A. ; Dai, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6850-6851.
- (148) Callegari, A. ; Cosnier, S. ; Marcaccio, M. ; Paolucci, D. ; Paolucci, F. ; Georgakilas, V. ; Tagmatarchis, N. ; Vázquez, E. ; Prato, M. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 807.
- (149) Wohlstadter, J. ; Wilbur, J. ; Sigal, G. ; Biebuyck, H. ; Billadeau, M. ; Dong, L. ; Fischer, A. ; Gudibande, S. ; Jameison, S. ; Kenten, J. ; Leginus, J. ; Leland, J. ; Massey, R. ; Wohlstadter, S. *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1184-1187.
- (150) Zhu, Y. ; Won, M. ; Shim, Y. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *In Press, Accepted Manuscript*.
- (151) Holzinger, M. ; Haddad, R. ; Maaref, A. ; Cosnier, S. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2009**, *9*, 6042-6046.
- (152) Balavoine, F. ; Schultz, P. ; Richard, C. ; Mallouh, V. ; Ebbesen, T. W. ; Mioskowski, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 1912-1915.
- (153) Chen, R. J. ; Zhang, Y. ; Wang, D. ; Dai, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3838-3839.
- (154) Besteman, K. ; Lee, J. ; Wiertz, F. G. M. ; Heering, H. A. ; Dekker, C. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 727-730.
- (155) Williams, K. A. ; Veenhuizen, P. T. M. ; De la Torre, B. G. ; Eritja, R. ; Dekker, C. *Nature* **2002**, *420*, 761.
- (156) Gao, M. ; Dai, L. ; Wallace, G. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 1089-1094.
- (157) Gao, M. ; Dai, L. ; Wallace, G. G. *Synth. Met.* **2003**, *137*, 1393-1394.
- (158) Cai, H. ; Xu, Y. ; He, P. ; Fang, Y. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 1864-1870.
- (159) Wang, J. ; Musameh, M. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *539*, 209-213.



# Chapitre II

Architectures biomoléculaires à base de  
poly(pyrrole-acide nitrilotriacétique)  
(NTA).



## **Chapitre II : Architectures biomoléculaires d'affinité à base de poly(pyrrole-acide nitrilotriacétique) (NTA).**

### **II.1. Généralités.**

La qualité de l'immobilisation des biomolécules sur des surfaces est une étape déterminante dans l'élaboration d'un biocapteur. Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, l'ancrage des molécules biologiques grâce à des interactions d'affinité est une technique très intéressante qui permet un contrôle de l'orientation des récepteurs biologiques sur la surface. Ces derniers peuvent être étiquetés grâce à des manipulations génétiques et/ou des greffages covalents de partenaires d'affinité par voie chimique à leur surface. Le développement de ces systèmes représente donc un enjeu important afin de mieux contrôler l'immobilisation des biomolécules et de trouver des alternatives au système classique avidine/biotine.

L'acide nitrilotriacétique est un très bon candidat dans cette optique et possède de nombreuses applications : traitement de l'eau pour prévenir la formation du calcaire<sup>1</sup> (complexe avec  $\text{Ca}^{2+}$ ), remplaçant des phosphates dans les lessives<sup>2</sup> (complexes avec  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ )... Il existe une forte interaction entre le complexe NTA/ $\text{Cu}^{2+}$  et l'acide aminé histidine qui a été mise à profit dans plusieurs domaines :

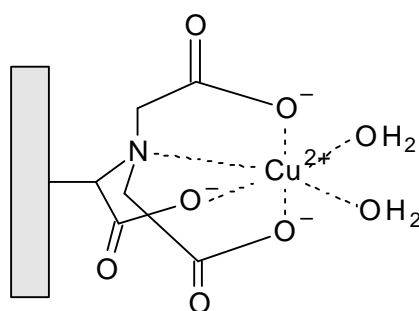
- la purification de molécules marquées avec une ou plusieurs molécules histidine (molécules histidinylées) par chromatographie d'affinité<sup>3</sup> (« Immobilized Metal Affinity Chromatography » : IMAC),

- l'immobilisation de molécules histidinylées sur des supports fonctionnalisés avec des groupements NTA tels que : monocouches lipidiques<sup>4,5</sup> ou thiolées<sup>6,7</sup> mais aussi sur des surfaces de silice<sup>8,9</sup>.

Depuis quelques années, les scientifiques s'intéressent à l'élaboration de polymères fonctionnalisés par les groupements NTA : des hydrogels permettant l'élaboration de moteurs biomoléculaires<sup>10</sup>, des films polypyrroliques dont le but est l'électrodéposition directe<sup>11</sup> ou indirecte<sup>12, 13</sup> des groupements NTA. Le monomère développé par Haddour et al.<sup>11</sup> en 2005 concerne un pyrrole N-substitué par le ligand NTA et il présente plusieurs avantages : l'obtention d'une couche de poly(pyrrole-NTA) homogène sur la surface et la possibilité d'y immobiliser de façon réversible des biomolécules histidinylées.

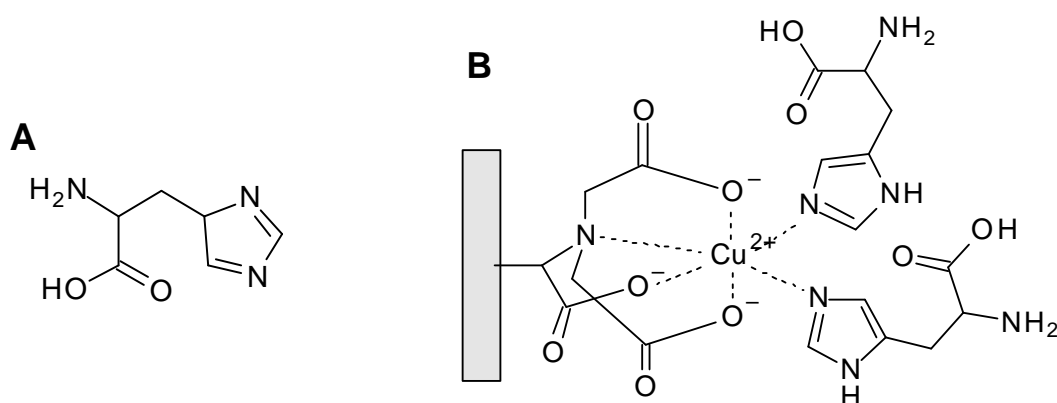
### II.1.1. L'acide nitrilotriacétique (NTA) et le complexe NTA/Cu<sup>2+</sup>.

L'acide nitrilotriacétique est un acide amino-tricarboxylique qui sert d'agent chélateur de nombreux ions métalliques (Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>...). Quatre liaisons de coordination s'établissent entre ce ligand et l'ion métallique concerné, c'est donc un chélateur quadridentate. Dans le cas du cuivre ou du nickel qui ont, en général, une sphère de coordination de six, quatre des six sites de coordination du métal sont occupés par ce ligand, les deux autres sites étant coordonnés avec une molécule d'eau chacun (**Schéma II-1**).



**Schéma II-1** : *Complexe NTA/Cu<sup>2+</sup>/(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>.*

### II.1.2. L'interaction NTA/Cu<sup>2+</sup>/Histidine.



**Schéma II-2** : *A - Structure de la molécule Histidine ; B - Interaction NTA/Cu<sup>2+</sup>/(His)<sub>2</sub>.*

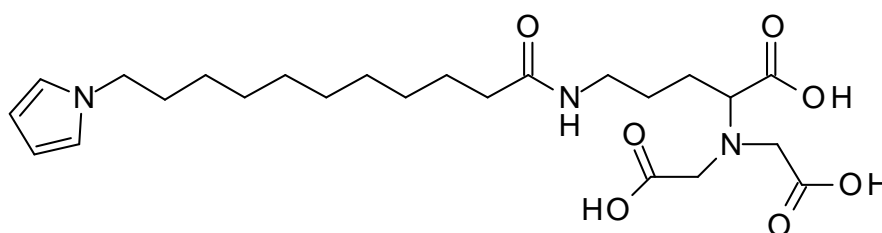
L'acide aminé histidine (His) fait partie des 20 acides aminés essentiels chez l'Homme (nourrissons et enfants) ; elle remplit des fonctions importantes dans la structure et la fonction des protéines (molécule tampon pour le maintien du pH sanguin, transporteur de protons dans les sites actifs enzymatiques...). Sa chaîne latérale a un caractère basique et possède un cycle

imidazole (**Schéma II-2-A**) qui permet l'interaction avec le système NTA/Cu<sup>2+</sup>. Elle est sous forme neutre à pH = 7 étant donné son point isoélectrique de 7,5. Lorsque le complexe avec NTA/Cu<sup>2+</sup> se forme, les deux molécules d'eau incluses dans celui-ci sont substituées par deux molécules histidine (**Schéma II-2-B**). Plusieurs travaux ont été publiés pour montrer que l'immobilisation est plus solide lorsque les molécules possèdent une séquence contenant six histidines<sup>14, 15</sup> mais aussi que le complexe formé avec Cu<sup>2+</sup> présente la plus grande stabilité thermodynamique<sup>16</sup>. Cette interaction possède le grand avantage d'être réversible ; elle peut être dissociée de plusieurs façons<sup>16</sup> :

- par l'ajout d'imidazole qui va remplacer les molécules histidines,
- par l'ajout d'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) qui va décomplexer l'ion métallique,
- par l'abaissement du pH (pH < 5) de la solution, l'histidine se protonne et l'interaction est rompue.

### II.1.3. Le poly(pyrrole-NTA).

Le poly(pyrrole-NTA) élaboré précédemment dans l'équipe résulte du couplage d'un pyrrole avec un motif NTA (**Schéma II-3**) et profite alors des avantages d'électrodéposition contrôlée des polymères conducteurs électroniques mais aussi des propriétés d'immobilisation du système NTA/Cu<sup>2+</sup>. Ce monomère électropolymérisable permet l'obtention d'un polymère organique à caractère hydrophile incorporant des motifs NTA. Après complexation avec Cu<sup>2+</sup>, il est alors possible de réaliser l'ancrage de molécules marquées avec des histidines<sup>11</sup>.



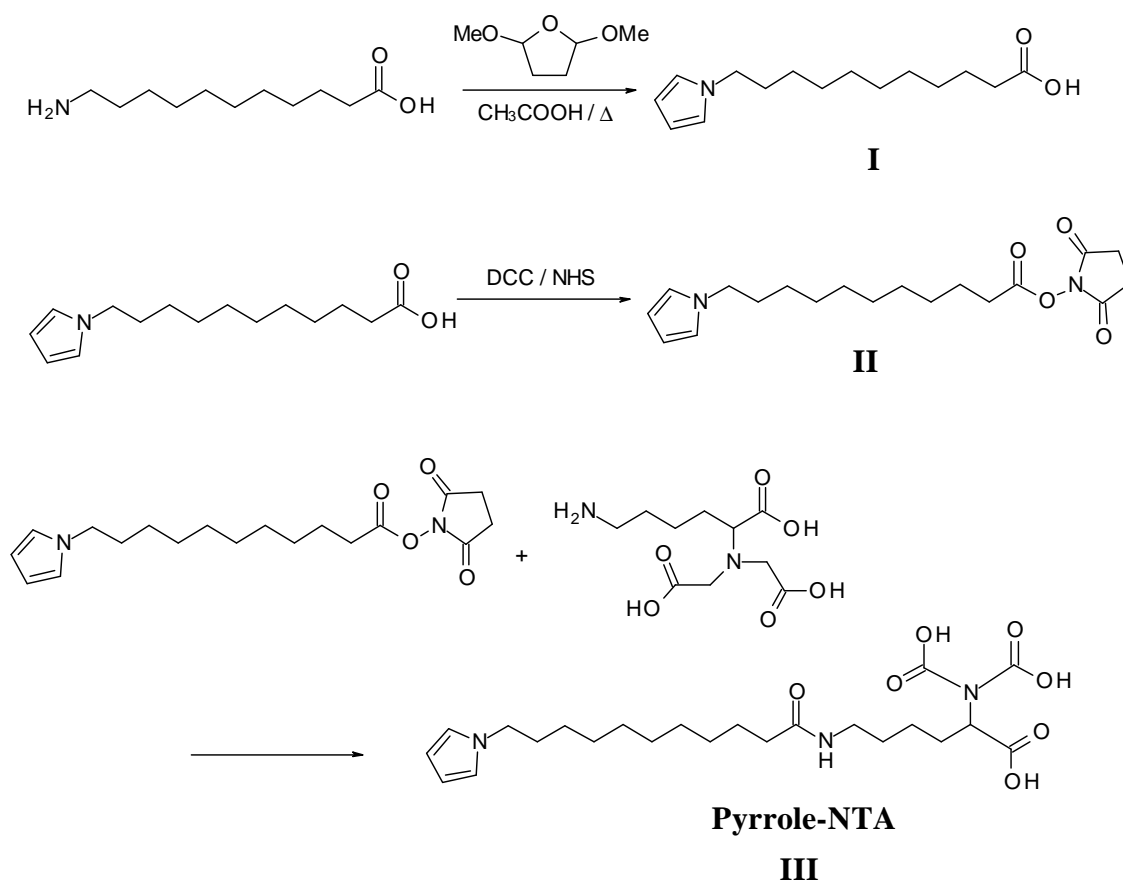
**Schéma II-3** : Structure du pyrrole-NTA.

Ce type de films a déjà été utilisé dans l'équipe pour l'immobilisation de protéines enzymatiques<sup>11</sup> ou transmembranaires<sup>17</sup> en offrant de très bonnes performances.

## II.2. Synthèse et caractérisation du pyrrole-NTA.

### II.2.1. Synthèse du monomère pyrrole-NTA.

La stratégie de synthèse utilisée correspond à celle développée par Haddour et al.<sup>11</sup> et comporte deux intermédiaires réactionnels à partir de l'acide 1-(11-undécanoïque) : l'acide 1-(11-undécanoïque) pyrrole **I** et l'ester activé **II** de ce dernier. Le pyrrole-NTA est obtenu par couplage de l'ester activé du pyrrole (**II**) avec le produit commercial  $N\alpha,N\alpha'$ -bis(carboxyméthyl)-L-lysine en milieu basique DMF-eau (rendement global : 36 %) (**Schéma II-4**).



**Schéma II-4** : Principe de la synthèse du pyrrole-NTA.

Les deux premières étapes de la synthèse permettant d'obtenir les produits **I** et **II** ont été réalisées comme décrites dans les travaux de Haddour et al.<sup>11</sup>. Seuls les rendements de ces étapes ont été optimisés (85% et 83% respectivement) en réalisant les synthèses sur de plus grandes quantités de matière tout en conservant les rapports molaires déjà établis par ces auteurs. Cependant, devant l'impossibilité d'obtenir le pyrrole-NTA (**III**, produit final), nous

avons dû optimiser la dernière étape. Après réaction et reprise dans l'eau, le milieu toujours basique était originellement acidifié avec de l'acide chlorhydrique pour obtenir le monomère sous forme protonée et permettre ainsi sa précipitation en solution aqueuse. Cette partie du protocole possède un inconvénient majeur puisque le pyrrole polymérise dans les solutions contenant des acides forts<sup>18</sup> ( $pK_a \leq -3$ ). Nous avons alors décidé de réaliser plusieurs lavages avec de l'eau pour éliminer un maximum de soude contenue dans le milieu réactionnel quitte à perdre un peu de notre produit final. Cette opération s'est révélée être un succès puisqu'elle permet d'obtenir le produit pur avec un rendement légèrement inférieur à celui obtenu auparavant (51% au lieu de 56%).

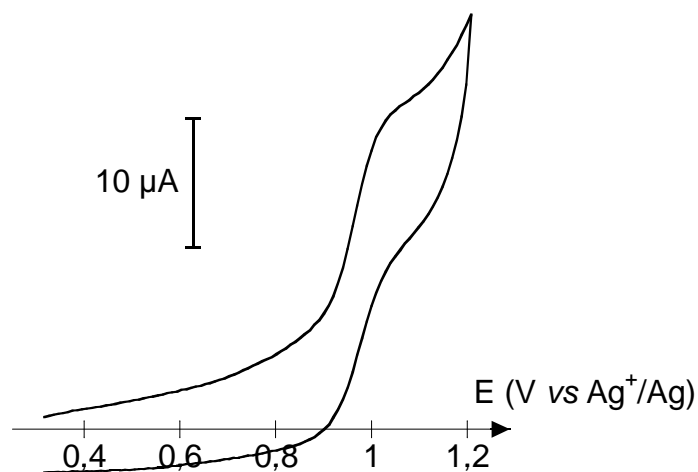
## II.2.2. Etude électrochimique du pyrrole-NTA.

Dans un premier temps, le monomère (pyrrole-NTA) a été caractérisé en solution par voltammétrie cyclique puis, dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la formation du poly(pyrrole-NTA) par balayages successifs de potentiels et par électrolyse à potentiel contrôlé. Les polymères obtenus ont ensuite été caractérisés par voltammétrie cyclique.

### *II.2.2.a. Etude du monomère en solution*

L'étude électrochimique du pyrrole-NTA a été réalisée en solution électrolytique  $\text{LiClO}_4$  ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) dans  $\text{CH}_3\text{CN}$  acidifiée avec  $\text{HClO}_4$  (augmentation de la solubilité du monomère en solution).

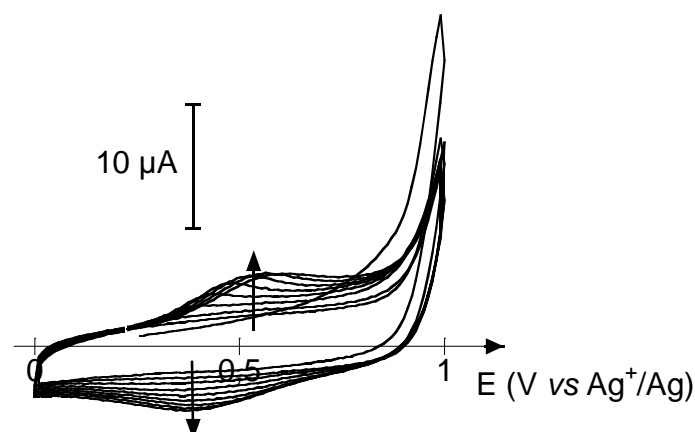
Dans un premier temps, le monomère a été caractérisé en solution par voltammétrie cyclique afin de vérifier qu'il présente le signal électroactif typique d'un N-alkylpyrrole<sup>19</sup>. Comme le montre la **Figure II-1**, le composé présente un pic anodique intense vers  $1,08 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$  qui correspond à l'oxydation irréversible du pyrrole et se trouve en accord avec les potentiels d'oxydation (entre  $1$  et  $1,2 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$ ) de monomères pyrroliques décrits dans la littérature<sup>19, 20</sup>.



**Figure II-1 :** Voltampérogramme d'une solution de pyrrole-NTA ( $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$  (acidifié avec  $\text{HClO}_4$ ) sur électrode de platine ( $\varnothing = 5 \text{ mm}$ ).  $\nu = 0,1 \text{ V.s}^{-1}$

### II.2.2.b. Polymérisation par voltammétrie cyclique

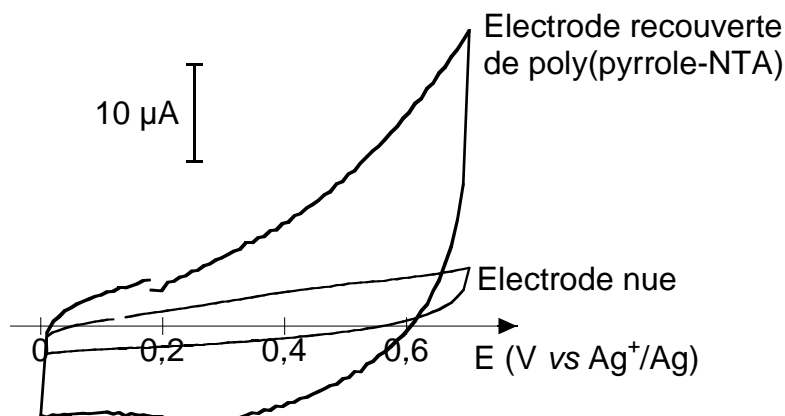
La formation du polymère a d'abord été étudiée par voltammétrie cyclique en réalisant 40 balayages successifs entre 0 et 1 V vs  $\text{Ag}^+/\text{Ag}$ . L'apparition d'un signal rédox réversible centré vers 0,47 V vs  $\text{Ag}^+/\text{Ag}$  est nettement visible sur la **Figure II-2** et correspond bien au signal électroactif typique d'un poly(pyrrole-N-alkyl)<sup>20</sup> qui se situe entre 0,4 et 0,6 V vs  $\text{Ag}^+/\text{Ag}$ . L'intensité du signal augmente au fur et à mesure des cycles et cette évolution est caractéristique de la formation d'un film poly(pyrrolique) électroactif à la surface de l'électrode avec 1 électron échangé pour 3 motifs pyrrole polymérisés.



**Figure II-2 :** Voltammétrie cyclique (40 cycles) du pyrrole-NTA ( $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$  (acidifié avec  $\text{HClO}_4$ ) sur électrode de platine ( $\varnothing = 0,5 \text{ mm}$ ) à  $\nu = 0,1 \text{ V.s}^{-1}$ . Pour des raisons de clarté, seulement les cycles 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 et 40 sont représentés ici.



Le transfert de l'électrode ainsi modifiée dans une solution électrolytique ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  dans  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) permet d'observer la persistance de ce signal rédox réversible (**Figure II-3**). Ceci confirme la stabilité du film polymère électrogénéré ainsi que sa forte adhérence à l'électrode.

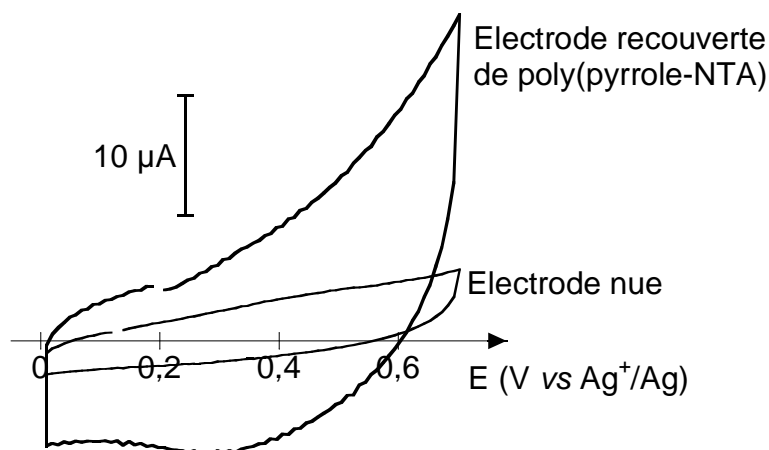


**Figure II-3 :** *Electrode de platine ( $\varnothing = 5 \text{ mm}$ ) modifiée avec le poly(pyrrole-NTA) polymérisé par voltammétrie cyclique et transférée dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$   $\text{LiClO}_4$  exempt de monomère avec  $v = 0,1 \text{ V.s}^{-1}$ .*

### II.2.2.c. Polymérisation à potentiel contrôlé

L'électropolymérisation du pyrrole-NTA a été réalisée par chronoampérométrie à potentiel imposé. Cette technique permet de contrôler aisément l'épaisseur de la couche de polymère déposé par contrôle de la charge électrique consommée durant le processus d'électropolymérisation. Nous avons choisi un potentiel  $E = 0,95 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$  se situant au pied du pic d'oxydation du pyrrole afin de permettre la polymérisation tout en évitant sa suroxydation. La suroxydation d'un film de poly(pyrrole) se produit à des potentiels supérieurs à  $1,2 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$  et conduit à la perte de conjugaison du polymère<sup>21, 22</sup> et donc à une partie de ses propriétés de conduction électrique.

Cette électrolyse à potentiel constant conduit à la formation d'un polymère stable qui présente le même signal rédox que celui élaboré par voltammétrie cyclique lorsque l'électrode est transférée dans une solution exempte de monomère (**Figure II-4**).



**Figure II-4 :** Electrode de platine ( $\varnothing = 5 \text{ mm}$ ) modifiée avec le poly(pyrrole-NTA) polymérisé par électrolyse à potentiel constant  $E = 0,95 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$  ( $Q = 0,5 \text{ mC}$ ) et transférée dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$  exempt de monomère avec  $v = 0,1 \text{ V.s}^{-1}$ .

L'intégration du signal obtenu permet de calculer le rendement de la polymérisation mais ne tient pas compte de l'éventuelle suroxydation du polymère. Ainsi, les rendements de polymérisation des films poly(pyrroliques) ne sont jamais égaux à 100 %. L'intégration de cette charge permet de calculer la concentration en sites électroactifs par unité de surface notée «  $\Gamma_{\text{réel}}$  » (recouvrement surfacique réel de l'électrode) en tenant compte du fait que 0,33 électrons sont consommés par motif pyrrole lorsqu'il est sous forme polymère lors du processus réversible d'oxydo-réduction de ce dernier. La charge limite imposée lors de la polymérisation permet de déterminer le recouvrement théorique de l'électrode noté «  $\Gamma_{\text{théorique}}$  » en considérant que 2,33 électrons sont consommés par motif pyrrole lors de l'électrolyse. Le rapport de ces deux valeurs permet de calculer le rendement de la polymérisation noté  $\eta = \Gamma_{\text{réel}} / \Gamma_{\text{théorique}}$ . Ainsi, pour une charge imposée de 0,5 mC lors de la polymérisation, nous avons obtenu un recouvrement surfacique  $\Gamma_{\text{réel}} = 1,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol.cm}^{-2}$  et donc un rendement de polymérisation  $\eta = 13 \%$ . Il est possible que le film ait été légèrement suroxydé dans notre cas vu la valeur du rendement de polymérisation ; la suroxydation d'un film de poly(pyrrole) conduit à la perte de conjugaison du polymère au profit de la formation de liaisons carbonyle ou alcool<sup>21, 23</sup> et, par conséquent, à une diminution du signal d'électroactivité du polymère.

### II.2.3. Etude de perméabilité.

La perméabilité électrochimique d'un polymère recouvrant une électrode représente sa capacité à laisser diffuser des espèces (molécules, gaz...) de la solution vers l'électrode et

vice-versa. Le coefficient de perméabilité se détermine grâce à l'ajout d'une sonde rédox en solution et par le suivi de l'évolution du signal de voltampérométrie stationnaire de l'électrode modifiée à différentes vitesses de rotation de l'électrode. Il rend compte du coefficient de partage K de la sonde rédox entre la solution et le polymère et du coefficient de diffusion de la sonde électrochimique dans le film polymère. Cette technique est basée sur l'équation de Koutecky-Levich qui permet de relier l'intensité limite ( $I_{lim}$ ) observée sur les courbes de la **Figure II-5** à la vitesse de rotation de l'électrode ( $\Omega$ ).

Au niveau du plateau ( $I_{lim}$ ), nous pouvons écrire :

$$\frac{1}{I_{lim}} = \frac{1}{I_s} + \frac{1}{I_m} \quad \text{Équation II-1}$$

où  $I_s$  et  $I_m$  caractérisent la diffusion de la sonde électrochimique dans la solution et la membrane (polymère), respectivement.

La partie de diffusion en solution  $I_s$  correspond à l'équation de Levich :

$$I_s = 0,62nFAD_s^{2/3}v^{-1/6}C^0\Omega^{1/2} \quad \text{Équation II-2}$$

Alors que la partie située dans la membrane polymère  $I_m$  est reliée au coefficient de partage K et au coefficient de diffusion de la sonde rédox dans la membrane  $D_m$  :

$$I_m = \frac{nFAD_mKC^0}{\delta} \quad \text{Équation II-3}$$

On obtient alors l'équation de Koutecky-Levich :

$$\frac{1}{I_{lim}} = \frac{1}{0,62nFAD_s^{2/3}v^{-1/6}C^0} \times \frac{1}{\Omega^{1/2}} + \frac{1}{nFP_mC^0} \quad \text{Équation II-4}$$

avec n : nombre d'électrons échangés, F : constante de Faraday, A : surface de l'électrode,  $D_s$  et  $C^0$  : coefficient de diffusion et concentration de la sonde électrochimique en solution,  $\nu$  : viscosité cinématique de la solution,  $\Omega$  : vitesse de rotation de l'électrode tournante,  $P_m$  : coefficient de perméabilité du film polymère vis-à-vis de la sonde électrochimique et  $\delta$  : épaisseur du film polymère.

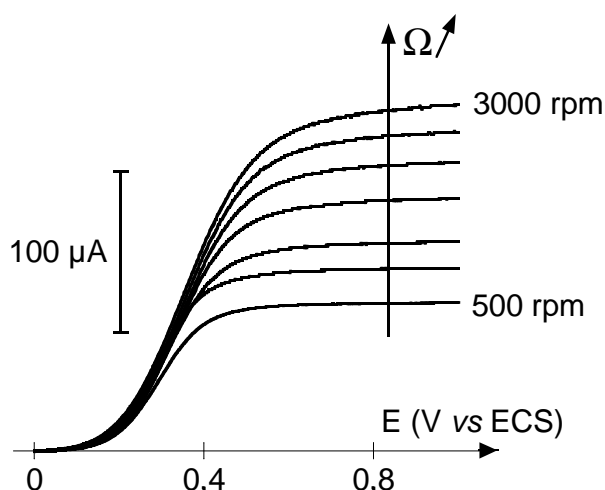
Cette équation est valable uniquement dans le cas d'une membrane polymère électroinactive pour que l'intensité du signal obtenu corresponde à la diffusion de la sonde rédox ajoutée en solution. Après l'électropolymérisation du pyrrole-NTA, nous avons donc commencé par détruire l'électroactivité du film polymère en le suroxydant par des balayages de potentiels entre 0 et 1,2 V vs Ag<sup>+</sup>/Ag jusqu'à disparition complète du signal électrochimique du poly(pyrrole-NTA).

On remarque que la perméabilité correspond au rapport :

$$P_m = \frac{KD_m}{\delta}$$

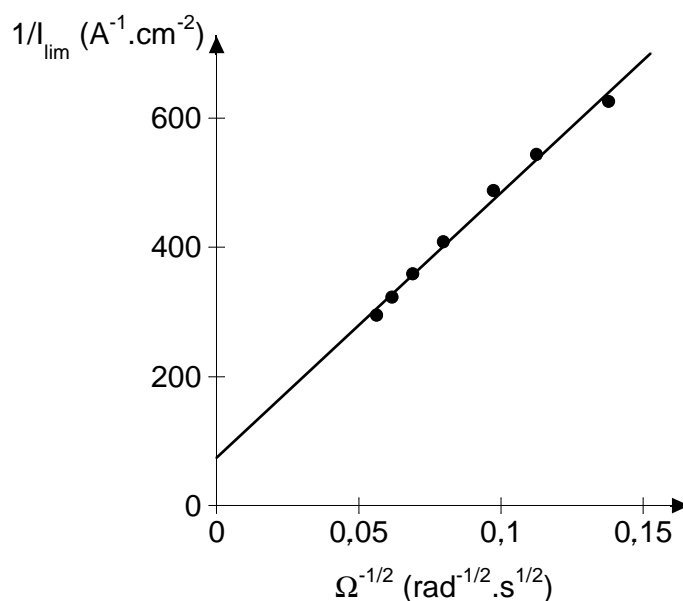
**Équation II-5**

Pour déterminer la perméabilité de notre polymère, nous avons donc enregistré l'évolution du signal de voltampérométrie stationnaire d'une électrode de carbone vitreux modifiée avec un film de poly(pyrrole-NTA) suroxydé dans une solution de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) contenant une sonde électrochimique. Etant donné la nature ionique du polymère, nous avons choisi d'utiliser une sonde rédox neutre sous ses formes oxydées et réduites, à savoir l'hydroquinone (10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup>). La **Figure II-5** montre les courbes obtenues à différentes vitesses de rotation ( $\Omega$ ) de l'électrode comprises entre 500 et 3000 rpm.



**Figure II-5 :** Voltampérogrammes de l'hydroquinone (10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup>) dans du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup>; pH = 7) sur une électrode tournante de carbone vitreux ( $\Phi = 3$  mm) modifiée par un film de poly(pyrrole-NTA) avec  $Q = 0,5$  mC. Vitesses de rotation de l'électrode :  $500 \leq \Omega \leq 3000$  rpm et  $v = 0,1$  V.s<sup>-1</sup>.

Le tracé de  $1/I_{lim}$  en fonction de  $\Omega^{-1/2}$  donne une droite (**Figure II-6**) dont l'ordonnée à l'origine dépend du coefficient de perméabilité  $P_m$ .



**Figure II-6 :** Courbe de Koutecky-Levich obtenue à partir des voltampérogrammes de l'hydroquinone ( $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>) dans du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup>; pH = 7) sur une électrode tournante de carbone vitreux ( $\varnothing = 3$  mm) modifiée par un film de poly(pyrrole-NTA).

Le film de poly(pyrrole-NTA) étudié ici présente une des meilleures perméabilités obtenues, à ce jour, pour un film de poly(pyrrole-N-alkyl substitué). Le **Tableau II-1** récapitule une partie des valeurs de la littérature pour différents polymères étudiés.

Polymère étudié	$P_m$ (cm.s <sup>-1</sup> )	Sonde électrochimique	Référence
Poly(pyrrole-NTA)	$10^{-1}$	Hydroquinone ( $10^{-3}$ mol.L <sup>-1</sup> )	ce travail
Poly(pyrrole-N-hydroxysuccinimide)	$7,7.10^{-3}$	[Ru <sup>III</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>3+</sup> ( $2.10^{-3}$ mol.L <sup>-1</sup> )	[24]
Poly(pyrrole-3'-siallyllactosyle)	$4,4.10^{-1}$	Hydroquinone ( $2.10^{-3}$ mol.L <sup>-1</sup> )	[25]
Poly(pyrrole-3'-siallyllactosyle)	1,89	[Ru <sup>III</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>3+</sup> ( $2.10^{-3}$ mol.L <sup>-1</sup> )	[25]
Copolymère à base de pyrrole-biotine et pyrrole-lactobioamide (1/1 molaire)	$2,38.10^{-2}$	[Ru <sup>III</sup> (NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>3+</sup> ( $2.10^{-3}$ mol.L <sup>-1</sup> )	[26]

**Tableau II-1 :** Valeurs de perméabilité obtenues sur des électrodes de carbone vitreux modifiées avec différents poly(pyrrole-N-alkyl substitués) électrogénérés ( $Q = 2,5$  mC.cm<sup>-2</sup>) en solutions aqueuses (0,1 mol.L<sup>-1</sup> LiClO<sub>4</sub> ou tampon phosphate).

On remarque que seul le poly(pyrrole-3'-siallyllactosyle) qui possède un haut caractère hydrophile (nombreuses fonction hydroxyles et charges positives) a une perméabilité supérieure au poly(pyrrole-NTA).

### **II.3. Capteur à ADN basé sur l'interaction NTA/Cu<sup>2+</sup>/Histidine : détection par spectroscopie d'impédance électrochimique.**

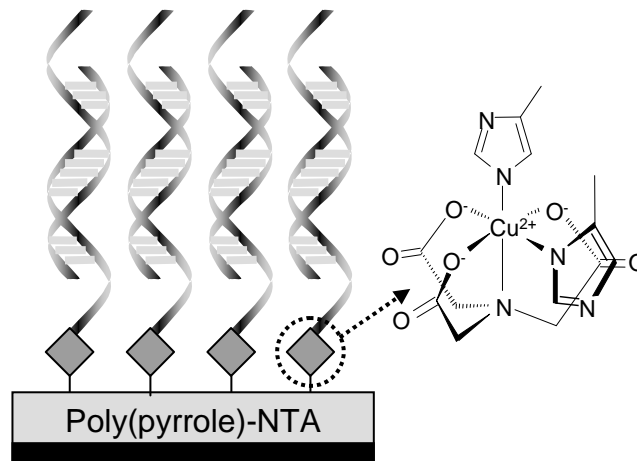
Le poly(pyrrole-NTA) a déjà été utilisé pour l'immobilisation de biomolécules telles que les protéines<sup>11, 17</sup> et nous avons examiné les possibilités d'application de ce polymère afin d'étendre ses compétences au développement de capteurs à ADN.

#### **II.3.1. Présentation du capteur et élaboration.**

En vue de détecter l'ADN du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), nous avons mis au point un capteur utilisant la spectroscopie d'impédance électrochimique comme technique de détection de la formation du duplex d'ADN (hybridation de deux brins complémentaires).

L'élaboration de ce capteur comporte plusieurs étapes dont la première consiste à électropolymériser le pyrrole-NTA sur la surface d'une électrode de carbone vitreux. Cette dernière est ensuite plongée dans une solution de Cu<sup>2+</sup> (10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup> dans du tampon acétate 0,1 mol.L<sup>-1</sup> à pH = 4,8) pendant 20 min puis rincée avec une solution de NaCl (0,5 mol.L<sup>-1</sup>) pendant 5 min sous vive agitation. L'ancrage du duplex d'ADN a été ensuite réalisé par incubations successives de 30 min de cette électrode dans une solution contenant l'oligonucléotide sonde (ADN<sub>sonde</sub>) comportant une queue polyhistidine (6 His) (0,05 mg.mL<sup>-1</sup> dans du tampon phosphate 0,1 mol.L<sup>-1</sup>; pH = 7) puis dans une solution contenant l'oligonucléotide cible complémentaire (ADN<sub>cible</sub>; 0,05 mg.mL<sup>-1</sup> dans du tampon phosphate 0,1 mol.L<sup>-1</sup>; pH = 7). L'électrode est rincée, sous agitation magnétique, dans du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup>; pH = 7) après chaque incubation pour éliminer toute biomolécule adsorbée de façon non-spécifique.

Une représentation schématique du biocapteur élaboré est présentée sur le **Schéma II-5**.



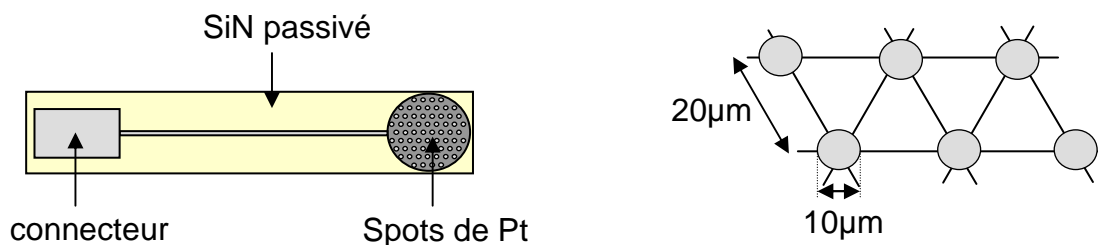
**Schéma II-5 :** Représentation schématique de l'architecture élaborée : poly(pyrrole-NTA)- $Cu^{2+}$ -ADN<sub>sonde</sub>-ADN<sub>cible</sub>.

### II.3.2. Caractérisations

L'architecture présentée a été caractérisée par plusieurs techniques offrant des méthodes de transduction du signal différentes. Nous avons étudié ce système grâce à la microscopie à fluorescence (détection optique), la microbalance à quartz (QCM, détection gravimétrique) et enfin, par ampérométrie (détection électrochimique).

#### II.3.2.a. Microscopie à fluorescence

Dans un premier temps, nous avons examiné la possibilité d'ancrer, de façon spécifique, l'oligonucléotide sonde histidinylé sur le film de poly(pyrrole-NTA). Afin de pouvoir réaliser une détection par microscopie à fluorescence, nous avons polymérisé le poly(pyrrole-NTA) sur des microélectrodes représentées sur le **Schéma II-6**.



**Schéma II-6 :** Représentation schématique de l'architecture des microélectrodes utilisées en microscopie à fluorescence.

Ces microélectrodes sont réalisées sur des wafers de silicium recouverts d'une fine couche de silice ( $\sim 0,8-1 \mu\text{m}$ ). Une fine couche de titane ( $\sim 50 \text{ nm}$ ) est ensuite déposée pour servir de couche d'accroche au platine ( $\sim 100-150 \text{ nm}$ ) qui est le matériau final d'électrode. La surface de l'électrode utilisée n'est pas un disque de platine plein mais un réseau de microélectrodes de  $10 \mu\text{m}$  de diamètre régulièrement espacées (**Schéma II-6**). Toute la surface du wafer est enfin passivée avec du nitrure de silicium (SiN) excepté le réseau de microélectrodes et le connecteur.

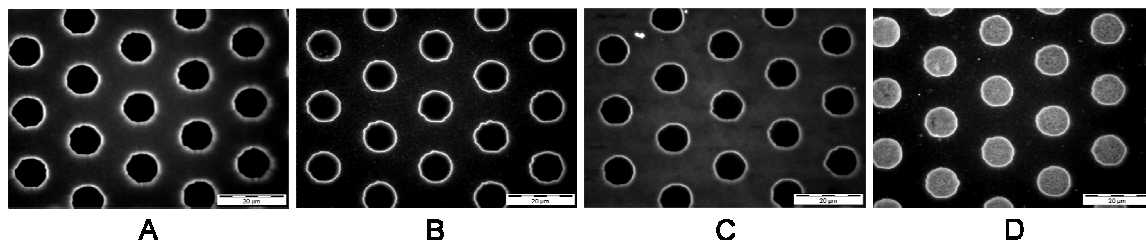
Afin d'obtenir un dépôt comparable à celui qui avait été réalisé sur les électrodes de platine de diamètre  $\varnothing = 5 \text{ mm}$ , nous avons contrôlé la charge électrique consommée au cours de l'électropolymérisation du pyrrole-NTA. Etant donné l'architecture complexe des microélectrodes, nous avons estimé que la surface des spots de platine représentait environ la moitié du disque dans lequel on observe ces derniers ; ainsi, nous avons limité la charge à  $Q = 20 \mu\text{C}$  ( $Q = 2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$ ). Ces microélectrodes modifiées avec du poly(pyrrole-NTA) ont été plongées dans une solution de  $\text{CuCl}_2$  ( $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  dans le tampon acétate  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 4,8$ ) pendant 20 min puis rincées successivement avec une solution  $\text{NaCl}$   $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  et une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) pendant 5 min chacune sous agitation. Elles ont ensuite été mises à incuber successivement dans des solutions de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) contenant l'ADN<sub>sonde</sub> histidinylé ( $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) puis un oligonucléotide cible complémentaire et biotinylé en 5' (B-ADN<sub>cible</sub> ;  $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) afin de pouvoir réaliser l'ancrage de l'avidine ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) fluorescente (marquage FITC) lors de la dernière incubation réalisée sur ces électrodes. Les électrodes ont été rincées dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) sous agitation magnétique après chaque incubation.

Nous avons choisi le fluorophore FITC (Fluorescéine Iso Thio Cyanate) car il est, de loin, le plus utilisé pour réaliser le marquage de protéines (telle que l'avidine) ou d'anticorps de nos jours. Il existe donc de nombreuses biomolécules marquées FITC disponibles dans le commerce. Il possède un fort rendement quantique (un photon absorbé sur deux va émettre un signal de fluorescence) et le maximum de sa longueur d'onde d'excitation se situe à  $495 \text{ nm}$  tandis que celui correspondant à sa longueur d'onde d'émission est à  $525 \text{ nm}$ .

Plusieurs expériences de contrôle ont été réalisées après chaque étape de l'élaboration de l'architecture afin de vérifier qu'il n'y avait pas d'interaction non-spécifique. Nous nous sommes d'abord assuré que l'avidine-FITC n'avait pas d'affinité ni avec le substrat de la



microélectrode ni avec le film de poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup> en laissant incuber celle-ci sur ces deux types de surfaces. Après incubation et rinçage (tampon phosphate 0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7 puis H<sub>2</sub>O distillée), on remarque qu'aucun signal de fluorescence n'est obtenu (**Figure II-7-A** et **B**, respectivement). La même procédure réalisée sur un wafer modifié avec les couches suivantes : poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup>/ADN<sub>sonde</sub> n'a pas permis d'observer la fluorescence non plus (**Figure II-7-C**). Effectivement, seule l'électrode comportant l'architecture complète poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup>/ADN<sub>sonde</sub>/B-ADN<sub>cible</sub> (**Figure II-7-D**) permet d'obtenir un signal en fluorescence. Ceci montre bien la spécificité de l'assemblage biomoléculaire réalisé et permet d'affirmer que l'avidine-FITC s'est bien ancrée par la biotine marquant l'oligonucléotide cible complémentaire.



**Figure II-7** : Clichés obtenus en microscopie à fluorescence après incubation avec de l'avidine fluorescente (FITC) sur une microélectrode : **A** - non modifiée, **B** - modifiée avec du poly(pyrrole-NTA) ( $\Gamma_{réel} = 1,5 \cdot 10^{-9}$  mol.L<sup>-1</sup>), **C** - après immobilisation de l'oligonucléotide-sonde (fonctionnalisé en 5' par une queue polyhistidine) sur le film polymère et **D** - après élaboration du capteur complet : poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup>/NH<sub>2</sub>-(His)<sub>6</sub>-ADN<sub>sonde</sub>/ADN<sub>cible</sub>-biotine. La barre d'échelle représente 20 µm.

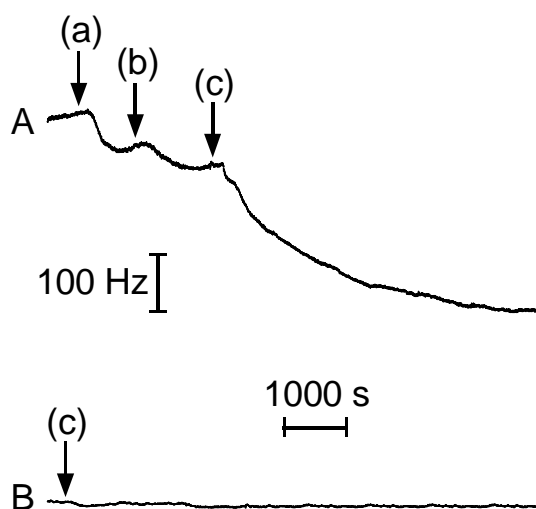
### II.3.2.b. Gravimétrie (QCM)

Afin de connaître la quantité de biomolécules immobilisées au cours de chaque étape, nous avons caractérisé le système grâce à la microbalance à quartz (QCM, principe et description de la technique en partie expérimentale). Cette technique est classiquement réalisée sur des disques de quartz dont chaque face est recouverte d'une fine électrode en or ( $\varnothing = 5$  mm). Ces quartz ont une fréquence de résonance de 9 MHz et on se place sur la troisième harmonique du signal (27 MHz) pour enregistrer les données et ainsi avoir une amplitude du signal maximale. Une adsorption à la surface du quartz provoque une diminution de la fréquence de vibration de ce dernier et correspond à une variation de masse grâce à l'équation de Sauerbrey<sup>27</sup> :

$$\Delta F = \frac{2f_0^2}{nA\mu^{1/2}\rho^{1/2}} \Delta m$$

### Équation II-6

L'électropolymérisation du pyrrole-NTA est donc réalisée sur une des deux faces (électrodes) du quartz et celui-ci est ensuite incubé dans une solution de  $\text{Cu}^{2+}$  ( $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  dans du tampon acétate  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 4,8$ ). Après un rinçage avec de l'eau distillée, ce quartz modifié est ensuite placé dans la cellule de la QCM ( $V_{\text{cellule}} = 50\mu\text{L}$  ; débit utilisé :  $50 \mu\text{L.min}^{-1}$ ). Toutes les solutions contenant les biomolécules ont été préparées dans un tampon phosphate salin (PBS :  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$  ; NaCl  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ) pour les mesures réalisées en QCM. Cette même solution est utilisée pour réaliser les rinçages entre chaque injection. La **Figure II-8-A** présente les variations de la fréquence de vibration du quartz modifié lors des injections successives d'une solution contenant l'oligonucléotide sonde histidinylé ( $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), l'oligonucléotide cible biotinylé ( $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) et l'avidine ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ).



**Figure II-8** : Variation de la fréquence d'un quartz modifié par du poly(pyrrole-NTA) complexant des ions  $\text{Cu}^{2+}$  en fonction du temps : **A** - lors de l'ajout de (a) une solution contenant l'oligonucléotide sonde histidinylé ( $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), (b) une solution contenant l'oligonucléotide cible biotinylé ( $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) et (c) une solution d'avidine ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) ; **B** - lors de l'ajout (c) d'une solution d'avidine ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Toutes les solutions ont été préparées dans un tampon phosphate salin (PBS :  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$   $\text{pH} = 7$  ; NaCl  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ) et circulent dans la cellule de la QCM à un débit de  $50 \mu\text{L.min}^{-1}$ .

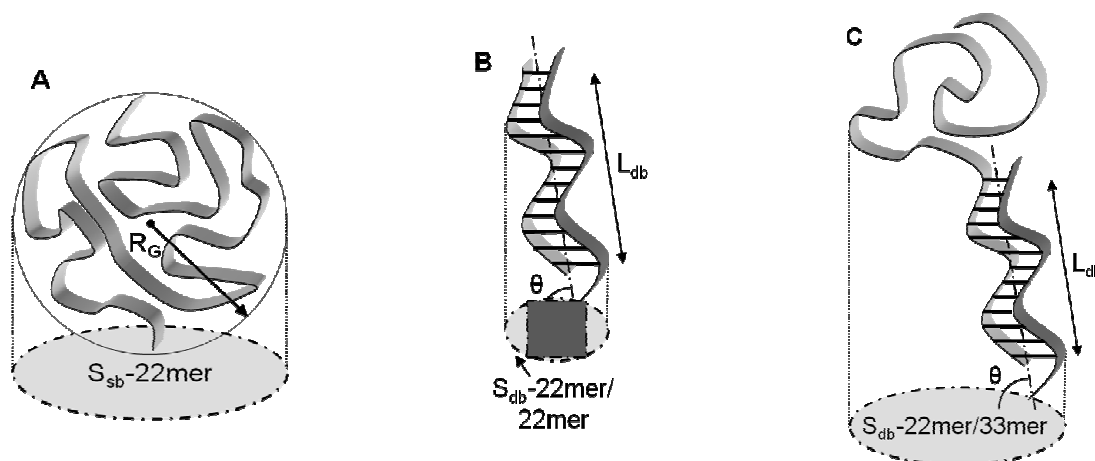
Les valeurs des variations de fréquence de vibration du quartz sont récapitulées dans le **Tableau II-2** ainsi que les valeurs massiques, molaires et le nombre de brins d'ADN pour chaque composé. On peut noter que seulement 45 % des brins de l'ADN<sub>sonde</sub> immobilisés lors de la première injection vont s'hybrider ; ceci est probablement dû à une gêne stérique qui

empêche les brins restants de s'hybrider. Enfin, l'injection d'avidine provoque une forte variation de la fréquence de vibration du quartz et une fixation quantitative de l'avidine sur les biotines présentées par les brins de l'ADN<sub>cible</sub> biotinylé. Ces résultats confirment l'ancrage spécifique de chaque couche lors de l'élaboration de l'architecture et permet de quantifier les résultats obtenus par microscopie à fluorescence. En parallèle, nous avons injecté une solution d'avidine (0,5 mg.mL<sup>-1</sup> dans le tampon phosphate salin exposé précédemment) directement sur le film de poly(pyrrole-NTA)-Cu<sup>2+</sup> (**Figure II-8-B**) et aucune variation de fréquence n'a pu être observée ; ceci corrobore les résultats obtenus en fluorescence quant à l'absence d'interaction entre les motifs NTA-Cu<sup>2+</sup> du polymère et l'avidine.

Composé	$\Delta F$ (Hz)	m (ng)	n (mol)	nombre de brins
ADN <sub>sonde</sub> histidinylé	71	26	$3,3 \cdot 10^{-12}$	$2 \cdot 10^{12}$
ADN <sub>cible</sub> biotinylé	44	16	$1,5 \cdot 10^{-12}$	$9 \cdot 10^{11}$
avidine	276	100	$1,5 \cdot 10^{-12}$	

**Tableau II-2 :** Valeurs des variations de fréquence observées lors de l'injection des solutions tampons phosphate salin (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7 ; NaCl 0,5 mol.L<sup>-1</sup>) contenant l'ADN<sub>sonde</sub>, l'ADN<sub>cible</sub> biotinylé ou l'avidine.

Pour profiter complètement des informations obtenues ici, nous avons voulu quantifier la part de la surface occupée par les brins d'ADN<sub>sonde</sub> dans un premier temps mais aussi l'angle que forme la double hélice avec la surface après l'hybridation. Ces calculs sont basés sur ceux développés par Piro et al.<sup>28</sup> en 2007.



**Schéma II-7 :** Représentations schématiques d'ADN immobilisés sur une surface, A - un simple brin (sb) d'ADN, B - un duplex d'ADN (double brin : db) complètement hybridé et C - un duplex d'ADN (db) dont une partie de la cible n'est pas hybridée avec la sonde. Les parties grisées représentent la surface qu'occupe l'ADN sur le support (l'électrode dans notre cas).

Le volume occupé par un brin d'ADN<sub>sonde</sub> se définit à l'aide du rayon de giration noté  $R_G$  représenté sur le **Schéma II-7-A** et est défini comme suit :

$$V_{sb} = \frac{4}{3} \pi R_G^3 \quad \text{Équation II-7}$$

Pour connaître l'encombrement du simple brin sur l'électrode, ce n'est pas le volume de ce dernier qui nous intéresse mais plutôt la surface occupée par ce dernier qui correspond alors à la surface de la projection de la sphère de rayon  $R_G$  :

$$S_{sb} = \pi R_G^2 \quad \text{Équation II-8}$$

La surface occupée par un brin d'ADN correspond alors à  $S_{sb} = 9,87 \text{ nm}^2$  pour un rayon de giration  $R_G = 1,77 \text{ nm}$  défini grâce à la relation suivante :

$$R_G = \left( \frac{pL}{3} \right)^{1/2} \quad \text{Équation II-9}$$

$L$  représente la longueur du brin d'ADN et  $p$  sa longueur de persistance.

Les expériences de QCM ayant permis de déterminer le nombre de brins immobilisés sur la surface, nous pouvons alors déterminer que 94 % de la surface du quartz est modifiée avec des brins d'ADN<sub>sonde</sub>. Ceci permet de démontrer que la première couche d'ADN déposée sur l'électrode est bien compacte mais aussi la bonne disponibilité des têtes NTA du polymère.

Lors de l'hybridation avec un ADN complémentaire, l'ADN<sub>sonde</sub> qui se trouvait sous forme d'une « pelote » change de configuration. Si l'ADN<sub>cible</sub> comporte le même nombre de bases que l'ADN<sub>sonde</sub>, la double hélice peut alors être assimilée à un cylindre formant un angle  $\theta$  avec la surface (**Schéma II-7-B**). Si l'ADN<sub>cible</sub> possède plus de bases que l'ADN<sub>sonde</sub>, nous sommes alors dans un cas hybride entre les deux présentés auparavant comme représenté sur le **Schéma II-7-C**. Dans le cas où les deux brins sont totalement hybridés, il faut noter que la surface peut être divisée en deux parties ; comme représenté sur le **Schéma II-7-B**, la surface peut être assimilée à un rectangle (partie la plus foncée) auquel il faut ajouter deux demi-cercles (parties les plus claires) de diamètre  $d$ . La longueur du rectangle est définie par ( $L_{db} \times$

cos  $\theta$ ) et sa largeur vaut  $d$ .  $L_{db}$  et  $d$  sont la longueur et le diamètre du double brin respectivement. Dans la double hélice,  $d = 2$  nm et la distance entre deux bases vaut :  $l = 0,34$  nm<sup>29</sup>. Le calcul de la surface correspondant à ce système totalement hybridé est alors :

$$S_{db-n/n} = \frac{d^2}{4} \pi + (L_{db} - 0,34) \times d \times \cos \theta \quad \text{Équation II-10}$$

Dans notre cas, les deux brins ne possèdent pas le même nombre de bases et il faut donc appliquer un terme correctif à cette équation prenant en compte la partie non hybridée du duplex d'ADN. Cette partie se calcule selon l'Équation II-8 définie précédemment pour un ADN simple brin. L'équation globale du système décrit sur le Schéma II-7-C est alors :

$$S_{db-n/m} = \frac{d^2}{4} \pi + (L_{db-n/n} - 0,34) \times d \times \cos \theta + \pi R_{G(m-n)}^2 \quad \text{Équation II-11}$$

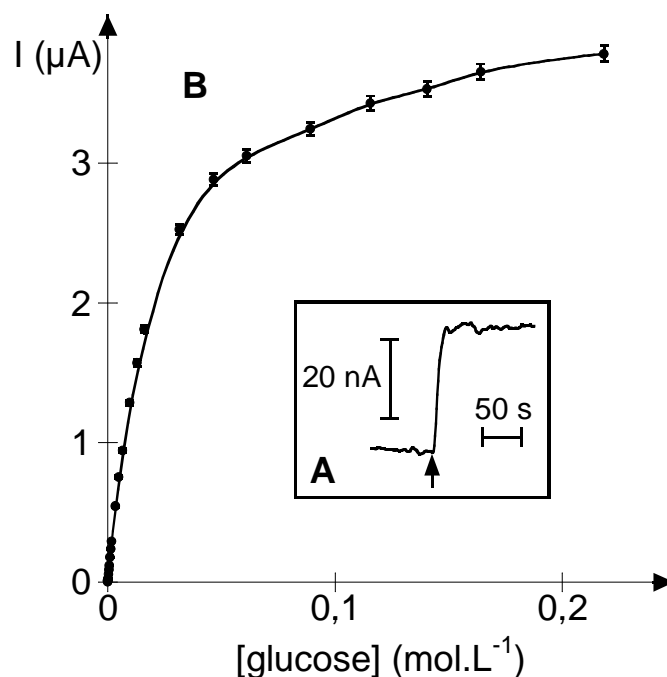
Etant donné que nous connaissons le pourcentage d'hybridation, nous pouvons déterminer le nombre de brins sous les deux formes (simple et double brin) mais aussi la surface occupée par des simples brins ( $S_1 = 1,1 \cdot 10^{13}$  nm<sup>2</sup>) et celle restant pour les doubles brins ( $S_2 = 8,7 \cdot 10^{12}$  nm<sup>2</sup>) avec  $S_{\text{quartz}} = S_1 + S_2$ . Ces relations permettent alors de déterminer l'angle  $\theta$  que forme le duplex d'ADN avec la surface :  $\theta = 79,5^\circ$ . La valeur obtenue permet de connaître l'orientation des brins d'ADN par rapport à la surface ; étant donné la compacité de la première couche d'ADN (94 % de recouvrement), il n'est pas étonnant que les duplex d'ADN soient presque perpendiculaires à la surface du quartz.

### II.3.2.c. Ampérométrie

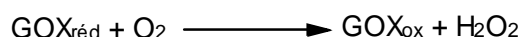
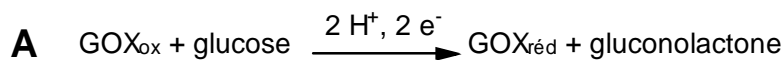
La dernière technique de caractérisation utilisée pour ce système est la chronoampérométrie à potentiel constant. Pour cela, nous avons réalisé un marquage enzymatique du duplex d'ADN avec la glucose oxydase en raison de sa large utilisation dans le domaine des biocapteurs.

Afin de pouvoir réaliser ce marquage enzymatique, nous avons utilisé l'ADN<sub>cible</sub> biotinylé comme pour les caractérisations précédentes. Une électrode de platine modifiée par un film de poly(pyrrole-NTA)-Cu<sup>2+</sup> a donc été successivement incubée dans des solutions tampons phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) contenant l'ADN<sub>sonde</sub> histidinylé (0,05 mg.mL<sup>-1</sup>),

l'oligonucléotide-cible complémentaire et biotinylé en 5' (B-ADN<sub>cible</sub> ; 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>), l'avidine (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) et enfin la glucose oxydase biotinylée (B-GOX ; 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>). Les électrodes ont été rincées dans du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) sous agitation magnétique après chaque incubation. Les performances de cette électrode ont été suivies par ampérométrie à E = 0,6 V vs ECS dans du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7 ; T = 25 °C).



**Figure II-9 :** **A** - Réponse ampérométrique à une augmentation de concentration en glucose de 1,6 mmol.L<sup>-1</sup> dans du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH = 7, T = 25 °C) à E = 0,6 V vs ECS obtenue avec une électrode de platine (Ø = 5 mm) modifiée avec du poly(pyrrole-NTA)-Cu<sup>2+</sup> et incubée successivement dans des solutions de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH = 7) contenant l'oligonucléotide sonde histidinylé (0,05 mg.mL<sup>-1</sup>), l'oligonucléotide cible biotinylé (0,05 mg.mL<sup>-1</sup>), l'avidine (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) puis la glucose oxydase biotinylée (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>). **B** - Courbe d'étalonnage du glucose obtenue avec l'électrode modifiée dans du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH = 7, T = 25 °C).



**Schéma II-8 :** **A** - activité enzymatique de la glucose oxydase (GOX) vis-à-vis du glucose permettant de générer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **B** - Détection électrochimique de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur électrode de platine à E = 0,6 V vs ECS.

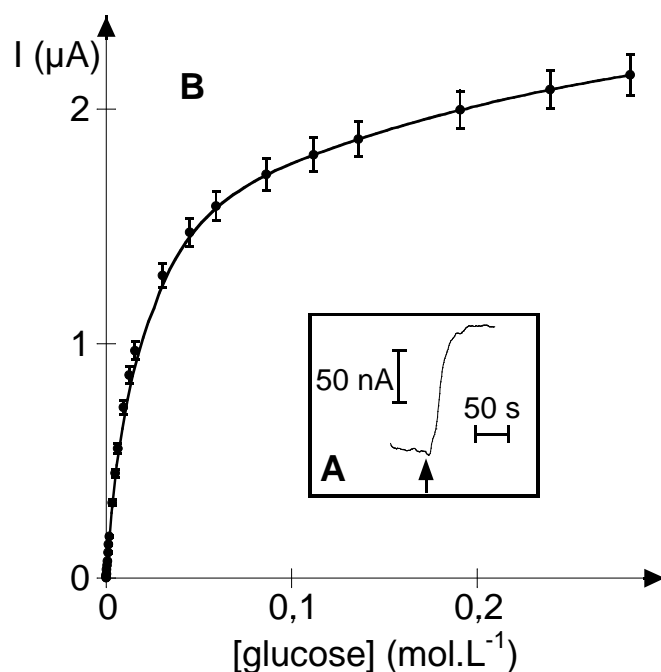
Le signal enregistré à l'électrode lors des injections de glucose correspond à l'oxydation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit lors de la réaction enzymatique entre la glucose oxydase, le glucose et le dioxygène (**Schéma II-8**). Cette réponse enzymatique a été suivie au cours du temps lors d'injections successives de glucose. La **Figure II-9-A** présente l'augmentation du courant obtenu à l'électrode modifiée pour une injection de glucose (200 µL à 10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup>) et permet de déterminer le temps de réponse de l'électrode (10 s). La **Figure II-9-B** présente la courbe d'étalonnage résultant du suivi de la réponse ampérométrique de l'électrode en fonction de la concentration en glucose. Cette courbe a l'allure typique des courbes obtenues pour des biocapteurs ampérométriques à glucose : la première partie de la courbe (faibles concentrations en glucose) augmente linéairement tandis que dans la seconde partie l'intensité est constante et correspond à la vitesse maximum d'oxydation du glucose par l'enzyme.

La première partie de cette courbe est linéaire sur une gamme de concentrations en glucose comprises entre 7.10<sup>-5</sup> et 6,3.10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup> et la mesure de la pente de cette droite permet de déterminer la sensibilité de l'électrode (0,91 mA.mol<sup>-1</sup>.L.cm<sup>-2</sup>). La seconde partie de ces courbes (plateau) permet de définir J<sub>max</sub> (21,8 µA.cm<sup>-2</sup>) ; cette valeur étant proportionnelle à la quantité d'enzyme immobilisée, elle va rendre compte de la compacité de la couche d'enzyme immobilisée et donc de la qualité de la technique d'immobilisation utilisée. La constante apparente de Michaelis-Menten K<sub>M</sub><sup>app</sup>, déterminée grâce à la linéarisation de Lineweaver-Burk<sup>30</sup>, est égale à K<sub>M</sub><sup>app</sup> = 13,2.10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0,9936).

Afin de voir l'éventuel effet de la double hélice d'ADN sur la réponse ampérométrique, nous avons réalisé une expérience en parallèle dans laquelle une électrode de platine modifiée par un film de poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup> a directement été incubée dans une solution de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) contenant la glucose oxydase marquée avec des histidines (His-GOX ; 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>). Après rinçage de cette électrode dans du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) sous vive agitation, les performances de cette électrode ont été suivies par ampérométrie à E = 0,6 V vs ECS dans du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7 ; T = 25 °C) lors d'ajouts successifs d'une solution de glucose. Le temps de réponse de l'électrode (10 s) déterminé lors d'une injection de glucose (200 µL à 10<sup>-1</sup> mol.L<sup>-1</sup>) est présenté sur la **Figure II-10-A**. La courbe d'étalonnage résultant de la variation de l'intensité du courant anodique en fonction de la concentration en glucose est présentée sur la **Figure**

**II-10-B.** Cette courbe présente une partie linéaire (de  $7.10^{-5}$  à  $6,3.10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>) et tend ensuite vers une asymptote horizontale pour les fortes concentrations en glucose.

La sensibilité de cette électrode, déterminée par la mesure de la pente de la partie linéaire de la courbe, est de  $0,5 \text{ mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-2}$  tandis que le courant de saturation (plateau) vaut :  $J_{\text{max}} = 11,5 \text{ } \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ . La constante apparente de Michaelis-Menten  $K_M^{\text{app}}$ , déterminée grâce à la linéarisation de Lineweaver-Burk, vaut  $K_M^{\text{app}} = 37,6.10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9963$ ).



**Figure II-10 :** **A** - Réponse ampérométrique à une augmentation de concentration en glucose de  $1,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ } ^\circ\text{C}$ ) à  $E = 0,6 \text{ V}$  vs ECS obtenues avec une électrode de platine ( $\text{Ø} = 5 \text{ mm}$ ) modifiée avec du poly(pyrrole-NTA)- $\text{Cu}^{2+}$  et incubée dans des solutions de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) contenant la glucose oxydase histidinylée ( $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). **B** - Courbe d'étalonnage du glucose obtenue avec l'électrode modifiée dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ } ^\circ\text{C}$ ).

Les données relatives à ces deux systèmes sont récapitulées dans le **Tableau II-3**. La troisième architecture présentée dans le **Tableau II-3** représente l'immobilisation de la glucose oxydase biotinylée (B-GOX) sur un film de poly(pyrrole-biotine) grâce à des ponts avidine qui a été précédemment étudiée au laboratoire<sup>31</sup>.

Afin de pouvoir effectuer des comparaisons entre les trois systèmes, il faut tout d'abord noter que toutes les enzymes utilisées n'ont pas la même activité. Nous avons donc rapporté à



la valeur de l'activité enzymatique les paramètres influencés par celle-ci comme le courant de saturation et la sensibilité de chaque système.

Système	Ppy-NTA/Cu <sup>2+</sup> / His-GOX	Ppy-NTA/Cu <sup>2+</sup> / ADN <sub>duplex</sub> /avidine/B-GOX	Ppy-biotine/ avidine/B-GOX
Référence	ce travail	ce travail	[31]
J <sub>max</sub> (μA.cm <sup>-2</sup> )	11,5 (0,08)	21,8 (0,1)	1 (0,009)
sensibilité (mA.mol <sup>-1</sup> .L.cm <sup>-2</sup> )	0,5 (0,003)	0,91 (0,004)	0,15 (0,001)
seuil de détection (mol.L <sup>-1</sup> )	7.10 <sup>-5</sup>	3,7.10 <sup>-5</sup>	non déterminé
gamme de linéarité (mol.L <sup>-1</sup> )	7.10 <sup>-5</sup> – 6,3.10 <sup>-3</sup>	3,7.10 <sup>-5</sup> – 1,6.10 <sup>-2</sup>	non déterminé
K <sub>M</sub> apparente (mol.L <sup>-1</sup> )	37,6.10 <sup>-3</sup>	13,2.10 <sup>-3</sup>	non déterminé
activité de l'enzyme en solution (U.mg <sup>-1</sup> )	150	220	110

**Tableau II-3 :** Comparatif des valeurs obtenues sur des électrodes modifiées avec différents poly(pyrroles) (Ppy) et la glucose oxydase (GOX). Les constantes apparentes de Michaelis-Menten ont été obtenues grâce au modèle cinétique de Lineweaver-Burk et les valeurs entre parenthèses ont été rapportées à l'activité enzymatique en solution.

Si on calcule le rapport {sensibilité/activité enzymatique}, la sensibilité de notre architecture contenant le duplex d'ADN est bien plus grande que celle correspondant à l'électrode modifiée avec le poly(pyrrole-biotine) mais similaire à celle obtenue avec le système poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup>/His-GOX. Ceci est probablement dû à la faible perméabilité du film de poly(pyrrole-biotine) comparée à celle du poly(pyrrole-NTA).

La seconde partie de ces courbes (plateau) permet de définir J<sub>max</sub>. Le rapport {J<sub>max</sub>/activité enzymatique} est bien plus grande pour les électrodes modifiées avec du poly(pyrrole-NTA) que pour celle élaborée avec du poly(pyrrole-biotine). Même si cette valeur est proportionnelle à la quantité d'enzyme immobilisée, il est difficile de comparer ces deux systèmes étant donnée la forte différence de perméabilité des deux polymères. Cependant, cela permet de démontrer la formation d'une couche compacte d'enzyme à la surface de l'électrode modifiée au préalable par le film poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup>/duplex

d'ADN/avidine. On peut remarquer que cette valeur est un peu plus faible lorsque l'enzyme est directement ancrée à la surface du polymère ; il est possible que la double hélice d'ADN permette d'augmenter la quantité d'enzymes immobilisées en exposant plus de points d'ancrage (biotines) vers la solution.

La constante apparente de Michaelis-Menten ( $K_M^{app}$ ) obtenue avec l'architecture poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup>/His-GOX ( $37,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  à 25 °C) est du même ordre de grandeur que celle obtenue lorsque la glucose oxydase est en solution<sup>32</sup> ( $33 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  à 25 °C). Le second système à base de poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup>/duplex d'ADN/avidine/B-GOX présente une valeur ( $13,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  à 25 °C) environ deux fois plus faible que celle de l'enzyme en solution. Cependant, dans ce cas, il est très hasardeux de comparer ces valeurs car l'enzyme est beaucoup plus éloignée de l'électrode que dans les deux autres cas ; il se peut alors que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enzymatiquement généré diffuse en plus grande quantité vers la solution que dans le cas où la glucose oxydase est immobilisée à proximité directe de l'électrode. Dans la majorité des biocapteurs élaborés, la constante apparente de Michaelis-Menten apparaît plus grande que la valeur du  $K_M$  de l'enzyme en solution<sup>33</sup> ; cette augmentation est systématiquement attribuée à des contraintes diffusionnelles par rapport au glucose dues aux stratégies d'immobilisation utilisées. En effet, il apparaît alors un gradient de concentration dans le film polymère qui se traduit globalement par une augmentation de la valeur du  $K_M^{app}$ . Ces raisonnements ne tiennent pas compte du rôle de l'oxygène et de la régénération de l'enzyme lors de l'oxydation électrochimique de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En effet, les travaux de Bartlett et Whitaker<sup>34</sup> ont montré que la réaction enzymatique peut aussi être limitée par la régénération de la glucose oxydase par le dioxygène. Ce phénomène peut intervenir à deux niveaux : la limitation du courant catalytique mais aussi la cinétique réactionnelle dans le cas de l'immobilisation de cette enzyme grâce à des polymères. Des travaux effectués antérieurement au laboratoire<sup>35</sup> ont permis d'attribuer cette diminution dans la valeur du  $K_M^{app}$  à la régénération de l'enzyme par O<sub>2</sub> qui devient alors l'étape limitante du mécanisme pour de fortes concentrations en substrat. Puisque nous avons observé que la présence du duplex d'ADN sur l'électrode permettait d'immobiliser plus d'enzymes, la limitation due à l'O<sub>2</sub> va donc être plus importante dans ce cas étant donné que la concentration en O<sub>2</sub> dissout en solution est constante pour toutes les expériences.

Enfin, les seuils de détection des deux systèmes à base de poly(pyrrole-NTA) sont elles aussi du même ordre de grandeur, elles ont été déterminées pour un rapport signal/bruit > 3.

Les temps de réponse des deux électrodes étant identiques (10 s), on peut déduire que la couche additionnelle de duplex d'ADN ne gêne pas la diffusion de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### II.3.3. Application à la détection de l'ADN-cible par impédance

La spectroscopie d'impédance électrochimique a été choisie pour réaliser la détection de l'ADN<sub>cible</sub> complémentaire. Contrairement aux techniques utilisées pour réaliser les caractérisations de ce système, elle permet de réaliser une détection sans marquage de la cible ; nous avons donc pu utiliser un ADN<sub>cible</sub> non marqué (pour les caractérisations, la cible était biotinylée).

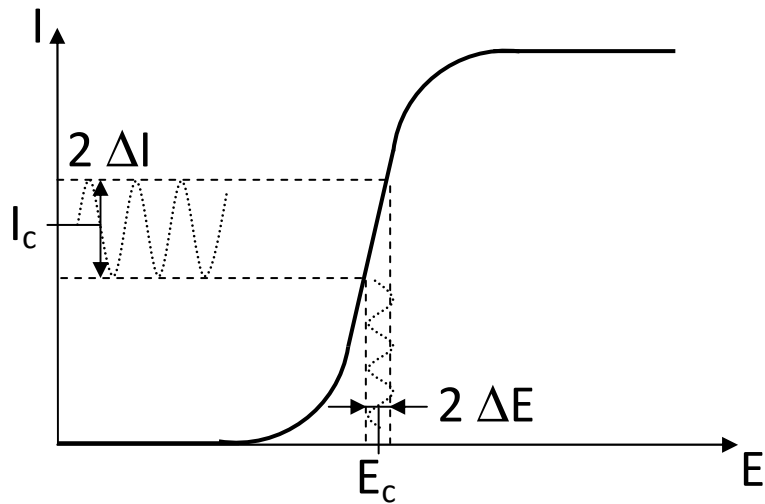
En spectroscopie d'impédance électrique, le système étudié doit être linéaire ; il faut interpréter cela par l'obtention d'une réponse linéaire en courant pour une faible perturbation de potentiel (mode potentiostatique) ou l'obtention d'une réponse linéaire en potentiel pour une faible perturbation en courant imposé (mode galvanostatique). Malheureusement, en électrochimie, les systèmes ne sont jamais linéaires. On choisit alors une perturbation du signal assez faible pour rester sur une partie linéaire de la courbe correspondant au système électrochimique. Par conséquent, si l'on fait varier de façon sinusoïdale, à différentes fréquences, le potentiel autour d'une valeur constante E<sub>c</sub> avec une amplitude ΔE faible, la réponse en courant suivra à la même fréquence la courbe stationnaire de façon à ce que le courant soit alors lui aussi sinusoïdal autour d'une valeur de courant constante I<sub>c</sub> avec une amplitude ΔI qui reflète la pente de la courbe stationnaire (**Schéma II-9**). Cette méthode permet d'obtenir des informations sur les étapes élémentaires constituant le processus électrochimique global. L'impédance électrique Z(ω) est définie comme le rapport entre la tension sinusoïdale  $E(\omega) = E \times \exp(j\omega t)$  appliquée au système et le courant résultant  $I(\omega) = I \times \exp[j(\omega t + \phi)]$  de manière que :

$$Z(\omega) = \frac{E}{I} \times \exp(-j\phi) = |Z(\omega)| \times \exp(j\phi) \quad \text{Équation II-12}$$

Soit, en coordonnées cartésiennes :

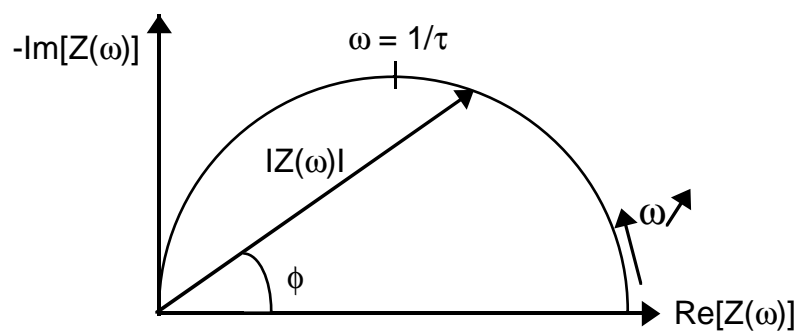
$$Z(\omega) = \text{Re}[Z(\omega)] + j \text{Im}[Z(\omega)] \quad \text{Équation II-13}$$

avec  $j$  : nombre imaginaire ( $j = \sqrt{-1}$ ),  $\omega = 2\pi f$  ( $f$  étant la fréquence),  $\text{Re}[Z(\omega)]$  et  $\text{Im}[Z(\omega)]$  : parties réelle et imaginaire de  $Z(\omega)$  respectivement.



**Schéma II-9 :** Principe de la spectroscopie d'impédance électrochimique.

En impédance électrochimique, les mesures sont représentées dans le plan de Nyquist des électrochimistes : il s'agit de tracer  $-\text{Im}[Z(\omega)]$  en fonction de  $\text{Re}[Z(\omega)]$ . Chaque point du diagramme représente alors les valeurs des composantes réelles et imaginaires de l'impédance pour une fréquence donnée et correspond aussi à l'extrémité du vecteur d'impédance de module  $|Z(\omega)|$  et d'angle  $\phi$  (**Schéma II-10**).



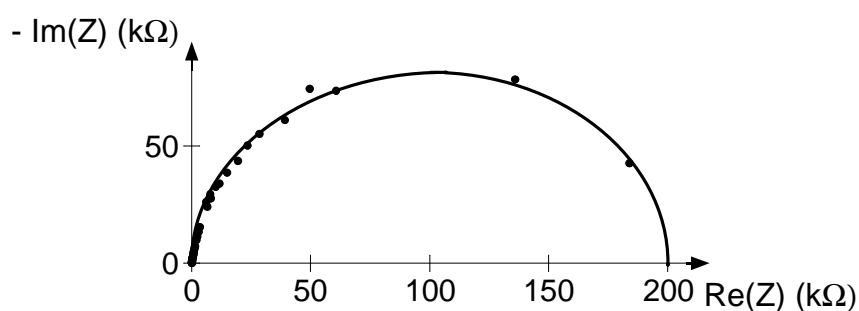
**Schéma II-10 :** Représentation de l'impédance électrochimique dans le plan complexe de Nyquist.

### II.3.3.a. Choix de la sonde électrochimique

L'impédance électrochimique peut être réalisée avec ou sans sonde électrochimique en solution. En absence de cette dernière, on observe le transfert des espèces ioniques seulement

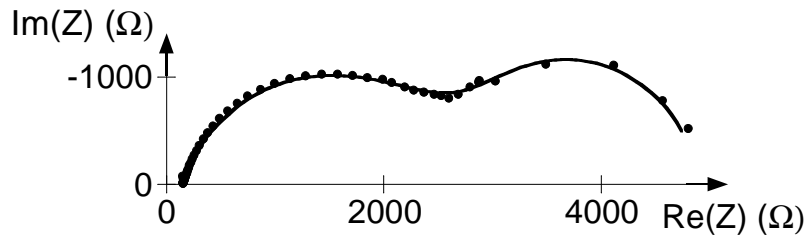
tandis qu'en présence d'une sonde, on peut observer le transport d'électrons associée à la réaction d'oxydation ou de réduction (selon le potentiel  $E_c$  choisi).

Les sondes rédox classiques utilisées sont le couple  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$  ou encore le couple  $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_6]^{3+}/[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ . Nous avons donc enregistré un premier spectre d'impédance en présence du couple ferri/ferrocyanure ( $4.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  dans le tampon phosphate  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$  ;  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) avec une électrode modifiée par un film poly(pyrrole-NTA)- $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{ADN}_{\text{sonde}}$  (**Figure II-11**). La courbe obtenue présente une résistance énorme ( $\sim 200 \text{ k}\Omega$ ). Le polymère étant chargé négativement, le choix d'une sonde chargée, elle aussi, négativement n'était pas adéquat en raison des phénomènes de répulsion électrostatiques empêchant le transfert d'électrons entre la sonde électrochimique et l'électrode recouverte de poly(pyrrole-NTA).



**Figure II-11** : Spectre d'impédance réalisé avec une électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ) modifiée par un film de poly(pyrrole-NTA)- $\text{Cu}^{2+}$  et incubée avec une solution d' $\text{ADN}_{\text{sonde}}$  histidinylé ( $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le tampon phosphate  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$   $\text{pH} = 7$ ). La sonde électrochimique utilisée est le couple ferri/ferrocyanure ( $4.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  dans le tampon phosphate  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$  ;  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Vitesse de rotation de l'électrode :  $\Omega = 500 \text{ rpm}$ , gamme de fréquences :  $0,1 \text{ Hz}$  à  $500 \text{ kHz}$ ,  $E_c = \text{OCP}$  mesuré et  $\Delta E = 5 \text{ mV rms}$ .

Notre choix s'est alors naturellement porté sur une sonde électrochimique neutre sous ses formes oxydée et réduite : l'hydroquinone. Cette sonde rédox avait déjà été employée pour les mesures de perméabilité (§ II.2.3.). Les mesures ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour le couple ferri/ferrocyanure en présence d'hydroquinone ( $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  dans le tampon phosphate  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$  ;  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Le diagramme obtenu (**Figure II-12**) présente des résistances beaucoup plus faibles ( $R < 5 \text{ k}\Omega$ ) mais aussi une allure bien différente. Afin de pouvoir modéliser cette courbe, il faut maintenant choisir le circuit électrique équivalent modèle adapté à ce système.



**Figure II-12 :** Spectre d'impédance réalisé avec une électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3$  mm) modifiée par un film de poly(pyrrole-NTA)- $\text{Cu}^{2+}$  et incubée avec une solution d'ADN<sub>sonde</sub> histidinylé ( $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le tampon phosphate  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pH = 7). La sonde électrochimique utilisée est l'hydroquinone ( $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  dans le tampon phosphate  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ; pH = 7 ;  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Vitesse de rotation de l'électrode :  $\Omega = 500 \text{ rpm}$ , gamme de fréquences :  $0,1 \text{ Hz}$  à  $500 \text{ kHz}$ ,  $E_c = 0,4 \text{ V vs ECS}$  et  $\Delta E = 5 \text{ mV rms}$ .

### II.3.3.b. Choix du circuit électrique équivalent modèle

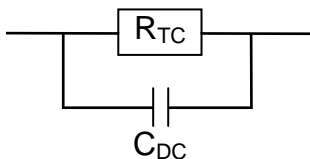
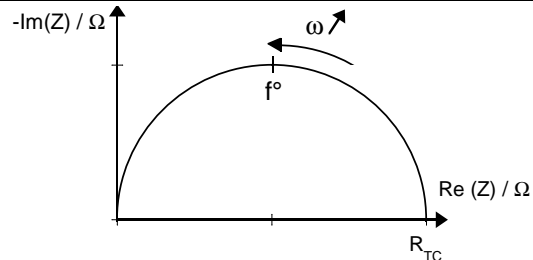
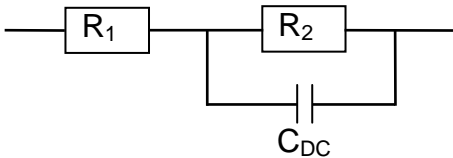
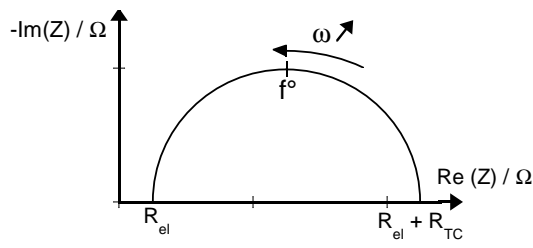
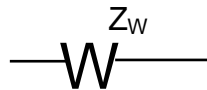
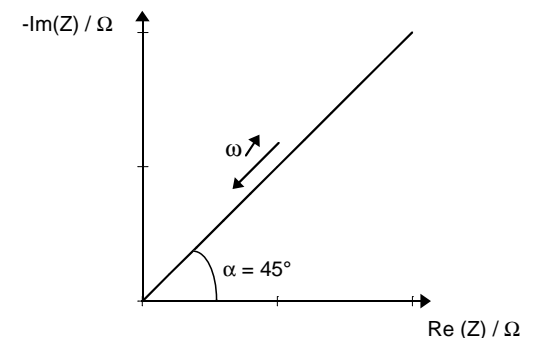
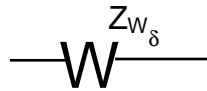
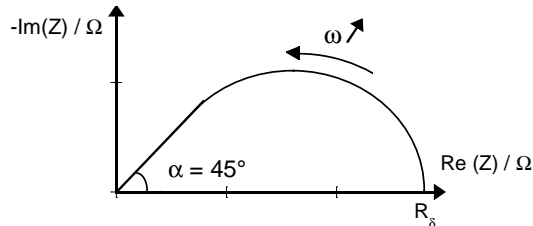
#### II.3.3.b. $\alpha$ . Circuits électriques élémentaires<sup>36, 37, 38</sup>

Les différents processus se déroulant à l'interface électrode/électrolyte peuvent être modélisés par la construction d'un circuit électrique équivalent. Chacun des composants utilisés, branchés en série ou en parallèle, représente un phénomène physique particulier. Ces modèles sont ensuite utilisés pour ajuster les diagrammes expérimentaux afin d'extraire les paramètres nécessaires à la compréhension du système étudié.

La mesure d'impédance électrochimique permet la séparation des courants faradique et capacitif. Dans le modèle électrique le plus simple où la cinétique électrochimique est due au seul transfert d'électron à l'interface, la partie faradique de l'impédance est modélisée par une résistance de transfert de charge,  $R_{TC}$  et la partie capacitive par un condensateur (capacitance) dû à la double couche électrochimique,  $C_{DC}$ . Les deux composantes (résistance de transfert de charge et capacitance de double couche) sont en parallèle. Dans ce cas, il faut additionner l'admittance (inverse de l'impédance) de chaque composant :

$$Z(\omega) = \frac{R_{TC}}{1 + j\omega R_{TC} C_{DC}} \quad \text{Équation II-14}$$

avec  $j = \sqrt{-1}$  et où  $\omega$  est la pulsation ( $\omega = 2\pi f$ ,  $f$  étant la fréquence du signal alternatif)

Circuit électrique	Représentation schématique
<p><b>A</b> - Résistance et capacité en parallèle</p> 	
<p><b>B</b> - Résistance <math>R_1</math> en série avec un circuit <math>R_2</math>-C parallèle</p> 	
<p><b>C</b> - Impédance de Warburg semi-infinie</p> 	
<p><b>D</b> - Impédance de Warburg avec couche de diffusion <math>\delta</math> limitée</p> 	

**Tableau II-4** : Représentation schématique des circuits élémentaires utilisés et des diagrammes de Nyquist théoriques correspondants.

La représentation de Nyquist de ce circuit ainsi que son schéma électrique sont présentés dans le **Tableau II-4-A**. Il faut noter qu'aux basses fréquences, l'impédance tend vers  $R_{TC}$  tandis qu'elle tend vers 0 au niveau des hautes fréquences. La fréquence au sommet du demi-cercle  $f^0$  (minimum de la partie imaginaire) est une caractéristique de l'interface électrode/électrolyte. On a alors :

$$R_{TC} C_{DC} 2\pi f^0 = 1$$

**Équation II-15**

Il est assez rare qu'un matériau d'électrode soit parfaitement plan. Le diagramme d'impédance qui en résulte est un demi-cercle dont l'origine est décentrée de l'axe de  $\text{Re}(Z)$ , d'un angle  $\beta_{RC}$ . Le paramètre d'angle  $\alpha_{RC} = 90 - \beta_{RC}$  est alors une mesure de l'hétérogénéité de surface. Plus l'angle  $\alpha_{RC}$  est proche de  $90^\circ$  plus la surface est homogène.

A cette impédance, il faut rajouter une composante due à la conduction ionique dans la solution et dans le film situé à la surface de l'électrode. Les propriétés électriques d'un matériau (solide ou solution) correspondent aux déplacements des charges ioniques dans ce matériau. Les phénomènes de conduction sont représentés par une résistance d'électrolyte  $R_{el}$ . Pour un circuit composé de cette résistance ( $R_{el}$ ) en série avec un circuit résistance ( $R_{TC}$ ) - condensateur ( $C_{DC}$ ) en parallèle, il faut ajouter à l'équation qui précède la résistance  $R_{el}$  :

$$Z(\omega) = R_{el} + \frac{R_{TC}}{1 + j\omega R_{TC} C_{DC}} \quad \text{Équation II-16}$$

Le diagramme de Nyquist de ce circuit (**Tableau II-4-B**) est sensiblement le même que celui décrit précédemment sauf que le demi-cercle a subi une translation de valeur  $R_{el}$  sur l'axe des abscisses. La valeur de la résistance obtenue aux basses fréquences est alors égale à  $(R_{el} + R_{TC})$ .

Lorsque la cinétique électrochimique est plus complexe et que le transport de matière intervient, la composante rajoutée dans le circuit électrique équivalent est une impédance de Warburg. Cette impédance est ajoutée dans le circuit électrique en série avec la résistance de transfert de charge (dans la branche faradique du circuit) et en parallèle avec la capacitance de double couche. Selon que la diffusion soit semi infinie (naturelle) ou dans une couche de diffusion  $\delta$  constante (électrode à disque tournant ou membrane perméable) on utilise les deux impédances de Warburg décritent ci-dessous :

Le circuit présenté dans le **Tableau II-4-C** représente l'impédance de Warburg semi-infinie. L'expression de l'impédance de Warburg est :

$$Z_w(\omega) = \frac{(1-j)\sigma}{\sqrt{\omega}} \quad \text{Équation II-17}$$

avec 
$$\sigma = \frac{RT}{n^2 F^2 A \sqrt{2}} \left[ \frac{1}{c_R \sqrt{D_R}} + \frac{1}{c_O \sqrt{D_O}} \right]$$



avec  $n$  : nombre d'électrons échangés dans la réaction d'électrode,  $A$  : surface de l'électrode,  $D_k$  : coefficient de diffusion de l'espèce électroactive mobile  $k$  (O ou R), de concentration  $c_k$  au sein de la solution.

Cette composante du circuit apparaît sur le diagramme de Nyquist comme une droite formant un angle  $\alpha = 45^\circ$  avec l'axe des abscisses. Aux grandes fréquences, l'impédance de Warburg est faible puisque les espèces diffusent sur une petite distance tandis qu'aux faibles fréquences, elles doivent diffuser beaucoup plus loin et, du coup, l'impédance de Warburg augmente considérablement.

La dernière composante d'un circuit électrique présentée dans le **Tableau II-4-D** est l'impédance de Warburg dans le cas d'une couche de diffusion  $\delta$  limitée. L'**Équation II-15** devient alors :

$$Z_{W_\delta}(\omega) = R_\delta \frac{\tanh\left(\sqrt{\frac{j\omega\delta^2}{D_k}}\right)}{\sqrt{\frac{j\omega\delta^2}{D_k}}} \quad \text{Équation II-18}$$

Aux hautes fréquences, on observe une droite à  $\alpha = 45^\circ$  qui se prolonge par une boucle coupant l'axe  $\text{Re}(Z)$  en un point  $R_\delta$  tel que :

$$R_\delta = \frac{RT}{n^2 F^2} \frac{\delta}{A} \frac{1}{D_k c_k} \quad \text{Équation II-19}$$

L'autre paramètre important de ce Warburg limité est le temps de relaxation,  $\tau_\delta$  :

$$\tau_\delta = \frac{\delta^2}{D_k} \quad \text{Équation II-20}$$

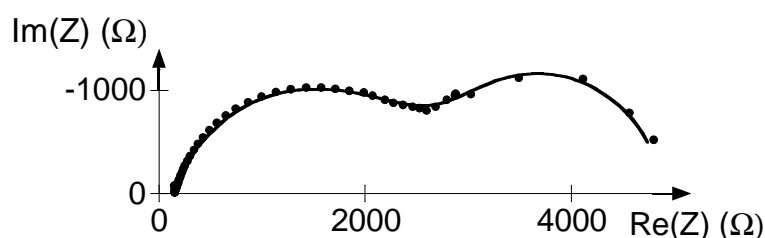
La fréquence au sommet de la boucle (minimum de la partie imaginaire) est donnée par :

$$f_{\text{sommet}} = \frac{2,54}{2\pi\tau_\delta} \quad \text{Équation II-21}$$

La combinaison de ces circuits élémentaires permet d'obtenir le circuit électrique équivalent modèle adapté aux données expérimentales. Celui-ci doit rendre compte des phénomènes électrochimiques se déroulant à l'électrode.

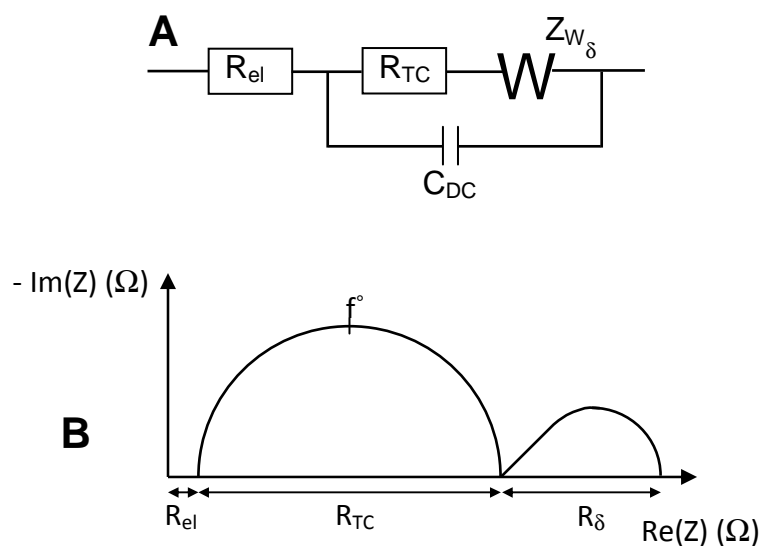
### II.3.3.b.β. Circuit électrique équivalent choisi

L'étude du système poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup>/ADN<sub>sonde</sub>-(His)<sub>6</sub>/ADN<sub>cible</sub> a donc été réalisée par impédance en présence de l'hydroquinone (10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup>) dans le tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7 ; T = 25 °C). Les mesures ont été réalisées en se plaçant au potentiel d'oxydation de l'hydroquinone (E<sub>c</sub> = 0,4 V vs ECS) avec une amplitude du signal perturbateur ΔE = 5 mV rms. Le domaine de fréquences choisi s'étend de 0,1 Hz à 500 kHz et la vitesse de rotation de l'électrode a tout d'abord été fixée à Ω = 500 rpm. Le spectre d'impédance obtenu est présenté **Figure II-13**.



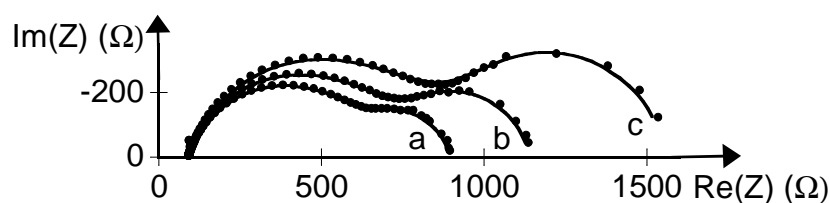
**Figure II-13** : Spectre d'impédance réalisé avec une électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3$  mm) modifiée par un film de poly(pyrrole-NTA)-Cu<sup>2+</sup> et incubée avec une solution d'ADN<sub>sonde</sub> histidinylé (0,05 mg.mL<sup>-1</sup> dans le tampon phosphate 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH = 7). La sonde électrochimique utilisée est l'hydroquinone (10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup> dans le tampon phosphate 0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7 ; T = 25 °C). Vitesse de rotation de l'électrode : Ω = 500 rpm, gamme de fréquences : 0,1 Hz à 500 kHz, E<sub>c</sub> = 0,4 V vs ECS et ΔE = 5 mV rms.

Le spectre d'impédance peut être décomposé en trois parties selon la gamme de fréquences considérée : aux hautes fréquences, il apparaît une résistance R<sub>el</sub> due à la chute ohmique en solution tandis qu'aux fréquences intermédiaires, on observe une résistance R<sub>TC</sub> (résistance due au transfert de charges) et un condensateur C<sub>DC</sub> (capacité de double couche électrochimique) en parallèle. Enfin, aux basses fréquences, nous avons introduit une impédance de Warburg avec couche de diffusion δ limitée en série avec R<sub>TC</sub>. Le circuit électrique équivalent choisi ainsi que sa représentation schématique dans le plan complexe de Nyquist sont présentés sur le **Schéma II-11**.



**Schéma II-11** : **A** - Circuit électrique équivalent choisi pour le système étudié : électrode de carbone vitreux modifiée avec un film poly(pyrrole-NTA)- $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{ADN}_{\text{sonde}}$ - $\text{ADN}_{\text{cible}}$  en présence de l'hydroquinone ( $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ). Le circuit se compose de  $R_{el}$  (résistance due à la chute ohmique en solution),  $R_{TC}$  (résistance due au transfert de charges) en série avec  $W_{\delta}$  (impédance de Warburg avec couche de diffusion  $\delta$  limitée) et en parallèle avec  $C_{DC}$  (capacité de double couche). **B** - Représentation schématique du circuit établi dans le plan de Nyquist.

Nous avons alors utilisé ce circuit équivalent pour réaliser la simulation des spectres obtenus dans le logiciel Z-view. Nous avons alors obtenu les paramètres  $R_{el}$ ,  $R_{TC}$ ,  $C_{DC}$ ,  $f^{\circ}$ ,  $\alpha_{RC}$ ,  $R_{\delta}$ ,  $\tau$  et  $\alpha_D$  qui permettent de déterminer la part de chaque composante dans le processus électrochimique global. Afin de valider le circuit électrique équivalent établi, nous avons étudié l'influence de la vitesse de rotation de l'électrode dans les conditions expérimentales préalablement exposées. Ces mesures ont été réalisées à  $\Omega = 500, 1000$  et  $2000 \text{ rpm}$  (**Figure II-14**) et nous avons alors pu étudier les variations des différents paramètres en fonction de la vitesse de  $\Omega$ .

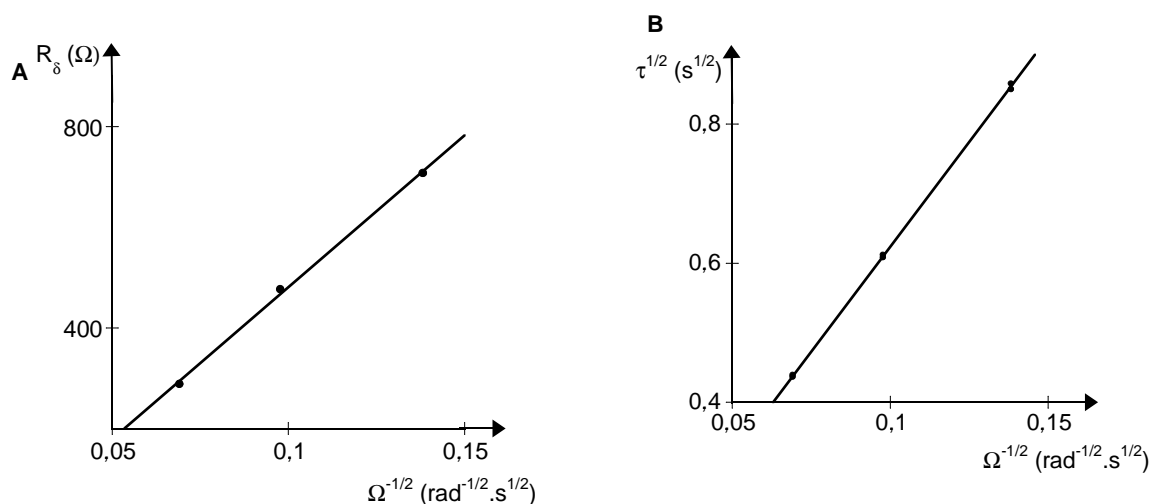


**Figure II-14** : Spectre d'impédance réalisé avec une électrode de carbone vitreux ( $\Phi = 3 \text{ mm}$ ) modifiée par un film de poly(pyrrole-NTA)- $\text{Cu}^{2+}$  et incubée avec une solution d' $\text{ADN}_{\text{sonde}}$  histidinylé ( $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le tampon phosphate  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$   $\text{pH} = 7$ ). La sonde électrochimique utilisée est l'hydroquinone ( $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  dans le tampon phosphate  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$  ;  $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Vitesses de rotation de l'électrode :  $\Omega = 500 \text{ rpm}$  (a),  $1000 \text{ rpm}$  (b) et  $2000 \text{ rpm}$  (c), gamme de fréquences :  $0,1 \text{ Hz}$  à  $500 \text{ kHz}$ ,  $E_c = 0,4 \text{ V vs ECS}$  et  $\Delta E = 5 \text{ mV rms}$ .

Nous avons pu mettre en évidence que seule la boucle correspondant à l'impédance de Warburg est affectée par la vitesse de rotation de l'électrode. Celle-ci étant liée à la diffusion des espèces en solution, nous avons alors vérifié que les paramètres  $R_\delta$  et  $\tau$  obéissaient bien aux **Équations II-19** et **II-20** en sachant que :

$$\delta = 1,613D^{1/3}\Omega^{-1/2}\nu^{1/6} \quad \text{Équation II-22}$$

Dans un système où la couche de diffusion est principalement localisée dans la solution, les courbes  $R_\delta = f(\Omega^{-1/2})$  et  $\tau^{1/2} = f(\Omega^{-1/2})$  doivent donc être linéaires selon les **Équations II-19**, **II-20** et **II-22**. La **Figure II-15** montre les droites obtenues pour **A** -  $R_\delta$  et **B** -  $\tau^{1/2}$  en fonction de  $\Omega^{-1/2}$  avec de bons coefficients de corrélation :  $R^2 = 0,9984$  et  $R^2 = 0,99976$  respectivement.

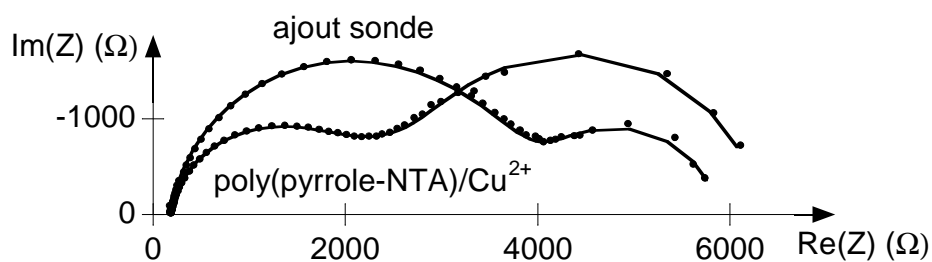


**Figure II-15** : **A** – Evolution de la résistance de diffusion  $R_\delta$  en fonction de l'inverse de la racine carrée de la vitesse de rotation de l'électrode ( $\Omega^{-1/2}$ ) et **B** – évolution de  $\tau^{1/2}$  en fonction de  $\Omega^{-1/2}$ .

Ces expériences permettent donc de valider le circuit équivalent choisi en démontrant que la boucle correspondant à l'impédance de Warburg a bien un caractère diffusif dû à la diffusion de l'hydroquinone qui a lieu principalement en solution.

### II.3.3.c. Ancrage de l'ADN<sub>sonde</sub> sur le poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup>

Dans un premier temps, nous avons étudié l'ancrage de l'ADN<sub>sonde</sub> sur le film polymère. Pour cela, nous avons enregistré un premier spectre d'impédance avec l'électrode modifiée par le poly(pyrrole-NTA)-Cu<sup>2+</sup> dans une solution de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7 ; T = 25 °C) contenant l'hydroquinone (10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup>). Un second spectre a ensuite été enregistré après incubation avec une solution de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) contenant l'ADN<sub>sonde</sub> (0,05 mg.mL<sup>-1</sup>) et rinçage avec du tampon phosphate. Les paramètres utilisés lors de cette étude sont identiques à ceux exposés précédemment ( $E_c = 0,4$  V vs ECS ;  $\Delta E = 5$  mV rms ;  $\Omega = 500$  rpm ; gamme de fréquences : de 0,1 Hz à 500 kHz). Les spectres expérimentaux (points) ainsi que les simulations (lignes) obtenues dans Z-view avec le circuit électrique équivalent choisi sont présentés sur la **Figure II-16**. Il est aisé de voir le phénomène d'immobilisation de l'ADN<sub>sonde</sub> sur le film polymère du fait du fort changement dans l'allure du spectre d'impédance. Une analyse plus approfondie est présentée dans le **Tableau II-5**.



**Figure II-16** : Spectres d'impédance réalisés avec une électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3$  mm) modifiée par un film de poly(pyrrole-NTA)-Cu<sup>2+</sup> puis après incubation dans une solution de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) contenant l'ADN<sub>sonde</sub> (0,05 mg.mL<sup>-1</sup>). La sonde électrochimique utilisée est l'hydroquinone (10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup> dans le tampon phosphate 0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7 ; T = 25 °C). Vitesse de rotation de l'électrode  $\Omega = 500$  rpm, gamme de fréquences : 0,1 Hz à 500 kHz,  $E_c = 0,4$  V vs ECS et  $\Delta E = 5$  mV rms. Ce graphe montre les données expérimentales (points) et les données obtenues grâce aux simulations réalisées avec le circuit électrique équivalent modèle établi (courbes).

Certains des paramètres obtenus varient peu ou pas du tout, par exemple, la résistance de l'électrolyte  $R_{el}$  ( $192 \pm 6$   $\Omega$ ) est invariante. En effet, elle est due à la concentration de l'électrolyte qui ne varie pas au cours des mesures. Il en est de même pour les valeurs de l'angle de décentrage du demi cercle  $\alpha_{RC}$  ( $83 \pm 3$  °), la constante de temps caractéristique du phénomène de diffusion  $\tau$  ( $0,76 \pm 0,03$  s) et l'angle de Warburg  $\alpha_D$  ( $40 \pm 2$  °). Par contre, la résistance de transfert de charge  $R_{TC}$  augmente considérablement ( $\Delta R_{TC} = + 1660$   $\Omega$ ) tandis

que la capacité de double couche  $C_{DC}$  et la fréquence au sommet du demi-cercle  $f^\circ$  diminuent de  $-0,53 \mu\text{F}$  et  $-10,7 \text{ Hz}$  respectivement. Ces résultats montrent que le transfert d'électron est ralenti (diminution de  $f^\circ$ ) mais aussi que la surface est plus encombrée (variations de  $C_{DC}$  et  $R_{TC}$ ). Il est surprenant que  $R_\delta$  diminue autant ( $-2110 \Omega$ ) car cela peut, en premier lieu, être interprété comme une meilleure diffusion de la sonde électrochimique. Cependant, comme la valeur de  $\tau$  reste constante, on peut supposer que la valeur de l'épaisseur de la couche de diffusion  $\delta$  reste constante elle aussi à condition que le coefficient de diffusion  $D$  soit identique (**Equation II-18**). Dans ce cas, la variation de la résistance due à la diffusion  $R_\delta$  ne serait donc pas liée à une variation de l'épaisseur de la couche de diffusion  $\delta$ . L'autre paramètre modifié lors de l'ajout de l'ADN<sub>sonde</sub> ne peut alors être que la concentration en hydroquinone (**Equation II-17**). Il se peut donc que la variation de la résistance due à la diffusion  $R_\delta$  observée soit due à une accumulation de la sonde électrochimique (l'hydroquinone) dans la couche de simples brins.

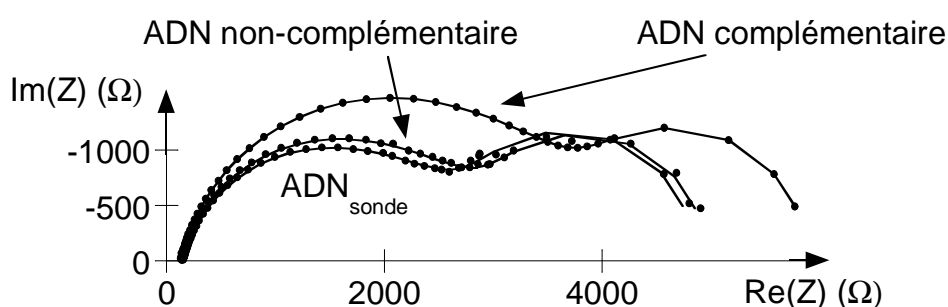
	poly(pyrrole-NTA)-Cu <sup>2+</sup>	poly(pyrrole-NTA)-Cu <sup>2+</sup> -ADN <sub>sonde</sub>
<b>R<sub>el</sub> (Ω)</b>	192 ± 6	191 ± 6
<b>R<sub>TC</sub> (Ω)</b>	1810 ± 60	3470 ± 110
<b>C<sub>DC</sub> (μF)</b>	3,2 ± 0,1	2,67 ± 0,08
<b>f<sup>°</sup> (Hz)</b>	27,9 ± 0,9	17,2 ± 0,6
<b>α<sub>RC</sub> (°)</b>	83 ± 3	82 ± 3
<b>R<sub>δ</sub> (Ω)</b>	4310 ± 130	2200 ± 70
<b>τ (s)</b>	0,76 ± 0,03	0,76 ± 0,03
<b>α<sub>D</sub> (°)</b>	41 ± 2	39 ± 2

**Tableau II-5** : Valeurs obtenues à partir de la **Figure II-16** grâce aux simulations des données expérimentales réalisées dans Z-view avec le circuit équivalent choisi.  $R_{el}$  : résistance de l'électrolyte,  $R_{TC}$  : résistance de transfert de charge,  $C_{DC}$  : capacité de double couche,  $f^\circ$  : fréquence au sommet du demi cercle,  $\alpha_{RC}$  : angle de décentrage du demi cercle,  $R_\delta$  : résistance due à la diffusion,  $\tau$  : constante de temps caractéristique du phénomène de diffusion,  $\alpha_D$  : angle de Warburg.

### II.3.3.d. Hybridation de l'ADN<sub>cible</sub>

Nous avons d'abord étudié la réponse de ce capteur face à un ADN<sub>cible</sub> complémentaire et un autre ADN non-complémentaire afin de démontrer la spécificité de l'hybridation. Cette étude a été réalisée grâce à la spectroscopie d'impédance électrochimique. Une électrode

modifiée par le poly(pyrrole-NTA)-Cu<sup>2+</sup> a été mise à incuber successivement dans des solutions de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) contenant l'ADN<sub>sonde</sub> puis l'ADN non-complémentaire (10<sup>-8</sup> mol.L<sup>-1</sup>) et l'ADN<sub>cible</sub> complémentaire (10<sup>-8</sup> mol.L<sup>-1</sup>). L'électrode a été rincée dans du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) après chaque incubation puis un spectre d'impédance est enregistré. Les spectres d'impédance obtenus sont présentés sur la **Figure II-17** ; les données sont représentées sous forme de points tandis que les courbes symbolisent les données obtenues par simulation dans Z-view avec le circuit équivalent modèle. Il faut d'ailleurs noter l'excellente corrélation entre les données expérimentales et celles obtenues par simulation qui confirment le bon choix du circuit électrique équivalent.



**Figure II-17** : Spectres d'impédance réalisés avec une électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3$  mm) modifiée par un film de poly(pyrrole-NTA)-Cu<sup>2+</sup>-ADN<sub>sonde</sub> et incubée avec des solutions tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7 ; T = 25 °C) contenant l'ADN non-complémentaire (10<sup>-8</sup> mol.L<sup>-1</sup>) ou l'ADN<sub>cible</sub> complémentaire (10<sup>-8</sup> mol.L<sup>-1</sup>). La sonde électrochimique utilisée est l'hydroquinone (10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup> dans le tampon phosphate 0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7 ; T = 25 °C). Vitesse de rotation de l'électrode  $\Omega = 500$  rpm, gamme de fréquences : 0,1 Hz à 500 kHz,  $E_c = 0,4$  V vs ECS et  $\Delta E = 5$  mV rms. Ce graphique montre les données expérimentales (points) et les données obtenues grâce aux simulations réalisées avec le circuit électrique équivalent modèle établi (courbes).

Les simulations réalisées dans Z-view avec le circuit équivalent ont permis d'obtenir les valeurs présentées dans le **Tableau II-6** après incubation avec l'ADN<sub>sonde</sub>, l'ADN<sub>cible</sub> complémentaire à 10<sup>-8</sup> mol.L<sup>-1</sup> et un ADN non-complémentaire à 10<sup>-8</sup> mol.L<sup>-1</sup> lui aussi. On peut remarquer que beaucoup de paramètres varient peu tels que la résistance de l'électrolyte :  $R_{el}$  (144 ± 5 Ω) due à la concentration de l'électrolyte, la fréquence au sommet du demi cercle  $f^\circ$  (20,8 ± 0,7 Hz), l'angle de décentrage du demi cercle  $\alpha_{RC}$  (78 ± 3 °), la résistance de diffusion  $R_\delta$  (2330 ± 80 Ω), la constante de temps caractéristique du phénomène de diffusion  $\tau$  (0,86 ± 0,03 s) et l'angle de Warburg  $\alpha_D$  (46 ± 2 °). Le fait que  $R_\delta$  varie peu avec la concentration en ADN<sub>cible</sub> confirme que la couche de diffusion est principalement localisée à l'extérieur du film polymère. La faible variation de la valeur de  $\alpha_{RC}$  montre que l'hybridation ne provoque pas de changement de rugosité de la surface de l'électrode<sup>36</sup>. La vitesse du

transfert de charge n'est pas affectée non plus puisque  $f^\circ$  est très peu influencée, elle aussi, par la concentration en  $\text{ADN}_{\text{cible}}$ . Par contre, on remarque que la capacité de double couche  $C_{\text{DC}}$  diminue ( $- 0,8 \mu\text{F}$ ) alors que la résistance de transfert de charge  $R_{\text{TC}}$  augmente ( $+ 1160 \Omega$ ) lors de l'hybridation avec un  $\text{ADN}_{\text{cible}}$  complémentaire. La valeur de  $C_{\text{DC}}$  est proportionnelle à la surface accessible au transfert de charge tandis que la valeur de  $R_{\text{TC}}$  est inversement proportionnelle à cette surface. Ces résultats démontrent que l'évolution obtenue lors de la formation du duplex n'est due qu'à un pur effet géométrique sur la surface de l'électrode : en effet, le transfert d'électron n'est pas ralenti mais a lieu sur une surface plus petite.

	$\text{ADN}_{\text{sonde}}$	$\text{ADN}_{\text{cible}}$ complémentaire ( $10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ )	$\text{ADN}$ non-complémentaire ( $10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ )
$R_{\text{el}} (\Omega)$	$157 \pm 5$	$130 \pm 4$	$144 \pm 5$
$R_{\text{TC}} (\Omega)$	$2310 \pm 70$	$3470 \pm 110$	$2510 \pm 80$
$C_{\text{DC}} (\mu\text{F})$	$3,2 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,1$	$2,99 \pm 0,09$
$f^\circ (\text{Hz})$	$21,3 \pm 0,7$	$19,9 \pm 0,6$	$21,1 \pm 0,7$
$\alpha_{\text{RC}} (^\circ)$	$77 \pm 3$	$78 \pm 3$	$78 \pm 3$
$R_\delta (\Omega)$	$2370 \pm 80$	$2330 \pm 70$	$2300 \pm 70$
$\tau (\text{s})$	$0,87 \pm 0,03$	$0,86 \pm 0,03$	$0,85 \pm 0,03$
$\alpha_{\text{D}} (^\circ)$	$46 \pm 2$	$45 \pm 2$	$46 \pm 2$

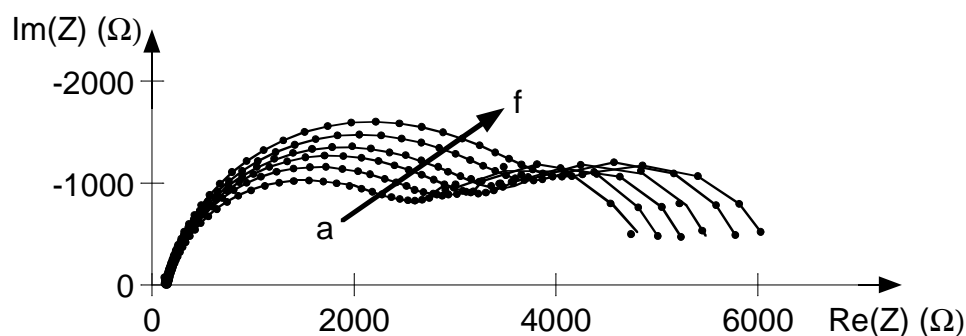
**Tableau II-6** : Valeurs obtenues grâce aux simulations des données expérimentales de la **Figure II-17** réalisées dans Z-view avec le circuit équivalent choisi.  $R_{\text{el}}$  : résistance de l'électrolyte,  $R_{\text{TC}}$  : résistance de transfert de charge,  $C_{\text{DC}}$  : capacité de double couche,  $f^\circ$  : fréquence au sommet du demi cercle,  $\alpha_{\text{RC}}$  : angle de décentrage du demi cercle,  $R_\delta$  : résistance due à la diffusion,  $\tau$  : constante de temps caractéristique du phénomène de diffusion,  $\alpha_{\text{D}}$  : angle de Warburg.

Il semble alors que seul le demi-cercle est affecté par la concentration en  $\text{ADN}_{\text{cible}}$  complémentaire (**Figure II-18**) et donc que  $R_{\text{TC}}$  soit le paramètre le plus influencé lors de la formation du duplex d'ADN (**Tableau II-6**). L'incubation d'une électrode modifiée par un film de poly(pyrrole-NTA)/ $\text{Cu}^{2+}$ / $\text{ADN}_{\text{sonde}}$  dans une solution d' $\text{ADN}_{\text{cible}}$  complémentaire ( $10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ ) provoque une augmentation de la résistance de transfert de charge de  $+ 1160 \Omega$  tandis qu'elle augmente de  $+ 200 \Omega$  avec un ADN non-complémentaire ( $10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ ).



Il faut cependant noter que les valeurs des paramètres obtenues peuvent être très différentes d'une électrode à une autre. Par exemple, la valeur de la résistance de transfert de charge correspondant à l'ADN<sub>sonde</sub> ancré sur le poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup> vaut 3470 Ω dans le **Tableau II-5** et 2310 Ω dans le **Tableau II-6**. Par contre, la même expérience reproduite quatre fois sur différentes électrodes permet d'obtenir des variations reproductibles avec une incertitude relative de 3 %.

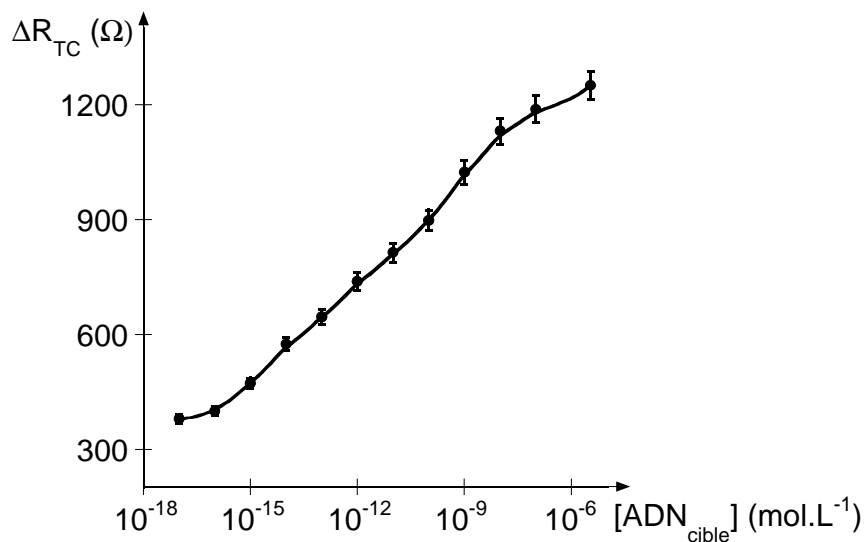
Nous avons finalement utilisé ce capteur pour la détection de concentrations croissantes en ADN<sub>cible</sub> complémentaire. Pour cela, l'électrode modifiée par le film de poly(pyrrole-NTA)-Cu<sup>2+</sup> a été incubée successivement dans des solutions de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup>; pH = 7) contenant l'ADN<sub>sonde</sub> puis des concentrations croissantes d'ADN<sub>cible</sub> comprises entre 10<sup>-17</sup> et 3,1.10<sup>-6</sup> mol.L<sup>-1</sup>. L'électrode a été rincée dans du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup>; pH = 7) après chaque incubation puis un spectre d'impédance a été enregistré. Les spectres d'impédance obtenus sont présentés sur la **Figure II-18**. Pour des raisons de clarté, seulement une courbe sur trois est représentée.



**Figure II-18** : Spectres d'impédance réalisés avec une électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ) modifiée par un film de poly(pyrrole-NTA)-Cu<sup>2+</sup>-ADN<sub>sonde</sub> et incubée avec des solutions tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup>; pH = 7; T = 25 °C) contenant l'ADN<sub>cible</sub> à des concentrations croissantes : (a) 0 mol.L<sup>-1</sup>, (b) 10<sup>-17</sup> mol.L<sup>-1</sup>, (c) 10<sup>-14</sup> mol.L<sup>-1</sup>, (d) 10<sup>-11</sup> mol.L<sup>-1</sup>, (e) 10<sup>-8</sup> mol.L<sup>-1</sup> et (f) 3,1.10<sup>-6</sup> mol.L<sup>-1</sup>. La sonde électrochimique utilisée est l'hydroquinone (10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup> dans le tampon phosphate 0,1 mol.L<sup>-1</sup>; pH = 7; T = 25 °C). Vitesse de rotation de l'électrode  $\Omega = 500 \text{ rpm}$ , gamme de fréquences : 0,1 Hz à 500 kHz,  $E_c = 0,4 \text{ V vs ECS}$  et  $\Delta E = 5 \text{ mV rms}$ . Ce graphe montre les données expérimentales (points) et les données obtenues grâce aux simulations réalisées avec le circuit électrique équivalent modèle établi (courbes).

La **Figure II-19** montre les variations de la résistance de transfert de charge  $\Delta R_{TC}$  en fonction de la concentration en ADN<sub>cible</sub> complémentaire. Ici aussi, les valeurs entre les différentes électrodes testées étaient différentes mais les variations restaient reproductibles (au

moins sur les quatre électrodes testées) ; c'est pour cela que nous avons choisi de présenter la variation de la résistance de transfert de charge  $\Delta R_{TC} = R_{TC}(ADN_{cible}) - R_{TC}(ADN_{sonde})$  en fonction de la concentration en  $ADN_{cible}$  complémentaire. Cette courbe montre une évolution linéaire de  $\Delta R_{TC}$  en fonction de  $\log([ADN_{cible}])$  sur une large gamme de concentrations en  $ADN_{cible}$  comprises entre  $10^{-15}$  et  $10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup> avec une pente égale à 91,4  $\Omega$ /unité log de concentration en  $ADN_{cible}$  ( $R^2 = 0,9943$ ). Le seuil de détection pour les mesures réalisées en impédance est de  $10^{-15}$  mol.L<sup>-1</sup>. Celle-ci reste compétitive avec les valeurs obtenues jusqu'ici qui étaient comprises entre  $10^{-10}$  et  $5 \cdot 10^{-15}$  mol.L<sup>-1</sup> pour les plus sensibles<sup>39, 40</sup>. On peut aussi remarquer que l'incubation avec un ADN non-complémentaire provoque une variation de la valeur de  $R_{TC}$  ( $\Delta R_{TC} = + 200 \Omega$ ) inférieure à celle obtenue pour un  $ADN_{cible}$  complémentaire à une concentration de  $10^{-16}$  mol.L<sup>-1</sup> (+ 400  $\Omega$ ) qui se situe pourtant en dessous du seuil de détection.

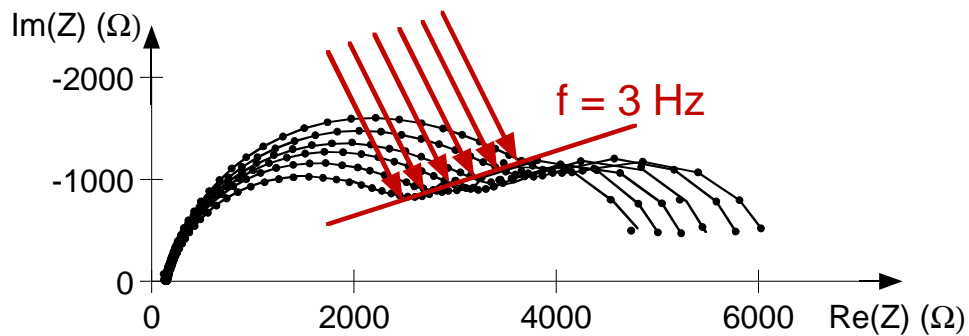


**Figure II-19 :** Courbe d'étalonnage pour le capteur à ADN élaboré correspondant à la variation de la résistance de transfert de charge  $\Delta R_{TC}$  en fonction de la concentration en  $ADN_{cible}$ . Courbe obtenue à partir des données de la **Figure II-18**.

L'excellence des performances obtenues est due à la forte perméabilité du film de poly(pyrrole-NTA) par rapport à la diffusion de l'hydroquinone mais aussi à la forte densité de biomolécules immobilisées lors de chaque étape. Enfin, ce polymère chargé négativement empêche l'adsorption non-spécifique de l'ADN (chargé négativement) par interactions électrostatiques.

### II.3.3.e. Etalonnage par conductimétrie

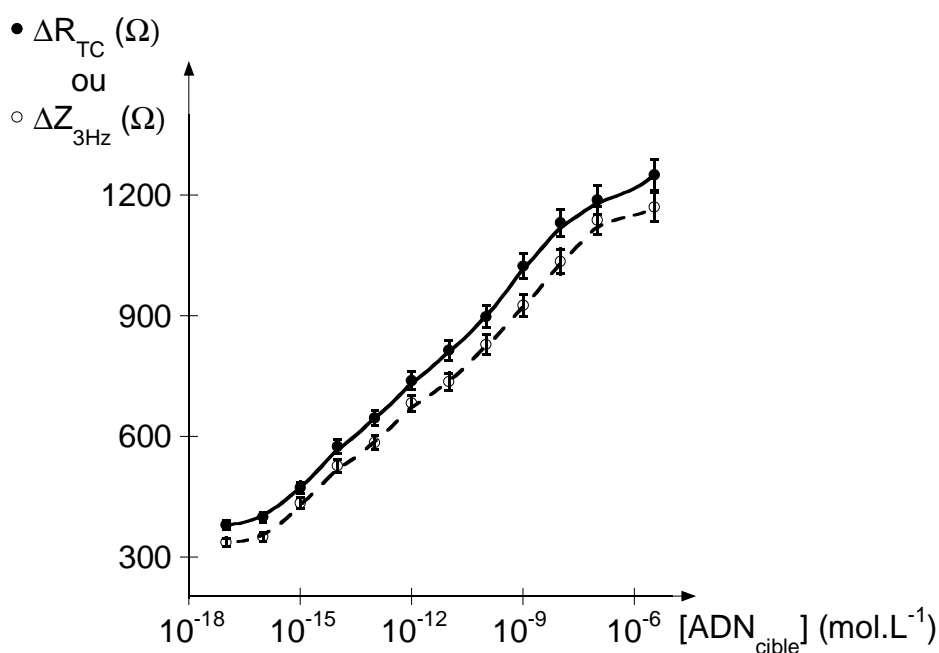
Afin de faciliter la détection, le capteur à ADN utilisé en impédance a été converti pour des mesures de conductimétrie. Ce type de mesures est réalisé en appliquant une tension électrique alternative à une fréquence donnée et permet de mesurer les variations de conductance ; celle-ci est inversement proportionnelle à la résistance. Puisque chaque point du spectre d'impédance dans le plan de Nyquist représente les valeurs des parties réelle et imaginaire de  $Z(\omega)$  pour une fréquence donnée, on peut connaître le module de l'impédance  $|Z(\omega)|$  pour chaque concentrations en  $ADN_{cible}$ . Nous avons donc mesuré les variations du module d'impédance à une fréquence de 3 Hz en fonction de la concentration en  $ADN_{cible}$ . La **Figure II-20** rappelle les spectres d'impédance obtenus avec des concentrations croissantes en  $ADN_{cible}$  tandis que la ligne représentée sur ces spectres montre les points où la fréquence  $\omega = 3$  Hz.



**Figure II-20** : Spectres d'impédance réalisés avec une électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3$  mm) modifiée par un film de poly(pyrrole-NTA)- $Cu^{2+}$ - $ADN_{sonde}$  et incubée avec des solutions tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $pH = 7$  ;  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) contenant l' $ADN_{cible}$  à des concentrations croissantes. La sonde électrochimique utilisée est l'hydroquinone ( $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  dans le tampon phosphate  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $pH = 7$  ;  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Vitesse de rotation de l'électrode  $\Omega = 500 \text{ rpm}$ , gamme de fréquences :  $0,1 \text{ Hz}$  à  $500 \text{ kHz}$ ,  $E_c = 0,4 \text{ V vs ECS}$  et  $\Delta E = 5 \text{ mV rms}$ . Ce graphe montre les données expérimentales (points) et les données obtenues grâce aux simulations réalisées avec le circuit électrique équivalent modèle établi (courbes). La droite rouge montre la fréquence retenue pour les mesures conductimétriques ( $\omega = 3 \text{ Hz}$ ) à la fin du demi-cercle.

Les courbes montrant les variations du module de l'impédance  $\Delta Z_{3\text{Hz}}$  à  $\omega = 3$  Hz mais aussi les variations de la résistance de transfert de charge  $\Delta R_{TC}$  ont donc pu être tracées en fonction de la concentration en  $ADN_{cible}$  (**Figure II-21**). On remarque que les deux courbes ont exactement la même allure et la même gamme de linéarité entre  $10^{-15}$  et  $10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ . La pente pour les mesures de conductivité est égale à  $83,2 \text{ } \Omega/\text{unité log de concentration}$  en

$ADN_{cible}$  ( $R^2 = 0,9935$ ) ; celle-ci est légèrement plus faible que pour le graphe précédent mais reste du même ordre de grandeur. Ceci est dû au fait que la fréquence au sommet du demi-cercle  $f^\circ$  ne change pas lors de la formation du duplex. Du coup, la distribution des points en fonction de la fréquence reste la même pour tous les spectres d'impédance enregistrés. Le point correspondant à une fréquence  $\omega = 3$  Hz est toujours le dernier point du demi-cercle.



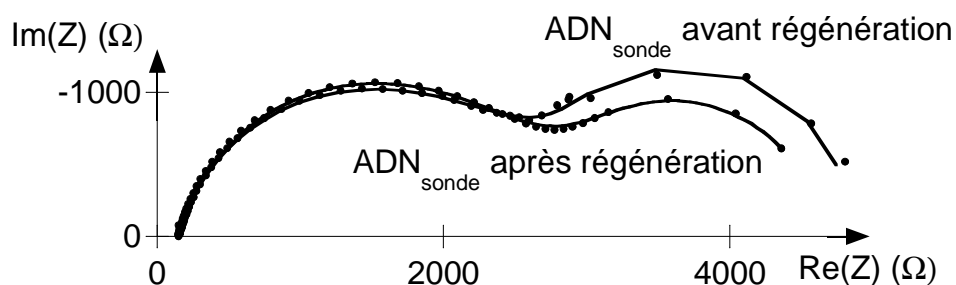
**Figure II-21 :** Courbe d'étalonnage pour le capteur à ADN élaboré correspondant à la variation de la résistance de transfert de charge  $\Delta R_{TC}$  (trait plein) et la variation du module de l'impédance  $\Delta Z_{3Hz}$  à  $\omega = 3$  Hz (pointillés) en fonction de la concentration en  $ADN_{cible}$ . Courbes obtenues à partir des données de la **Figure II-20**.

### II.3.3.f. Etude de la régénération de l'électrode

Afin de vérifier la réversibilité de l'immobilisation de l' $ADN_{sonde}$  histidinylé sur le film poly(pyrrole-NTA)/ $Cu^{2+}$ , nous avons laissé incuber le biocapteur présenté ci-dessus dans une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $pH = 7$ ) contenant  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  d'imidazole pendant 2 heures sous vive agitation puis rincé cette électrode dans une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $pH = 7$ ) pendant 2 heures sous vive agitation et enfin 2 heures supplémentaires dans une nouvelle solution de tampon phosphate. L'immersion successive de cette électrode dans une solution de tampon acétate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $pH = 4,8$ ) contenant du  $CuCl_2$  ( $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ ) pendant 20 min puis dans des solutions de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $pH = 7$ ) contenant l' $ADN_{sonde}$  ( $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) et l' $ADN_{cible}$  ( $3,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ) pendant 30 min chacune permet d'étudier la possibilité de régénération de l'électrode. Les incubations

sont suivies d'un rinçage dans une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) sous vive agitation pendant 5 min. Nous avons enregistré un spectre d'impédance après les incubations réalisées avec l' $\text{ADN}_{\text{sonde}}$  et l' $\text{ADN}_{\text{cible}}$  dans les conditions expérimentales décrites auparavant ( $E_c = 0,4 \text{ V vs ECS}$  ;  $\Delta E = 5 \text{ mV rms}$  ; gamme de fréquences : de  $0,1 \text{ Hz}$  à  $500 \text{ kHz}$  ;  $\Omega = 500 \text{ rpm}$ ) en présence de l'hydroquinone ( $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$  ;  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

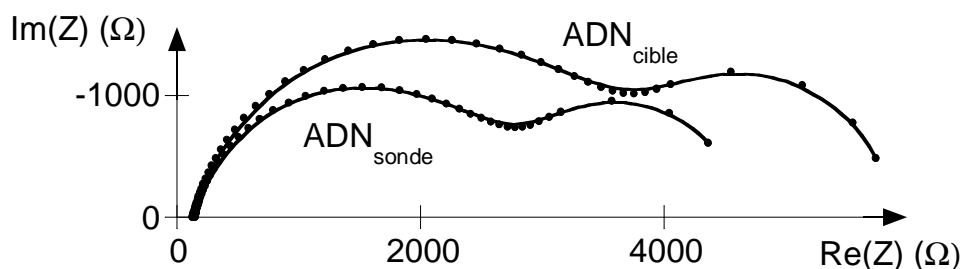
Les spectres obtenus pour l'électrode modifiée par le film poly(pyrrole-NTA)/ $\text{Cu}^{2+}$ / $\text{ADN}_{\text{sonde}}$  avant et après régénération de l'électrode sont présentés sur la **Figure II-22**. On remarque qu'ils sont légèrement différents mais ceci avait déjà été observé au laboratoire<sup>41</sup> lors d'une étude similaire traitant de la réversibilité de l'immobilisation de la glucose oxydase histidinylée sur le poly(pyrrole-NTA)/ $\text{Cu}^{2+}$ . Celle-ci avait permis de montrer que  $\sim 20 \%$  du signal était perdu lors de la première régénération de l'électrode. La répétition de cette opération de coordination et décoordination des ligands histidine de l'enzyme avait ensuite été reproduite cinq fois de suite sur la même électrode sans provoquer de diminution notable du signal à partir de la deuxième régénération. Les résultats obtenus ici montrent bien que le signal évolue un peu lors de la première régénération de l'électrode.



**Figure II-22** : Spectres d'impédance réalisés avec une électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ) modifiée par un film de poly(pyrrole-NTA)- $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{ADN}_{\text{sonde}}$  et régénérée avec une solution d'imidazole ( $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ ) dans le tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) puis incubée dans une solution tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) contenant l' $\text{ADN}_{\text{sonde}}$  ( $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Un spectre a été enregistré avant la régénération puis un autre après régénération et incubation avec l' $\text{ADN}_{\text{sonde}}$ . La sonde électrochimique utilisée est l'hydroquinone ( $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  dans le tampon phosphate  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$  ;  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Vitesse de rotation de l'électrode  $\Omega = 500 \text{ rpm}$ , gamme de fréquences :  $0,1 \text{ Hz}$  à  $500 \text{ kHz}$ ,  $E_c = 0,4 \text{ V vs ECS}$  et  $\Delta E = 5 \text{ mV rms}$ . Ce graphe montre les données expérimentales (points) et les données obtenues grâce aux simulations réalisées avec le circuit électrique équivalent modèle établi (courbes).

Les spectres obtenus après régénération pour l' $\text{ADN}_{\text{sonde}}$  et l' $\text{ADN}_{\text{cible}}$  sont présentés sur la **Figure II-23** et on voit bien que le phénomène d'hybridation a toujours lieu. Cependant,

nous avons obtenu une variation de la résistance de transfert de charge  $\Delta R_{TC} = + 1250 \Omega$  pour cette concentration d'ADN<sub>cible</sub> ( $3,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ) lors de l'élaboration du capteur et nous avons maintenant une variation  $\Delta R_{TC} = + 977 \Omega$  qui correspond à 78 % de la réponse initiale après régénération du capteur. On peut remarquer que l'on retrouve ~ 80 % du signal comme pour les mesures effectuées précédemment au laboratoire avec la glucose oxydase histidinylée<sup>41</sup>.



**Figure II-23 :** Spectres d'impédance réalisés avec une électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ) modifiée par un film de poly(pyrrole-NTA)- $\text{Cu}^{2+}$ -ADN<sub>sonde</sub>-ADN<sub>cible</sub> et régénérée avec une solution d'imidazole ( $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ ) dans le tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 7$ ) puis incubée dans des solutions tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 7$ ) contenant l'ADN<sub>sonde</sub> ( $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) et ensuite l'ADN<sub>cible</sub> ( $3,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ). Un spectre est enregistré après chaque incubation dans les solutions contenant l'ADN<sub>sonde</sub> et l'ADN<sub>cible</sub> respectivement. La sonde électrochimique utilisée est l'hydroquinone ( $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  dans le tampon phosphate  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 7$ ;  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Vitesse de rotation de l'électrode  $\Omega = 500 \text{ rpm}$ , gamme de fréquences :  $0,1 \text{ Hz}$  à  $500 \text{ kHz}$ ,  $E_c = 0,4 \text{ V vs ECS}$  et  $\Delta E = 5 \text{ mV rms}$ . Ce graphe montre les données expérimentales (points) et les données obtenues grâce aux simulations réalisées avec le circuit électrique équivalent modèle établi (courbes).

Ces résultats illustrent parfaitement la réversibilité de l'immobilisation de biomolécules histidinylées sur le film de poly(pyrrole-NTA)/ $\text{Cu}^{2+}$  via le complexe NTA/ $\text{Cu}^{2+}$ /His ainsi que la bonne répétabilité du processus d'immobilisation et l'excellente stabilité du film polymère.

#### II.3.4. Bilan

Cette étude a permis d'illustrer les capacités du poly(pyrrole-NTA) en vue de son utilisation dans le domaine des biocapteurs et plus particulièrement pour la réalisation d'un capteur à ADN. Ce système offre de nombreux avantages comparé au système classique avidine/biotine comme nous avons pu l'illustrer tout au long de cette partie du chapitre.

Les capteurs élaborés avec des polymères biotinylés souffrent souvent de la mauvaise perméabilité de ces films biotinylés à laquelle vient s'ajouter la couche d'avidine qui a

souvent un effet « bloquant » au niveau de l'interface électrode/solution et ralentit alors les processus électrochimiques.

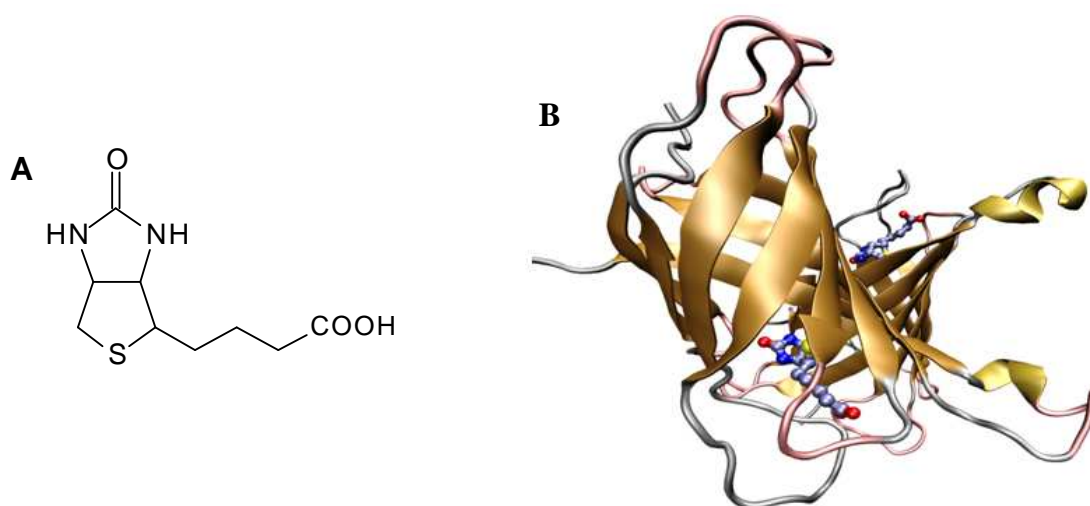
Les performances exceptionnelles obtenues avec le poly(pyrrole-NTA) résident dans le fait que ce polymère organique à caractère hydrophile possède une perméabilité très intéressante et peut permettre l'immobilisation de couches compactes de biomolécules.

## II.4. Immobilisation de biomolécules grâce à l'interaction NTA/Cu<sup>2+</sup>/Biotine.

### II.4.1. L'interaction NTA/Cu<sup>2+</sup>/Biotine.

#### II.4.1.a. Le système biotine/avidine

La biotine est une vitamine hydrosoluble (vitamine B<sub>8</sub> ou H) ; c'est un coenzyme qui participe à de nombreux métabolismes (acides gras, glucides...) mais aussi à la synthèse d'autres vitamines (B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub>...). Elle est composée d'un noyau 2-imidazolidinone fusionné à un noyau thiolane auquel un groupement acide propanoïque est rattaché (**Schéma II-12-A**).



**Schéma II-12** : **A** - Structure de la molécule biotine ; **B** - Complexe avidine-biotine.

En vue de l'immobilisation de biomolécules, elle est très souvent utilisée avec son partenaire affiné : l'avidine ou d'autres molécules ayant la même activité (neutravidine, streptavidine...) du fait qu'elle forme une interaction très forte avec ces derniers ( $K_D = 10^{-15} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ )<sup>42</sup>.

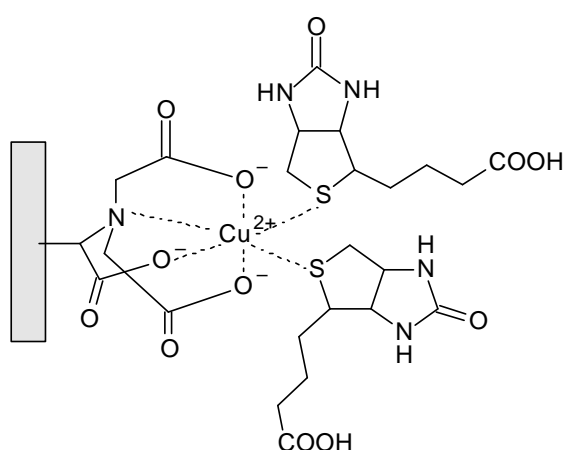
L'avidine est une glycoprotéine tétramérique qui est constituée de quatre sous-unités identiques permettant de reconnaître chacune une molécule de biotine (**Schéma II-12-B**).

Les surfaces modifiées avec une biotine ont elles aussi été très utilisées pour l'immobilisation de molécules biotinylées *via* des molécules d'avidine. Cependant, ces architectures souffrent souvent d'une faible perméabilité et présentent des performances électrochimiques amoindries.

#### **II.4.1.b. Apport du nouveau complexe**

Dans les années 1970, les travaux de Sigel<sup>43</sup> et Griesser<sup>44</sup> ont permis de démontrer qu'une liaison de coordination s'établit entre la biotine et les ions métalliques tels que  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  et  $Zn^{2+}$ . De plus, ces auteurs suggèrent que l'interaction avec ces ions métalliques divalents impliquerait l'atome de soufre de la biotine<sup>45</sup>.

Nous avons donc combiné ces deux systèmes pour étudier l'ancrage de la biotine sur le système NTA/ $Cu^{2+}$  (**Schéma II-13**) avec comme atouts la disponibilité commerciale de nombreuses molécules marquées avec une biotine mais aussi l'utilisation d'un polymère organique à caractère hydrophile qui permet d'obtenir une meilleure perméabilité de la couche de polymère comparée à l'hydrophobie des films de poly(pyrrole-biotine).

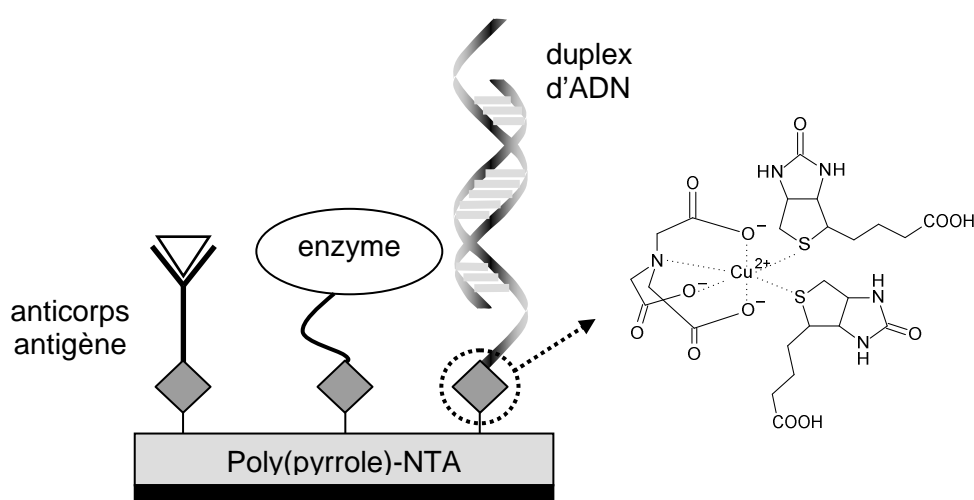


**Schéma II-13** : Interaction NTA/ $Cu^{2+}$ /(biotine)<sub>2</sub>.



### II.4.1.c. Présentation du nouveau système d'immobilisation de biomolécules biotinylées

Nous rapportons ici une nouvelle méthode d'immobilisation de molécules biotinylées sur des surfaces fonctionnalisées. Nous avons profité d'une interaction non-spécifique entre la biotine et le cuivre  $\text{Cu}^{2+}$  découverte lors de l'étude du capteur à ADN précédent. Ce nouveau système d'immobilisation peut permettre l'immobilisation de biomolécules (enzymes, anticorps, ADN...) biotinylées (**Schéma II-14**).



**Schéma II-14** : Immobilisation de biomolécules grâce au système  $\text{NTA}/\text{Cu}^{2+}/\text{biotine}$ .

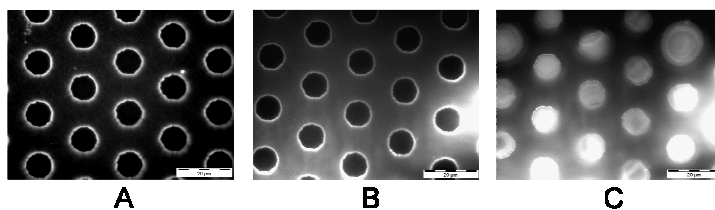
L'élaboration de ces architectures a été réalisée en plusieurs étapes dont la première consiste à électropolymériser le pyrrole-NTA sur la surface d'une électrode de carbone vitreux ou de platine. Cette dernière est ensuite plongée dans une solution de  $\text{Cu}^{2+}$  ( $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup> dans du tampon acétate 0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 4,8) pendant 20 min puis rincée avec une solution de NaCl (0,5 mol.L<sup>-1</sup>) pendant 5 min sous vive agitation. L'ancrage de la biomolécule biotinylée est ensuite réalisée par incubation de l'électrode dans une solution de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) contenant la glucose oxydase biotinylée (B-GOX ; 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>), la polyphénol oxydase biotinylée (B-PPO ; 0,3 mg.mL<sup>-1</sup>) ou l'ADN<sub>sonde</sub> biotinylé (B-ADN<sub>sonde</sub> ; 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>). L'électrode est ensuite rincée, sous agitation magnétique, dans du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7).

## II.4.2. Caractérisation par microscopie à fluorescence

Avant d'étudier l'ancrage de biomolécules biotinylées, nous avons tout d'abord caractérisé cette nouvelle voie d'immobilisation grâce à la microscopie à fluorescence. Nous avons utilisé les microélectrodes et le fluorophore FITC précédemment présentés (cf. § II.3.2.a.) pour réaliser ces expériences.

Ces microélectrodes ont été préalablement modifiées avec un film de poly(pyrrole-NTA) par électropolymérisation puis plongées dans une solution de  $\text{CuCl}_2$  ( $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  dans un tampon acétate  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 4,8$ ) pendant 20 min. Après des rinçages successifs dans des solutions de  $\text{NaCl}$  ( $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ) et de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ), les microélectrodes ont été mises à incuber pendant 30 min dans des solutions de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) contenant la glucose oxydase biotinylée (B-GOX ;  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) puis l'avidine marquée avec le fluorophore FITC (avidine-FITC ;  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Les électrodes ont été rincées dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) sous agitation magnétique après chaque incubation.

Comme précédemment, nous avons commencé par réaliser des expériences de contrôle en laissant incuber l'avidine-FITC sur la surface de la microélectrode directement mais aussi sur le poly(pyrrole-NTA)/ $\text{Cu}^{2+}$ . L'absence de fluorescence sur ces deux types d'électrodes (**Figure II-24-A** et **B**) corrobore bien les mesures effectuées dans la première partie du chapitre. Seul le wafer modifié avec le poly(pyrrole-NTA)/ $\text{Cu}^{2+}$ /B-GOX/avidine-FITC permet d'observer le signal de fluorescence (**Figure II-24-C**). Il faut tout d'abord noter que l'enzyme biotinylée (B-GOX) ne porte pas une seule mais plusieurs molécules de biotine en surface ; certaines lui permettent de s'ancrer sur le film polymère tandis que celles plus exposées à la solution forment le complexe avec l'avidine. Nous avons donc démontré la formation d'un complexe entre les motifs NTA du polymère et les molécules de biotine s'établissant autour de l'ion  $\text{Cu}^{2+}$ .



**Figure II-24** : Clichés obtenus en microscopie à fluorescence après incubation avec de l'avidine fluorescente (FITC) sur une microélectrode : **A** - non modifiée, **B** - modifiée avec du poly(pyrrole-NTA)/ $\text{Cu}^{2+}$  ( $\Gamma_{\text{réel}} = 1,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ ), **C** - après immobilisation de la glucose oxydase biotinylée sur le film polymère. La barre d'échelle représente  $20 \mu\text{m}$ .

### II.4.3. Etude de l'ancrage de biomolécules biotinylées

Ayant démontré la possibilité d'ancrer la biotine sur le poly(pyrrole-NTA), nous avons, dans un premier temps immobilisé une enzyme modèle (la glucose oxydase biotinylée : B-GOX) à la surface du polymère. Celle-ci étant largement utilisée dans le domaine des biocapteurs, la comparaison des performances obtenues avec d'autres systèmes déjà établis est facilitée. Dans un second temps, nous avons immobilisé une autre enzyme : la polyphénol oxydase biotinylée (B-PPO) et enfin un ADN biotinylé (B-ADN<sub>sonde</sub>).

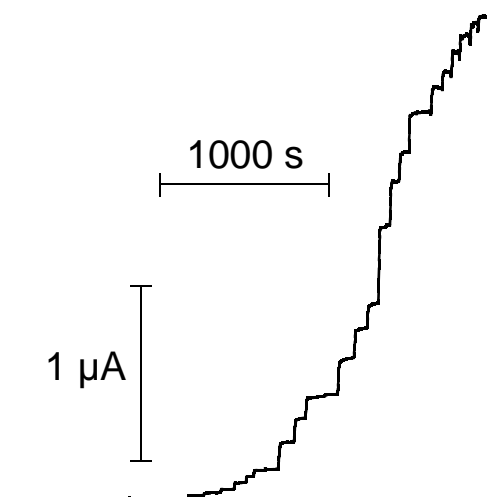
#### *II.4.3.a. Glucose oxydase biotinylée (B-GOX)*

Un biocapteur à glucose a donc été réalisé sur une électrode de platine ( $\varnothing = 5$  mm) modifiée par un film de poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup> par incubation dans une solution de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) contenant la glucose oxydase biotinylée (B-GOX ; 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>). Après un rinçage dans du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) sous agitation, nous avons déterminé les performances de cette électrode pour la détection du glucose par chronoampérométrie à potentiel constant  $E = 0,6$  V vs ECS dans une solution de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7 ; T = 25 °C).

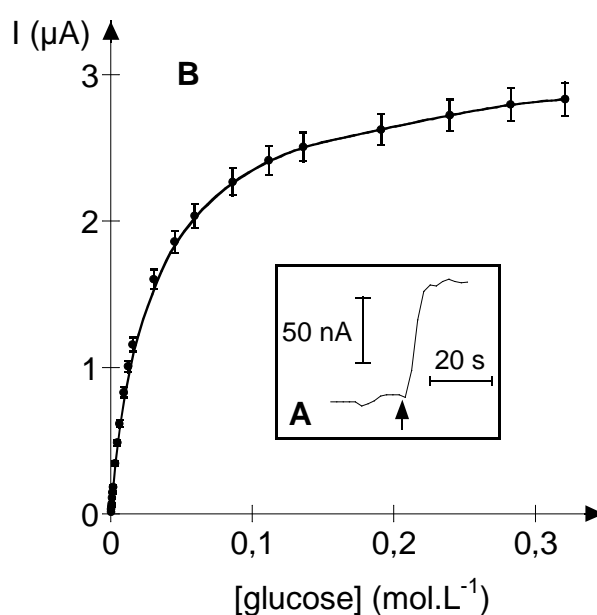
#### *II.4.3.a. $\alpha$ . Résultats expérimentaux*

La réponse ampérométrique de ce capteur, correspondant à l'oxydation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enzymatiquement généré, a été enregistrée au fur et à mesure des injections successives de glucose dans la solution.

La **Figure II-25** présente l'évolution du courant d'oxydation à l'électrode en fonction du temps ; chaque injection de glucose provoque une augmentation de l'intensité du signal qui se stabilise ensuite et apparaît alors sur la courbe comme des « marches d'escaliers ».



**Figure II-25 :** Réponse ampérométrique d'une électrode de platine ( $\varnothing = 5 \text{ mm}$ ) modifiée avec du poly(pyrrole-NTA)/ $\text{Cu}^{2+}$  et incubée dans une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) contenant la glucose oxydase biotinylée (B-GOX ;  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) à  $E = 0,6 \text{ V}$  vs ECS suite aux injections successives de glucose dans la cellule électrochimique.



**Figure II-26 :** **A** - Réponse ampérométrique à une augmentation de concentration en glucose de  $1,6 \text{ mmol.L}^{-1}$  dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) à  $E = 0,6 \text{ V}$  vs ECS obtenues avec une électrode de platine ( $\varnothing = 5 \text{ mm}$ ) modifiée avec du poly(pyrrole-NTA)/ $\text{Cu}^{2+}$ /B-GOX. **B** - Courbe d'étalonnage du glucose obtenue avec l'électrode modifiée dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Comme illustré par le signal de réponse du biocapteur à une injection de  $200 \mu\text{L}$  d'une solution de glucose à  $10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$  (**Figure II-26-A**), le temps de réponse du système est relativement rapide (environ 10 s). La courbe d'étalonnage résultant de ces injections (**Figure II-26-B**) a l'allure typique des courbes classiquement observées pour des biocapteurs

ampérométriques enzymatiques. Une partie linéaire est obtenue aux faibles concentrations en substrat avec une pente de  $0,6 \text{ mA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-2}$  correspondant à la sensibilité du biocapteur à glucose. Aux fortes concentrations en glucose, un plateau montrant la saturation de l'enzyme en substrat apparaît ; celui-ci définit le courant maximum d'oxydation du glucose par la glucose oxydase :  $J_{\text{max}} = 13,2 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ . La constante apparente de Michaelis-Menten, déterminée grâce à la linéarisation de Lineweaver-Burk, est égale à  $K_{\text{M}}^{\text{app}} = 36,6\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9974$ ).

#### *II.4.3.a.β. Comparaison avec les systèmes NTA/Cu<sup>2+</sup>/Histidine et biotine/avidine/biotine*

Afin de bien mettre en évidence les performances du système d'immobilisation basé sur l'interaction NTA/Cu<sup>2+</sup>/biotine, nous avons comparé les différents paramètres obtenus lors de l'étude ampérométrique de l'ancrage de la glucose oxydase biotinylée sur le poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup> (**Figure II-26-B**) avec ceux obtenus lors de l'immobilisation de la glucose oxydase histidinylée (His-GOX ; **Figure II-10-B**) sur ce même polymère d'une part et ceux obtenus précédemment dans l'équipe lors de l'immobilisation de la B-GOX sur le poly(pyrrole-biotine) *via* des ponts avidine d'autre part.

Les données concernant les études ampérométriques de ces trois systèmes sont récapitulées dans le **Tableau II-7**. En tenant compte des différentes activités enzymatiques des glucoses oxydases utilisées, les rapports {sensibilité/activité enzymatique} des capteurs à glucose à base de poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup> sont identiques et environ trois fois plus grandes que celle obtenue avec le poly(pyrrole-biotine) (dans le **Tableau II-7**, les valeurs entre parenthèses ont été rapportées aux activités enzymatiques en solution). Ceci est sûrement dû au fait que la perméabilité de notre polymère est bien plus grande que celle du poly(pyrrole-biotine).

Les courants maximum ( $J_{\text{max}}$ ) obtenus doivent, eux aussi, être rapportés à l'activité enzymatique en solution. Ces valeurs étant directement reliées à la quantité d'enzymes immobilisées sur l'électrode, la comparaison des deux systèmes à base de poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup> permet de dire qu'environ 80 % de la surface est recouverte de B-GOX si on fait l'hypothèse d'un recouvrement surfacique de 100 % avec His-GOX. Par contre, le rapport { $J_{\text{max}}$ /activité enzymatique} obtenu avec le poly(pyrrole-biotine) est plus de cinq fois plus faible que les deux autres mais on ne peut pas relier cette évolution à la quantité d'enzymes

sur l'électrode car les deux polymères ont des perméabilités très différentes qui vont aussi influencer sur cette valeur.

Les constantes apparentes de Michaelis-Menten ( $K_M^{app}$ ) obtenues avec les architectures élaborées sur du poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup> sont du même ordre de grandeur que celle obtenue lorsque la glucose oxydase est en solution<sup>32</sup> ( $33.10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>). Bien qu'il soit un peu audacieux de comparer ces valeurs, cette similitude peut être attribuée à l'excellente perméabilité du poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup> mais aussi à une remarquable biocompatibilité de cette surface modifiée qui confère alors à l'enzyme un environnement équivalent à celui qu'elle aurait en solution aqueuse.

Système	Ppy-NTA/Cu <sup>2+</sup> / B-GOX	Ppy-NTA/Cu <sup>2+</sup> / His-GOX	Ppy-biotine/ avidine/B-GOX
Référence	ce travail	ce travail	[31]
temps de réponse (s)	10	10	5
J <sub>max</sub> (μA.cm <sup>-2</sup> )	13,2 (0,06)	11,5 (0,08)	1 (0,009)
sensibilité (mA.mol <sup>-1</sup> .L.cm <sup>-2</sup> )	0,6 (0,003)	0,5 (0,003)	0,15 (0,001)
seuil de détection (mol.L <sup>-1</sup> )	1,7.10 <sup>-4</sup>	7.10 <sup>-5</sup>	non déterminé
gamme de linéarité (mol.L <sup>-1</sup> )	1,7.10 <sup>-4</sup> – 1,5.10 <sup>-2</sup>	7.10 <sup>-5</sup> – 6,3.10 <sup>-3</sup>	non déterminé
K <sub>M</sub> apparente (mol.L <sup>-1</sup> )	36,6.10 <sup>-3</sup>	37,6.10 <sup>-3</sup>	non déterminé
activité de l'enzyme en solution (U.mg <sup>-1</sup> )	220	150	110

**Tableau II-7 :** Comparatif des valeurs obtenues sur des électrodes modifiées avec le poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup> et la glucose oxydase marquée avec des biotines (B-GOX) ou des histidines (His-GOX) et le système classique poly(pyrrole-biotine)/avidine/B-GOX. Les valeurs entre parenthèses ont été rapportées à l'activité enzymatique en solution.

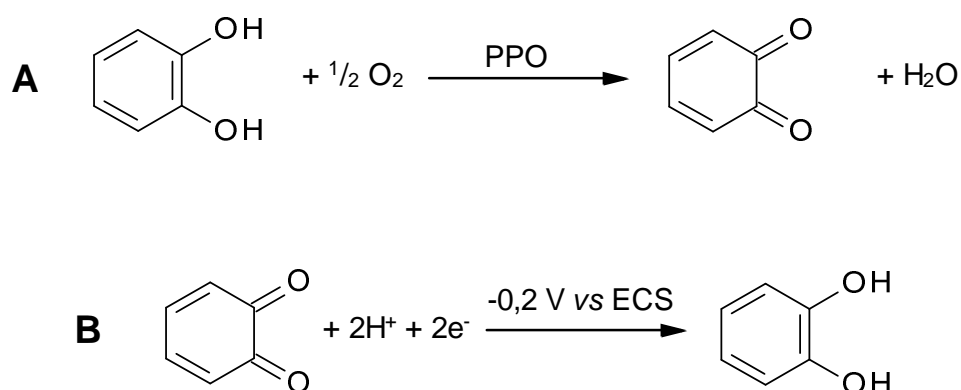
#### II.4.3.b. Polyphénol oxydase biotinylée (B-PPO)

En vue de confirmer les possibilités offertes par ce nouveau système, nous avons réalisé un biocapteur à base de polyphénol oxydase biotinylée (B-PPO) pour la détection du catéchol. Cette étude a été réalisée sur une électrode de carbone vitreux (Ø = 5 mm) modifiée par un

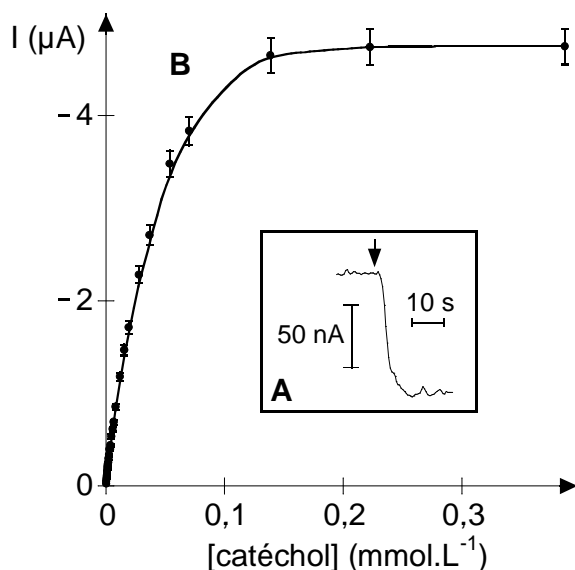
film de poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup> puis incubée dans une solution de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) contenant la polyphénol oxydase biotinylée (B-PPO ; 0,3 mg.mL<sup>-1</sup>). Après un rinçage dans du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) sous vive agitation, les performances de cette électrode ont été déterminées par chronoampérométrie à potentiel constant E = -0,2 V vs ECS dans une solution de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7 ; T = 25 °C).

#### II.4.3.b.α. Résultats expérimentaux

Lors des injections de catéchol (*ortho*-phénol) et en présence d'O<sub>2</sub>, la polyphénol oxydase produit de l'*ortho*-benzoquinone qui va alors être réduite à l'électrode à E = - 0,2 V vs ECS (**Schéma II-15**). Ces injections provoquent alors une augmentation du courant de réduction à l'électrode suivie d'une stabilisation du courant (plateau).



**Schéma II-15** : **A** - activité enzymatique de la polyphénol oxydase (PPO) vis-à-vis de l'*ortho*-diphénol permettant de générer l'*ortho*-benzoquinone. **B** - Détection électrochimique de l'*ortho*-benzoquinone sur électrode de carbone vitreux à E = - 0,2 V vs ECS.



**Figure II-27** : **A** - Réponse ampérométrique à une augmentation de concentration en catéchol de  $8,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$  dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) à  $E = -0,2 \text{ V}$  vs ECS obtenues avec une électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 5 \text{ mm}$ ) modifiée avec du poly(pyrrole-NTA)/ $\text{Cu}^{2+}$ /B-PPO. **B** - Courbe d'étalonnage du catéchol obtenue avec l'électrode modifiée dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

L'ajout de  $100 \mu\text{L}$  d'une solution de catéchol à  $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  est représenté sur la **Figure II-27-A** ; on peut observer que le temps de réponse de l'électrode, de l'ordre de  $10 \text{ s}$ , est relativement rapide. La courbe d'étalonnage résultant de ces injections successives (**Figure II-27-B**) présente une évolution caractéristique aux biocapteurs enzymatiques. Aux faibles concentrations en catéchol, une droite de pente égale à  $656 \text{ mA.mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-2}$  est obtenue et définit la sensibilité de ce biocapteur à catéchol. A partir d'une concentration en catéchol d'environ  $1,5.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , un plateau correspondant à la saturation de la polyphénol oxydase en catéchol apparaît avec un courant de saturation  $J_{\text{max}} = 25,4 \mu\text{A.cm}^{-2}$ . La constante apparente de Michaelis-Menten, déterminée grâce à la linéarisation de Lineweaver-Burk, est égale à  $K_M^{\text{app}} = 7,5.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9992$ ).

#### II.4.3.b.β. Comparaison avec le système biotine/avidine/biotine

Une étude comparative des données relatives à l'ancrage de la polyphénol oxydase biotinylée (B-PPO) sur le poly(pyrrole-NTA)/ $\text{Cu}^{2+}$  et le poly(pyrrole-biotine)/avidine peut alors être tentée.

Comme précédemment, les valeurs des sensibilités et des courants maximum obtenues ont été rapportés à l'activité enzymatique de la B-PPO en solution. De plus, il faut noter que les données relatives au système classique avidine/biotine obtenues au laboratoire<sup>46</sup> ont été



réalisées avec une électrode modifiée par cinq couches de B-PPO reliées entre elles par une couche d'avidine. Cependant, une autre étude réalisée au laboratoire dans laquelle des couches successives de B-PPO ont été déposées sur une électrode modifiée par du poly(pyrrole-biotine) grâce à des ponts avidine entre chaque couche de B-PPO a permis de démontrer que le courant maximum  $J_{\max}$  est directement proportionnel au nombre de couches d'enzyme (au moins jusqu'à 7 couches successivement déposées)<sup>47</sup>. La valeur de  $J_{\max}$  du capteur à base de poly(pyrrole-biotine)<sup>46</sup> a donc été divisée par cinq pour déterminer le courant maximum équivalent à une couche de B-PPO.

Etant donné la similitude des activités spécifiques des enzymes employées avec le poly(pyrrole-NTA) et le poly(pyrrole-biotine), respectivement 5080 et 5150 U.mg<sup>-1</sup>, les valeurs de  $J_{\max}$  enregistrées avec les deux systèmes peuvent être directement comparées. Il apparaît ainsi que la valeur obtenue avec le poly(pyrrole-NTA) égale à 25,4  $\mu\text{A.cm}^{-2}$  est plus de deux fois plus grande que celle obtenue (10,3  $\mu\text{A.cm}^{-2}$ ) lors de l'immobilisation de la polyphénol oxydase biotinylée sur du poly(pyrrole-biotine). Comme nous l'avons déjà mentionné lors des études concernant l'immobilisation de la glucose oxydase biotinylée, l'hydrophobie des films de poly(pyrrole-biotine) pénalise fortement les performances du biocapteur qui en résulte.

Les rapports {sensibilité/activité enzymatique} des deux systèmes sont similaires, on obtient une valeur de sensibilité de 656 mA.mol<sup>-1</sup>.L.cm<sup>-2</sup> pour le système élaboré avec le poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup> et 522,4 mA.mol<sup>-1</sup>.L.cm<sup>-2</sup> pour le système élaboré avec du poly(pyrrole-biotine) et 5 couches successives de B-PPO. Cependant, l'évolution de la sensibilité en fonction du nombre de couches d'enzymes n'est pas forcément linéaire mais dépend tout de même de la quantité d'enzymes<sup>46</sup> ; il est alors délicat de tirer des conclusions ici.

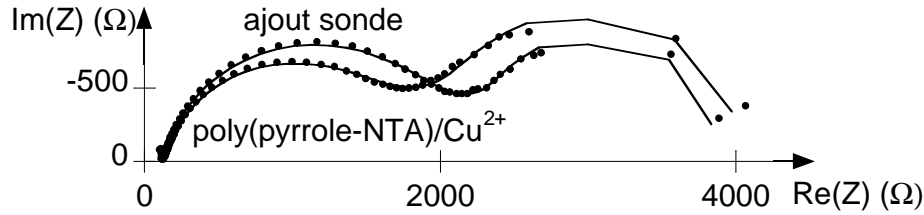
Pour le système élaboré sur du poly(pyrrole-NTA), la constante de Michaelis-Menten  $K_M^{\text{app}}$  est plus faible ( $7,5.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>) que celle obtenue lorsque l'enzyme est en solution<sup>48</sup> ( $1,9.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>). Cependant, il ne faut pas oublier que dans le cas de la PPO, le mécanisme électro-enzymatique est différent : l'injection de catéchol permet de générer enzymatiquement l'*ortho*-benzoquinone qui est ensuite réduite en catéchol à l'électrode ; celui-ci va pouvoir être re-oxydé par l'enzyme. Ce phénomène de recyclage peut modifier la cinétique enzymatique et va donc avoir un ordre de réaction supérieur à 1 vis-à-vis du catéchol, ce qui peut engendrer un abaissement de la valeur du  $K_M^{\text{app}}$ .

### *II.4.3.c. Oligonucléotide biotinylé (B-ADN)*

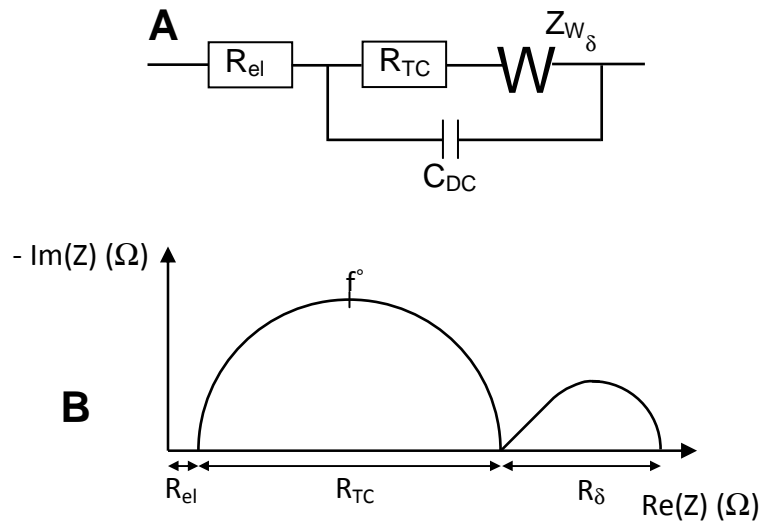
Dans le but d'élargir les compétences de ce nouveau système, nous avons examiné la possibilité d'immobiliser d'autres biomolécules que les enzymes, par exemple l'ADN. La spectroscopie d'impédance électrochimique a été choisie pour réaliser cette détection afin de pouvoir comparer les performances obtenues lors de l'immobilisation d'un ADN biotinylé (B-ADN<sub>sonde</sub>) et celles préalablement exposées lors de l'ancrage d'un ADN histidinylé (His-ADN<sub>sonde</sub>) à la surface du poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup>.

La procédure concernant l'élaboration de cette électrode modifiée est très similaire à celle utilisée pour réaliser le capteur à ADN présenté lors de la première partie de ce chapitre. La première étape concerne l'électropolymérisation du pyrrole-NTA à la surface d'une électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3$  mm). Dans un second temps, cette électrode est plongée dans une solution de tampon acétate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 4,8) contenant du Cu<sup>2+</sup> (10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup>) pendant 20 min sous agitation magnétique puis rincée avec une solution de NaCl (0,5 mol.L<sup>-1</sup>) pendant 5 min sous vive agitation et enfin rincée dans une solution de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) pendant 5 min sous agitation. L'immobilisation de la double hélice d'ADN a été finalement réalisée par incubations successives dans des solutions de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) contenant l'oligonucléotide sonde biotinylé (B-ADN<sub>sonde</sub> ; 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>) puis l'oligonucléotide cible (ADN<sub>cible</sub> ; 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>). Après chaque incubation, l'électrode a été rincée dans du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) sous agitation magnétique.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'ancrage de l'ADN<sub>sonde</sub> biotinylé (B-ADN<sub>sonde</sub>) sur le poly(pyrrole-NTA). Dans cette optique, un premier spectre d'impédance d'une électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3$  mm) modifiée par du poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup> a été enregistré puis l'enregistrement d'un second spectre d'impédance a été réalisé après incubation de cette électrode dans une solution de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) contenant l'ADN<sub>sonde</sub> biotinylé. Ces mesures ont été réalisées dans une solution de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7 ; T = 25 °C) contenant l'hydroquinone (10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup>). Nous avons choisi l'hydroquinone comme sonde électrochimique pour les mêmes raisons que celles exposées lors de la précédente étude réalisée par spectroscopie d'impédance électrochimique (§ II.3.3.a). Dans l'optique de comparer les résultats obtenus pour l'immobilisation d'oligonucléotides sondes histidinylé ou biotinylé, nous avons conservé les paramètres de mesures établis précédemment ( $E_c = 0,4$  V vs ECS ;  $\Delta E = 5$  mV rms ;  $\Omega = 500$  rpm ; gamme de fréquences : de 0,1 Hz à 500 kHz).



**Figure II-28** : Spectres d'impédance réalisés avec une électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ) modifiée par un film de poly(pyrrole-NTA)- $\text{Cu}^{2+}$  puis après incubation dans une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) contenant l'ADN<sub>sonde</sub> biotinylé ( $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). La sonde électrochimique utilisée est l'hydroquinone ( $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  dans le tampon phosphate  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$  ;  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Vitesse de rotation de l'électrode  $\Omega = 500 \text{ rpm}$ , gamme de fréquences :  $0,1 \text{ Hz}$  à  $500 \text{ kHz}$ ,  $E_c = 0,4 \text{ V vs ECS}$  et  $\Delta E = 5 \text{ mV rms}$ . Ce graphe montre les données expérimentales (points) et les données obtenues grâce aux simulations réalisées avec le circuit électrique équivalent modèle établi (courbes).



**Schéma II-16** : **A** - Circuit électrique équivalent choisi pour le système étudié : électrode de carbone vitreux modifiée avec un film poly(pyrrole-NTA)/ $\text{Cu}^{2+}$ /B-ADN<sub>sonde</sub>/ADN<sub>cible</sub> en présence de l'hydroquinone ( $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ). Le circuit se compose de  $R_{el}$  (résistance due à la chute ohmique en solution),  $R_{TC}$  (résistance due au transfert de charges) en série avec  $W_\delta$  (impédance de Warburg avec couche de diffusion  $\delta$  limitée) et en parallèle avec  $C_{DC}$  (capacité de double couche). **B** - Représentation schématique du circuit établi dans le plan de Nyquist.

Les spectres expérimentaux (points) obtenus lors de l'étude de l'ancrage de B-ADN<sub>sonde</sub> sur le poly(pyrrole-NTA) ainsi que les simulations (lignes) obtenues dans Z-view avec le circuit électrique équivalent choisi sont présentés sur la **Figure II-28**. On peut remarquer que l'allure des spectres est similaire à celle des spectres correspondant à l'ancrage de l'ADN<sub>sonde</sub> histidinylé sur le poly(pyrrole-NTA)/ $\text{Cu}^{2+}$  ; nous avons alors appliqué le même circuit électrique équivalent (**Schéma II-16**) pour les deux systèmes. Il s'est avéré que les simulations obtenues dans Z-view sont en bonne corrélation avec les données expérimentales collectées ce qui permet de valider le circuit électrique équivalent choisi.

Les données obtenues lors des simulations dans Z-view sont regroupées dans le **Tableau II-8**. On peut remarquer que plusieurs paramètres présentent une faible variation lors de l'ancrage de l'ADN<sub>sonde</sub> biotinylé : la résistance due à la concentration de l'électrolyte  $R_{el}$  est constante ( $122 \pm 6 \Omega$ ) ainsi que l'angle de décentrage du demi-cercle  $\alpha_{RC}$  ( $77 \pm 4^\circ$ ), la constante de temps caractéristique du phénomène de diffusion  $\tau$  ( $0,63 \pm 0,03$  s) et enfin, l'angle de Warburg  $\alpha_D$  ( $46 \pm 2^\circ$ ). Seule la résistance de transfert de charge  $R_{TC}$  augmente (+  $360 \Omega$ ) pendant que la capacité de double couche  $C_{DC}$  et la fréquence au sommet du demi-cercle  $f^\circ$  diminuent de -  $0,15 \mu F$  et -  $6$  Hz respectivement. Ces observations mettent en évidence un ralentissement du transfert d'électron (diminution de  $f^\circ$ ) qui peut être expliqué par une augmentation de l'encombrement de la surface de l'électrode (variations de  $C_{DC}$  et  $R_{TC}$ ). Par contre, la résistance de diffusion  $R_\delta$  diminue considérablement (-  $560 \Omega$ ) ; comme nous l'avons observé lors de l'ancrage de l'ADN<sub>sonde</sub> histidinylé, cette variation ne serait pas réellement due à une meilleure diffusion de la sonde électrochimique mais plutôt à une accumulation de celle-ci dans la couche de simples brins étant donné que  $\tau$  n'est pas modifié lors de l'ancrage de B-ADN<sub>sonde</sub>.

Cette étude a permis de mettre en évidence l'ancrage de l'ADN<sub>sonde</sub> biotinylé sur le poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup>.

	poly(pyrrole-NTA)/Cu <sup>2+</sup>	poly(pyrrole-NTA)/Cu <sup>2+</sup> /B-ADN <sub>sonde</sub>
<b><math>R_{el}</math> (<math>\Omega</math>)</b>	$122 \pm 6$	$121 \pm 6$
<b><math>R_{TC}</math> (<math>\Omega</math>)</b>	$1540 \pm 80$	$1900 \pm 100$
<b><math>C_{DC}</math> (<math>\mu F</math>)</b>	$1,14 \pm 0,06$	$0,99 \pm 0,05$
<b><math>f^\circ</math> (Hz)</b>	$90 \pm 5$	$84 \pm 4$
<b><math>\alpha_{RC}</math> (<math>^\circ</math>)</b>	$77 \pm 4$	$77 \pm 4$
<b><math>R_\delta</math> (<math>\Omega</math>)</b>	$2370 \pm 120$	$1810 \pm 90$
<b><math>\tau</math> (s)</b>	$0,62 \pm 0,03$	$0,63 \pm 0,03$
<b><math>\alpha_D</math> (<math>^\circ</math>)</b>	$45 \pm 2$	$47 \pm 2$

**Tableau II-8** : Valeurs obtenues à partir de la **Figure II-28** grâce aux simulations des données expérimentales réalisées dans Z-view avec le circuit équivalent choisi.  $R_{el}$  : résistance de l'électrolyte,  $R_{TC}$  : résistance de transfert de charge,  $C_{DC}$  : capacité de double couche,  $f^\circ$  : fréquence au sommet du demi cercle,  $\alpha_{RC}$  : angle de décentrage du demi cercle,  $R_\delta$  : résistance due à la diffusion,  $\tau$  : constante de temps caractéristique du phénomène de diffusion,  $\alpha_D$  : angle de Warburg.

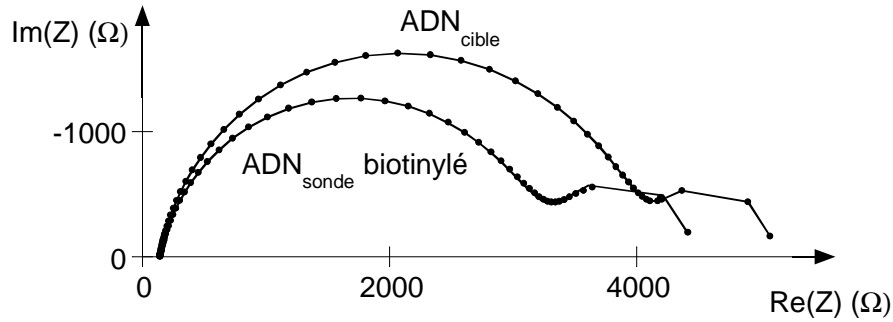
La comparaison de ce système avec celui basé sur l'interaction NTA/Cu<sup>2+</sup>/Histidine est délicate car les deux oligonucléotides sondes utilisés ne possèdent pas le même nombre de bases (ADN<sub>sonde</sub> histidinylé : 22 bases et B-ADN<sub>sonde</sub> : 15 bases) et les techniques d'ancrage sont différentes puisque dans un cas le poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup> est coordonné avec des histidines et dans l'autre cas c'est avec des biotines.

Pour rappel, les variations de résistance de transfert de charge  $\Delta R_{TC}$  observées lors de l'ancrage de l'ADN<sub>sonde</sub> histidinylé ou biotinylé sont égales à + 1660  $\Omega$  et + 360  $\Omega$  respectivement.

On remarque alors que la variation  $\Delta R_{TC}$  est beaucoup moins importante pour B-ADN<sub>sonde</sub> et ceci ne peut pas seulement être expliqué par la différence du nombre de bases des deux ADN. On peut alors supposer que l'interaction NTA/Cu<sup>2+</sup>/Biotine est moins forte que l'interaction NTA/Cu<sup>2+</sup>/Histidine et donc que le recouvrement surfacique sera plus petit dans le cas de B-ADN<sub>sonde</sub>.

Même si ce n'est qu'une hypothèse, cela confirme ce que nous avons observé précédemment (§ II.4.3.a) à savoir que si le recouvrement surfacique est de 100 % pour la glucose oxydase histidinylée, on n'a que 80 % de la surface qui sera occupée par la glucose oxydase biotinylée.

Dans un second temps, nous avons étudié l'évolution des paramètres lors de l'hybridation des deux brins d'ADN en réalisant le spectre d'impédance d'une électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3$  mm) modifiée par un film de poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup>/B-ADN<sub>sonde</sub> puis celui de cette même électrode après incubation dans une solution de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) contenant l'ADN<sub>cible</sub> (0,05 mg.mL<sup>-1</sup>) pendant 30 min. Ces mesures ont été réalisées dans une solution de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7 ; T = 25 °C) contenant l'hydroquinone (10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup>) et nous avons utilisé les mêmes paramètres que ceux établis précédemment ( $E_c = 0,4$  V vs ECS ;  $\Delta E = 5$  mV rms ;  $\Omega = 500$  rpm ; gamme de fréquences : de 0,1 Hz à 500 kHz). Les données expérimentales (points) et les simulations (lignes) obtenues sont présentées sur la **Figure II-29**. L'hybridation est clairement visible sur les spectres d'impédance et une analyse plus approfondie des résultats est présentée dans le **Tableau II-9**.



**Figure II-29** : Spectres d'impédance réalisés avec une électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ) modifiée par un film de poly(pyrrole-NTA)- $\text{Cu}^{2+}$ /ADNsonde-biotinylé puis après incubation dans une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) contenant l'ADN<sub>cible</sub> ( $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). La sonde électrochimique utilisée est l'hydroquinone ( $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  dans le tampon phosphate  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$  ;  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Vitesse de rotation de l'électrode  $\Omega = 500 \text{ rpm}$ , gamme de fréquences :  $0,1 \text{ Hz}$  à  $500 \text{ kHz}$ ,  $E_c = 0,4 \text{ V}$  vs ECS et  $\Delta E = 5 \text{ mV rms}$ . Ce graphe montre les données expérimentales (points) et les données obtenues grâce aux simulations réalisées avec le circuit électrique équivalent modèle établi (courbes).

Comme dans le cas du capteur à ADN réalisé avec un ADN<sub>sonde</sub> histidinylé, beaucoup de paramètres exposés dans le **Tableau II-9** varient peu ou pas du tout : la résistance de l'électrolyte  $R_{el}$  ( $144 \pm 5 \text{ } \Omega$ ), l'angle de décentrage du demi-cercle  $\alpha_{RC}$  ( $80 \pm 3 \text{ }^\circ$ ), la résistance de diffusion  $R_\delta$  ( $1160 \pm 40 \text{ } \Omega$ ), la constante de temps caractéristique du phénomène de diffusion  $\tau$  ( $0,66 \pm 0,02 \text{ s}$ ) et l'angle de Warburg  $\alpha_D$  ( $46 \pm 2 \text{ }^\circ$ ).

	ADN <sub>sonde</sub> biotinylé	ADN <sub>cible</sub> complémentaire
$R_{el}$ ( $\Omega$ )	$145 \pm 5$	$142 \pm 5$
$R_{TC}$ ( $\Omega$ )	$3010 \pm 90$	$3820 \pm 120$
$C_{DC}$ ( $\mu\text{F}$ )	$1,84 \pm 0,06$	$1,60 \pm 0,05$
$f^\circ$ (Hz)	$86 \pm 3$	$78 \pm 3$
$\alpha_{RC}$ ( $^\circ$ )	$79 \pm 3$	$80 \pm 3$
$R_\delta$ ( $\Omega$ )	$1190 \pm 40$	$1120 \pm 40$
$\tau$ (s)	$0,66 \pm 0,02$	$0,66 \pm 0,02$
$\alpha_D$ ( $^\circ$ )	$46 \pm 2$	$46 \pm 2$

**Tableau II-9** : Valeurs obtenues à partir de la **Figure II-29** grâce aux simulations des données expérimentales réalisées dans Z-view avec le circuit équivalent choisi.  $R_{el}$  : résistance de l'électrolyte,  $R_{TC}$  : résistance de transfert de charge,  $C_{DC}$  : capacité de double couche,  $f^\circ$  : fréquence au sommet du demi cercle,  $\alpha_{RC}$  : angle de décentrage du demi cercle,  $R_\delta$  : résistance due à la diffusion,  $\tau$  : constante de temps caractéristique du phénomène de diffusion,  $\alpha_D$  : angle de Warburg.

Les paramètres qui varient lors de l'hybridation des deux brins sont alors la capacité de double couche  $C_{DC}$  (- 0,24  $\mu\text{F}$  soit - 13 %), la résistance de transfert de charge  $R_{TC}$  (+ 810  $\Omega$  soit + 22 %) et la fréquence au sommet du demi-cercle  $f^\circ$  (- 8 Hz soit - 9 %). Ces résultats montrent que la rugosité de surface n'est pas modifiée lors de la formation du duplex ( $\alpha_{RC}$  constant) mais aussi que la vitesse du transfert de charge diminue lors de l'hybridation des deux brins (diminution de  $f^\circ$ ). De plus, on peut imaginer qu'ici aussi la majorité de la couche de diffusion sera à l'extérieur du film polymère puisque  $R_\delta$  varie peu.

Il faut aussi remarquer que  $|\Delta R_{TC}| = |\Delta C_{DC}| + |\Delta f^\circ|$  et que la variation  $\Delta R_{TC}$  sera donc due à un ralentissement du transfert d'électrons combiné à un effet géométrique sur la surface de l'électrode. La surface accessible pour réaliser le transfert d'électron devient plus petite après l'hybridation des deux brins et ralentit alors la vitesse de transfert de charge dans ce cas.

Comme dans l'étude précédente, on peut remarquer que les valeurs obtenues varient beaucoup entre deux électrodes ; par exemple, la valeur de la résistance de transfert de charge  $R_{TC}$  correspondant à l'ancrage de l'ADN<sub>sonde</sub> biotinylé sur le poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup> est égale à 1900  $\Omega$  dans le **Tableau II-8** et 3010  $\Omega$  dans le **Tableau II-9**. Par contre, la même expérience reproduite quatre fois sur différentes électrodes permet d'obtenir des variations reproductibles avec une incertitude relative de 4 %.

#### II.4.4. Bilan

Tout au long de cette partie, nous avons mis en évidence les potentialités de ce nouveau système d'ancrage basé sur l'interaction NTA/Cu<sup>2+</sup>/Biotine. Ce système d'immobilisation a été étudié par chronoampérométrie grâce à la glucose oxydase (GOX) et à la polyphénol oxydase (PPO) ; dans le cas de la GOX, on réalise l'oxydation du produit de la réaction enzymatique tandis que pour la PPO, la détection est basée sur la réduction de l'*ortho*-benzoquinone produite enzymatiquement. Dans la dernière étude, on a utilisé la spectroscopie d'impédance électrochimique pour la détection de l'ADN. Toutes ces études ont permis de valider l'approche de l'ancrage de biomolécules biotinylées sur le poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup> au moyen d'interactions de coordination ; ceci a aussi été confirmée par microscopie à fluorescence.

Il serait intéressant d'étudier les possibilités de régénération d'un tel système en vue de son utilisation future dans le domaine des biocapteurs.

## II.5. Conclusions du Chapitre II

Ce chapitre présente l'élaboration de biocapteurs à base de poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup>. Ce polymère a été élaboré pour la première fois en 2005 au laboratoire<sup>11</sup> et avait été utilisé pour immobiliser de façon réversible une enzyme modèle : la glucose oxydase histidinylée (His-GOX).

Dans la première partie de ce chapitre, l'interaction NTA/Cu<sup>2+</sup>/Histidine a été utilisée pour réaliser l'ancrage d'une biomolécule plus complexe : l'ADN. De part la complexité de cette biomolécule, de nombreuses caractérisations du système ont été réalisées (microscopie, gravimétrie et ampérométrie) avant l'étude du capteur à ADN par impédancemétrie et conductimétrie. L'excellente perméabilité du film polymère a permis d'obtenir un seuil de détection (10<sup>-15</sup> mol.L<sup>-1</sup>) très compétitive. Cette méthode originale d'immobilisation couple les avantages de l'adressage électrochimique des polymères conducteurs électroniques à la réversibilité de l'interaction affine NTA/Cu<sup>2+</sup>/Histidine.

Dans la seconde et dernière partie du chapitre, nous avons décrit l'immobilisation de biomolécules (enzymes et ADN) biotinylées sur le poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup>. Cette nouvelle interaction affine peut être d'un grand intérêt pour la conception de biocapteurs enzymatiques, d'immunocapteurs ou de puces à ADN.

Ces deux systèmes affins ont pu être comparés lors de l'ancrage des glucose oxydases (His-GOX et B-GOX). Les performances (sensibilité, J<sub>max</sub>, K<sub>M</sub><sup>app</sup>, temps de réponse, seuil de détection et gamme de linéarité) sont similaires même s'il semble que l'interaction NTA/Cu<sup>2+</sup>/histidine permet d'immobiliser une quantité de GOX légèrement plus importante (~ 20 %). Par contre, il est aisé d'obtenir des biomolécules biotinylées qui peuvent être commerciales ou obtenues simplement en moins d'une journée (synthèse, purification, dosage et test de l'activité enzymatique) grâce aux kits commerciaux de biotinylation existants. Ceci est alors un réel atout pour la deuxième interaction décrite.

Le poly(pyrrole-NTA) est donc un polymère très prometteur qui peut servir de plateforme d'ancrage de biomolécules histidinylées ou biotinylées ; il représente une alternative séduisante au système classique avidine/biotine.



## Bibliographie

- (1) Archibald, D. D. ; Qadri, S. B. ; Gaber, B. P. *Langmuir* **1996**, *12*, 538-546.
- (2) Harju, L. ; Sara, R. *Anal. Chim. Acta* **1977**, *91*, 393-396.
- (3) Porath, J. ; Carlsson, J. ; Olsson, I. ; Belfrage, G. *Nature* **1975**, *258*, 598-599.
- (4) Dietrich, C. ; Boscheinen, O. ; Scharf, K. ; Schmitt, L. ; Tampe, R. *Biochemistry* **1996**, *35*, 1100-1105.
- (5) Hartono, D. ; Xue, C. ; Yang, K. ; Yung, L. L. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 3574-3579.
- (6) Sigal, G. B. ; Bamdad, C. ; Barberis, A. ; Strominger, J. ; Whitesides, G. M. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 490-497.
- (7) Lee, J. K. ; Kim, Y. ; Chi, Y. S. ; Yun, W. S. ; Choi, I. S. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 7665-7673.
- (8) Rigler, P. ; Ulrich, W. ; Hoffmann, P. ; Mayer, M. ; Vogel, H. *ChemPhysChem* **2003**, *4*, 268-275.
- (9) Smith, B. M. ; Lappi, S. E. ; Brewer, S. H. ; Dembowy, S. ; Belyea, J. ; Franzen, S. *Langmuir* **2004**, *20*, 1184-1188.
- (10) Yu, T. ; Wang, Q. ; Johnson, D. ; Wang, M. ; Ober, C. *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*, 1303-1309.
- (11) Haddour, N. ; Cosnier, S. ; Gondran, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5752-5753.
- (12) Garnier, F. (BIO MERIEUX), Brevet, Electroactive Probe Comprising A Chelating Agent And A Metal Ion, EP1458790, **2004**.
- (13) Thompson, L. B. ; Mack, N. H. ; Nuzzo, R. G. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 4301.
- (14) Nieba, L. ; Nieba-Axmann, S. E. ; Persson, A. ; Hämäläinen, M. ; Edebratt, F. ; Hansson, A. ; Lidholm, J. ; Magnusson, K. ; Karlsson, Å. F. ; Plückthun, A. *Anal. Biochem.* **1997**, *252*, 217-228.
- (15) Verbelen, C. ; Gruber, H. J. ; Dufrêne, Y. F. *J. Mol. Recognit.* **2007**, *20*, 490-494.
- (16) Schmitt, L. ; Ludwig, M. ; Gaub, H. E. ; Tampé, R. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 3275-3285.
- (17) Aravinda, C. ; Cosnier, S. ; Chen, W. ; Myung, N. V. ; Mulchandani, A. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1451-1455.
- (18) Clayden, J. ; Warren, S. ; Greeves, N. *Chimie organique*, Éd. De Boeck Université, **2002**.
- (19) Deronzier, A. ; Moutet, J. C. *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 249-255.
- (20) Diaz, A. F. ; Castillo, J. ; Kanazawa, K. K. ; Logan, J. A. ; Salmon, M. ; Fajardo, O. J. *Electroanal. Chem.* **1982**, *133*, 233-239.

- (21) Morse, N. J. ; Rosseinsky, D. R. ; Mortimer, R. J. ; Walton, D. J. *J. Electroanal. Chem.* **1988**, 255, 119-141.
- (22) Gao, Z. ; Chen, B. ; Zi, M. *J. Electroanal. Chem.* **1994**, 365, 197-205.
- (23) Gao, Z. ; Minxian, Z. ; Beshen, C. *J. Electroanal. Chem.* **1994**, 373, 141-148.
- (24) Giroud, F. ; Gorgy, K. ; Gondran, C. ; Cosnier, S. ; Pinacho, D. G. ; Marco, M. ; Sánchez-Baeza, F. J. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 8405-8409.
- (25) Dubois, M. P. ; Thèse de doctorat : « Conception d'un biocapteur électrochimique pour la détection des interactions oligosaccharides/protéines. », Université Joseph Fourier, Grenoble, **2006**.
- (26) Ionescu, R. E. ; Gondran, C. ; Gheber, L. A. ; Cosnier, S. ; Marks, R. S. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 6808-6813.
- (27) Sauerbrey, G. *Z. Phys. A : Hadrons Nucl.* **1959**, 155, 206-222.
- (28) Piro, B. ; Reisberg, S. ; Noel, V. ; Pham, M. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 3126-3131.
- (29) Voet, D. ; Voet, J. G. ; Rousseau, G. *Biochimie*, Éd. De Boeck Université, **2005**.
- (30) Lineweaver, H. ; Burk, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, 56, 658-666.
- (31) Cosnier, S. ; Stoytcheva, M. ; Senillou, A. ; Perrot, H. ; Furriel, R. P. M. ; Leone, F. A. *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3692-3697.
- (32) Swoboda, B. ; Massey, V. *J. Biol. Chem.* **1964**, 240, 2209-2215.
- (33) Hale, P. D. ; Boguslavsky, L. I. ; Inagaki, T. ; Karan, H. I. ; Lee, H. S. ; Skotheim, T. A. ; Okamoto, Y. *Anal. Chem.* **1991**, 63, 677-682.
- (34) Bartlett, P. N. ; Whitaker, R. G. *J. Electroanal. Chem.* **1987**, 224, 37-48.
- (35) Mailley, P. ; Thèse de doctorat : « Immobilisation d'enzymes dans des poly(pyrrole-amphiphiles) : caractérisation et application à la biodétection ampérométrique du glucose. », Université Joseph Fourier, Grenoble, **1995**.
- (36) Barsoukov, E. ; Macdonald, J. R. *Impedance spectroscopy: theory, experiment, and applications*, Éd. Wiley and Sons, **2005**.
- (37) Girault, H. H. *Électrochimie physique et analytique*; Éd. PPUR presses polytechniques, **2007**.
- (38) Gondran, C. ; Fabry, P. *Capteurs électrochimiques: Fonctionnement, utilisation, conception ; Cours et exercices corrigés*; Éd. Ellipses, **2008**.
- (39) Zhang, K. ; Ma, H. ; Zhang, L. ; Zhang, Y. *Electroanalysis* **2008**, 20, 2127-2133.
- (40) Kjällman, T. H. M. ; Peng, H. ; Soeller, C. ; Travas-Sejdic, J. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 9460-9466.
- (41) Haddour, N. ; Thèse de doctorat : « Réalisation d'assemblages biologiques électroactifs : application aux biocapteurs d'affinité. », Université Joseph Fourier, Grenoble, **2005**.

- (42) Wilchek, M. ; Bayer, E. A. *Anal. Biochem.* **1988**, *171*, 1-32.
- (43) Sigel, H. ; McCormick, D. B. ; Griesser, R. ; Prijs, B. ; Wright, L. D. *Biochemistry* **1969**, *8*, 2687-2695.
- (44) Griesser, R. ; Siegel, H. ; Wright, L. D. ; McCormick, D. B. *Biochemistry* **1973**, *12*, 1917-1922.
- (45) Griesser, R. ; Prijs, B. ; Sigel, H. ; Foery, W. ; Wright, L. D. ; McCormick, D. B. *Biochemistry* **1970**, *9*, 3285-3293.
- (46) Mousty, C. ; Bergamasco, J. ; Wessel, R. ; Perrot, H. ; Cosnier, S. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2890-2897.
- (47) Cosnier, S. ; Gondran, C. ; Le Pellec, A. ; Senillou, A. *Anal. Lett.* **2001**, *34*, 61.
- (48) Duckworth, H. W. ; Coleman, J. E. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 1613-1625.



# Chapitre III

Biocapteurs enzymatiques à base de  
nanotubes de carbone.



## **Chapitre III : Biocapteurs enzymatiques à base de nanotubes de carbone.**

### **III.1. Généralités**

Du fait de leurs propriétés exceptionnelles (haute surface spécifique<sup>1</sup> et propriétés mécaniques<sup>2</sup> et électriques<sup>3</sup> remarquables), les nanotubes de carbones (CNTs) sont de bons candidats en vue d'élaborer des architectures biomoléculaires tridimensionnelles. Cependant, il faut réussir à contrôler leur dépôt sur la surface des électrodes et la reproductibilité de ce dépôt ainsi que leur fonctionnalisation éventuelle pour permettre l'immobilisation de biomolécules sans perte de leur activité biologique.

Les nanotubes de carbone ont été observés pour la première fois en 1952 par Radushkevich et Lukyanovich (Russie) en microscopie électronique en transmission ; les images de ces CNTs ont d'ailleurs été publiées dans le Journal de Chimie Physique de Russie<sup>4</sup>.

En 1976, Oberlin et al. ont décrit la synthèse de « fibres de carbone » par décomposition du benzène<sup>5</sup> (pyrolyse en présence de dihydrogène) ; ces « fibres de carbone » étaient, en réalité, des CNTs.

Finalement, en 1991, Iijima publie des clichés de nanotubes de carbone obtenus par décharge par arc électrique et visualisés par microscopie électronique en transmission à haute résolution (HRTEM) ; ceux-ci seront tout d'abord nommés « microtubules » puis « nanotubes de carbone » sous l'influence de la communauté scientifique internationale.

A partir de cette date, ces nanotubes de carbone ont attiré l'attention de nombreux groupes de recherche<sup>6</sup> afin d'étudier leur solubilisation, leur fonctionnalisation et même leur incorporation dans les biocapteurs ou les biopiles.

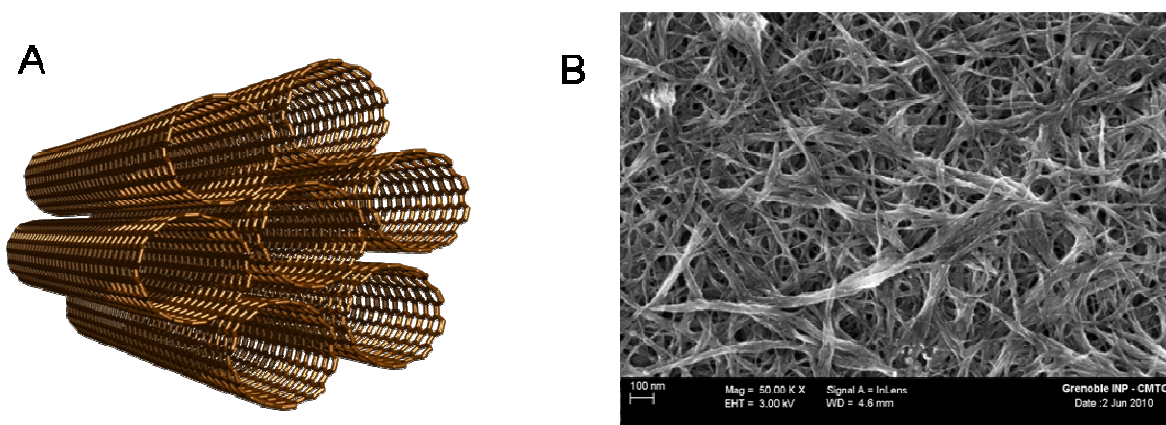
Dans un premier temps, nous avons utilisé ces nanotubes de carbone pour réaliser la fonctionnalisation multiple d'électrodes dans le but de montrer les possibilités offertes par ce type de matériau pour l'élaboration de biocapteurs. Dans un second temps, ils ont été utilisés dans des systèmes hybrides CNTs/hydrogénase/polymère qui pourront servir à la bioconversion de l'énergie.

### III.1.1. Les nanotubes de carbone (CNTs)

Comme nous avons pu le voir précédemment, les nanotubes de carbone sont des nanostructures qui occupent une place particulière dans le domaine des nanotechnologies. Malgré le fait que leur découverte date de 1952<sup>4</sup>, le nombre de publications scientifiques traitant des nanotubes de carbone connaît maintenant une évolution exponentielle. Afin de bien comprendre leur intérêt, la structure des différents types de nanotubes de carbone sera décrite dans une première partie tandis que la seconde partie de ce paragraphe traitera de leurs propriétés.

#### III.1.1.a. Les différentes structures des nanotubes de carbone

Tout d'abord, il existe différents types de CNTs : les nanotubes de carbone mono-paroi (single walled carbon nanotubes ou SWCNTs) ou multi-parois (multi walled carbon nanotubes ou MWCNTs). De façon générale, les nanotubes de carbone ont un diamètre de l'ordre du nanomètre tandis que leur longueur peut varier de la centaine de nanomètres à la dizaine de micromètres. Le facteur de forme qui correspond au rapport {longueur/diamètre} peut alors valoir plusieurs milliers.



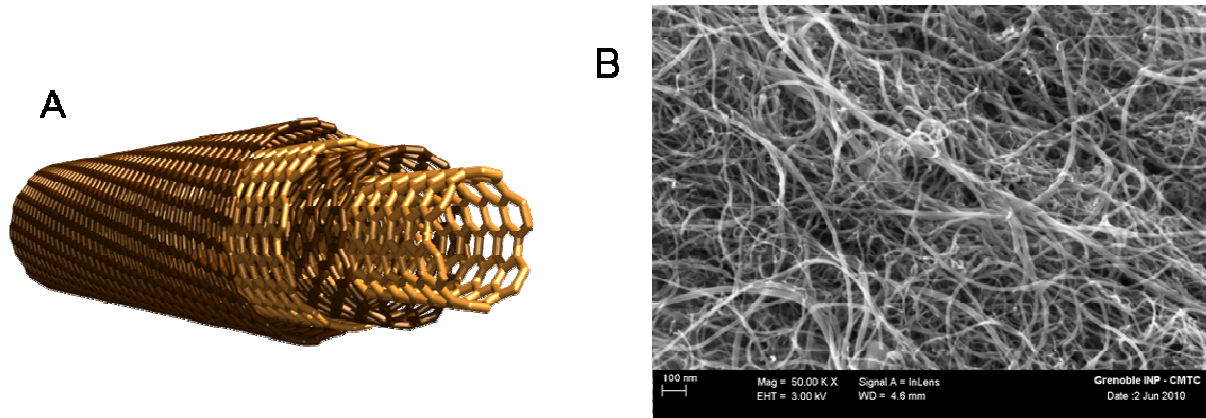
**Figure III-1** : **A** – Représentation schématique des nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs) et **B** – cliché obtenu en microscopie électronique à balayage d'un dépôt de SWCNTs.

La structure des SWCNTs peut être représentée comme un feuillet de graphène enroulé sur lui-même de manière à former un tube « sans couture » (**Figure III-1-A**). Les SWCNTs sont souvent organisés sous forme de fagots (regroupement cylindrique de plusieurs SWCNTs) comme on peut le voir sur la **Figure III-1-B** représentant un cliché obtenu par



microscopie électronique à balayage d'un dépôt de SWCNTs. Cette technique permet d'obtenir des informations structurales sur l'échantillon (densité et taille des fagots présents) mais aussi des indications concernant la pureté de celui-ci. On remarque bien la grande différence de taille des nanostructures présentées et aussi qu'il reste difficile d'observer des SWCNTs uniques par microscopie électronique à balayage classique du fait du fort enchevêtrement des SWCNTs. Cette technique permet donc d'effectuer principalement une observation qualitative des dépôts de CNTs.

Les nanotubes de carbone multi-parois (MWCNTs) ont, à la base, la même structure que les SWCNTs mais ils sont constitués de plusieurs cylindres de graphène coaxiaux (**Figure III-2-A**). Les différentes couches de graphène sont séparées de 0,34 nm ce qui représente la distance qui sépare les feuillets de graphène dans le graphite. L'observation d'un dépôt de MWCNTs par microscopie électronique à balayage (**Figure III-2-B**) permet d'observer que ce type de nanotubes forme beaucoup moins d'agrégats que les SWCNTs mais aussi que le diamètre des nanotubes est bien plus grand. Le diamètre des MWCNTs, en effet, dépend du nombre de parois qui les constituent.



**Figure III-2** : **A** – Représentation schématique des nanotubes de carbone multi-parois (MWCNTs) et **B** – cliché obtenu en microscopie électronique à balayage d'un dépôt de MWCNTs.

#### **III.1.1.b. Synthèse des nanotubes de carbone**

Il existe deux grandes familles pour réaliser la synthèse des nanotubes de carbone : les synthèses à haute (> 3000 °C) et moyennes (500 - 1200 °C) températures.

Concernant les synthèses à hautes températures, ces dernières peuvent être réalisées par décharge d'arc électrique<sup>7, 8</sup>, ablation par laser<sup>9, 10</sup> ou synthèse dans un four solaire<sup>11, 12</sup>. Cependant, ces techniques ne permettent pas de produire de grandes quantités de nanotubes et ceci est problématique devant la forte demande mondiale. De plus, les nanotubes produits contiennent un fort taux d'impuretés (plus de 25 % massique de carbone amorphe, fullerènes ou particules de catalyseur) qui entraînent alors un coût important de purification.

Les synthèses à moyenne températures sont basées sur le procédé CCVD<sup>13, 14</sup> (Catalytic Chemical Vapor Deposition ou décomposition chimique et catalytique en phase vapeur). Ce procédé pouvant fonctionner en continu, il permet de synthétiser des nanotubes à une plus grande échelle qui convient mieux aux besoins mondiaux actuels. Dans la méthode CCVD classique, la source de carbone est un gaz de type hydrocarbure (souvent le méthane ou l'éthylène) décomposé à des températures variant entre 500 et 1100 °C en présence d'un catalyseur (nanoparticules de Fer, Cobalt ou Nickel le plus souvent). Cette technique permet d'obtenir des nanotubes plus purs (moins de 25% massique d'impuretés) et nécessitant donc une purification moins coûteuse. Les MWCNTs utilisés au laboratoire et fournis par la société Nanocyl ont été produits par CCVD. Par contre, les SWCNTs étudiés dans ce chapitre sont commercialisés par la société Unidym et ont été synthétisés par le procédé HIPCO® (High Pressure Carbon Monoxide ou décomposition du monoxyde de carbone à haute pression). Cette technique de production fait partie des techniques CCVD mais la source de carbone est ici le monoxyde de carbone (CO) et non plus un hydrocarbure ; elle a été développée aux Etats-Unis en 1998 par le groupe de Smalley<sup>15</sup>. L'originalité de ce procédé vient du fait que le catalyseur est formé *in situ* par décomposition du gaz précurseur (pentacarbonyle de Fer) qui est injecté dans l'enceinte en même temps que le CO ; cette enceinte est maintenue sous une pression de 10 atm et chauffée à 1200 °C. Cette technique permet d'obtenir des nanotubes exempts d'impuretés graphitiques mais pouvant contenir jusqu'à 50 % massique de catalyseur résiduel en fin de synthèse qui est ensuite éliminé par voie chimique et ne représente alors que 10 à 20 % massique dans le produit commercial.

### ***III.1.1.c. Propriétés des nanotubes de carbone***

Les principales propriétés des nanotubes de carbone sont leurs conductivités thermique et électrique ainsi que leur surface spécifique.

Les propriétés de transport électrique des nanotubes de carbone dépendent du type de CNTs considérés car ils peuvent être métalliques ou semi-conducteurs en fonction de leur géométrie<sup>3, 16</sup>. De même, les CNTs présentent une conductivité thermique remarquable<sup>17, 18</sup>. Les nanotubes de carbone ayant un caractère métallique ont donc une conductivité électrique excellente. Les nanotubes de carbone ont aussi des propriétés mécaniques exceptionnelles puisqu'ils sont environ cent fois plus résistants que l'acier tout en étant environ six fois plus légers que celui-ci<sup>2, 19</sup>.

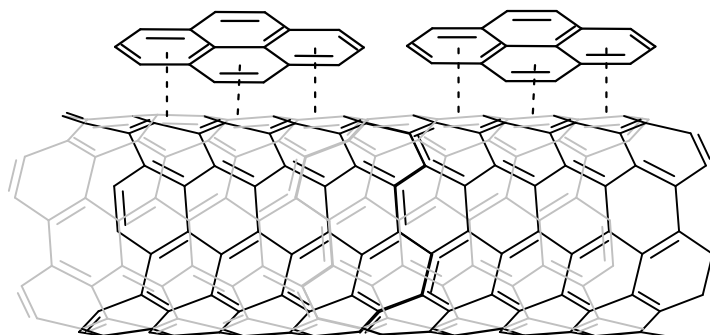
Enfin, la propriété la plus intéressante pour l'élaboration de biocapteurs ou de biopiles, mais aussi dans le cadre de ce travail, reste leur haute surface spécifique<sup>1</sup> qui a été estimée à 1000 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>.

### III.1.2. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone par $\pi$ -stacking grâce à l'interaction CNTs/pyrène

Depuis une dizaine d'années, la fonctionnalisation des nanotubes de carbone est devenue un axe de recherche en plein développement<sup>20</sup>. Cette modification de surface peut être réalisée dans le but d'améliorer la solubilisation des nanotubes de carbone ou encore avec des groupes fonctionnels permettant, par exemple, l'ancrage de macromolécules biologiques. Différentes approches ont été entreprises pour réaliser ces modifications : la fonctionnalisation des défauts ponctuels des nanotubes de carbone, la formation de liaisons covalentes ou non-covalentes avec les nanotubes de carbone, le remplissage de la cavité interne des tubes ou encore l'élaboration de matériaux composites nanotubes de carbone/polymère.

Les résultats présentés dans ce chapitre concernent principalement des nanotubes fonctionnalisés par des interactions non-covalentes de type  $\pi$ - $\pi$  qui s'établissent entre la paroi des nanotubes et la molécule de pyrène<sup>21, 22</sup> comme on peut le voir sur le **Schéma III-1**. Ce type d'interactions se forme entre des composés organiques contenant des parties aromatiques (nanotubes de carbone, graphite, anthracène, coronène, pyrène, pentacène...) et sont provoquées par le recouvrement intermoléculaire des orbitales  $\pi$  de ces systèmes conjugués. Cette interaction devient de plus en plus forte quand le nombre d'électrons  $\pi$  des molécules

considérées augmente ; les nanotubes de carbone sont donc d'excellents candidats pour réaliser ce type de liaisons non-covalentes.



**Schéma III-1** : Représentation schématique de l'interaction pyrène/nanotubes de carbone par  $\pi$ -stacking.

## III.2. Fonctionnalisation multiple de SWCNTs

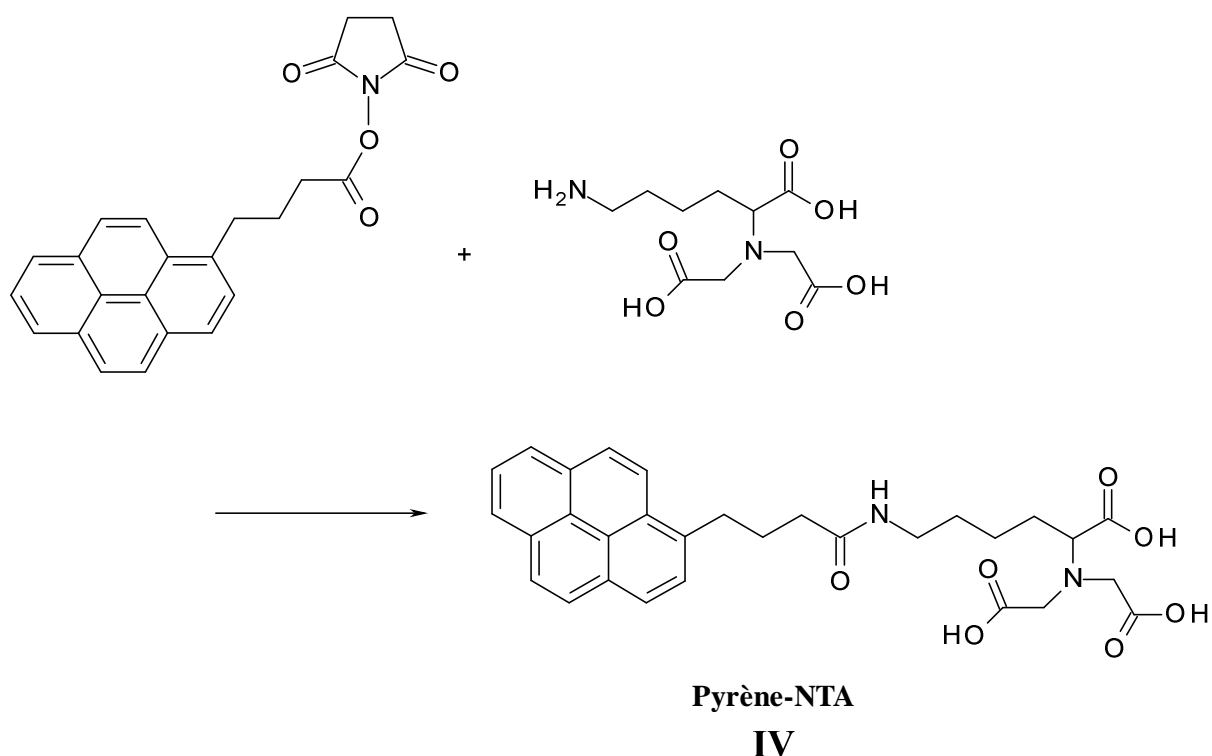
L'interaction pyrène/nanotubes de carbone a donc été mise à profit pour réaliser la fonctionnalisation multiple des nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs). Dans cette optique, nous avons synthétisé différents pyrènes modifiés avec des groupements fonctionnels intervenants dans des systèmes affins (biotine/avidine, adamantane/ $\beta$ -cyclodextrine, NTA/ $\text{Cu}^{2+}$ /histidine). Cette partie du chapitre décrira alors la synthèse des différents pyrènes et les caractérisations effectuées pour chaque système affin considéré pour aboutir finalement à l'architecture « multi-fonctionnalisée ».

### III.2.1. Synthèse des pyrènes fonctionnalisés

#### III.2.1.a. Le pyrène-NTA

La synthèse du pyrène-acide nitrilotriacétique (pyrène-NTA) a été réalisée par une stratégie assez similaire à celle utilisée pour la synthèse du pyrrole-NTA. Dans le cas du pyrène (**Schéma III-2**), les produits de départ étant tous commerciaux nous n'avons pas eu besoin de former l'ester activé du pyrène. Le couplage de cet ester activé du pyrène avec la  $\text{N}_{\alpha},\text{N}_{\alpha}$ -bis(carboxyméthyl)-L-lysine a donc été réalisé en milieu basique DMF-eau sous agitation pendant 3 jours à 60 °C. Après évaporation du solvant, le produit a été repris dans l'eau et nous avons pu réaliser une acidification du milieu avec l'acide chlorhydrique pour

faire précipiter le produit final : le pyrène-NTA (**IV**). Après filtration et lavage du précipité à l'eau, on obtient le produit **IV** pur avec un bon rendement  $\eta = 83 \%$ .

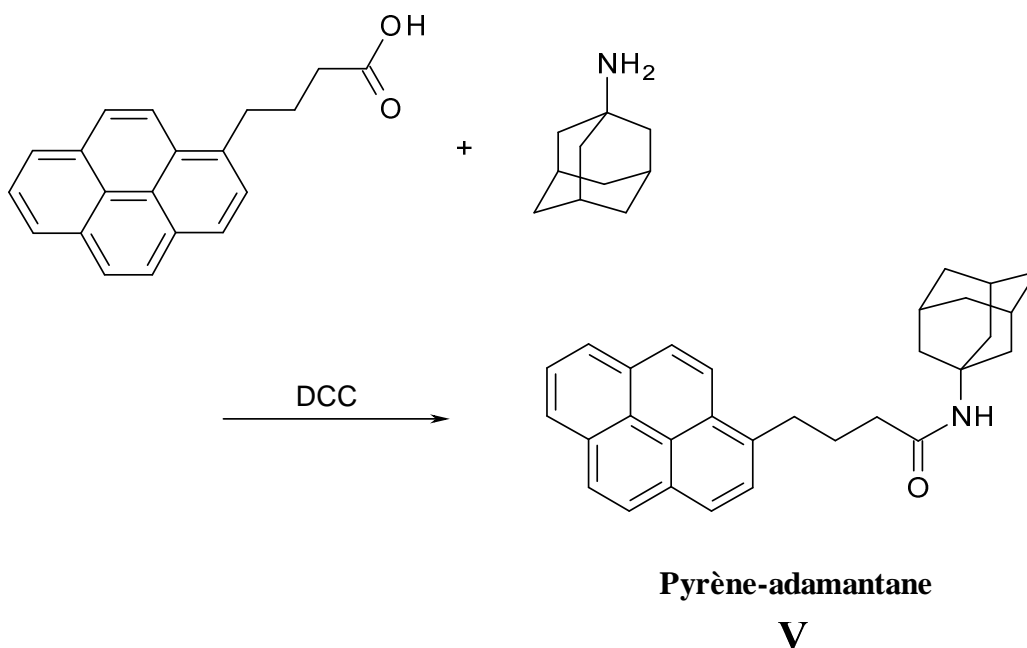


**Schéma III-2** : Principe de la synthèse du pyrène-NTA.

Le pyrène-NTA (produit **IV**) a finalement été caractérisé par RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ), IR, UV-visible et spectrométrie de masse (partie expérimentale).

### III.2.1.b. Le pyrène-adamantane

Concernant la synthèse du pyrène-adamantane, elle a été réalisée *via* un couplage amide classique entre les groupements acide carboxylique et amine en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) comme indiqué sur le **Schéma III-3**. Le mélange, réalisé dans le dichlorométhane sec, a été maintenu sous agitation pendant 3 jours et le pyrène-adamantane (produit **V**) est obtenu après chromatographie sur colonne de silice (100%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) sous forme d'une poudre jaune clair avec un rendement de  $\eta = 74 \%$ .

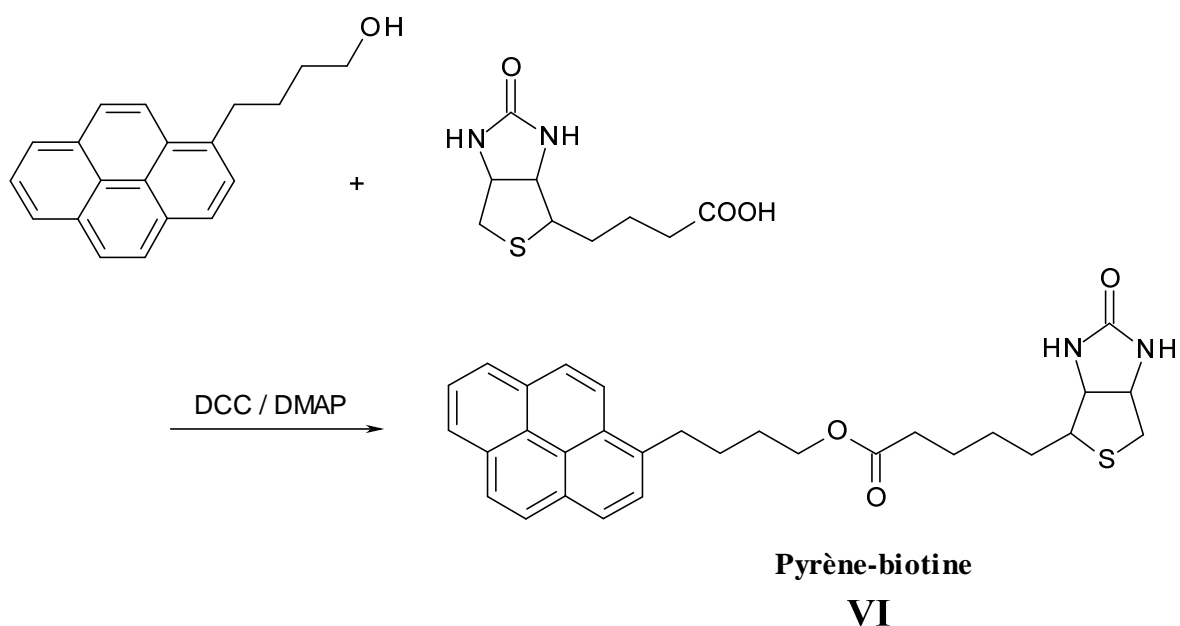


**Schéma III-3 :** Principe de la synthèse du pyrène-adamantane.

Comme précédemment, le pyrène-adamantane (produit **V**) a finalement été caractérisé par RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ), IR, UV-visible et spectrométrie de masse (partie expérimentale).

### *III.2.1.c. Le pyrène-biotine*

La stratégie développée pour synthétiser le pyrène-biotine est basée sur la réaction d'estérification de Steglich<sup>23</sup> qui permet la formation d'un ester par couplage d'un acide carboxylique avec un alcool en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC : agent de couplage) et de 4-(diméthylamino)-pyridine (DMAP : catalyseur). Le pyrène-butanol et la biotine ont donc été mis en présence de DCC et de DMAP dans du dichlorométhane (**Schéma III-4**). Après réaction sous agitation et à température ambiante pendant une semaine, la solution est concentrée par évaporation et le pyrène-biotine a ensuite été purifié par chromatographie sur colonne de silice (95 %  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / 5 % EtOH) puis obtenu sous forme d'une poudre jaune avec un rendement de  $\eta = 40\%$ .



**Schéma III-4 :** Principe de la synthèse du pyrène-biotine.

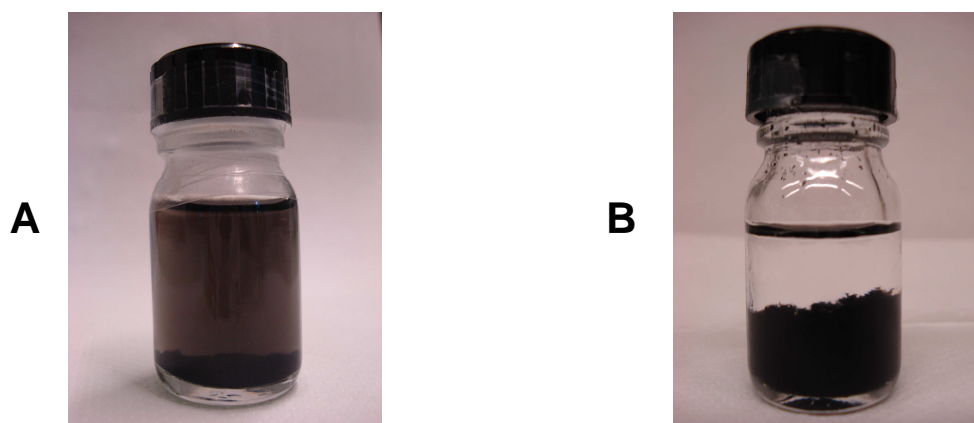
Le pyrène-biotine (produit **VI**) a, lui aussi, été caractérisé par RMN ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ), IR, UV-visible et spectrométrie de masse (partie expérimentale).

### III.2.2. Prétraitement, dispersion et dépôt des nanotubes de carbone mono-paroi

Les nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs) utilisés dans cette étude ne peuvent pas être correctement dispersés dans le THF sans prétraitement. Afin de palier cela, une méthode de prétraitement des SWCNTs a été mise au point au laboratoire<sup>24</sup> : les nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs) commerciaux (environ 20 mg ; production HIPCO<sup>®</sup>, purifiés, Unidym) sont tout d'abord dispersés dans environ 200 mL de THF dans un bain à ultrasons pendant 2 heures. Après évaporation du solvant, une fine poudre de SWCNTs est obtenue et re-dispersée dans environ 200 mL de DMF aux ultrasons pendant 1 heure. Après sédimentation des SWCNTs non-dispersés, la solution obtenue est filtrée sur une membrane en Téflon<sup>®</sup> (PTFE ; diamètre des pores = 0,45  $\mu\text{m}$ ) en prenant soin de ne pas sécher la membrane. Les SWCNTs sont ensuite lavés avec du THF puis les nanotubes de carbone mono-paroi sont finalement repris et agités mécaniquement dans de l'éther diéthylique afin d'éviter que les SWCNTs ne forment des agrégats. L'agitation mécanique est maintenue jusqu'à

évaporation à sec de l'éther diéthylique et les SWCNTs prétraités sont finalement séchés à l'étuve à 70 °C pendant 12 heures.

Ce prétraitement permet d'obtenir une bonne dispersion de nanotubes de carbone mono-paroi ( $0,1\text{mg.mL}^{-1}$  dans le THF) après mise aux ultrasons pendant seulement 15 à 30 minutes et sans utiliser de tensio-actif. La **Figure III-3** montre le type de dispersions que l'on peut obtenir avec (**Figure III-3-A**) ou sans (**Figure III-3-B**) prétraitement. Ces nanotubes peuvent ensuite être déposés à la surface des électrodes de façon reproductible.



**Figure III-3** : Dispersions de nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs) dans le THF obtenues après 15 minutes dans le bain à ultrasons : **A** - avec prétraitement et **B** - sans prétraitement.

Le dépôt des nanotubes de carbone mono-paroi peut alors être effectué à partir de la dispersion obtenue. Après mise aux ultrasons, la dispersion est laissée à stabiliser pendant 12 heures et les dépôts sont effectués en déposant  $20\ \mu\text{L}$  de la dispersion (SWCNTs ;  $0,1\text{mg.mL}^{-1}$  dans le THF) sur une électrode de platine ( $\varnothing = 5\ \text{mm}$ ). Cette première couche de nanotubes est finalement séchée sous vide et on peut ensuite procéder au dépôt de la seconde couche de la même manière. Une étude réalisée au laboratoire a permis de démontrer que le courant optimum était obtenu pour trois couches de nanotubes de carbone mono-paroi déposées sur l'électrode lors de l'utilisation du système SWCNTs/pyrène-biotine/avidine/B-GOX<sup>25</sup> ; nous avons donc répété trois fois les étapes de dépôt de la dispersion de SWCNTs et de séchage pour obtenir une électrode modifiée avec  $3 \times 20\ \mu\text{L}$  de SWCNTs au final.



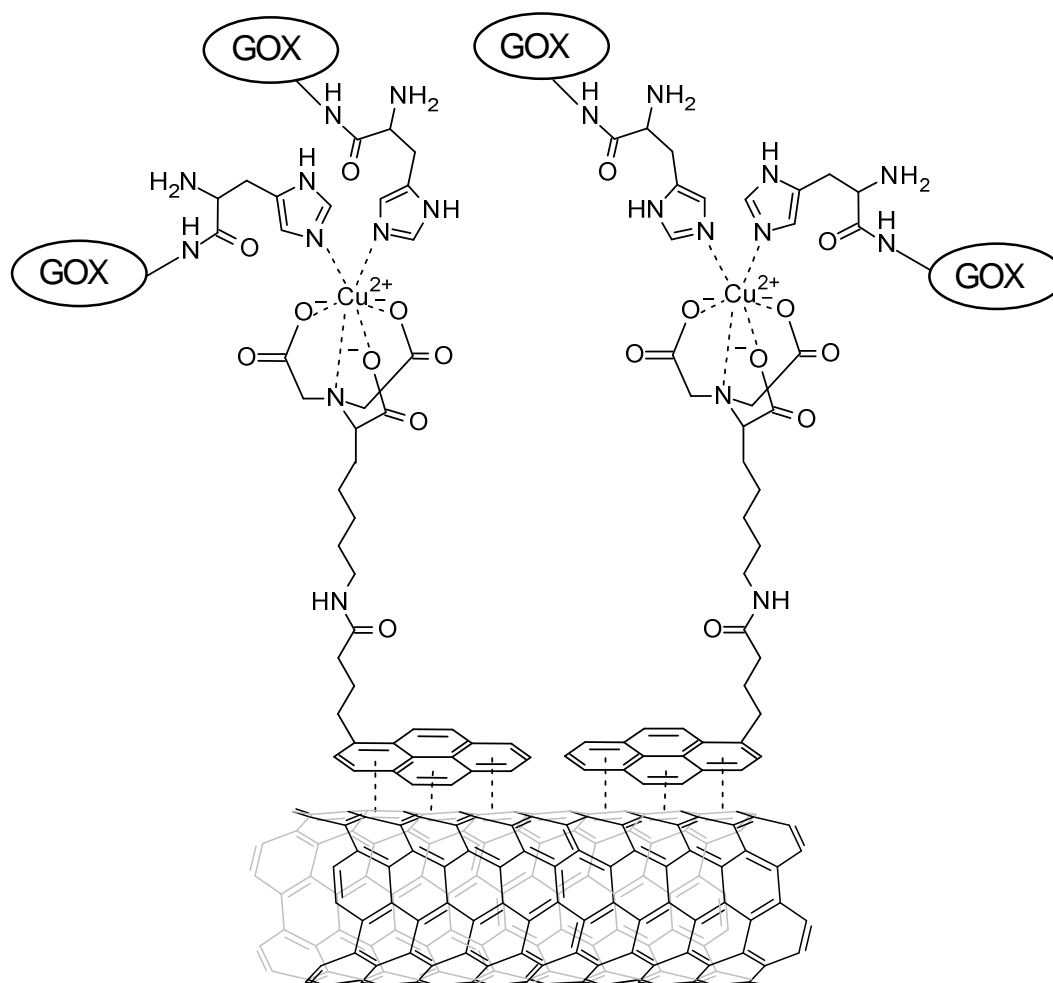
### III.2.3. Marquage enzymatique des électrodes modifiées par un seul pyrène avec une enzyme modèle : la glucose oxydase

Afin de valider notre approche pour la fonctionnalisation multiple de nanotubes de carbone mono-paroi, nous avons tout d'abord étudié chaque système séparément par ampérométrie. Nous avons choisi d'utiliser la glucose oxydase comme enzyme modèle pour réaliser ces expériences du fait qu'elle reste relativement résistante à de nombreux paramètres tels que la température ou le pH ; de plus, nous avons remarqué que l'étiquetage de cette enzyme par les groupements fonctionnels histidine,  $\beta$ -cyclodextrine et biotine n'altère pas (ou peu) l'activité enzymatique.

#### *III.2.3.a. Immobilisation de la glucose oxydase via le système pyrène-NTA/SWCNTs*

##### *III.2.3.a.α. Principe de l'immobilisation grâce au système SWCNTs/pyrène-NTA/Cu<sup>2+</sup>/His-GOX*

Nous nous sommes d'abord intéressés à l'immobilisation de la glucose oxydase histidinylée sur le système SWCNTs/pyrène-NTA via des ions Cu<sup>2+</sup>. L'interaction NTA/Cu<sup>2+</sup>/Histidine a été décrite dans le chapitre précédent (§ II.1.2.) et appliquée à l'élaboration de biocapteurs à ADN<sup>26</sup> ou protéiniques<sup>27, 28</sup>. Pour rappel, il s'agit d'une liaison de coordination entre l'acide nitrilotriacétique et deux molécules Histidine qui s'établit autour de l'ion Cu<sup>2+</sup>. Le **Schéma III-5** montre une représentation du système considéré incorporant les interactions pyrène/SWCNTs et NTA/Cu<sup>2+</sup>/Histidine.

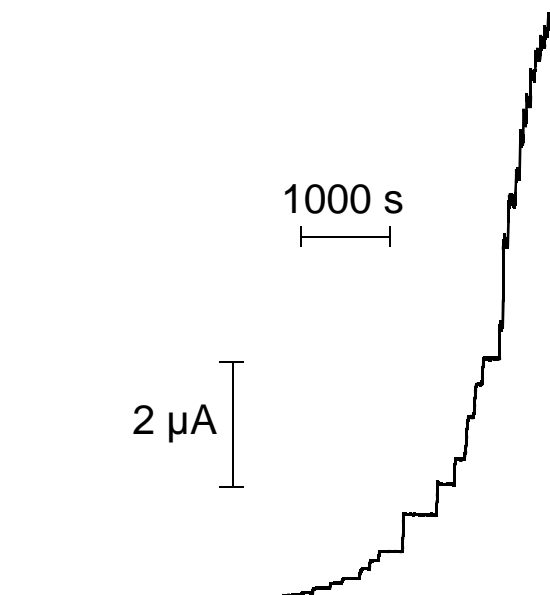


**Schéma III-5 :** Représentation schématique de l'immobilisation de la glucose oxydase histidinylée (His-GOX) sur les nanotubes de carbone (CNTs) via le système afffin NTA/Cu<sup>2+</sup>/Histidine.

### III.2.3.a.β. Etude ampérométrique du système SWCNTs/pyrène-NTA/Cu<sup>2+</sup>/His-GOX

Ce marquage enzymatique a été réalisé sur des électrodes de platine préalablement modifiées par 3 x 20 µL de nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs). Cette électrode a ensuite été plongée dans une solution de pyrène-NTA (5.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> dans le THF) pendant 30 minutes. Après avoir effectué des rinçages successifs (5 minutes chacun) de l'électrode dans du THF, de l'eau distillée et du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) sous agitation, l'électrode est plongée dans une solution de CuCl<sub>2</sub> (10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup> dans du tampon acétate 0,1 mol.L<sup>-1</sup> à pH = 4,8) pendant 20 minutes puis rincée à nouveau dans des solutions de NaCl (0,5 mol.L<sup>-1</sup>) et de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) sous agitation pendant cinq minutes

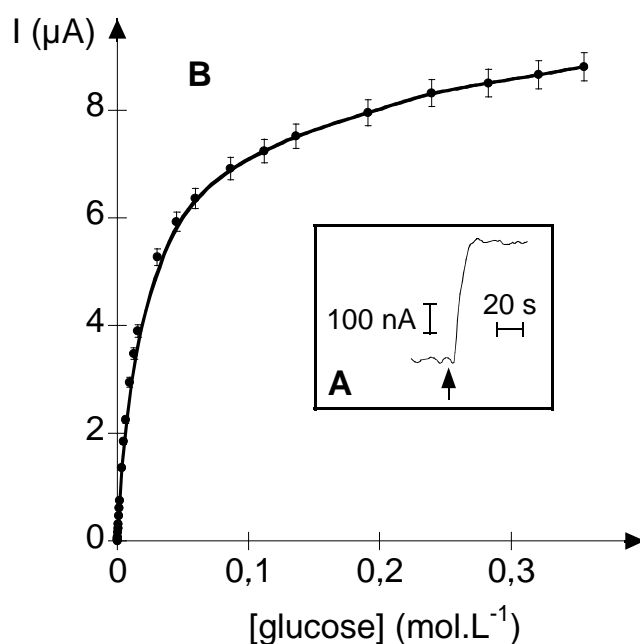
chacune. Enfin, l'ancrage de la glucose oxydase histidinylée (His-GOX) est réalisé par incubation de l'électrode dans une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) contenant His-GOX ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Un rinçage final dans le tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) est ensuite effectué afin d'éliminer toute biomolécule ancrée sur l'électrode de façon non-spécifique et les performances de cette architecture ont été évaluées par ampérométrie à  $E = 0,6 \text{ V vs ECS}$  dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$  ;  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). La **Figure III-4** montre l'évolution du courant au cours des injections successives de glucose dans la cellule électrochimique. On peut remarquer que les courants de plateaux obtenus après une injection de glucose sont stables et ceci permet de confirmer la stabilité de l'ancrage de biomolécules histidinylées par l'intermédiaire de l'interaction NTA/ $\text{Cu}^{2+}$ /Histidine mais aussi la stabilité de l'interaction pyrène/SWCNTs dans ce cas.



**Figure III-4 :** Réponse ampérométrique d'une électrode de platine ( $\varnothing = 5 \text{ mm}$ ) modifiée avec des nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs ;  $3 \times 20 \text{ } \mu\text{L}$  à  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le THF) puis incubée successivement avec une solution de pyrène-NTA ( $5.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  dans le THF), une solution de tampon acétate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 4,8$ ) contenant  $\text{Cu}^{2+}$  ( $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ ) et une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) contenant la glucose oxydase histidinylée (His-GOX ;  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) à  $E = 0,6 \text{ V vs ECS}$  suite aux injections successives de glucose dans la cellule électrochimique.

L'augmentation du courant lors de l'injection de  $200 \text{ } \mu\text{L}$  d'une solution de glucose à  $10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$  est représentée sur la **Figure III-5-A** ; on peut noter que le temps de réponse, de l'ordre de  $10 \text{ s}$ , est relativement faible. La **Figure III-5-B** montre la courbe d'étalonnage résultant des injections successives de glucose ; cette courbe a l'allure typique des courbes

obtenues pour des biocapteurs enzymatiques selon la représentation de Michaelis-Menten. Aux faibles concentrations en glucose, on observe une droite de pente  $2,38 \text{ mA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-2}$  correspondant à la sensibilité de l'électrode modifiée tandis qu'un plateau correspondant à la saturation de l'enzyme en substrat est obtenu pour les fortes concentrations en glucose avec un courant de saturation  $J_{\text{max}} = 44,8 \text{ }\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Le seuil de détection obtenu pour cette architecture est de  $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  et la gamme de linéarité s'étend jusqu'à  $6,3\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . La constante apparente de Michaelis-Menten, déterminée par la linéarisation de Lineweaver-Burk<sup>29</sup>, est égale à  $K_M^{\text{app}} = 11,8\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9981$ ).



**Figure III-5 :** *A - Réponse ampérométrique à une augmentation de concentration en glucose de  $1,6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) à  $E = 0,6 \text{ V}$  vs ECS obtenues avec une électrode de platine ( $\text{Ø} = 5 \text{ mm}$ ) modifiée avec des SWCNTs ( $3 \times 20 \text{ }\mu\text{L}$  à  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans le THF) puis incubée successivement avec une solution de pyrène-NTA ( $5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  dans le THF), une solution de tampon acétate ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 4,8$ ) contenant  $\text{Cu}^{2+}$  ( $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) contenant la glucose oxydase histidinylée (His-GOX ;  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). B - Courbe d'étalonnage du glucose obtenue avec l'électrode modifiée dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). RSD : 3 %.*

Etant donné que nous avons étudié l'ancrage de la glucose oxydase histidinylée (His-GOX) sur des électrodes de platine modifiées par un film de poly(pyrrole-NTA), il nous a alors semblé intéressant de comparer les résultats obtenus au Chapitre II (§ II.3.2.c.) avec ceux décrits ici pour l'immobilisation de His-GOX sur des électrodes de platine modifiées par des nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs) fonctionnalisés par du pyrène-NTA. Nous

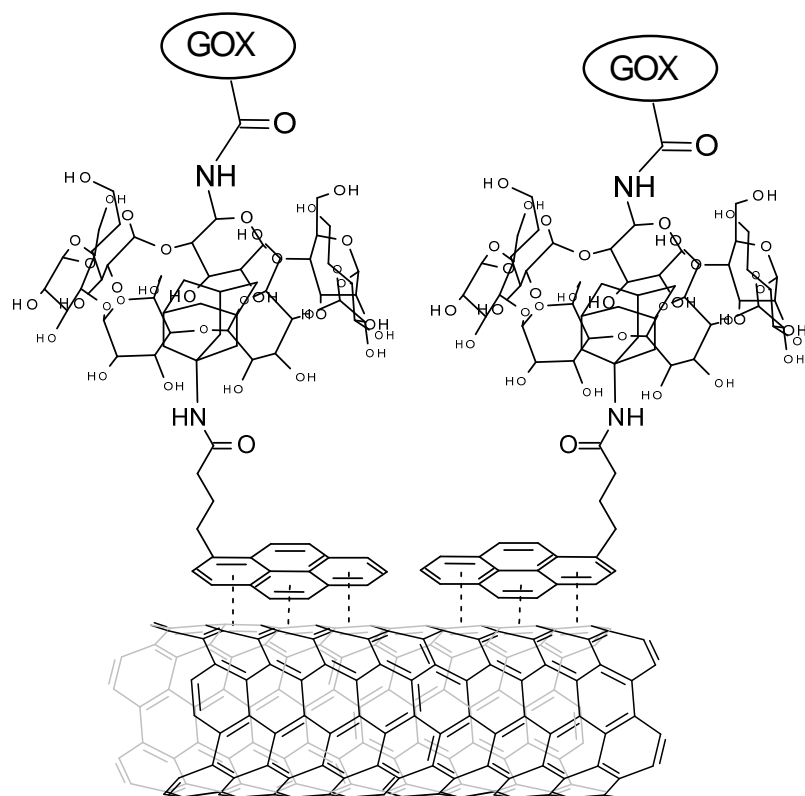
nous sommes principalement intéressés aux paramètres qui ont beaucoup évolué ce qui n'est pas le cas du seuil de détection, de la gamme de linéarité ou encore du temps de réponse obtenus pour chaque architecture. La comparaison des deux systèmes permet de mettre en évidence que le courant de saturation et la sensibilité sont environ quatre fois plus grands pour le système contenant des nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs/pyrène-NTA/Cu<sup>2+</sup>/His-GOX) que pour celui basé sur le poly(pyrrole-NTA) (poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup>/His-GOX). Ceci suggère donc une augmentation de la surface spécifique des électrodes par l'ajout de SWCNTs. La constante apparente de Michaelis-Menten  $K_M^{app}$  évolue, quant à elle, de façon inverse : celle obtenue avec le système incorporant des SWCNTs est environ trois fois plus petite que celle obtenue avec le poly(pyrrole-NTA). Cette dernière observation correspond toujours à un effet d'augmentation de la surface spécifique due aux SWCNTs puisque cet effet va permettre l'immobilisation d'une quantité de glucose oxydase histidinylée plus importante nécessitant alors une concentration en dioxygène plus grande pour réaliser la régénération des enzymes. Une diminution de la valeur de  $K_M^{app}$  est souvent attribuée à des problèmes de régénération de l'enzyme<sup>30</sup> mais nous verrons par la suite que d'autres phénomènes peuvent être à l'origine de cette diminution. Par exemple, elle peut également être attribuée à une diminution des contrastes stériques due à la présence des nanotubes de carbone.

### *III.2.3.b. Immobilisation de la glucose oxydase via le système pyrène-adamantane/SWCNTs*

#### *III.2.3.b.α. Principe de l'immobilisation grâce au système SWCNTs/pyrène-adamantane/ $\beta$ -CD-GOX*

Dans un second temps, nous avons étudié l'immobilisation de la glucose oxydase marquée avec des  $\beta$ -cyclodextrines ( $\beta$ -CD-GOX) sur le système SWCNTs/pyrène-adamantane. L'association adamantane/ $\beta$ -cyclodextrine s'établit grâce à l'interaction hydrophobe qui existe entre la cavité intérieure de la  $\beta$ -cyclodextrine et l'adamantane<sup>31, 32</sup>. Ce système a d'ailleurs déjà été utilisé pour l'élaboration d'un matériau composite nanotubes de carbone mono-paroi/poly(pyrrole-adamantane) au laboratoire qui a permis l'immobilisation de la glucose oxydase marquée avec des  $\beta$ -cyclodextrines<sup>33</sup>. Le **Schéma III-6** montre une

représentation du système considéré incorporant les interactions pyrène/SWCNTs et adamantane/ $\beta$ -cyclodextrine.

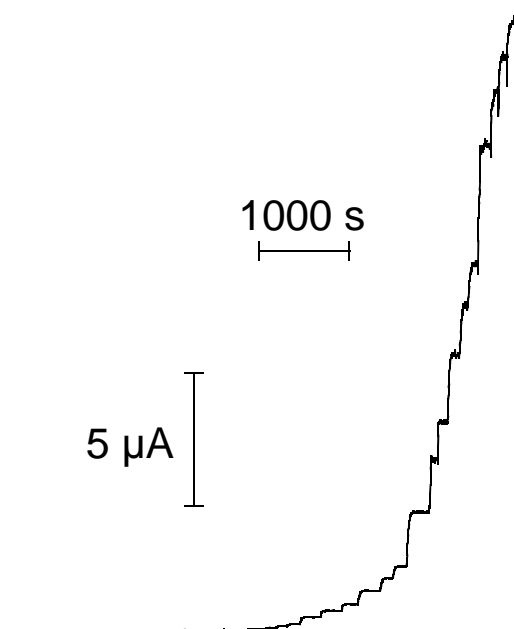


**Schéma III-6 :** Représentation schématique de l'immobilisation de la glucose oxydase marquée avec des  $\beta$ -cyclodextrines ( $\beta$ -CD-GOX) sur les nanotubes de carbone (CNTs) via le système affini  $\beta$ -CD/adamantane.

### III.2.3.b. $\beta$ . Etude ampérométrique du système SWCNTs/pyrène-adamantane/ $\beta$ -CD-GOX

Cette architecture a été élaborée de manière assez similaire au protocole concernant le système NTA/Cu<sup>2+</sup>/Histidine. Une électrode de platine a été préalablement modifiée par 3 x 20  $\mu$ L de nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs) et a ensuite été plongée dans une solution de pyrène-adamantane ( $5 \cdot 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> dans le THF) pendant 30 minutes. Après des rinçages successifs (5 minutes chacun) de l'électrode dans du THF, de l'eau distillée et du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) sous agitation, l'électrode a été mise au contact d'une solution de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) contenant la glucose oxydase marquée avec des  $\beta$ -cyclodextrines ( $\beta$ -CD-GOX ; 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>). Après un rinçage final dans le tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7), les performances de cette architecture ont été évaluées par ampérométrie à E = 0,6 V vs ECS dans du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH =

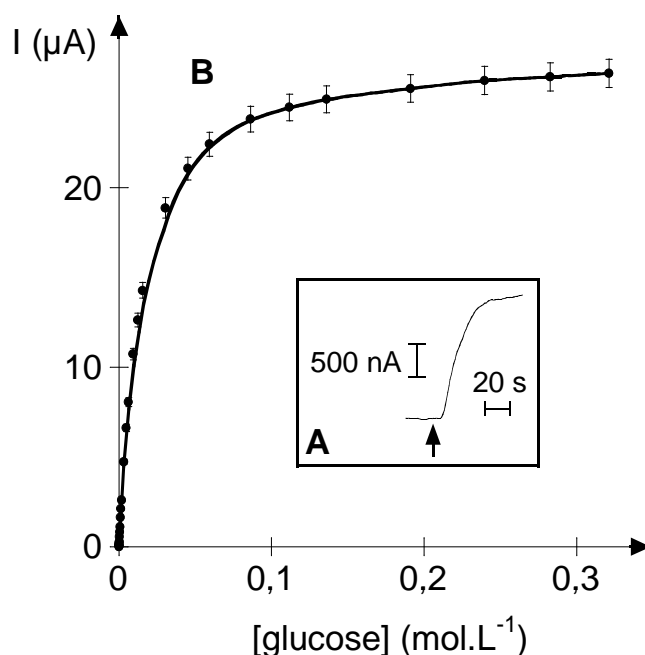
7 ;  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). La **Figure III-6** montre l'évolution du courant au cours des injections successives de glucose dans la cellule électrochimique. On peut noter, qu'ici aussi, les plateaux obtenus après une injection de glucose sont stables démontrant la force des interactions adamantane/ $\beta$ -cyclodextrine et pyrène/SWCNTs.



**Figure III-6 :** Réponse ampérométrique d'une électrode de platine ( $\varnothing = 5\text{ mm}$ ) modifiée avec des nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs ;  $3 \times 20\text{ }\mu\text{L}$  à  $0,1\text{ mg.mL}^{-1}$  dans le THF) puis incubée successivement avec une solution de pyrène-adamantane ( $5.10^{-4}\text{ mol.L}^{-1}$  dans le THF) et une solution de tampon phosphate ( $0,1\text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) contenant la glucose oxydase marquée avec des  $\beta$ -cyclodextrines ( $\beta$ -CD-GOX ;  $0,5\text{ mg.mL}^{-1}$ ) dans du tampon phosphate ( $0,1\text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) à  $E = 0,6\text{ V}$  vs ECS suite aux injections successives de glucose dans la cellule électrochimique.

L'ajout de  $200\text{ }\mu\text{L}$  d'une solution de glucose à  $10^{-1}\text{ mol.L}^{-1}$  dans la cellule électrochimique (**Figure III-7-A**) permet de déterminer le temps de réponse de cette électrode ( $\sim 30\text{ s}$ ), qui est assez important pour cette architecture comparée à la précédente. La **Figure III-7-B** montre la courbe d'étalonnage résultant des injections successives de glucose ; cette courbe a l'allure typique des courbes obtenues pour des biocapteurs enzymatiques. On obtient une droite de pente  $8,20\text{ mA.mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-2}$  aux faibles concentrations en glucose ; celle-ci correspond à la sensibilité de l'électrode modifiée. Pour de fortes concentrations en glucose, un plateau correspondant à la saturation de l'enzyme en substrat est obtenu avec un courant de saturation  $J_{\text{max}} = 135,4\text{ }\mu\text{A.cm}^{-2}$ . Ce système présente un seuil de détection de  $3,1.10^{-6}\text{ mol.L}^{-1}$  en glucose et sa gamme de linéarité s'étend jusqu'à  $9,4.10^{-3}\text{ mol.L}^{-1}$ . La constante apparente

de Michaelis-Menten, déterminée par la linéarisation de Lineweaver-Burk<sup>29</sup>, est égale à  $K_M^{app} = 1,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9956$ ).



**Figure III-7 :** *A - Réponse ampérométrique à une augmentation de concentration en glucose de  $1,6 \text{ mmol.L}^{-1}$  dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) à  $E = 0,6 \text{ V}$  vs ECS obtenues avec une électrode de platine ( $\text{Ø} = 5 \text{ mm}$ ) modifiée avec des SWCNTs ( $3 \times 20 \text{ }\mu\text{L}$  à  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le THF) puis incubée successivement avec une solution de pyrène-adamantane ( $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  dans le THF) et une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) contenant la glucose oxydase marquée avec des  $\beta$ -cyclodextrines ( $\beta\text{-CD-GOX}$  ;  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). B - Courbe d'étalonnage du glucose obtenue avec l'électrode modifiée dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). RSD : 3 %.*

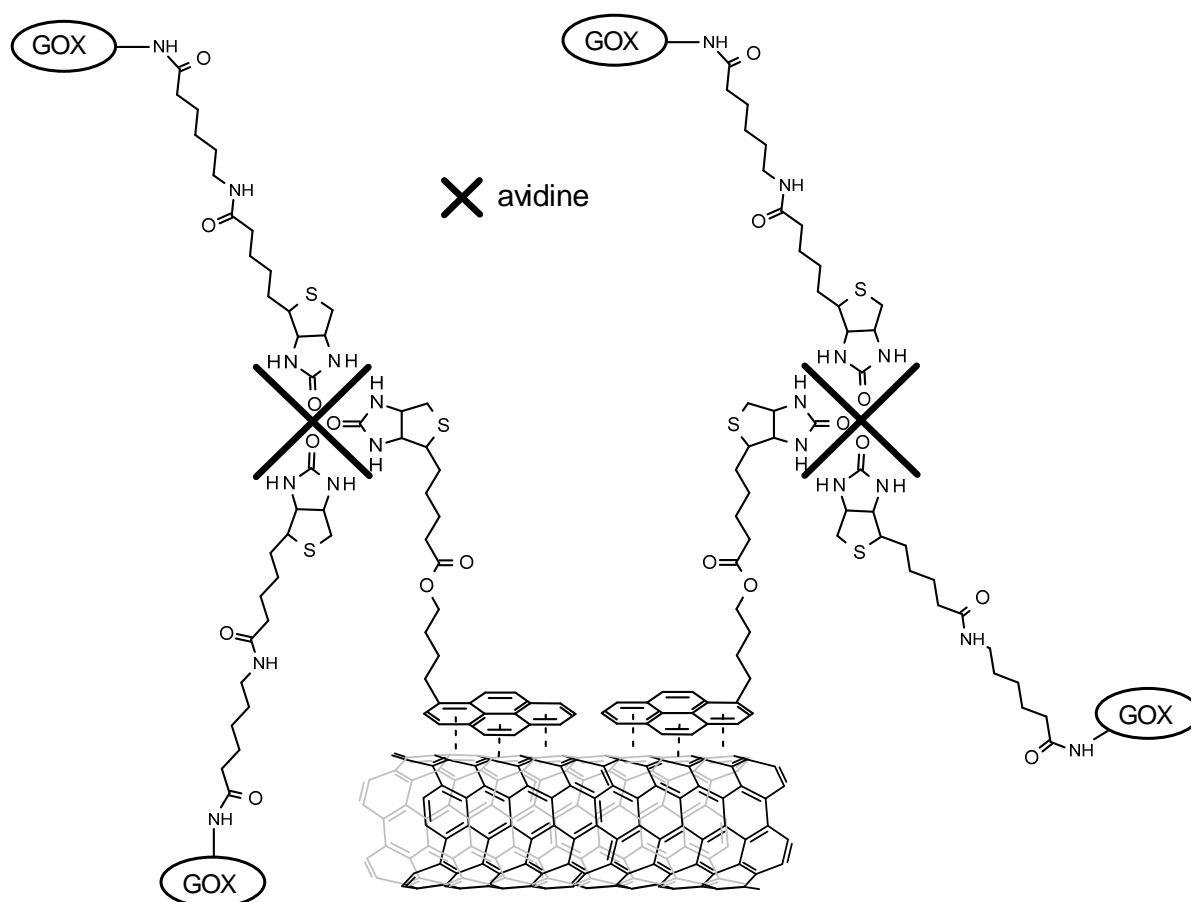
### III.2.3.c. Immobilisation de la glucose oxydase via le système pyrène-biotine/SWCNTs

#### III.2.3.c.α. Principe de l'immobilisation grâce au système SWCNTs/pyrène-biotine/avidine/B-GOX

Finalement, nous avons examiné l'immobilisation de la glucose oxydase biotinylée (B-GOX) sur le système SWCNTs/pyrène-biotine par l'intermédiaire d'une couche d'avidine. L'association biotine/avidine est très connue et employée dans le domaine des biocapteurs ; de même que pour l'interaction NTA/ $\text{Cu}^{2+}$ /Histidine, elle a déjà été décrite dans le Chapitre II (§ II.4.1.a.). La forte utilisation de ce système afin vient du fait qu'il existe une très forte interaction<sup>34</sup> entre l'avidine et la biotine ce qui permet un ancrage solide des biomolécules à la



surface des électrodes. Le **Schéma III-7** représente le système considéré incorporant les interactions pyrène/SWCNTs et biotine/avidine/biotine.

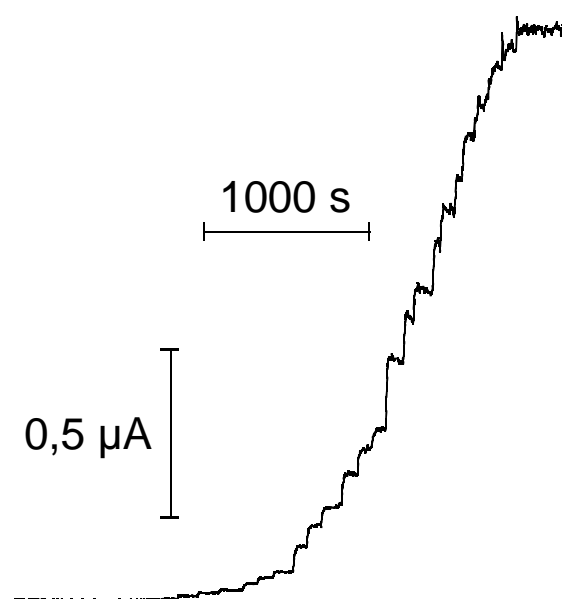


**Schéma III-7** : Représentation schématique de l'immobilisation de la glucose oxydase biotinylée (B-GOX) sur les nanotubes de carbone (CNTs) via le système affinitaire biotine/avidine/biotine. Pour des raisons de clarté, l'avidine a été représentée par une croix.

### III.2.3.c.β. Etude ampérométrique du système SWCNTs/pyrène-biotine/avidine/B-GOX

L'élaboration de cette architecture suit un protocole assez similaire aux deux précédents : une électrode de platine a d'abord été modifiée par 3 x 20  $\mu\text{L}$  de nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs) et a ensuite été plongée dans une solution de pyrène-biotine ( $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  dans le THF) pendant 30 minutes. Après des rinçages successifs (5 minutes chacun) de l'électrode dans du THF, de l'eau distillée et du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) sous agitation, l'électrode a été successivement mise au contact de solutions de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) contenant l'avidine ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) puis la glucose oxydase biotinylée (B-GOX ;  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Suite à un rinçage dans le tampon phosphate ( $0,1$

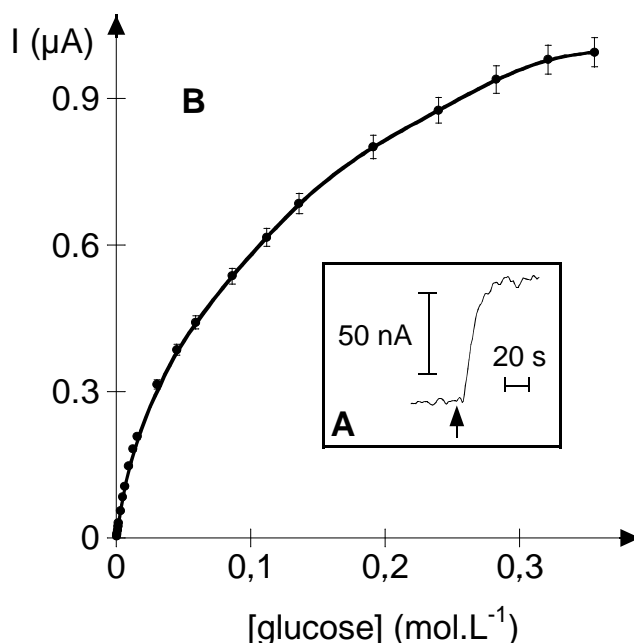
mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) sous agitation, les performances de cette électrode modifiée ont été évaluées par ampérométrie à E = 0,6 V vs ECS dans du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7 ; T = 25 °C). La **Figure III-8** montre l'évolution du courant au cours des injections successives de glucose dans la cellule électrochimique. Les plateaux obtenus après une injection de glucose sont toujours stables et démontrent l'ancrage solide de l'enzyme B-GOX à la surface de l'électrode à travers les interactions pyrène/SWCNTs et biotine/avidine.



**Figure III-8 :** Réponse ampérométrique d'une électrode de platine ( $\varnothing = 5$  mm) modifiée avec des nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs ; 3 x 20  $\mu$ L à 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> dans le THF) puis incubée successivement avec une solution de pyrène-biotine ( $5.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> dans le THF) et des solutions de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH = 7) contenant l'avidine (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) puis la glucose oxydase biotinylée (B-GOX ; 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) dans du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH = 7, T = 25 °C) à E = 0,6 V vs ECS suite aux injections successives de glucose dans la cellule électrochimique.

La **Figure III-7-A** montre l'évolution du courant lors de l'injection de 200  $\mu$ L d'une solution de glucose à 10<sup>-1</sup> mol.L<sup>-1</sup> ; on peut alors déterminer le temps de réponse de cette électrode de l'ordre de 20 s, celui-ci a une valeur intermédiaire comparée aux architectures précédentes. La **Figure III-7-B** montre la courbe d'étalonnage résultant des injections successives de glucose ; cette courbe a l'allure typique des courbes obtenues pour des biocapteurs enzymatiques. Une droite de pente 0,11 mA.mol<sup>-1</sup>.L.cm<sup>-2</sup> est observée aux faibles concentrations en glucose et correspond à la sensibilité de cette architecture. Pour les fortes concentrations en glucose, on observe un plateau avec un courant de saturation  $J_{\max} = 5,1$

$\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  ; celui-ci correspond à la saturation de l'enzyme en substrat. Ce système présente un seuil de détection de  $3,4\cdot 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> en glucose et sa gamme de linéarité s'étend jusqu'à  $1,2\cdot 10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup>. La constante apparente de Michaelis-Menten, déterminée par la linéarisation de Lineweaver-Burk<sup>29</sup>, est égale à  $K_M^{\text{app}} = 66,4\cdot 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0,9953$ ).



**Figure III-9 :** *A - Réponse ampérométrique à une augmentation de concentration en glucose de  $1,6$  mmol.L<sup>-1</sup> dans du tampon phosphate ( $0,1$  mol.L<sup>-1</sup>, pH = 7,  $T = 25$  °C) à  $E = 0,6$  V vs ECS obtenues avec une électrode de platine ( $\varnothing = 5$  mm) modifiée avec des SWCNTs ( $3 \times 20$   $\mu\text{L}$  à  $0,1$  mg.mL<sup>-1</sup> dans le THF) puis incubée successivement avec une solution de pyrène-biotine ( $5\cdot 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> dans le THF) et des solutions de tampon phosphate ( $0,1$  mol.L<sup>-1</sup>, pH = 7) contenant l'avidine ( $0,5$  mg.mL<sup>-1</sup>) puis la glucose oxydase biotinylée (B-GOX ;  $0,5$  mg.mL<sup>-1</sup>). B - Courbe d'étalonnage du glucose obtenue avec l'électrode modifiée dans du tampon phosphate ( $0,1$  mol.L<sup>-1</sup>, pH = 7,  $T = 25$  °C). RSD : 3 %.*

#### III.2.3.d. Comparaison des trois systèmes étudiés

L'étude de ces trois systèmes a permis d'obtenir des informations précises sur chacun d'entre eux. Même si les interactions mises en jeu pour l'immobilisation des différentes glucose oxydases sont très différentes, nous avons voulu comparer les résultats obtenus ; pour cela, le **Tableau III-1** récapitule les paramètres extraits des études ampérométriques. Afin d'effectuer ces comparaisons le plus rigoureusement possible, les courants maximum obtenus ( $J_{\text{max}}$ ) ainsi que les sensibilités ont été rapportés à l'activité enzymatique en solution.

Tout d'abord, les courants maximum enregistrés pour chaque système sont très différents : on peut remarquer tout de suite les faiblesses du système avidine/biotine qui présente un  $J_{\max}$  plus de dix fois plus faible que les autres. Comme il l'avait déjà été évoqué au chapitre précédent (§ II.4.1.a.), les systèmes basés sur l'interaction biotine/avidine souffrent souvent de problèmes de perméabilité qui peuvent être dus à la couche additionnelle de protéine (avidine) nécessaire pour ce système et qui n'a pas lieu d'être dans les deux autres. On observe d'ailleurs que le  $J_{\max}$  obtenu pour le système NTA/Cu<sup>2+</sup>/Histidine est bien plus élevé comme dans le cas de l'étude de ces deux systèmes d'affinité effectuée au Chapitre II (§ II.3.2.c.). En effet, cette étude présentant des biocapteurs réalisés sur des films de poly(pyrrole) fonctionnalisés avec des biotines ou le groupement fonctionnel NTA avait permis d'obtenir un rapport  $\{J_{\max}/\text{activité enzymatique}\}$  environ dix fois plus grand pour le système NTA/Cu<sup>2+</sup>/Histidine que pour l'architecture basée sur l'interaction biotine/avidine. Ici aussi, on observe la même évolution pour ces deux architectures, ce qui confirme l'hypothèse des problèmes de perméabilité rencontrés avec le couple affin biotine/avidine. Concernant l'interaction adamantane/ $\beta$ -cyclodextrine, elle permet d'obtenir des résultats exceptionnels : en effet le rapport  $\{J_{\max}/\text{activité enzymatique}\}$  est doublé en comparaison avec celui obtenu pour le système NTA/Cu<sup>2+</sup>/Histidine. Cependant, il faut remarquer que, dans ce cas, le pyrène-adamantane synthétisé possède une chaîne carbonée deux fois plus courte que les deux autres entre les groupements pyrène et adamantane. Cette différence de longueur de chaîne carbonée peut avoir un effet sur l'hydrophobicité du film formé sur l'électrode ; dans le cas d'une chaîne plus courte, le film sera moins hydrophobe et permettra une meilleure diffusion des espèces jusqu'à l'électrode.

Si on s'intéresse maintenant aux rapports  $\{\text{sensibilité}/\text{activité enzymatique}\}$  obtenus, on remarque que l'évolution observée en comparant les systèmes NTA/Cu<sup>2+</sup>/Histidine et adamantane/ $\beta$ -cyclodextrine suit la même tendance que l'évolution du rapport  $\{J_{\max}/\text{activité enzymatique}\}$  pour ces deux architectures ; en effet, la sensibilité du deuxième système considéré est doublée par rapport au premier. De même, le système basé sur l'interaction avidine/biotine exhibe une sensibilité très faible par rapport aux deux autres : la valeur obtenue est environ 40 fois plus faible que celle obtenue avec le système NTA/Cu<sup>2+</sup>/Histidine. Cette observation continue de mettre en évidence les défaillances de ce système. Comme pour le paragraphe traitant des courants de saturation, il est très délicat de poursuivre la comparaison des résultats du fait des fortes différences entre les trois systèmes d'affinité.

Dans un troisième temps, nous avons voulu analyser les constantes apparentes de Michaelis-Menten,  $K_M^{app}$ , obtenues par la linéarisation de Lineweaver-Burk lors de ces expériences. On peut, ici aussi, constater de fortes disparités entre les différentes valeurs qui évoluent entre 2 et  $66.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ . L'architecture basée sur l'interaction NTA/ $\text{Cu}^{2+}$ /Histidine présente une valeur intermédiaire ( $\sim 12.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) qui reste convenable mais moins bonne que celles que nous avons pu obtenir sur le poly(pyrrole-NTA) lors des études réalisées au Chapitre II (**Tableaux II-3** et **II-7**) qui étaient du même ordre de grandeur que celle obtenue lorsque l'enzyme est libre en solution<sup>35</sup> ( $33.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  à 25 °C). Plusieurs hypothèses peuvent être formulées à ce sujet :

- premièrement, la méthode d'accroche du groupement NTA à la surface de l'électrode étant différente (poly(pyrrole-NTA) *versus* SWCNTs/pyrène-NTA), il se peut que la conductivité et la perméabilité de la couche de nanotubes de carbone mono-paroi fonctionnalisés par du pyrène-NTA soit moins bonne et donc que le glucose et l' $\text{O}_2$  y diffusent moins bien que dans le cas du film de poly(pyrrole-NTA) qui est un polymère très perméable,

- deuxièmement, seule une architecture sur les deux contient des nanotubes de carbone et ceci peut engendrer un éloignement de l'électrode pour l'enzyme immobilisée et une diminution de la valeur de la constante apparente de Michaelis-Menten, comme dans le cas de l'électrode modifiée par le poly(pyrrole-NTA)/ $\text{Cu}^{2+}$ /duplex d'ADN/avidine/B-GOX vue au Chapitre II (§ II.3.2.c.) qui présentait d'ailleurs une valeur de  $K_M^{app}$  ( $\sim 13.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) similaire à celle obtenue ici,

- enfin, il est probable que, dans le cas présenté ici, les SWCNTs permettent d'augmenter la surface spécifique de l'électrode et, du coup, d'immobiliser une plus grande quantité d'enzymes (pour le système basé sur du poly(pyrrole-NTA), la valeur du  $J_{max}$  est d'ailleurs quatre fois plus faible qu'ici) ce qui engendrerait alors une plus grande consommation d' $\text{O}_2$  pour la régénération des enzymes ; cette étape de régénération peut alors devenir l'étape limitante du mécanisme enzymatique et provoquer cette diminution du  $K_M^{app}$  comme nous l'avons déjà suggéré<sup>30</sup>.

Le système adamantane/ $\beta$ -cyclodextrine présente une constante apparente de Michaelis-Menten,  $K_M^{app}$ , très faible ( $1,6.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ). Cependant, étant donné les performances exceptionnelles obtenues avec ce système au niveau du courant de saturation et de la sensibilité, on peut supposer qu'une quantité importante d'enzyme a été immobilisée sur la surface de l'électrode ; la concentration en  $\text{O}_2$  en solution étant identique pour toutes les

configurations, on pourra donc observer ici le ralentissement de l'étape de régénération des enzymes entraînant cette diminution du  $K_M^{app}$ . De plus, l'adamantane est une molécule très hydrophobe qui peut gêner la diffusion des espèces vers l'électrode et/ou la solution. Quant au système basé sur l'interaction biotine/avidine, on peut remarquer que la valeur de  $K_M^{app}$  ( $66.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) est deux fois plus importante que celle de l'enzyme en solution ce qui confirme une nouvelle fois les problèmes de diffusion liés à ce système. Effectivement cette augmentation du  $K_M^{app}$  peut être attribuée à une mauvaise diffusion du glucose due à la stratégie d'immobilisation.

Enfin, on peut remarquer que les seuils de détection et les gammes de linéarité obtenues pour les systèmes NTA/ $\text{Cu}^{2+}$ /Histidine et adamantane/ $\beta$ -cyclodextrine sont similaires tandis que celles pour le système biotine/avidine sont décalées vers des concentrations dix fois plus importantes.

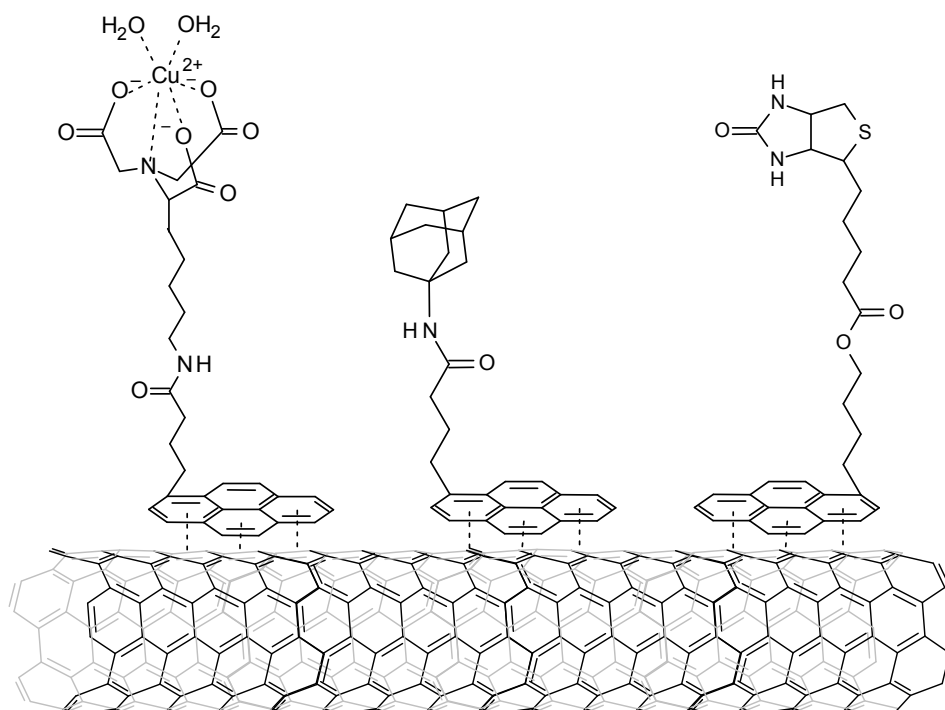
Système	Pyrène-NTA/ $\text{Cu}^{2+}$ /His-GOX	Pyrène-adamantane/ $\beta$ -CD-GOX	Pyrène-biotine/ avidine/B-GOX
temps de réponse (s)	10	30	20
$J_{max}$ ( $\mu\text{A.cm}^{-2}$ )	44,8 (0,3)	135,4 (0,6)	5,1 (0,02)
sensibilité ( $\text{mA.mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-2}$ )	2,38 (0,02)	8,20 (0,04)	0,11 (0,0005)
seuil de détection ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	$10^{-5}$	$3,1.10^{-6}$	$3,4.10^{-4}$
gamme de linéarité ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	$10^{-5} - 6,3.10^{-3}$	$3,1.10^{-6} - 9,4.10^{-3}$	$3,4.10^{-4} - 1,2.10^{-2}$
$K_M$ apparent ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	$11,8.10^{-3}$	$1,6.10^{-3}$	$66,4.10^{-3}$
activité de l'enzyme en solution ( $\text{U.mg}^{-1}$ )	150	230	220

**Tableau III-1 :** Comparatif des valeurs obtenues sur des électrodes modifiées avec des SWCNTs ( $3 \times 20 \mu\text{L}$  à  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le THF) et un des trois systèmes affins étudiés : pyrène-NTA/ $\text{Cu}^{2+}$ /His-GOX, pyrène-adamantane/ $\beta$ -CD-GOX et pyrène-B/avidine/B-GOX. Les valeurs entre parenthèses ont été rapportées à l'activité enzymatique en solution.

### III.2.4. Marquage enzymatique d'électrodes modifiées par un mélange des trois pyrènes avec la glucose oxydase

Afin de procéder par étapes, nous avons ensuite étudié l'immobilisation des trois glucose oxydases marquées avec les groupements fonctionnels histidine,  $\beta$ -cyclodextrine ou biotine sur les nanotubes de carbone mono-paroi fonctionnalisés par un mélange des trois pyrènes modifiés (mélange équimolaire des pyrènes marqués avec le NTA, l'adamantane ou la biotine). Une représentation schématique des SWCNTs fonctionnalisés par ce mélange est présentée sur le **Schéma III-8**.

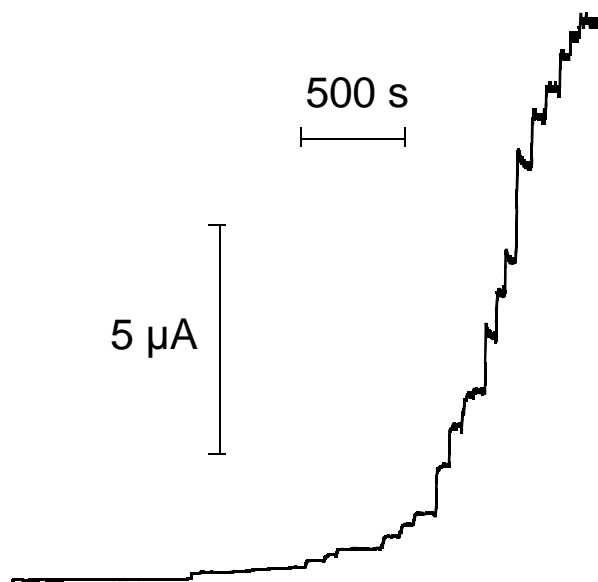
Pour toutes ces expériences, les électrodes de platine utilisées ont été modifiées avec un dépôt de SWCNTs (3 x 20  $\mu$ L d'une dispersion à 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> séchées successivement à la surface de l'électrode) puis ces électrodes ont été plongées dans une solution de THF contenant le pyrène-NTA, le pyrène-adamantane et le pyrène-biotine (5.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> chacun) pendant 30 minutes. Ces électrodes ont finalement été rincées successivement avec du THF, de l'eau distillée et du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) sous agitation pendant 5 minutes chacun.



**Schéma III-8** : Principe de l'immobilisation des trois pyrènes fonctionnalisés (pyrène-NTA, pyrène-adamantane et pyrène-biotine) sur les nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs).

### III.2.4.a. Immobilisation de la glucose oxydase histidinylée (His-GOX) sur des électrodes modifiées par le mélange des trois pyrènes

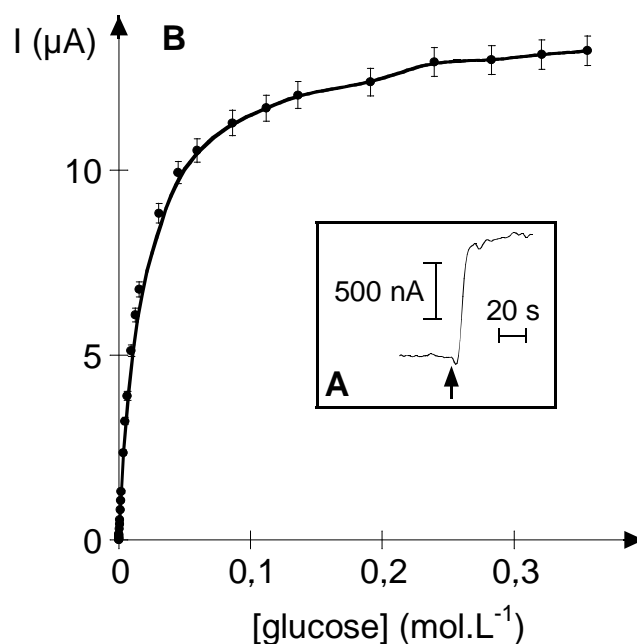
Dans un premier temps, nous avons réalisé le marquage enzymatique des électrodes de platine modifiées avec la glucose oxydase histidinylée. Pour cela, une électrode préalablement modifiée avec les SWCNTs et le mélange équimolaire des trois pyrènes a été plongée dans une solution de  $\text{CuCl}_2$  ( $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  dans du tampon acétate  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  à  $\text{pH} = 4,8$ ) pendant 20 minutes. Après rinçage de cette électrode avec des solutions de  $\text{NaCl}$  ( $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ) et de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 7$ ) sous agitation pendant cinq minutes chacune, l'électrode a été incubée avec une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 7$ ) contenant la glucose oxydase histidinylée (His-GOX;  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) puis rincée à nouveau dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 7$ ) sous agitation pendant 5 minutes. La réponse ampérométrique de cette électrode à des injections de glucose (**Figure III-10**) a été enregistrée en imposant un potentiel  $E = 0,6 \text{ V vs ECS}$  dans une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 7$ ;  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).



**Figure III-10** : Réponse ampérométrique d'une électrode de platine ( $\varnothing = 5 \text{ mm}$ ) modifiée avec des nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs;  $3 \times 20 \text{ } \mu\text{L}$  à  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le THF) puis incubée successivement avec une solution de THF contenant les trois pyrènes fonctionnalisés (pyrène-NTA/pyrène-adamantane/pyrène-biotine; 1/1/1), une solution de tampon acétate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 4,8$ ) contenant  $\text{Cu}^{2+}$  ( $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ ) et une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) contenant la glucose oxydase histidinylée (His-GOX;  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) à  $E = 0,6 \text{ V vs ECS}$  suite aux injections successives de glucose dans la cellule électrochimique.



La **Figure III-11-A** montre l'augmentation du courant obtenue lors de l'injection de 200  $\mu\text{L}$  d'une solution de glucose à  $10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$  dans la cellule électrochimique et permet de déterminer le temps de réponse qui est de l'ordre de 10 s. La courbe d'étalonnage suite aux injections successives de glucose dans la cellule est présentée sur la **Figure III-11-B** et celle-ci présente l'allure typique des courbes obtenues pour un biocapteur enzymatique. La sensibilité et le courant de saturation obtenus pour cette électrode modifiée sont de  $4,08 \text{ mA.mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-2}$  et  $67,4 \mu\text{A.cm}^{-2}$  respectivement. Le seuil de détection de cette architecture est de  $3,1.10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  et la gamme de linéarité s'étend jusqu'à des concentrations en glucose de  $6,3.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ . La constante apparente de Michaelis-Menten déterminée par la linéarisation de Lineweaver-Burk<sup>29</sup> est égale à  $41,2.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9985$ ).



**Figure III-11 :** **A** - Réponse ampérométrique à une augmentation de concentration en glucose de  $1,6 \text{ mmol.L}^{-1}$  dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) à  $E = 0,6 \text{ V}$  vs ECS obtenues avec une électrode de platine ( $\text{Ø} = 5 \text{ mm}$ ) modifiée avec des SWCNTs ( $3 \times 20 \mu\text{L}$  à  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le THF) puis incubée successivement avec une solution de THF contenant les trois pyrènes fonctionnalisés (pyrène-NTA/pyrène-adamantane/pyrène-biotine ; 1/1/1), une solution de tampon acétate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 4,8$ ) contenant  $\text{Cu}^{2+}$  ( $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ ) et une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) contenant la glucose oxydase histidinylée (His-GOX ;  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). **B** - Courbe d'étalonnage du glucose obtenue avec l'électrode modifiée dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). RSD : 5 %.

Il nous est alors apparu intéressant de comparer les résultats obtenus dans cette étude avec ceux présentés au paragraphe précédent (**Tableau III-2**) lors de l'immobilisation de la glucose oxydase histidinylée sur une électrode modifiée par des nanotubes de carbone mono-paroi fonctionnalisés avec du pyrène-NTA uniquement.

On peut noter que certains paramètres n'ont pas, ou peu, évolué comme le temps de réponse qui est de 10 s dans les deux cas ou encore la gamme de linéarité et le seuil de détection qui sont très similaires pour les deux architectures considérées.

Par contre, le courant de saturation a augmenté de + 50 % en passant des nanotubes de carbone mono-paroi fonctionnalisés avec seulement du pyrène-NTA à ceux fonctionnalisés par un mélange équimolaire des trois pyrènes. Cette évolution peut être surprenante car on pensait immobiliser une quantité moins importante d'enzymes dans le second cas mais il est probable que cette diminution de la compacité de la couche enzymatique soit plus propice à la diffusion des différentes espèces jusqu'à la surface de l'électrode.

Nous avons d'ailleurs suggéré que, dans le cas des SWCNTs fonctionnalisés avec du pyrène-NTA seulement, une mauvaise diffusion de l'O<sub>2</sub> pouvait intervenir et faire diminuer la valeur de  $K_M^{app}$  en limitant l'étape de régénération de l'enzyme. A ce sujet, on peut remarquer que la valeur de  $K_M^{app}$  obtenue avec les SWCNTs fonctionnalisés par le mélange des trois pyrènes ( $41,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) est plus proche de la valeur de  $K_M^{app}$  déterminée en solution<sup>35</sup> ( $33 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) ; ceci suggère donc une amélioration de la biocompatibilité du matériau pour la glucose oxydase histidinylée qui adopte alors un comportement similaire à celui qu'elle a en solution.

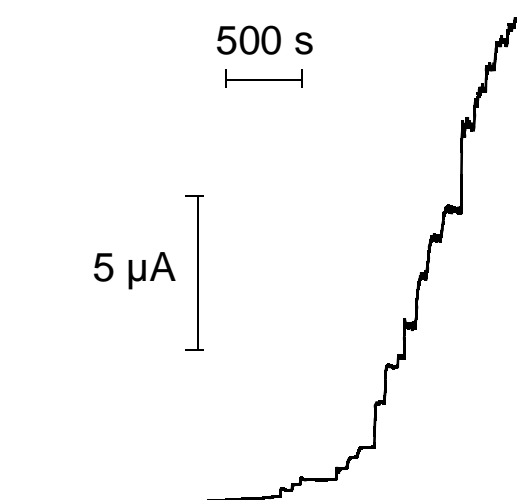
Les valeurs de sensibilité obtenues suivent toujours la même évolution : ce paramètre voit sa valeur doubler en passant des électrodes fonctionnalisées avec du pyrène-NTA seulement à celles modifiées par le mélange des trois pyrènes. Cette évolution confirme notre hypothèse de la formation d'une couche d'enzyme moins compacte permettant alors une meilleure diffusion des espèces en solution (système plus perméable).

Système	Pyrène-NTA/Cu <sup>2+</sup> /His-GOX	(Pyrène-NTA/Pyrène-biotine/ Pyrène-adamantane : 1/1/1)/ Cu <sup>2+</sup> /His-GOX
temps de réponse (s)	10	10
J <sub>max</sub> (μA.cm <sup>-2</sup> )	44,8	67,4
sensibilité (mA.mol <sup>-1</sup> .L.cm <sup>-2</sup> )	2,38	4,08
seuil de détection (mol.L <sup>-1</sup> )	10 <sup>-5</sup>	3,1.10 <sup>-6</sup>
gamme de linéarité (mol.L <sup>-1</sup> )	10 <sup>-5</sup> – 6,3.10 <sup>-3</sup>	3,1.10 <sup>-6</sup> – 6,3.10 <sup>-3</sup>
K <sub>M</sub> apparente (mol.L <sup>-1</sup> )	11,8.10 <sup>-3</sup>	41,2.10 <sup>-3</sup>

**Tableau III-2 :** Comparatif des valeurs obtenues lors de l'immobilisation de la glucose oxydase histidinylée (His-GOX) sur des électrodes modifiées avec des SWCNTs (3 x 20 μL à 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> dans le THF) et le pyrène-NTA dans le premier cas ou un mélange équimolaire des trois pyrènes fonctionnalisés (pyrène-NTA/pyrène-biotine/pyrène-adamantane) dans le second cas.

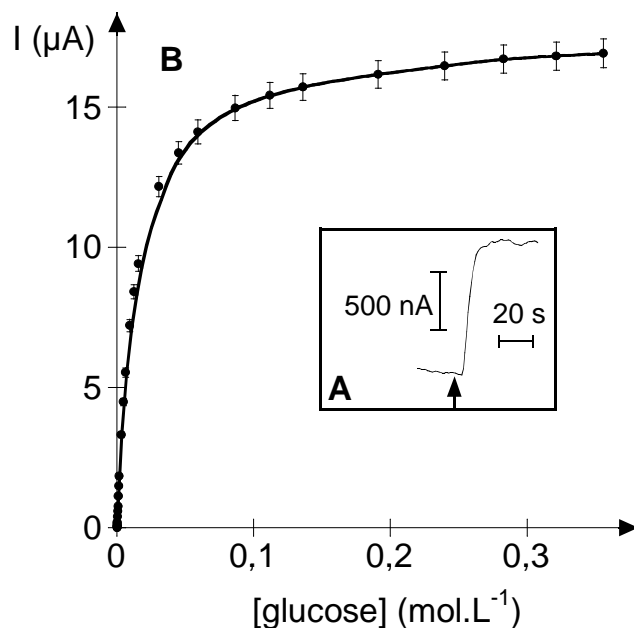
#### III.2.4.b. Immobilisation de la glucose oxydase marquée avec la β-cyclodextrine (β-CD-GOX) sur des électrodes modifiées par le mélange des trois pyrènes

Dans un second temps, nous avons étudié l'immobilisation de la glucose oxydase sur une électrode de platine modifiée par les nanotubes de carbone mono-paroi fonctionnalisés par le mélange équimolaire des trois pyrènes. Pour cela, une électrode déjà modifiée avec les SWCNTs et les trois pyrènes a été plongée dans une solution de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) contenant la glucose oxydase marquée avec des β-cyclodextrines (β-CD-GOX ; 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) puis rincée dans du tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7) sous agitation pendant 5 minutes. Nous avons ensuite suivi la réponse ampérométrique de cette électrode à un potentiel constant E = 0,6 V vs ECS dans une solution de tampon phosphate (0,1 mol.L<sup>-1</sup> ; pH = 7 ; T = 25 °C) en fonction des ajouts successifs de glucose dans la cellule électrochimique (**Figure III-12**).



**Figure III-12** : Réponse ampérométrique d'une électrode de platine ( $\varnothing = 5 \text{ mm}$ ) modifiée avec des nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs ;  $3 \times 20 \mu\text{L}$  à  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le THF) puis incubée successivement avec une solution de THF contenant les trois pyrènes fonctionnalisés (pyrène-NTA/pyrène-adamantane/pyrène-biotine ; 1/1/1) et une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) contenant la glucose oxydase marquée avec des  $\beta$ -cyclodextrines ( $\beta\text{-CD-GOX}$  ;  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) à  $E = 0,6 \text{ V}$  vs ECS suite aux injections successives de glucose dans la cellule électrochimique.

L'augmentation du courant obtenue lors de l'injection de  $200 \mu\text{L}$  d'une solution de glucose à  $10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$  dans la cellule électrochimique est présentée sur la **Figure III-13-A** ; le temps de réponse de cette électrode est donc de 30 s environ. La **Figure III-13-B** présente la courbe d'étalonnage résultant des injections de glucose dans la cellule électrochimique ; celle-ci a toujours l'allure typique des courbes obtenues pour les biocapteurs enzymatiques. La sensibilité et le courant de saturation obtenus lors de cette étude sont de  $5,71 \text{ mA.mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-2}$  et  $86,2 \mu\text{A.cm}^{-2}$  respectivement. Pour cette architecture, nous avons obtenu un seuil de détection de  $10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  et la gamme de linéarité s'étend jusqu'à  $6,3.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  en glucose. La constante apparente de Michaelis-Menten déterminée par la linéarisation de Lineweaver-Burk<sup>29</sup> est égale à  $10,5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  ( $R^2 = 0,995$ ).



**Figure III-13 :** **A** - Réponse ampérométrique à une augmentation de concentration en glucose de  $1,6 \text{ mmol.L}^{-1}$  dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) à  $E = 0,6 \text{ V}$  vs ECS obtenues avec une électrode de platine ( $\varnothing = 5 \text{ mm}$ ) modifiée avec des SWCNTs ( $3 \times 20 \text{ } \mu\text{L}$  à  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le THF) puis incubée successivement avec une solution de THF contenant les trois pyrènes fonctionnalisés (pyrène-NTA/pyrène-adamantane/pyrène-biotine ; 1/1/1) et une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) contenant la glucose oxydase marquée avec des  $\beta$ -cyclodextrines ( $\beta$ -CD-GOX ;  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). **B** - Courbe d'étalonnage du glucose obtenue avec l'électrode modifiée dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). RSD : 5 %.

Comme pour la précédente étude nous avons voulu comparer les résultats obtenus (**Tableau III-3**) lors de l'immobilisation de l'enzyme  $\beta$ -CD-GOX sur des nanotubes de carbone mono-paroi fonctionnalisés par le pyrène-adamantane seulement ou par le mélange équimolaire des trois pyrènes.

On peut noter, qu'ici aussi, les temps de réponse, les seuils de détection et les gammes de linéarité obtenus pour les deux architectures ne varient pas.

La valeur du courant de saturation  $J_{\text{max}}$  a diminué d'environ - 30 % dans le cas des SWCNTs fonctionnalisés avec le mélange équimolaire des trois pyrènes ; on aurait pu penser obtenir un tiers de la précédente valeur puisque seulement un tiers de la surface des SWCNTs sera fonctionnalisée par des groupements adamantane.

Cependant, nous avons aussi mis en avant une forte limitation au niveau de la régénération de l'enzyme lors de l'immobilisation de la glucose oxydase marquée avec des  $\beta$ -cyclodextrines sur les SWCNTs fonctionnalisés avec du pyrène-adamantane seulement et si

on regarde maintenant la constante apparente de Michaelis-Menten pour les deux architectures, on peut remarquer qu'elle a considérablement augmenté (multipliée par six environ) lors de l'étude sur les SWCNTs fonctionnalisés par le mélange des trois pyrènes. On peut alors estimer que la diffusion de O<sub>2</sub> sera meilleure si la couche d'enzyme est moins compacte comme nous l'avions évoqué pour le système NTA/Cu<sup>2+</sup>/Histidine.

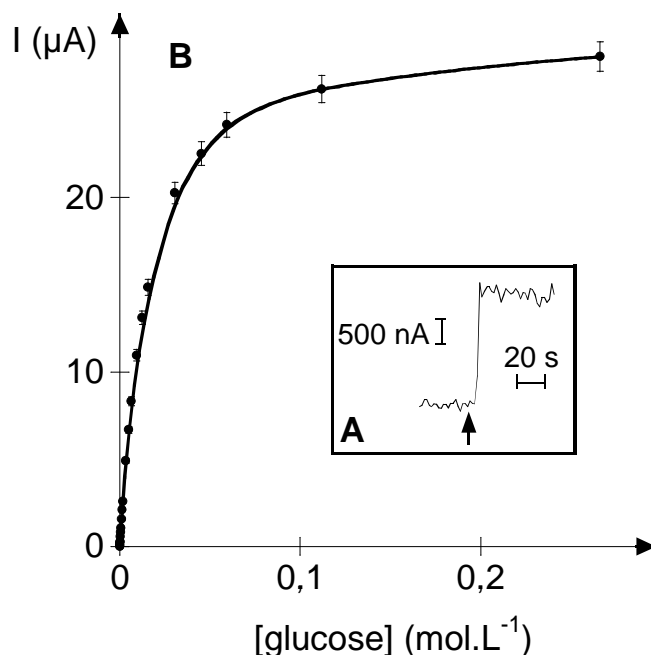
En effet, nous verrons un peu plus tard l'effet que peut avoir la drastique diminution du pourcentage de pyrène-adamantane sur l'électrode. On observe donc ici une diminution de la valeur de J<sub>max</sub> moins grande que ce que l'on attendait car, en même temps, la diffusion de O<sub>2</sub> semble s'améliorer ; l'amélioration de la diffusion de O<sub>2</sub> semble alors reliée de façon inverse à la quantité d'enzymes immobilisées sur l'électrode. Finalement, l'évolution de la sensibilité est identique à celle du courant de saturation : on perd – 30 % du signal lors de la diminution du pourcentage de pyrène-adamantane.

Système	Pyrène-adamantane/ β-CD-GOX	(Pyrène-NTA/Pyrène-biotine/ Pyrène-adamantane : 1/1/1)/ β-CD-GOX
temps de réponse (s)	30	30
J <sub>max</sub> (μA.cm <sup>-2</sup> )	135,4	86,2
sensibilité (mA.mol <sup>-1</sup> .L.cm <sup>-2</sup> )	8,20	5,71
seuil de détection (mol.L <sup>-1</sup> )	3,1.10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>
gamme de linéarité (mol.L <sup>-1</sup> )	3,1.10 <sup>-6</sup> – 9,4.10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-5</sup> – 6,3.10 <sup>-3</sup>
K <sub>M</sub> apparente (mol.L <sup>-1</sup> )	1,63.10 <sup>-3</sup>	10,5.10 <sup>-3</sup>

**Tableau III-3** : Comparatif des valeurs obtenues lors de l'immobilisation de la glucose oxydase marquée avec des β-cyclodextrines (β-CD-GOX) sur des électrodes modifiées avec des SWCNTs (3 x 20 μL à 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> dans le THF) et le pyrène-adamantane dans le premier cas ou un mélange équimolaire des trois pyrènes fonctionnalisés (pyrène-NTA/pyrène-biotine/pyrène-adamantane) dans le second cas.

Afin d'essayer de mieux comprendre ce système, nous avons réalisé une expérience supplémentaire en changeant le rapport molaire des trois pyrènes dans la solution permettant la fonctionnalisation des SWCNTs ; après plusieurs essais, nous avons choisi d'utiliser une

solution contenant 10 % de pyrène-NTA, 10 % de pyrène-adamantane et 80 % de pyrène-biotine. Nous nous sommes, en réalité, aperçu que toutes les électrodes élaborées avec seulement 10 % de pyrène-adamantane dans le mélange des trois permettait d'obtenir une constante apparente de Michaelis-Menten proche de celle déterminée en solution. Les étapes de modification de l'électrode n'ont pas été changées, elles ont été conservées afin de pouvoir comparer les résultats plus aisément.



**Figure III-14 :** **A** - Réponse ampérométrique à une augmentation de concentration en glucose de  $1,6 \text{ mmol.L}^{-1}$  dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) à  $E = 0,6 \text{ V}$  vs ECS obtenues avec une électrode de platine ( $\varnothing = 5 \text{ mm}$ ) modifiée avec des SWCNTs ( $3 \times 20 \text{ } \mu\text{L}$  à  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le THF) puis incubée successivement avec une solution de THF contenant les trois pyrènes fonctionnalisés (pyrène-NTA/pyrène-adamantane/pyrène-biotine ; rapport molaire 10/10/80) et une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) contenant la glucose oxydase marquée avec des  $\beta$ -cyclodextrines ( $\beta\text{-CD-GOX}$  ;  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). **B** - Courbe d'étalonnage du glucose obtenue avec l'électrode modifiée dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).  $\text{RSD} = 4 \%$ .

La **Figure III-14-A** montre l'augmentation de courant observée lors de l'injection de  $200 \text{ } \mu\text{L}$  d'une solution de glucose à  $10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$  dans la cellule électrochimique et on peut remarquer qu'ici le temps de réponse de l'électrode est de  $10 \text{ s}$  environ. La courbe d'étalonnage résultant des injections de glucose dans la cellule électrochimique est présentée sur la **Figure III-14-B**. La sensibilité et le courant de saturation obtenus avec ce rapport molaire des trois pyrènes lors de l'immobilisation de la glucose oxydase marquée avec des  $\beta$ -cyclodextrines sont de  $8,07 \text{ mA.mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-2}$  et  $142,8 \text{ } \mu\text{A.cm}^{-2}$  respectivement. Pour ce

rapport molaire des trois pyrènes, nous avons obtenu un seuil de détection de  $6,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  et la gamme de linéarité s'étend jusqu'à  $9,4 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  en glucose. La constante apparente de Michaelis-Menten déterminée par la linéarisation de Lineweaver-Burk<sup>29</sup> est égale à  $30,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9955$ ).

Cette étude supplémentaire a permis de fournir des informations complémentaires au sujet du système adamantane/ $\beta$ -cyclodextrine : il nous est alors paru intéressant de comparer les paramètres obtenus ici avec ceux obtenus lors de l'étude de l'ancrage de la glucose oxydase marquée avec des  $\beta$ -cyclodextrines sur les nanotubes de carbone mono-paroi fonctionnalisés avec du pyrène-adamantane seulement.

Dans le **Tableau III-4**, on peut tout de suite observer que les valeurs des courants maximum, des sensibilités, des seuils de détection et des gammes de linéarité pour ces deux architectures sont proches.

Il est peu probable que les SWCNTs fonctionnalisés par du pyrène-adamantane seulement ou avec le mélange contenant seulement 10 % de pyrène-adamantane permettent d'immobiliser la même quantité de  $\beta$ -CD-GOX.

Cependant, l'évolution des autres paramètres (temps de réponse et constante apparente de Michaelis-Menten) semble confirmer l'hypothèse d'une meilleure diffusion d' $\text{O}_2$  et/ou d'une moins grande consommation de celui-ci si la couche enzymatique est moins dense.

En effet, on constate qu'avec 10 % de pyrène-adamantane, la constante  $K_M^{\text{app}}$  obtenue est très proche de celle déterminée en solution<sup>35</sup> ( $33 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) et ceci permet de démontrer que les sites actifs enzymatiques seront plus accessibles (couche enzymatique moins compacte) grâce à une meilleure biocompatibilité du matériau.

De même, le temps de réponse a été divisé par trois en diminuant le pourcentage de pyrène-adamantane sur l'électrode ; on peut expliquer cela par la diminution de la compacité de la couche enzymatique mais il se peut aussi que la surface soit moins hydrophobe puisqu'il y a moins de groupements adamantane à la surface de l'électrode.



Système	Pyrène-adamantane/ $\beta$ -CD-GOX	(Pyrène-NTA/Pyrène-biotine/ Pyrène-adamantane : 10/80/10)/ $\beta$ -CD-GOX
temps de réponse (s)	30	10
$J_{\max}$ ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	135,4	142,8
sensibilité ( $\text{mA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	8,20	8,07
seuil de détection ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$3,1\cdot 10^{-6}$	$6,7\cdot 10^{-6}$
gamme de linéarité ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$3,1\cdot 10^{-6} - 9,4\cdot 10^{-3}$	$6,7\cdot 10^{-6} - 9,4\cdot 10^{-3}$
$K_M$ apparente ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$1,63\cdot 10^{-3}$	$30,5\cdot 10^{-3}$

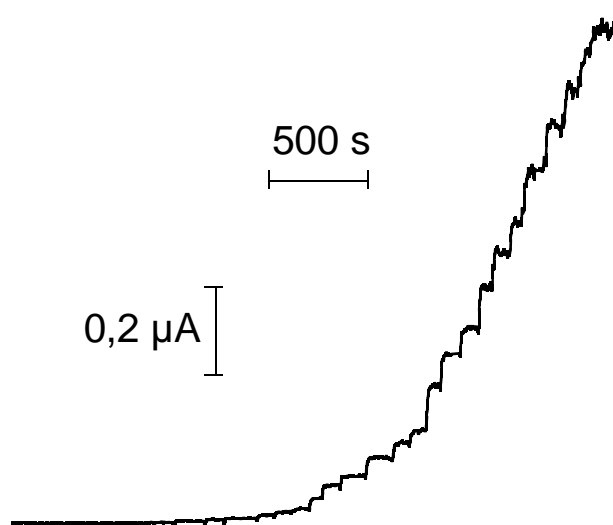
**Tableau III-4 :** Comparatif des valeurs obtenues lors de l'immobilisation de la glucose oxydase marquée avec des  $\beta$ -cyclodextrines ( $\beta$ -CD-GOX) sur des électrodes modifiées avec des SWCNTs ( $3 \times 20 \mu\text{L}$  à  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans le THF) et le pyrène-adamantane dans le premier cas ou un mélange des trois pyrènes fonctionnalisés (pyrène-NTA/pyrène-biotine/pyrène-adamantane avec un rapport molaire 10/10/80) dans le second cas.

#### III.2.4.c. Immobilisation de la glucose oxydase biotinylée (B-GOX) sur des électrodes modifiées par le mélange des trois pyrènes

Dans un troisième et dernier temps, nous avons examiné l'ancrage de la glucose oxydase biotinylée sur une électrode de platine sur laquelle nous avons effectué le dépôt des nanotubes de carbone mono-paroi qui ont ensuite été fonctionnalisés par trempage dans une solution équimolaire des trois pyrènes. Cette électrode a été incubée successivement dans des solutions de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) contenant l'avidine ( $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) puis la glucose oxydase biotinylée (B-GOX ;  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Chaque incubation a été suivie d'une étape de rinçage dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) sous agitation. La **Figure III-15** montre la réponse ampérométrique de cette électrode au potentiel imposé  $E = 0,6 \text{ V vs ECS}$  dans une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$  ;  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) au fur et à mesure des ajouts de glucose.

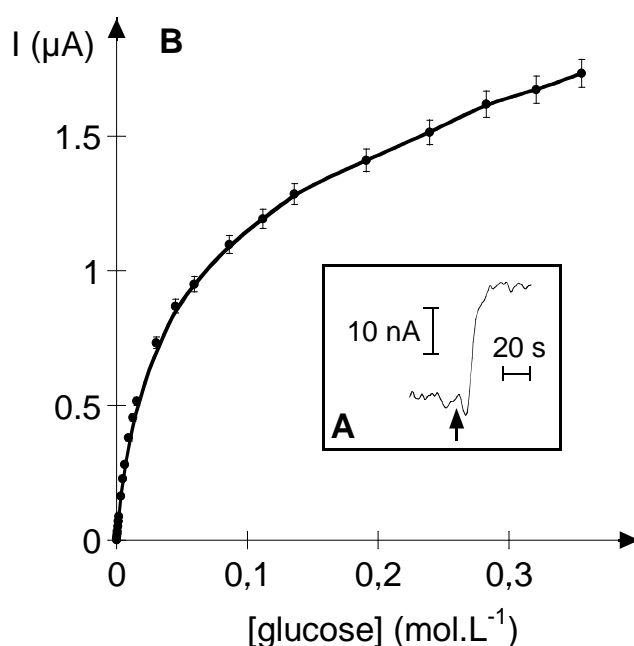
Comme nous avons mis en évidence l'interaction NTA/ $\text{Cu}^{2+}$ /biotine au Chapitre II (§ **II.4.**), nous n'avons évidemment pas mis les électrodes modifiées par les SWCNTs

fonctionnalisés par le mélange des trois pyrènes dans une solution contenant des ions  $\text{Cu}^{2+}$  avant d'étudier l'ancrage de la glucose oxydase biotinylée sur ce type d'électrodes. Cependant, une étude précédente réalisée au laboratoire<sup>36</sup> avec le poly(pyrrole-NTA) avait permis de démontrer que la glucose oxydase histidinylée pouvait s'ancrer sur ce polymère même sans ajout de  $\text{Cu}^{2+}$  et en fournissant des résultats bien inférieurs à ceux obtenus lorsque le polymère était tout d'abord modifié avec des ions  $\text{Cu}^{2+}$  ; en effet, sans complexation préalable d'ions  $\text{Cu}^{2+}$  sur le poly(pyrrole-NTA), on n'obtient qu'environ 20 % des valeurs obtenues en présence de ce cation métallique. Ceci peut s'expliquer par le fait que la verrerie, l'eau distillée ou encore les tampons utilisés ne peuvent pas être totalement débarrassés de leurs cations métalliques. De même, nous n'avons pas purifié les enzymes utilisées et celles-ci peuvent aussi contenir des cations métalliques. Dans le cas de l'immobilisation de la glucose oxydase biotinylée, il se peut alors que celle-ci s'ancore aussi sur le pyrène-NTA et pas seulement sur le pyrène-biotine même si nous avons essayé de minimiser ce phénomène en n'ajoutant pas  $\text{Cu}^{2+}$  avant toutes les expériences décrites par la suite.



**Figure III-15 :** Réponse ampérométrique d'une électrode de platine ( $\varnothing = 5 \text{ mm}$ ) modifiée avec des nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs ;  $3 \times 20 \mu\text{L}$  à  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le THF) puis incubée successivement avec une solution de THF contenant les trois pyrènes fonctionnalisés (pyrène-NTA/pyrène-adamantane/pyrène-biotine ; 1/1/1) et des solutions de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) contenant l'avidine ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) puis la glucose oxydase biotinylée (B-GOX ;  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) à  $E = 0,6 \text{ V}$  vs ECS suite aux injections successives de glucose dans la cellule électrochimique.

L'injection de 200  $\mu\text{L}$  d'une solution de glucose à une concentration de  $10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$  est représentée sur la **Figure III-16-A** ; le temps de réponse propre à cette architecture est de 20 s environ. Les injections successives de glucose dans la cellule électrochimique ont permis d'obtenir la courbe d'étalonnage présentée sur la **Figure III-16-B**. On peut clairement observer que les performances de ce système sont beaucoup plus faibles que pour les deux autres : la sensibilité de cette électrode modifiée est de  $0,29 \text{ mA.mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-2}$  tandis que le courant de saturation vaut  $8,8 \mu\text{A.cm}^{-2}$ . La gamme de linéarité s'étend de  $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  (seuil de détection) à  $6,3.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  en glucose. La constante  $K_M^{\text{app}}$ , déterminée par la linéarisation de Lineweaver-Burk<sup>29</sup>, s'élève à  $76,6.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9973$ ).



**Figure III-16 :** A - Réponse ampérométrique à une augmentation de concentration en glucose de  $1,6 \text{ mmol.L}^{-1}$  dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) à  $E = 0,6 \text{ V}$  vs ECS obtenues avec une électrode de platine ( $\text{Ø} = 5 \text{ mm}$ ) modifiée avec des SWCNTs ( $3 \times 20 \mu\text{L}$  à  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le THF) puis incubée successivement avec une solution de THF contenant les trois pyrènes fonctionnalisés (pyrène-NTA/pyrène-adamantane/pyrène-biotine ; 1/1/1) et des solutions de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) contenant l'avidine ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) puis la glucose oxydase biotinylée (B-GOX ;  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). B - Courbe d'étalonnage du glucose obtenue avec l'électrode modifiée dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). RSD : 5 %.

De la même manière que pour les deux systèmes précédents, nous avons analysé les résultats obtenus pour l'ancrage de la glucose oxydase biotinylée sur les nanotubes de carbone mono-paroi fonctionnalisés par du pyrène-biotine seulement ou par le mélange équimolaire des trois pyrènes afin d'effectuer une comparaison (**Tableau III-5**).

Comme pour les comparaisons réalisées précédemment, on remarque que les temps de réponse, les seuils de détection et les gammes de linéarité sont similaires. Par contre, on peut noter une nette augmentation du courant de saturation  $J_{\max}$  (+ 75 %) et de la valeur de la sensibilité (+ 160 %); la diminution de la quantité de pyrène-biotine à la surface des SWCNTs et donc de l'électrode se traduit par une diminution de la quantité d'avidine déposée sur la surface. Cette couche d'avidine étant connue pour générer des problèmes de diffusion, la diminution de la densité de la couche de cette protéine pourrait permettre d'expliquer l'augmentation des valeurs de sensibilité et de courant de saturation.

Cependant, si on regarde maintenant les constantes apparentes de Michaelis-Menten des deux architectures, on peut observer que sa valeur a augmenté (+ 15 %) en diminuant le pourcentage de pyrène-biotine sur la surface. Ce phénomène peut venir du fait que ce système est un peu plus compliqué que les deux autres car l'avidine est une protéine qui peut être coordonnée à quatre molécules de biotine (**Schéma III-7**). Une précédente étude réalisée par microbalance à quartz au laboratoire<sup>37</sup> a permis de démontrer que, l'exposition d'une surface fonctionnalisée par du poly(pyrrole-biotine)/avidine a une solution de glucose oxydase biotinylée ne va pas permettre à toutes les molécules d'avidine d'être occupées par une enzyme. De plus, si moins de molécules de biotine venant du pyrène-biotine sont disponibles sur la surface, on aura probablement un meilleur espacement entre celles-ci à condition que le pyrène-biotine se répartisse de façon uniforme sur la surface. Dans le cas d'une distribution homogène des groupements biotine sur les SWCNTs fonctionnalisés par le mélange des trois pyrènes, on immobilisera moins de molécules d'avidine et celles-ci pourront alors être toutes occupées par une enzyme (glucose oxydase biotinylée) voire plusieurs. Effectivement, il semblerait donc que dans les deux systèmes comparés ici, il ne s'agisse pas vraiment d'une meilleure diffusion du glucose mais plutôt d'une meilleure distribution des enzymes à la surface des nanotubes de carbone mono-paroi.

Comme pour le système adamantane/ $\beta$ -cyclodextrine, nous avons effectué une expérience supplémentaire afin de vérifier cette hypothèse et de trouver le pourcentage de pyrène-biotine permettant d'obtenir une constante apparente de Michaelis-Menten proche de celle déterminée en solution pour cette enzyme.

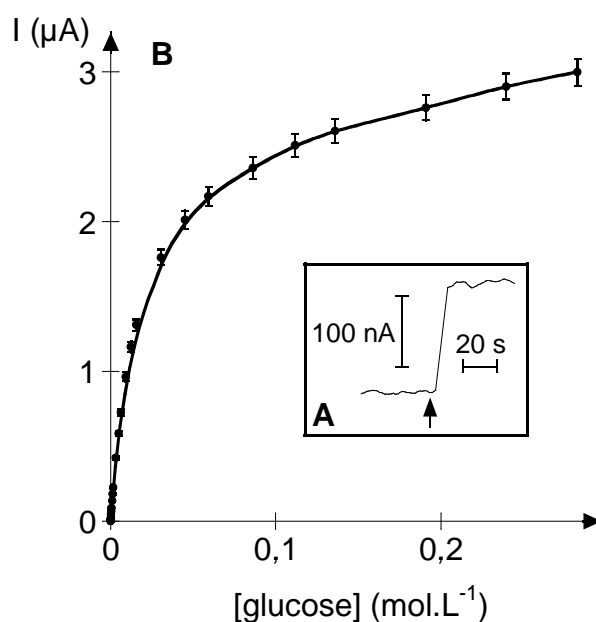
Système	Pyrène-biotine/avidine/B-GOX	(Pyrène-NTA/Pyrène-biotine/ Pyrène-adamantane : 1/1/1)/ avidine/B-GOX
temps de réponse (s)	20	20
$J_{\max}$ ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	5,1	8,8
sensibilité ( $\text{mA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0,11	0,29
seuil de détection ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$3,4\cdot 10^{-4}$	$10^{-4}$
gamme de linéarité ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$3,4\cdot 10^{-4} - 1,2\cdot 10^{-2}$	$10^{-4} - 6,3\cdot 10^{-3}$
$K_M$ apparente ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$66,4\cdot 10^{-3}$	$76,6\cdot 10^{-3}$

**Tableau III-5 :** Comparatif des valeurs obtenues lors de l'immobilisation de la glucose oxydase biotinylée (B-GOX) sur des électrodes modifiées avec des SWCNTs ( $3 \times 20 \mu\text{L}$  à  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans le THF) et le pyrène-biotine dans le premier cas ou un mélange équimolaire des trois pyrènes fonctionnalisés (pyrène-NTA/pyrène-biotine/pyrène-adamantane) dans le second cas.

De la même manière que pour le système précédent, différents rapports molaires ont été testés et nous nous sommes aperçus qu'il faut, pour ce système, utiliser une solution contenant très peu de pyrène-biotine. En effet, toutes les expériences réalisées avec seulement 1 % de pyrène-biotine sont celles qui permettent d'obtenir la constante apparente de Michaelis-Menten la plus proche de celle déterminée en solution. Les nanotubes de carbone mono-paroi précédemment déposés sur l'électrode de platine ont donc été fonctionnalisés par trempage dans une solution contenant 20 % de pyrène-NTA, 79 % de pyrène-adamantane et 1 % de pyrène-biotine. La procédure de modification de l'électrode est restée identique afin de vraiment voir l'effet de cette diminution du pourcentage de pyrène-biotine à la surface des SWCNTs.

Le temps de réponse correspondant à cette électrode modifiée est de l'ordre de 10 s et a été déterminé à partir de la **Figure III-17-A** sur laquelle on voit l'augmentation du courant provoquée par l'ajout de  $200 \mu\text{L}$  d'une solution de glucose à  $10^{-1} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Les injections successives de glucose dans la cellule électrochimique nous ont permis d'obtenir la courbe d'étalonnage présentée sur la **Figure III-17-B**. Cette courbe est linéaire pour des

concentrations en glucose comprises entre  $1,8 \cdot 10^{-5}$  et  $6,3 \cdot 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> et la pente de cette partie linéaire de la courbe (sensibilité de l'électrode) est de  $0,72 \text{ mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Le courant de saturation est de  $15,3 \text{ } \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  tandis que la constante apparente de Michaelis-Menten,  $K_M^{\text{app}}$ , déterminée par la linéarisation de Lineweaver-Burk<sup>29</sup>, vaut  $37,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9963$ ).



**Figure III-17 :** *A - Réponse ampérométrique à une augmentation de concentration en glucose de  $1,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ } ^\circ\text{C}$ ) à  $E = 0,6 \text{ V}$  vs ECS obtenues avec une électrode de platine ( $\text{Ø} = 5 \text{ mm}$ ) modifiée avec des SWCNTs ( $3 \times 20 \text{ } \mu\text{L}$  à  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  dans le THF) puis incubée successivement avec une solution de THF contenant les trois pyrènes fonctionnalisés (pyrène-NTA/pyrène-adamantane/pyrène-biotine ; rapport molaire 20/79/1) et des solutions de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) contenant l'avidine ( $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) puis la glucose oxydase biotinylée (B-GOX ;  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). B - Courbe d'étalonnage du glucose obtenue avec l'électrode modifiée dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ } ^\circ\text{C}$ ). RSD : 6 %.*

Les résultats correspondant à l'immobilisation de la glucose oxydase biotinylée sur les nanotubes de carbone mono-paroi fonctionnalisés par du pyrène-biotine seulement ou le mélange des trois pyrènes dans un rapport molaire 20/79/1 (pyrène-NTA/pyrène-adamantane/pyrène-biotine ;  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) sont présentés dans le **Tableau III-6**. On peut tout de suite noter que, dans le cas du système avec seulement 1 % de pyrène-biotine, nous avons réussi à obtenir une constante apparente de Michaelis-Menten ( $37,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) très proche de celle de l'enzyme en solution<sup>35</sup> ( $33 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) et ceci permet de dire que ce matériau a une meilleure biocompatibilité avec la glucose oxydase biotinylée.

Il faut, en tout premier lieu, rappeler que le pyrène-NTA est présent à la surface des SWCNTs et peut interagir avec cette enzyme en la maintenant sur l'électrode même si nous n'avons pas réalisé d'incubation préalable dans une solution contenant un cation métallique tel que  $\text{Cu}^{2+}$ ; les résultats présentés ici peuvent alors être une combinaison des deux phénomènes d'ancrage biotine/avidine et NTA/ $\text{Cu}^{2+}$ /biotine.

Comme nous l'avions précédemment supposé, le fait de mettre moins de pyrène-biotine va faire aussi diminuer la quantité d'avidine sur la surface; en effet, le passage de 100 % à 1 % de pyrène-biotine permet de multiplier par trois le courant de saturation. En principe, la valeur de  $J_{\text{max}}$  est directement proportionnelle à la quantité d'enzymes immobilisées sur la surface de l'électrode<sup>38</sup> mais on peut remarquer que, dans le cas de ce système, ce ne sera pas le cas puisque le courant de saturation aurait alors dû être divisé par 100. De même, cette augmentation ne peut pas être expliquée par l'immobilisation de plusieurs B-GOX sur la même avidine (on aurait alors obtenu une valeur de  $J_{\text{max}}$  égale à environ 3 % de la valeur obtenue avec 100 % de pyrène-biotine sur la surface des SWCNTs). De plus, il ne faut pas oublier la possibilité d'interaction entre les groupements NTA et la biotine qui peuvent être présents dans ce genre d'architecture. Cette augmentation remarquable du courant de saturation est probablement due à une meilleure perméabilité des couches déposées sur l'électrode; de même, cette évolution serait sûrement moins marquée si les groupements biotine déposés sur la surface des SWCNTs n'étaient pas répartis de façon homogène.

Le passage de 100 % à 1 % de pyrène-biotine sur la surface des SWCNTs provoque une nette augmentation de la sensibilité de l'électrode qui a été multipliée par sept environ. Ceci traduit bien une augmentation de la perméabilité de la couche de protéine déposée sur les nanotubes de carbone mono-paroi. Nous avons donc réussi à optimiser le taux d'occupation du système biotine/avidine sur la surface des SWCNTs et donc de l'électrode.

Le seuil de détection et la gamme de linéarité obtenues avec seulement 1 % de pyrène-biotine sur la surface de l'électrode ont, elles-aussi, évolué et même si cette évolution est moins marquée, on peut noter que l'on retrouve maintenant des valeurs pour ces deux paramètres assez similaires à celles obtenues avec les deux autres systèmes affins étudiés dans cette partie du chapitre. Bien que ce cas paraisse plus compliqué que les deux autres en raison d'interactions non-spécifiques entre la biotine et le groupement NTA, les résultats obtenus sont prometteurs.

Système	Pyrène-biotine/avidine/B-GOX	(Pyrène-NTA/Pyrène-biotine/ Pyrène-adamantane : 20/1/79)/ avidine/B-GOX
temps de réponse (s)	20	10
$J_{\max}$ ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	5,1	15,3
sensibilité ( $\text{mA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0,11	0,72
seuil de détection ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$3,4\cdot 10^{-4}$	$1,8\cdot 10^{-5}$
gamme de linéarité ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$3,4\cdot 10^{-4} - 1,2\cdot 10^{-2}$	$1,8\cdot 10^{-5} - 6,3\cdot 10^{-3}$
$K_M$ apparente ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$66,4\cdot 10^{-3}$	$37,6\cdot 10^{-3}$

**Tableau III-6 :** Comparatif des valeurs obtenues lors de l'immobilisation de la glucose oxydase biotinylée (B-GOX) sur des électrodes modifiées avec des SWCNTs ( $3 \times 20 \mu\text{L}$  à  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans le THF) et le pyrène-biotine dans le premier cas ou un mélange des trois pyrènes fonctionnalisés (pyrène-NTA/pyrène-biotine/pyrène-adamantane avec un rapport molaire 20/79/1) dans le second cas.

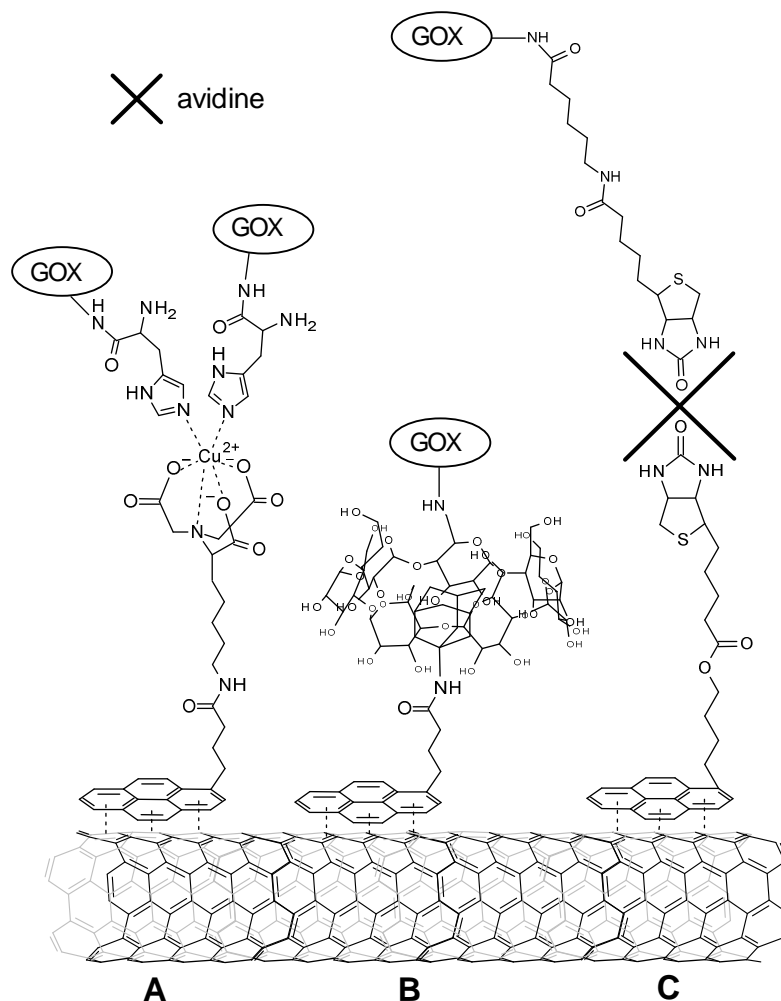
### III.2.5. Combinaison des trois systèmes affins pour la fonctionnalisation multiple des nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs)

Dans cette dernière partie du chapitre, nous avons finalement combiné les trois systèmes affins étudiés précédemment afin de réaliser l'immobilisation des trois glucose oxydases marquées avec des histidines, des  $\beta$ -cyclodextrines ou des biotines sur des électrodes modifiées par des SWCNTs fonctionnalisés par le mélange des trois pyrènes (pyrène-NTA, pyrène-adamantane et pyrène-biotine).

#### III.2.5.a. Principe

Le **Schéma III-9** représente l'architecture « multi-fonctionnalisée » que nous avons voulu étudier ; les différentes interactions mises en jeu en vue de l'élaboration de ce système sont regroupées sur ce schéma (pyrène/SWCNTs, NTA/ $\text{Cu}^{2+}$ /Histidine, adamantane/ $\beta$ -cyclodextrine et avidine/biotine).





**Schéma III-9 :** Principe de l'immobilisation des trois glucose oxydases fonctionnalisées (*His-GOX*,  $\beta$ -*CD-GOX* et *B-GOX*) sur les nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs) modifiés par le mélange des trois pyrènes (pyrène-NTA, pyrène-adamantane et pyrène-biotine) grâce aux différents systèmes d'affinité utilisés : **A** - NTA/Cu<sup>2+</sup>/Histidine, **B** -  $\beta$ -cyclodextrine/adamantane et **C** - biotine/avidine/biotine.

Comme pour les expériences précédentes, des électrodes de platine ont, tout d'abord, été modifiées avec un dépôt de nanotubes de carbone mono-paroi (3 x 20  $\mu$ L d'une dispersion à 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> déposées successivement sur la surface de l'électrode et séchées sous vide). Nous avons pu remarquer lors du processus de caractérisation de chaque système séparément que le mélange équimolaire des trois pyrènes (5.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> dans le THF) n'est pas forcément celui qui permet l'obtention des meilleurs résultats mais, nous verrons plus tard qu'il permet tout de même la triple fonctionnalisation des électrodes. Devant cet état de fait, nous avons utilisé ce mélange équimolaire pour réaliser l'étude présentée ici.

### ***III.2.5.b. Détermination de l'ordre des incubations***

Devant la complexité d'une telle architecture, nous avons dû déterminer l'ordre des incubations afin d'éviter des interactions non-spécifiques.

En effet, dans paragraphe **II.4.** du Chapitre II, nous avons mis en évidence l'existence d'une interaction NTA/Cu<sup>2+</sup>/biotine qui doit absolument être contrée dans cette étude afin de pouvoir détecter l'ancrage de chaque enzyme. Nous avons donc décidé de réaliser le trempage dans la solution de Cu<sup>2+</sup> juste avant de réaliser l'incubation avec His-GOX.

De la même façon, nous avons grandement illustré les problèmes de perméabilité causés par le système avidine/biotine tout au long des étapes de caractérisations présentées dans ce chapitre (§ **III.2.3.c.** et § **III.2.4.c.**).

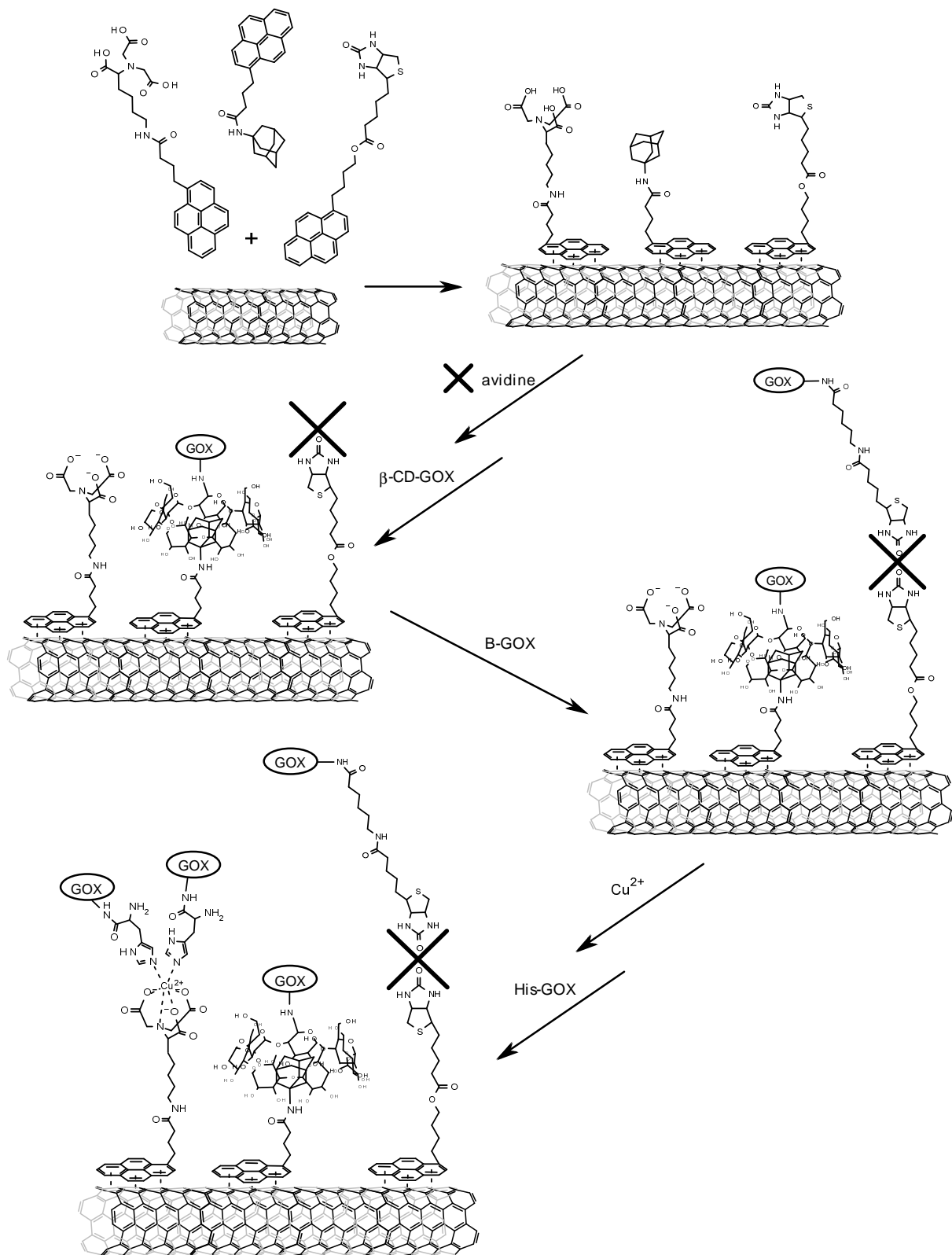
Afin de déterminer à quelle étape de la construction de cet assemblage biomoléculaire l'avidine devait être déposée sur la surface, nous avons examiné l'effet du dépôt d'avidine sur la surface de SWCNTs fonctionnalisés par le mélange équimolaire des trois pyrènes lors de l'ancrage des glucose oxydases marquées avec des histidines ou des  $\beta$ -cyclodextrines. L'immobilisation de  $\beta$ -CD-GOX sur ce type de surface modifiée (§ **III.2.4.b.**) avait permis d'obtenir un courant de saturation  $J_{\max} = 86,2 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  tandis que lorsque cette même surface a été préalablement modifiée avec l'avidine, on obtient seulement 6 % de cette valeur ( $J_{\max} = 5,1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). De la même manière, l'ancrage de His-GOX sur des nanotubes fonctionnalisés par le mélange équimolaire des trois pyrènes (§ **III.2.4.a.**) fourni un courant de saturation  $J_{\max} = 67,4 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  tandis que lorsque l'avidine est tout d'abord immobilisée sur la surface, on obtient uniquement 20 % de cette valeur ( $J_{\max} = 13,8 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Nous avons ensuite remarqué que si l'avidine n'est pas la première couche déposée sur l'électrode, il est impossible d'obtenir une évolution croissante des courants de saturation pour chaque couche d'enzyme déposée successivement sur l'électrode ; effectivement, pour toutes les électrodes testées, dès que l'on réalise l'incubation avec l'avidine, les valeurs de  $J_{\max}$  diminuent drastiquement. Nous avons donc choisi de déposer l'avidine en tout premier lieu même si les performances de l'électrode « multi-fonctionnalisée » seront alors amoindries.

En tenant compte de toutes ces considérations, nous avons établi l'ordre suivant pour les incubations : avidine,  $\beta$ -CD-GOX, B-GOX,  $\text{Cu}^{2+}$ , His-GOX. Le **Schéma III-10** montre une représentation schématique de la stratégie multi-étapes utilisée pour réaliser la fonctionnalisation multiple des nanotubes de carbone mono-paroi.

Que ce soit pour les caractérisations par microscopie électronique à balayage ou pour les mesures ampérométriques, les électrodes de platine fonctionnalisées par les nanotubes de carbone mono-paroi ont été tout d'abord trempées dans le mélange équimolaire des trois pyrènes (pyrène-NTA/pyrène-adamantane/pyrène-biotine ; rapport molaire 1/1/1 ;  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  dans le THF) pendant 30 min. Les électrodes ont été rincées avec du THF, de l'eau distillée et du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) sous agitation pendant 5 minutes chacun. Ces électrodes ont ensuite été incubées successivement dans des solutions de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) contenant l'avidine ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), la glucose oxydase marquée avec des  $\beta$ -cyclodextrines ( $\beta$ -CD-GOX ;  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), la glucose oxydase biotinylée (B-GOX ;  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), une solution de tampon acétate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 4,8$ ) contenant  $\text{Cu}^{2+}$  ( $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ ) puis une dernière solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) contenant la glucose oxydase histidinylée (His-GOX ;  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ).

Pour les mesures ampérométriques, chaque incubation a été suivie d'un rinçage dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) sous agitation pendant 5 minutes sauf dans le cas de l'incubation avec  $\text{Cu}^{2+}$  où ce rinçage a été précédé d'un rinçage dans une solution de NaCl ( $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ) pendant 5 minutes et sous agitation.

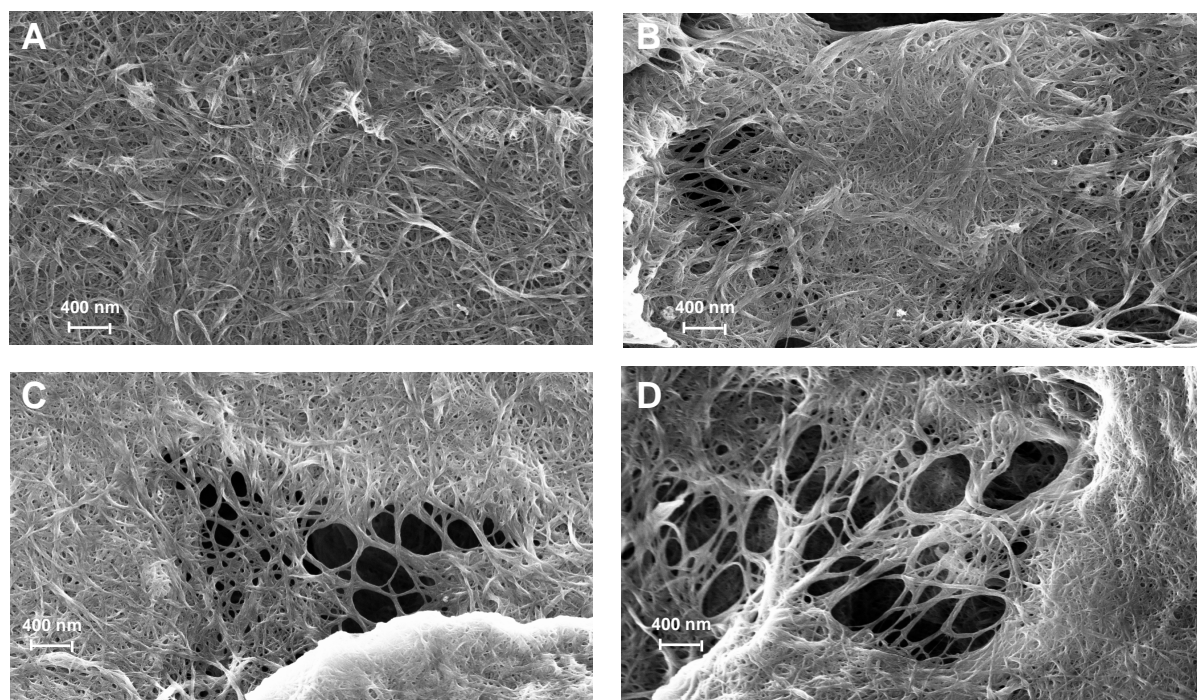
Pour les caractérisations par microscopie électronique à balayage, Chaque rinçage avec du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) a été suivi d'une autre étape de rinçage avec de l'eau ultra-pure afin de ne pas avoir les traces de sels sur les clichés MEB.



**Schéma III-10 :** Représentation schématique de la stratégie étape par étape employée pour la fonctionnalisation multiple des nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs).

### III.2.5.c. Caractérisation par microscopie électronique à balayage

Nous avons utilisé la microscopie électronique à balayage pour caractériser ce système et obtenir des informations qualitatives de l'état de la surface des nanotubes de carbone mono-paroi après chaque incubation avec une enzyme.



**Figure III-18** : Clichés obtenus en microscopie électronique à balayage pour des électrodes modifiées par un dépôt de nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs) fonctionnalisés par le mélange équimolaire des trois pyrènes (pyrène-NTA, pyrène-adamantane et pyrène-biotine), **A** - sans autre modification puis après l'immobilisation successive de **B** - l'avidine et la glucose oxydase marquée avec des  $\beta$ -cyclodextrines ( $\beta$ -CD-GOX), **C** - la glucose oxydase biotinylée (B-GOX) et enfin, **D** - les ions  $\text{Cu}^{2+}$  et la glucose oxydase histidinylée (His-GOX).

La **Figure III-18-A** montre un cliché obtenu avec une électrode de platine recouverte de SWCNTs fonctionnalisés par le mélange équimolaire des trois pyrènes ; on peut remarquer que la surface est recouverte d'un dépôt homogène de nanotubes de carbone mono-paroi. Après les incubations avec l'avidine et  $\beta$ -CD-GOX, on obtient le cliché présenté sur la **Figure III-18-B** et on peut observer que le dépôt de nanotubes semble plus compact mais aussi que de petites cavités sont apparues dans la couche de SWCNTs.

On peut supposer que ces micro-cavités proviennent d'une réticulation des nanotubes due aux modifications de l'électrode effectuées ; en effet, l'avidine va pouvoir agir comme un pont entre deux biotines provenant des molécules de pyrène-biotine immobilisées sur la surface à condition qu'elles soient assez proches et, dans le cas du système adamantane/ $\beta$ -

cyclodextrine, une enzyme  $\beta$ -CD-GOX va, elle-aussi, pouvoir ponter entre deux molécules d'adamantane exposées par la surface.

Si on regarde maintenant les clichés suivants correspondants à l'état de surface après l'immobilisation de la glucose oxydase biotinylée (**Figure III-18-C**) puis après l'incubation avec  $\text{Cu}^{2+}$  et la glucose oxydase histidinylée (**Figure III-18-D**), on peut noter que les cavités ont tendance à s'élargir en formant de grandes cavités qui nous confortent dans l'hypothèse d'une réticulation des nanotubes de carbone mono-paroi par les protéines fonctionnalisées.

#### *III.2.5.d. Etude du système par ampérométrie*

Nous avons finalement évalué les performances de l'architecture biomoléculaire « multi-fonctionnalisée » élaborée selon le protocole défini précédemment par des mesures ampérométriques à potentiel imposé  $E = 0,6 \text{ V vs ECS}$  au fur et à mesure des injections de glucose dans la cellule électrochimique dans une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$  ;  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Ces mesures ont été réalisées après chaque incubation avec une enzyme et l'électrode a ensuite été soigneusement rincée avant d'y déposer l'enzyme suivante afin d'éliminer toute trace de glucose de l'électrode et ainsi éviter une désactivation de l'enzyme lors du processus d'immobilisation sur la surface.

Pour rappel, l'ordre des incubations est le suivant : les électrodes de platine modifiées avec les SWCNTs et le mélange équimolaire des trois pyrènes ont successivement été incubées avec l'avidine,  $\beta$ -CD-GOX, B-GOX,  $\text{Cu}^{2+}$  et His-GOX.

Les trois courbes d'étalonnages obtenues sont présentées sur la **Figure III-19** et on voit bien l'augmentation du courant de saturation en fonction des différentes glucose oxydases immobilisées sur la surface sur ces courbes.

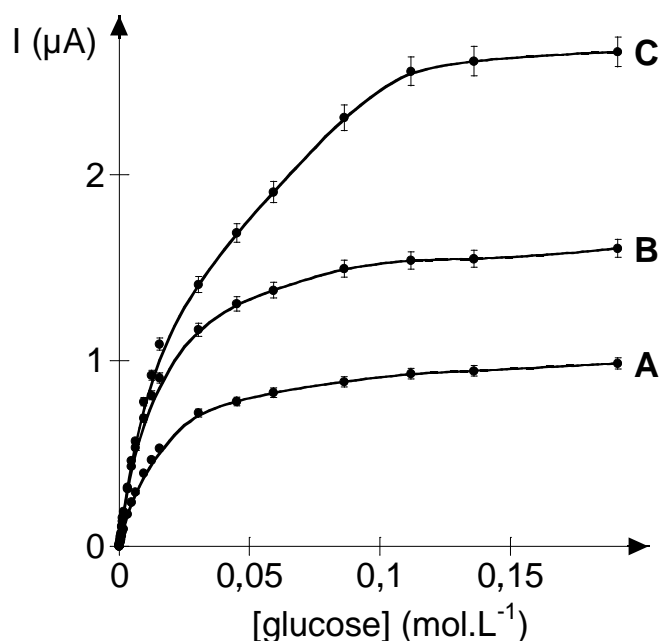
Dans ce cas, nous ne nous sommes pas intéressés aux valeurs des constantes apparentes de Michaelis-Menten  $K_M^{\text{app}}$  ; en effet, leur détermination n'aurait aucun réel sens physique puisque ces constantes seraient alors, en réalité, une combinaison des constantes de chaque enzyme. Ceci aurait alors nécessité des modélisations de cinétique enzymatiques qui n'était pas l'objet de cette étude.

L'ancrage de la glucose oxydase marquée avec des  $\beta$ -cyclodextrines ( $\beta$ -CD-GOX), correspondant à la courbe d'étalonnage présentée sur la **Figure III-19-A**, permet d'obtenir un

courant de saturation égal à  $5,3 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ , une sensibilité de  $0,3 \text{ mA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-2}$  et un temps de réponse, relativement élevé, de l'ordre de 60 s.

La **Figure III-19-B** montre la courbe d'étalonnage obtenue après l'immobilisation de la glucose oxydase biotinylée (B-GOX) ; celle-ci présente un courant de saturation égal à  $8,4 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  correspondant aux réponses combinées des deux enzymes ( $\beta$ -CD-GOX et B-GOX). La sensibilité de cette électrode modifiée est de  $0,53 \text{ mA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-2}$  tandis que le temps de réponse vaut 40 s.

La courbe d'étalonnage présentée sur la **Figure III-19-C** a été obtenue après les incubations avec  $\text{Cu}^{2+}$  et la glucose oxydase histidinylée (His-GOX). Dans ce cas, les résultats sont assez surprenants car on a une augmentation significative du courant de saturation qui devient égal à  $13,5 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  (combinaison des réponses des trois enzymes :  $\beta$ -CD-GOX, B-GOX et His-GOX) tandis que la valeur de la sensibilité de l'électrode n'évolue que très peu ( $0,59 \text{ mA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Le temps de réponse de cette électrode est de 20 s.



**Figure III-19** : Courbes d'étalonnage du glucose dans le tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) à  $E = 0,6 \text{ V}$  vs ECS obtenues avec une électrode de platine ( $\varnothing = 5 \text{ mm}$ ) modifiée par un dépôt de SWCNTs ( $3 \times 20 \mu\text{L}$  à  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans le THF) puis incubée successivement avec une solution de THF contenant les trois pyrènes fonctionnalisés (pyrène-NTA/pyrène-adamantane/pyrène-biotine ;  $1/1/1$  molaire à  $5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), des solutions de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) contenant l'avidine ( $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),  $\beta$ -CD-GOX ( $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (courbe A), B-GOX ( $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (courbe B), une solution de tampon acétate ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 4,8$ ) contenant  $\text{Cu}^{2+}$  ( $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) contenant His-GOX ( $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (courbe C). RSD : 4 % pour chaque courbe.

Les valeurs obtenues pour chaque couche d'enzyme déposée sur l'électrode sont récapitulées dans le **Tableau III-7**. On voit bien la complexité de cette architecture de part l'évolution de certains paramètres mais on peut quand même remarquer que le temps de réponse diminue au fur et à mesure des différentes enzymes déposées sur l'électrode ; ceci nous a tout d'abord surpris par le fait que nous pensions voir cette valeur augmenter en fonction du nombre de couches enzymatiques à cause d'un ralentissement de la diffusion de  $H_2O_2$  dans cette couche d'enzyme qui devient de plus en plus compacte mais si on regarde à nouveau les clichés obtenus par MEB, on peut expliquer cette diminution du temps de réponse par la formation des micro-cavités dans le dépôt de SWCNTs que l'on a mise en évidence et leur agrandissement en fonction des enzymes successivement déposées.

Les seuils de détection et les gammes de linéarité des trois couches enzymatiques sont identiques.

On peut remarquer que les valeurs des courants de saturation et de sensibilité présentées dans le **Tableau III-7** n'ont pas été rapportées à l'activité enzymatique en solution (même si celle-ci est tout de même mentionnée, pour information) ; ceci vient du fait que les valeurs obtenues correspondent à la réponse simultanée de plusieurs enzymes (sauf pour la première couche) et qu'il serait alors incorrect de rapporter ces valeurs à celle d'une seule enzyme.

On remarque que l'évolution du courant de saturation n'est pas linéaire pour les trois couches puisque nous avons obtenu  $5,3 \mu A.cm^{-2}$  pour  $\beta$ -CD-GOX puis une augmentation de  $+ 3,1 \mu A.cm^{-2}$  lors de l'immobilisation de B-GOX suivie d'une augmentation de  $+ 5,1 \mu A.cm^{-2}$  pour His-GOX.

De la même façon, la sensibilité obtenue pour la première couche d'enzyme ( $\beta$ -CD-GOX) était de  $0,30 mA.mol^{-1}.L.cm^{-2}$  et cette valeur a presque doublé lors de l'immobilisation de B-GOX ( $+ 0,23 mA.mol^{-1}.L.cm^{-2}$ ) tandis qu'elle a très peu évolué pour la troisième et dernière enzyme immobilisée ( $+ 0,06 mA.mol^{-1}.L.cm^{-2}$  pour His-GOX).

Ces évolutions paraissent très compliquées à expliquer mais l'état de la surface change aussi considérablement en fonction des ajouts d'enzymes sur la surface de l'électrode comme nous l'avons vu par microscopie à balayage électronique. Effectivement, nous avons mis en évidence un compactage et une réticulation des SWCNTs lors de l'augmentation du nombre d'enzymes immobilisées qui vont alors réduire la surface des nanotubes de carbone accessible aux enzymes mais celle-ci vont pouvoir par la même occasion s'ancrer dans les cavités créées de façon concomitante.



Enzyme	$\beta$ -CD-GOX	B-GOX	His-GOX
temps de réponse (s)	60	40	20
$J_{\max}$ ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	5,3	8,4	13,5
sensibilité ( $\text{mA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	0,30	0,53	0,59
seuil de détection ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$3,6\cdot 10^{-5}$	$3,6\cdot 10^{-5}$	$3,6\cdot 10^{-5}$
gamme de linéarité ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$3,6\cdot 10^{-5} - 6,3\cdot 10^{-3}$	$3,6\cdot 10^{-5} - 6,3\cdot 10^{-3}$	$3,6\cdot 10^{-5} - 1,6\cdot 10^{-2}$
activité de l'enzyme en solution ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	230	220	150

**Tableau III-7 :** Comparatif des valeurs obtenues sur des électrodes modifiées avec des SWCNTs ( $3 \times 20 \mu\text{L}$  à  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans le THF) et le mélange équimolaire des trois pyrènes (pyrène-NTA/pyrène-adamantane/pyrène-biotine ; rapport molaire 1/1/1) lors de l'immobilisation successive des glucose oxydases  $\beta$ -CD-GOX, B-GOX et His-GOX.

### III.2.6. Bilan

Cette première partie du chapitre a permis d'illustrer les propriétés des nanotubes de carbone mono-paroi en vue de leur incorporation dans les biocapteurs. Nous avons réussi à fonctionnaliser des SWCNTs avec trois systèmes affins pour l'immobilisation des trois glucose oxydases marquées mais aussi à combiner ces trois systèmes d'affinité malgré les interactions non-spécifiques qui existent entre eux.

Cette fonctionnalisation multiple des SWCNTs possède des applications dans le domaine des biocapteurs (détection multiple d'espèces) mais elle pourrait aussi être utilisée dans le domaine des matériaux composites fonctionnels en profitant de l'effet de réticulation des SWCNTs observé qui pourrait être utilisé pour renforcer ce type de matériaux.

Cette étude a aussi permis de mettre en évidence que la formation de couches enzymatiques trop compactes à la surface de l'électrode peut nuire aux performances des biocapteurs pour les trois systèmes d'affinité étudiés. Ceci est clairement visible pour les systèmes NTA/ $\text{Cu}^{2+}$ /Histidine et biotine/avidine puisque nous avons obtenu de meilleures performances sur des électrodes modifiées par des nanotubes de carbone fonctionnalisés par le mélange des trois pyrènes que lorsque les SWCNTs sont fonctionnalisés par un seul

pyrène. Pour le système NTA/Cu<sup>2+</sup>/histidine, une explication pourrait être également une répulsion électrostatique entre les nanotubes de carbone recouverts de pyrène-NTA et la glucose oxydase qui sont tous deux négativement chargés ; avec le mélange des trois pyrènes (1/1/1), ces phénomènes de répulsion seraient diminués. Quant au système adamantane/ $\beta$ -cyclodextrine, il est moins évident de le remarquer au niveau des valeurs de courant de saturation et de sensibilité mais il faut regarder plus attentivement et comparer les valeurs des constantes apparentes de Michaelis-Menten pour voir ce phénomène.

Ceci est donc une propriété importante pour le développement futur des biocapteurs élaborés par cette méthode de fonctionnalisation des électrodes. Cependant, notre but était de démontrer simplement la possibilité de fonctionnaliser, sans liaison covalente et par simple immersion des nanotubes de carbone, par trois biomolécules différentes. Nous avons également démontré la possibilité de moduler les concentrations respectives de ces trois biomolécules ouvrant ainsi des perspectives pour le développement d'immunocapteurs avec détection électroenzymatique combinée par exemple.

### III.3. Connexion d'une hydrogénase NiFe sur les CNTs

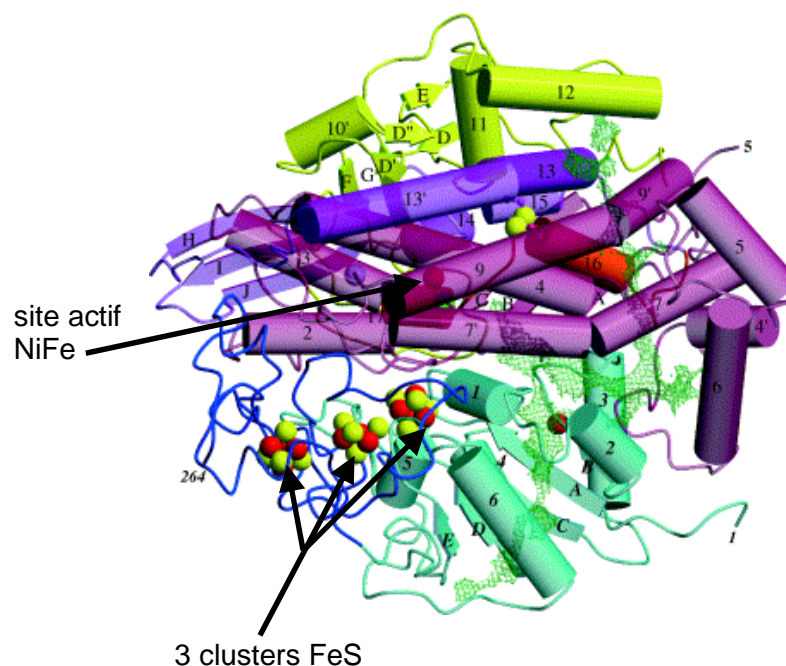
Les hydrogénases NiFe sont présentes chez certaines bactéries et archées ; ce sont des enzymes clés du métabolisme de l'hydrogène par le fait qu'elles catalysent l'interconversion H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub> de façon remarquable selon la réaction :  $2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$ . Ces enzymes, et en particulier celles du genre *Desulfovibrio*, sont aussi les hydrogénases les mieux caractérisées tant d'un point de vue structural que fonctionnel<sup>39</sup> ; elles représentent donc un axe de recherche majeur dans le domaine de la bioconversion de l'énergie. En effet, l'hydrogène paraît aujourd'hui être une ressource énergétique des plus durables afin de diminuer la consommation mondiale des énergies fossiles qui génèrent beaucoup de pollution<sup>40</sup>.

#### III.3.1. L'hydrogénase NiFe : synthèse et caractérisation

Dans l'optique d'étudier l'oxydation de H<sub>2</sub> par les hydrogénases, nous avons choisi de travailler avec l'hydrogénase NiFe de la bactérie *Desulfovibrio fructosovorans* ; celle-ci possède plusieurs avantages tels que la possibilité de réaliser la purification aérobie des protéines tout en conservant une forte activité enzymatique pour la consommation et la production d'hydrogène. Cependant, elle reste quand même très sensible à l'oxygène mais

peut être réactivée de façon chimique ou électrochimique aisément ; après activation, l'enzyme considérée est environ 20 fois plus active qu'en fin de purification aérobie. Ces propriétés exceptionnelles proviennent de la structure originale de cette protéine.

La première structure cristallographique d'une hydrogénase NiFe a été déterminée en 1995 par Volbeda et al.<sup>41</sup> pour la bactérie *Desulfovibrio gigas* qui possède une structure très similaire à celle étudiée ici<sup>42</sup>. Les hydrogénases NiFe sont constituées de deux sous-unités (28 et 60 kDa) et le site actif qui est un complexe hétérobimétallique à base de Fer et de Nickel se trouve enfoui au cœur de la grosse sous-unité comme on peut le remarquer sur le **Schéma III-11**. La petite sous-unité possède, quant à elle, trois clusters Fe-S qui sont alignés : deux d'entre eux (distal et proximal) sont de type  $[4\text{Fe-4S}]^{2+/+}$  tandis que celui du centre (médial) est du type  $[3\text{Fe-4S}]^{+/0}$ . Le cluster proximal est celui qui est le plus proche du site actif tandis que le distal en est le plus éloigné.



**Schéma III-11** : Structure cristallographique de l'hydrogénase NiFe extraite de la bactérie *Desulfovibrio fructosovorans*<sup>43</sup>. Les codes couleurs pour les atomes métalliques (sphères) sont : Fe = rouge, S = jaune, Ni = vert et Mg = violet. Les cylindres correspondent les hélices  $\alpha$  de la protéine contenant au moins six acides aminés tandis que les hélices  $\beta$  sont représentées par des flèches. La petite sous-unité comprend les parties bleues ciel (domaine S1) et bleues (domaine S2) tandis que tous les éléments d'autres couleurs (violet, vert, rouge...) correspondent à la grande sous-unité.

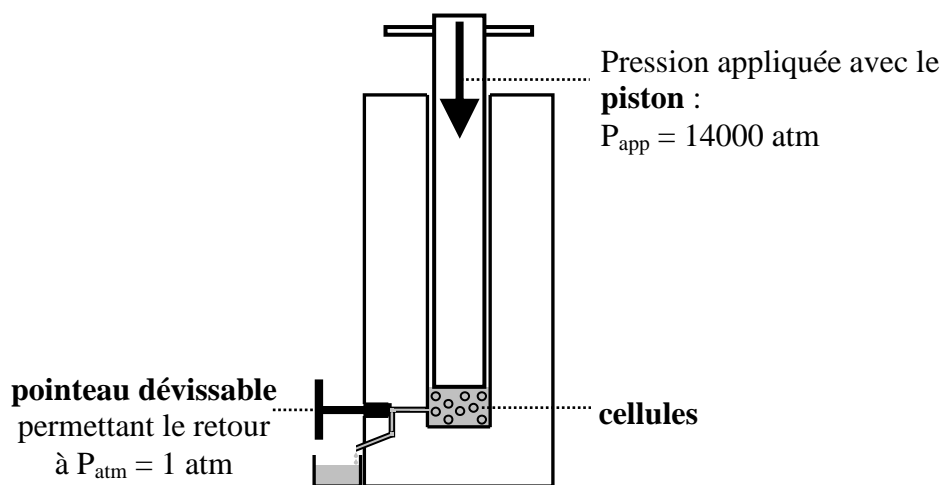
### III.3.1.a. Synthèse

#### III.3.1.a.α. Culture cellulaire

La culture cellulaire bactérienne de *Desulfovibrio fructosovorans* a été réalisée au Laboratoire de Biochimie et Ingénierie des protéines de Marseille en collaboration avec M. Rousset et S. Dementin<sup>44, 45</sup>. De même, la purification des hydrogénases NiFe extraites de ce type de bactéries nécessite un marquage par un Strep-tag (qui sera présenté au paragraphe § III.3.1.a.χ.) qui est introduit dans les gènes de la protéine d'intérêt par des expériences de PCR dans *Escherichia coli* selon le protocole établi par ce même groupe<sup>46</sup>.

#### III.3.1.a.β. Extraction

Les solutions de culture cellulaire bactérienne de *Desulfovibrio fructosovorans* ont ensuite été introduites dans une presse de French (**Schéma III-12**).



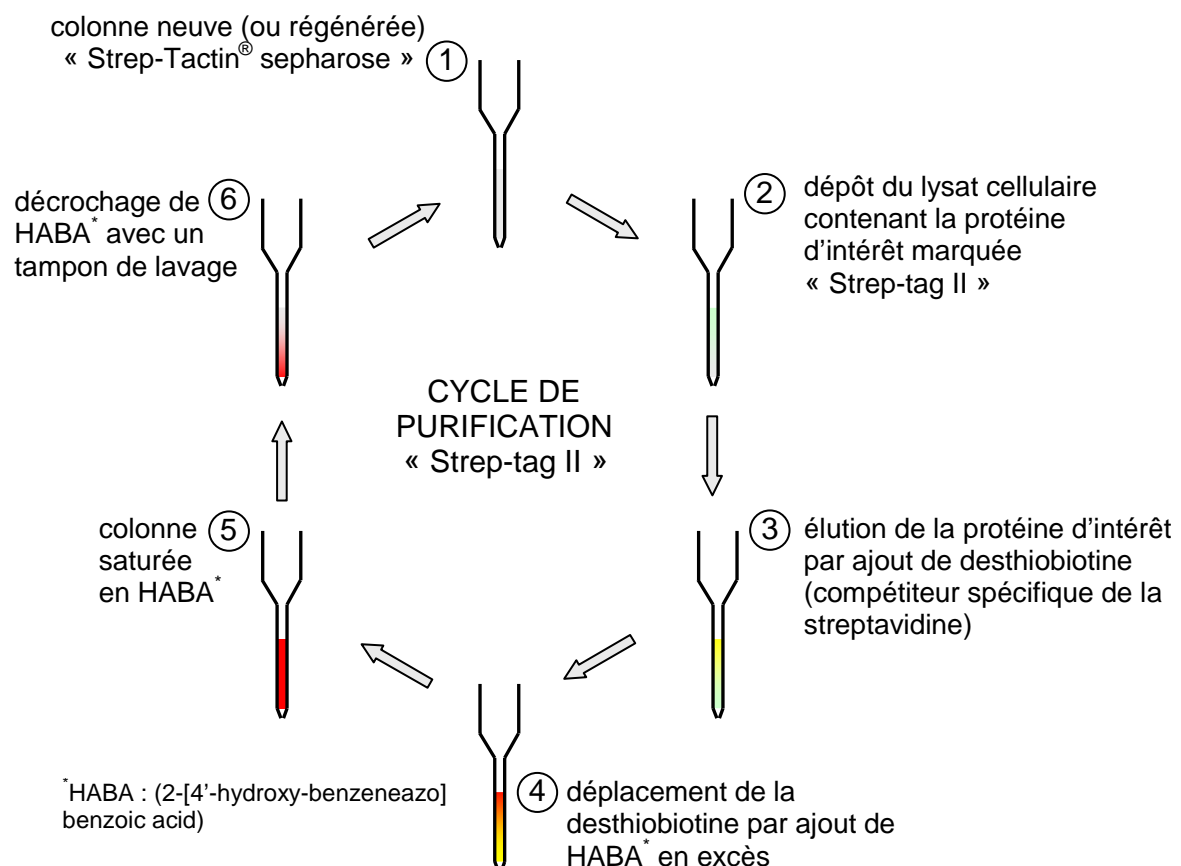
**Schéma III-12** : Représentation schématique du principe de fonctionnement de la Presse de French.

Cet appareil est couramment utilisé en biologie pour briser la membrane plasmique et la paroi cellulaire des bactéries afin d'isoler les protéines ou d'autres composants cellulaires. Cette presse, en acier inoxydable, utilise une pompe hydraulique externe qui permet d'exercer une pression ( $P_{app} = 14000 \text{ atm}$ ) sur l'échantillon liquide qui passe ensuite à travers une vanne à aiguille et subir de fortes contraintes de cisaillement puis un changement brutal de pression

lors du retour à pression atmosphérique ( $P_{\text{atm}} = 1 \text{ atm}$ ) faisant éclater les cellules. Afin de récupérer le maximum d'enzymes, l'échantillon a été passé deux fois dans la presse de French en présence de DNase qui va permettre d'éviter que l'ADN libéré lors de la lyse des cellules reste en solution et gélifie le milieu qui doit rester liquide pour ne pas abimer l'appareil et d'un cocktail anti-protéase permettant de dissoudre les protéases libérées qui sont capables d'hydrolyser les liaisons peptidiques des protéines et donc d'endommager la protéine d'intérêt : l'hydrogénase NiFe.

### III.3.1.a.χ. Purification

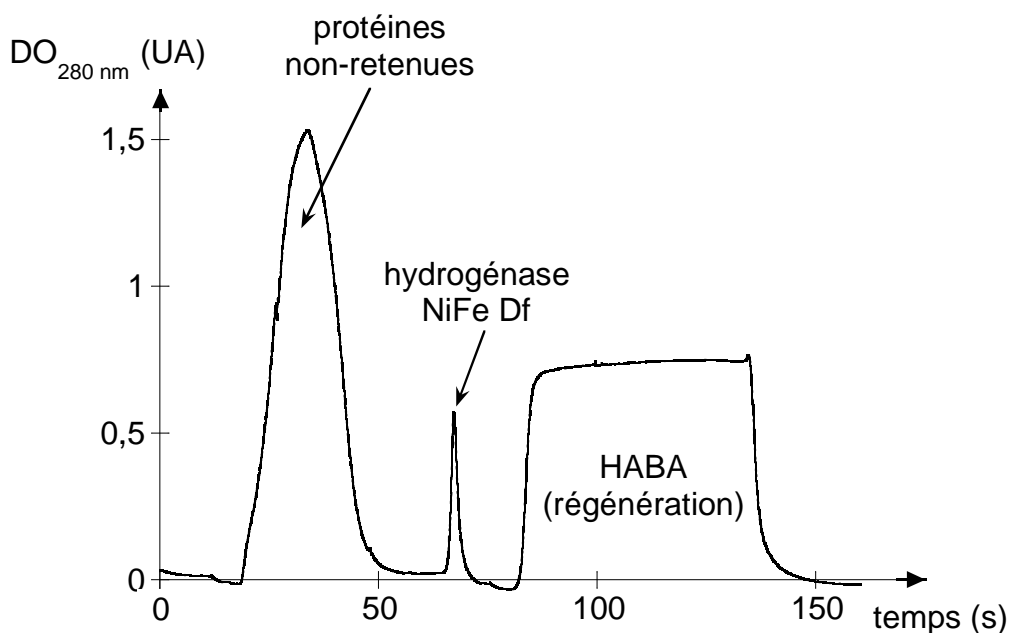
Le liquide récupéré en sortie de la presse de French doit ensuite être purifié ; pour cela, nous avons réalisé une purification sur colonne « Strep-Tactin Sepharose » commerciale (**Schéma III-13**).



**Schéma III-13** : Représentation schématique du protocole utilisé pour la purification des hydrogénases basée sur le système « Strep-tag II ». Chaque couleur représente l'accrochage d'un composé différent sur la colonne : gris = colonne neuve ou régénérée, vert = protéine d'intérêt marquée « Strep-tag », jaune = desthiobiotine et rouge = HABA.

Il s'agit d'une chromatographie d'affinité permettant la purification et la détection des protéines marquées avec un Strep-tag ; ce dernier est un peptide synthétique composé de huit acides aminés (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) qui présente une affinité pour la colonne Strep-Tactin composée de streptavidine. Cette technique de purification permet d'isoler la protéine marquée avec le Strep-tag directement à partir du lysat cellulaire brut et en une seule étape dans des conditions relativement douces adaptées à la production de protéines fonctionnelles<sup>47</sup>. Ce Strep-tag est introduit dans les gènes de la protéine lors de la culture cellulaire de la protéine recombinante dans *Escherichia coli* et, du fait de sa faible taille, il va être quasiment inerte d'un point de vue biochimique.

La purification de l'échantillon de cellules lysées a donc été réalisée sur une colonne Strep-Tactin neuve ou régénérée (étape 1 du **Schéma III-13**) conditionnée avec du tampon TRIS salin ( $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 8$  ;  $\text{NaCl } 0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ ) qui sera utilisé pour l'élution des différents composés sur la colonne. Cet échantillon a tout d'abord été déposé sur la colonne Strep-Tactin (étape 2 du **Schéma III-13** où la protéine est représentée en vert) puis éluée avec le tampon TRIS salin. La purification a été suivie par la mesure de l'absorbance à  $\lambda = 280 \text{ nm}$  en sortie de colonne (**Figure III-20**). On observe que les protéines non-marquées par le Strep-tag vont sortir de la colonne en premier du fait de la faible adsorption non-spécifique des protéines sur ce type de colonne. Lorsque celles-ci ont été complètement éluées, une solution de desthiobiotine faiblement concentrée ( $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) dans le tampon TRIS salin (étape 3 du **Schéma III-13**) est injectée et va permettre le décrochage de la protéine marquée avec le Strep-tag grâce à son affinité forte pour la streptavidine. La régénération de la colonne est alors réalisée par l'ajout d'une solution d'acide 2-[4'-hydroxy-benzeneazo] benzoïque (HABA) en excès ( $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) dans le tampon TRIS salin (étape 4 du **Schéma III-13**). La suppression de la desthiobiotine sur la colonne est indiquée par un changement de couleur du jaune-orangé (HABA en solution) au rouge (HABA lié à la streptavidine) ; la colonne rouge saturée en HABA (étape 5 du **Schéma III-13**) est ensuite lavée avec un grand volume de tampon TRIS salin (étape 6 du **Schéma III-13**) jusqu'à disparition complète de la coloration rouge indiquant le décrochage de HABA de la colonne rendant ainsi celle-ci prête pour un autre cycle de purification.



**Figure III-20 :** Courbe obtenue lors du suivi de l'évolution de l'absorbance à 280 nm en sortie de colonne de purification « Strep-tag II » en fonction du temps.

### III.3.1.b. Caractérisations par spectroscopie UV-visible

#### III.3.1.b.α. Dosage protéinique

Après purification, nous avons réalisé le dosage par spectroscopie UV-visible des enzymes. Pour cela, nous avons mesuré l'absorbance à  $\lambda = 280$  et  $400$  nm qui permettent de doser respectivement la quantité totale de protéines et les centres FeS de l'hydrogénase. La mesure de l'absorbance à  $\lambda = 400$  nm suffirait à déterminer la concentration de notre solution mais le rapport  $Abs_{400}/Abs_{280}$  permet de déterminer la pureté de l'échantillon ; pour une enzyme pure, ce rapport doit être compris entre 0,24 et 0,26.

Dilution	Abs <sub>280</sub> (UA)	Abs <sub>400</sub> (UA)	Abs <sub>400</sub> /Abs <sub>280</sub>	[enzyme] <sub>diluée</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	[enzyme] <sub>SM</sub> (g.L <sup>-1</sup> )
1/5	1,670	0,411	0,25	0,74	3,6
1/10	0,804	0,192	0,24	0,35	3,5

**Tableau III-8 :** Données relatives au dosage de l'hydrogénase NiFe après purification par spectroscopie UV-visible aux longueurs d'onde de 280 et 400 nm permettant aussi de déterminer la pureté de l'échantillon considéré. Pour notre enzyme,  $\epsilon_{400} = 50000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$  et  $M = 90000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Les concentrations [enzyme]<sub>diluée</sub> et [enzyme]<sub>SM</sub> correspondent aux concentrations dans la solution après et avant dilution respectivement.

Le **Tableau III-8** présente les valeurs obtenues lors du dosage de la solution contenant l'hydrogénase NiFe ; on peut remarquer l'efficacité de la technique de purification utilisée en observant les rapports  $Abs_{400}/Abs_{280}$  obtenus qui sont bien compris entre 0,24 et 0,26. La concentration de notre solution est alors de  $3,55 \text{ g.L}^{-1}$  ce qui correspond à 7,1 mg d'enzymes extraites des cultures cellulaires étant donné le volume de solution obtenu (2 mL).

### *III.3.1.b.β. Test d'activité*

Nous avons ensuite procédé aux tests d'activité enzymatique par spectroscopie UV-visible à une longueur d'onde  $\lambda = 604 \text{ nm}$  qui correspond à la longueur d'onde d'absorption du diméthyl-viologène réduit.

Les enzymes ayant été purifiées en milieu aérobie, nous avons tout d'abord dû les activer. Cette activation a été réalisée dans une cellule spectroscopique hermétique contenant 500  $\mu\text{L}$  de tampon TRIS ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 8$ ) et  $2.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de diméthyl-viologène qui a été dégazée avec  $\text{H}_2$  pendant 10 min avant l'injection de 10  $\mu\text{g}$  d'hydrogénase NiFe. Il faut en principe ajouter un peu de dithionite de sodium pour éliminer les traces d'oxygène éventuellement présentes dans la solution et ainsi amorcer la réaction de réduction du diméthyl-viologène mais cela n'a pas été nécessaire dans notre cas puisque dès l'introduction de l'enzyme, la solution a commencé à bleuir ; ce changement de couleur correspond à la réduction du diméthyl-viologène qui est bleu sous forme réduite. Les tubes ont ensuite été placés à  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant 1 heure afin d'obtenir une activation totale des enzymes.

L'activité des enzymes a été ensuite mesurée dans des cuvettes spectroscopiques contenant 1 mL de solution de diméthyl-viologène ( $50.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) dans du tampon TRIS ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 8$ ) dégazée pendant 10 min avec  $\text{H}_2$  et thermostatée à  $T = 30^\circ\text{C}$ . Après injection de 0,04  $\mu\text{g}$  d'hydrogénase NiFe, nous avons suivi l'évolution de l'absorbance à  $\lambda = 604 \text{ nm}$  ; nous avons alors obtenu une droite de pente  $0,49 \text{ UA.min}^{-1}$ . On peut donc déterminer que notre hydrogénase NiFe a une activité de  $450 \pm 50 \text{ Unités.mg}^{-1}$  (1 Unité. $\text{mg}^{-1}$  correspond à 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2$  consommées par minute et par mg d'enzyme). Cette activité est comparable à celles obtenues précédemment<sup>46</sup> pour cette enzyme marquée avec un Strep-tag qui étaient de l'ordre de  $500 \text{ Unités.mg}^{-1}$ .



### III.3.2. Etude du système hybride CNTs/hydrogénase/poly(pyrrole-viologène)

L'hydrogénase NiFe de la bactérie *Desulfovibrio fructosovorans* a déjà été connectée de façon covalente sur des nanotubes de carbone<sup>48</sup> (CNTs). Eu égard à l'expérience développée depuis 25 ans dans le laboratoire sur les films de poly(pyrrole) fonctionnalisés et, plus particulièrement, sur les films de poly(pyrrole-viologène), nous nous sommes orientés vers la combinaison des nanotubes de carbone et des polymères-viologènes pour l'immobilisation et la connexion électrique des hydrogénases. Cet axe de recherche correspond à un enjeu important lié au développement d'une nouvelle génération de biopiles basées sur la production d'énergie à partir du dihydrogène et non pas de sucres ou d'alcools. Nous avons réalisé cette étude avec deux types de nanotubes de carbone : les mono-paroi (SWCNTs) et les multi-parois (MWCNTs). Concernant le polymère, notre choix s'est naturellement porté vers un film de poly(pyrrole) fonctionnalisé par un médiateur rédox (méthyl-viologène) qui pourra ainsi interagir avec l'enzyme et permettre le transfert des électrons de l'enzyme vers l'électrode. Les films incorporant des motifs viologènes ont été décrits pour la première fois en 1984<sup>49</sup>. La synthèse d'un monomère-viologène amphiphile a permis, par la suite, d'électropolymériser ce dernier en milieu aqueux et donc d'immobiliser simultanément des biomolécules par encapsulation dans la matrice polymérique<sup>50</sup>. Cette stratégie a ainsi été appliquée au développement d'un biocapteur à nitrates<sup>50</sup>. Pour notre part, nous avons utilisé un dérivé de ce composé amphiphile du fait que son électropolymérisation peut être réalisée en solution aqueuse ce qui permet d'éviter d'endommager l'hydrogénase par l'utilisation de solvants organiques.

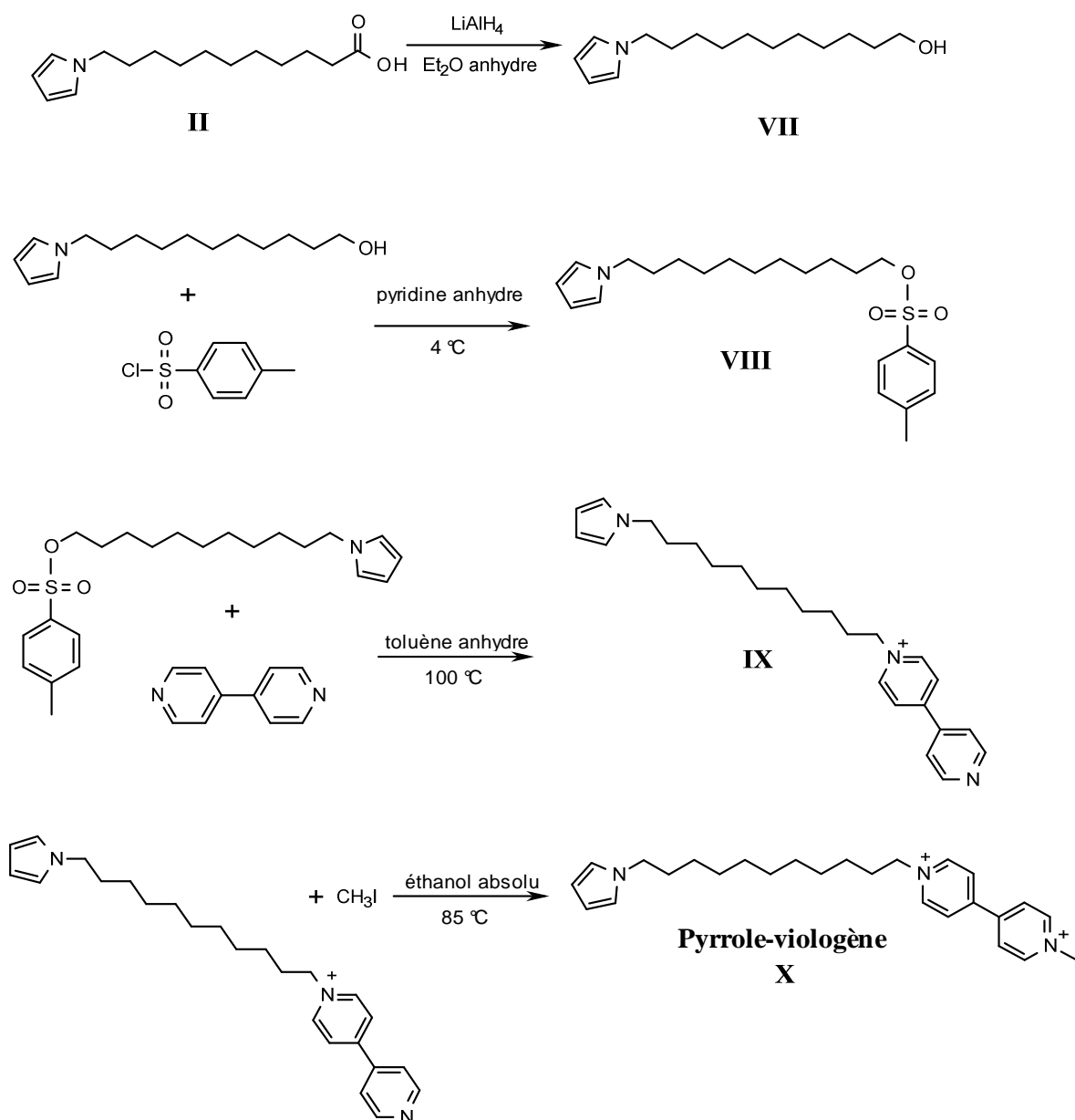
#### *III.3.2.a. Synthèse et caractérisation du pyrrole-viologène*

##### *III.3.2.a.α Synthèse*

La synthèse du pyrrole-C<sub>11</sub>-viologène a été réalisée selon un protocole similaire à celui décrit précédemment au laboratoire<sup>51</sup> (**Schéma III-14**).

Le pyrrole-C<sub>10</sub>-COOH (**II**) a tout d'abord été réduit en pyrrole-C<sub>11</sub>-OH (**VII**) en présence de LiAlH<sub>4</sub> dans l'éther diéthylique anhydre. Afin d'améliorer le caractère nucléofuge du groupement alcool, celui-ci a ensuite été remplacé par un groupement tosylate en mélangeant le composé **VII** avec du chlorure de tosyloxy dans de la pyridine anhydre

pendant 10 heures et à  $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Après isolation et caractérisation, le composé formé (**VIII**) a été mélangé avec de la 4,4'-bipyridine dans le toluène anhydre et porté à reflux pendant 18 heures ; on observe alors la formation d'un précipité correspondant au produit **IX** qui est ensuite filtré et lavé avec du toluène anhydre. Après séchage, le composé **IX** a été finalement mis en présence d'un grand excès d'iodure de méthyle dans l'éthanol absolu et porté à reflux pendant 16 heures ; on obtient alors le composé **X** (pyrrole- $\text{C}_{11}$ -viologène) qui précipite en solution lors du refroidissement de celle-ci. Ce précipité est alors filtré puis lavé avec de l'éthanol absolu. Le pyrrole- $\text{C}_{11}$ -viologène,  $2\text{BF}_4^-$  (**X**) est finalement obtenu avec un rendement  $\eta = 52\%$ .



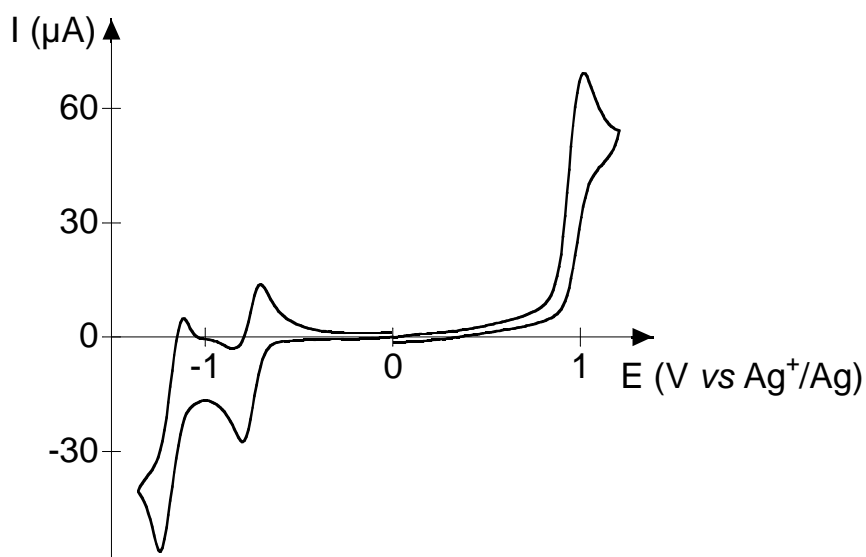
**Schéma III-14** : Principe de la synthèse multi-étapes du pyrrole-viologène.

Ce monomère a été caractérisé par RMN  $^1\text{H}$  (partie expérimentale).

### III.3.2.a.β. Etude électrochimique sur électrode de carbone vitreux nue

Nous avons ensuite étudié le comportement électrochimique de ce monomère en solution électrolytique  $\text{LiClO}_4$  ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) dans  $\text{CH}_3\text{CN}$  sur électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ).

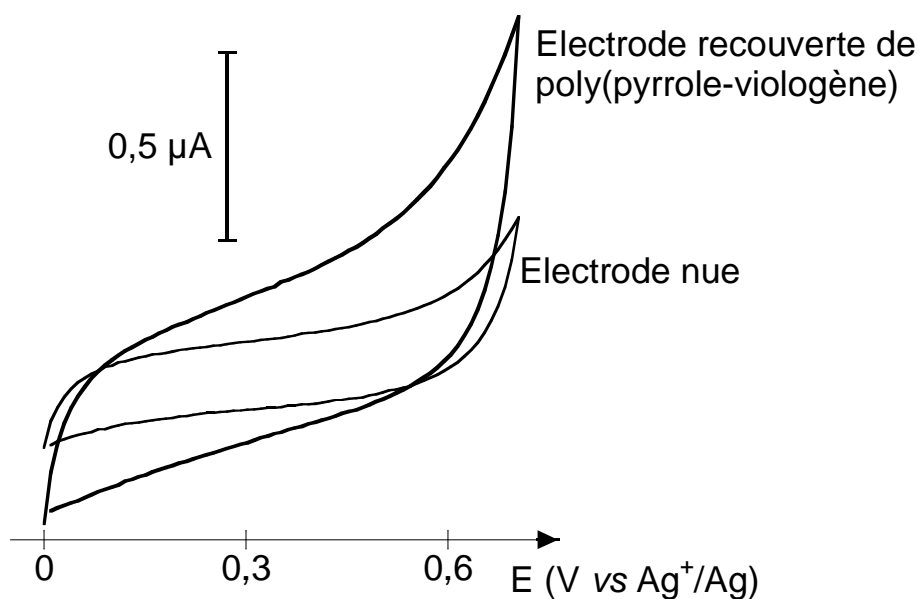
Comme on peut le remarquer sur la **Figure III-21**, le composé présente un pic anodique intense vers  $1,01 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$  correspondant à l'oxydation irréversible du motif pyrrole et en bon accord avec les données de la littérature<sup>52, 53</sup>. On peut aussi clairement voir deux systèmes réversibles dans la partie cathodique de la courbe à  $-0,72$  et  $-1,16 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$  relatifs aux deux réductions monoélectroniques successives du groupement viologène<sup>54</sup> ( $\Delta E_{\text{pic}_1} = 60 \text{ mV}$  et  $\Delta E_{\text{pic}_2} = 110 \text{ mV}$ ).



**Figure III-21** : Voltampérogramme d'une solution de pyrrole-viologène ( $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$  sur électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ) ;  $\nu = 0,1 \text{ V.s}^{-1}$ .

L'électropolymérisation de ce monomère (pyrrole-viologène) a été réalisée par chronoampérométrie à potentiel imposé ; nous avons choisi d'appliquer un potentiel  $E = 0,85 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$  qui se situe au pied du pic d'oxydation du motif pyrrolique afin de réaliser la polymérisation tout en limitant au maximum le phénomène de suroxydation du polymère formé. La **Figure III-22** montre le signal obtenu dans une solution  $\text{LiClO}_4$  ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) +

$\text{CH}_3\text{CN}$  exempt de monomère après polymérisation de ce dernier par électrolyse à  $E = 0,85 \text{ V}$  vs  $\text{Ag}^+/\text{Ag}$  sur une électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$  ;  $Q = 0,2 \text{ mC}$ ). Comme déjà observé pour plusieurs films de poly(pyrrole), le signal électrochimique réversible du film dû à l'électroactivité du poly(pyrrole-viologène) n'apparaît pas clairement sur cette courbe. La différence entre les deux courbes présentées sur la **Figure III-22** obtenues pour une électrode de carbone vitreux nue ou recouverte de poly(pyrrole-viologène) indique la formation d'un dépôt sur la surface.

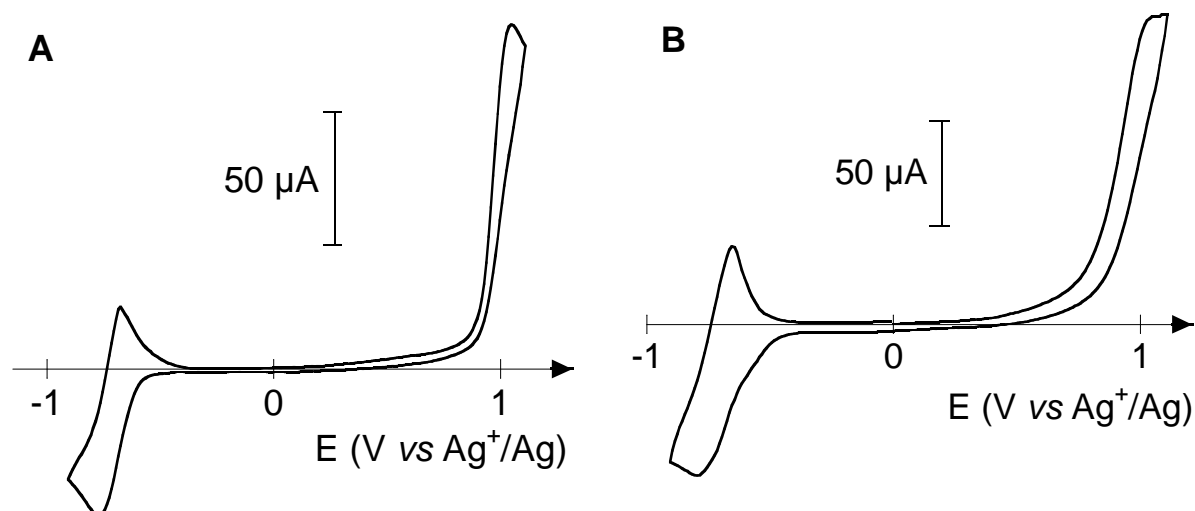


**Figure III-22** : Electrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ) modifiée avec le poly(pyrrole-viologène) polymérisé par électrolyse à potentiel constant  $E = 0,85 \text{ V}$  vs  $\text{Ag}^+/\text{Ag}$  ( $Q = 0,2 \text{ mC}$ ) et transférée dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$  exempt de monomère avec  $v = 0,1 \text{ V.s}^{-1}$ .

### III.3.2.a.χ. Etude électrochimique sur électrode de carbone vitreux modifiée avec les CNTs (SWCNTs et MWCNTs)

Afin de vérifier que la présence de dépôts de nanotubes de carbone sur l'électrode ne modifie pas (ou peu) le signal du monomère en solution, nous avons réalisé la même étude que celle effectuée sur l'électrode de carbone vitreux nue (**Figure III-21**) sur des électrodes de carbone vitreux modifiées par un dépôt ( $5 \times 10 \mu\text{L}$  d'une dispersion à  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le THF) de nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs ; **Figure III-23-A**) ou multi-parois (MWCNTs ; **Figure III-23-B**). On peut observer que les signaux électrochimiques des différents groupements électroactifs de ce monomère (pyrrole et viologène) sont assez

similaires à ceux obtenus sur électrode de carbone vitreux nue. Pour une comparaison plus aisée, les données concernant les intensités et les potentiels pour chaque électrode ont été rassemblées dans le **Tableau III-9** et le **Tableau III-10** présentés ci-après.



**Figure III-23** : Voltampérogrammes d'une solution de pyrrole-viologène ( $3.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$  sur électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ) modifiée par un dépôt ( $5 \times 10 \mu\text{L}$  d'une dispersion à  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le THF) de : A - nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs) et B – nanotubes de carbone multi-parois (MWCNTs) ;  $v = 0,1 \text{ V.s}^{-1}$ .

Le **Tableau III-9** montre les valeurs d'intensité obtenues pour les signaux anodiques des motifs pyrrole et viologène (premier système rédox) et pour les différentes électrodes étudiées. On peut remarquer que la présence des nanotubes de carbone permet d'augmenter l'intensité de tous les signaux qui sont tous à peu près multipliés par deux. Cette augmentation peut être due à une augmentation de la surface spécifique des électrodes *via* les nanotubes de carbone.

Electrode	$I_{\text{pyrrole}} (\mu\text{A})$	$I_{\text{anodique}} (\text{V}^{2+/+}) (\mu\text{A})$
carbone vitreux nue	70	15
carbone vitreux / SWCNTs	130	25
carbone vitreux / MWCNTs	150	40

**Tableau III-9** : Récapitulatif des différentes intensités (pyrrole et premier signal du motif viologène) obtenus sur des électrodes de carbone vitreux nue ou modifiée avec un dépôt de nanotubes de carbone (SWCNTs ou MWCNTs) lors des études du pyrrole-viologène en solution électrolytique  $\text{LiClO}_4$  ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) dans  $\text{CH}_3\text{CN}$  par voltammétrie cyclique. Les données ont été extraites des courbes présentées sur la **Figure III-21** et la **Figure III-23**.

Dans le **Tableau III-10**, les potentiels des différents motifs sont rapportés ainsi que l'écart des pics obtenu pour le premier système rédox réversible du viologène. On peut tout d'abord remarquer que le potentiel correspondant à l'oxydation du pyrrole varie peu mais se déplace vers des potentiels légèrement supérieurs lorsqu'on passe de l'électrode de carbone nue à celle modifiée par les SWCNTs puis à celle modifiée par les MWCNTs. Concernant le potentiel de demi-vague du motif viologène, on observe qu'il reste constant et a pour valeur  $E_{1/2} = -0,72 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$ ; celui-ci a été défini comme suit :  $E_{1/2} (\text{V}^{2+/+}) = (E_{\text{ox}} + E_{\text{red}})/2$ . Cependant, si on observe l'écart entre les pics d'oxydation et de réduction du premier signal du viologène, on observe que celui-ci augmente en passant de l'électrode de carbone vitreux nue à celle modifiée par les SWCNTs puis les MWCNTs. Ceci illustre l'importance des propriétés spécifiques des nanotubes de carbone sur les signaux électrochimiques.

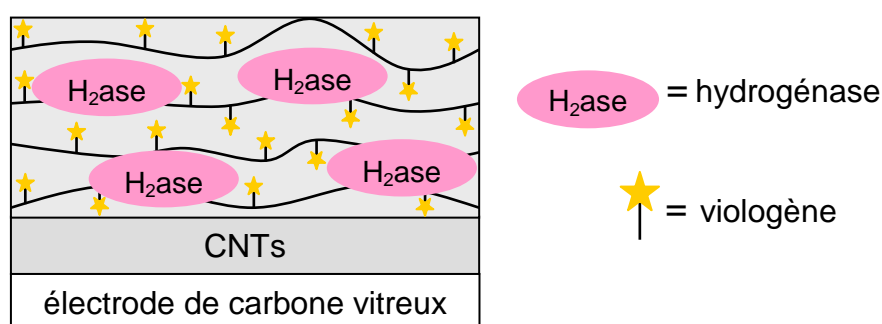
<b>Electrode</b>	<b><math>E_{\text{pyrrole}}</math> (V vs <math>\text{Ag}^+/\text{Ag}</math>)</b>	<b><math>E_{1/2} (\text{V}^{2+/+})</math> (V vs <math>\text{Ag}^+/\text{Ag}</math>)</b>	<b><math>\Delta E_{\text{viologène}} (\text{V}^{2+/+})</math> (mV)</b>
carbone vitreux nue	1,01	-0,72	60
carbone vitreux SWCNTs	1,05	-0,72	98
carbone vitreux MWCNTs	1,08	-0,72	146

**Tableau III-10 :** Récapitulatif des différents potentiels (pyrrole et premier signal du motif viologène) obtenus sur des électrodes de carbone vitreux nue ou modifiée avec un dépôt de nanotubes de carbone (SWCNTs ou MWCNTs) lors des études du pyrrole-viologène en solution électrolytique  $\text{LiClO}_4$  ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) dans  $\text{CH}_3\text{CN}$  par voltammétrie cyclique. Les données ont été extraites des courbes présentées sur la **Figure III-21** et la **Figure III-23**.

### **III.3.2.b. Elaboration de l'architecture**

Dans le but d'étudier l'oxydation de l'hydrogène par l'hydrogénase NiFe de la bactérie *Desulfovibrio fructosovorans*, nous avons étudié la connexion de cette enzyme sur un système hybride à base de nanotubes de carbone (SWCNTs ou MWCNTs) et de poly(pyrrole-viologène). Dans ces expériences, nous avons utilisé deux types de nanotubes de carbone : les mono- et multi-parois ; il a donc tout d'abord fallu les disperser afin de pouvoir les déposer sur les électrodes de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ). Les nanotubes de carbone mono-paroi ayant

subi un prétraitement (§ III.2.2.) ont ensuite été dispersés dans le THF ( $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Les nanotubes de carbone multi-parois sont, quant à eux, beaucoup plus faciles à disperser : sans prétraitement, ceux-ci sont dispersés ( $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le THF) de façon exceptionnelle aux ultrasons pendant 5 minutes seulement. Après repos de ces dispersions pendant 12 heures,  $10 \mu\text{L}$  d'une de ces solutions sont déposés sur les électrodes puis séchés ; cette opération a été reproduite plusieurs fois afin d'augmenter la quantité de nanotubes sur l'électrode. Après ces dépôts, l'élaboration de l'architecture (**Schéma III-15**) a été réalisée de façon assez simple en déposant  $10 \mu\text{L}$  d'une solution contenant  $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$  d'hydrogénase et  $4.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de pyrrole-viologène dans de l'eau distillée. Ce dépôt est ensuite laissé 30 minutes sur l'électrode à  $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$  afin qu'il puisse imprégner le dépôt de nanotubes de carbone et séché sous vide dans un dessiccateur. Cette électrode modifiée est finalement placée dans une cellule électrochimique contenant une solution aqueuse de  $\text{LiClO}_4$  ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  dans l'eau distillée) dégazée avec de l'argon et la polymérisation du monomère est effectuée par chronoampérométrie à  $E = 0,8 \text{ V vs ECS}$  en limitant la charge d'électrolyse à  $Q = 0,2 \text{ mC}$ . Cette électrode est finalement rincée dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) sous vive agitation pendant 5 minutes.



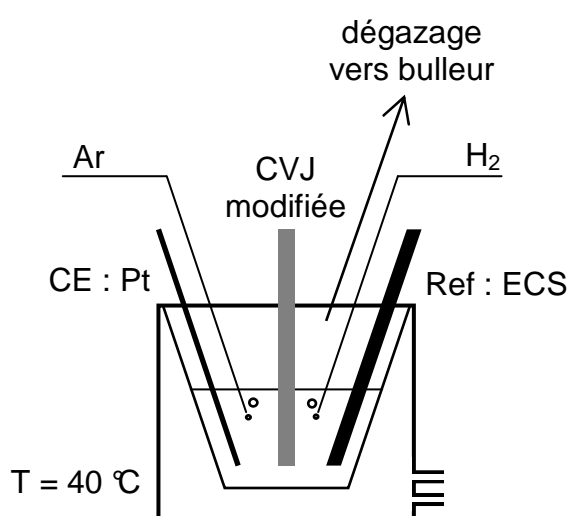
**Schéma III-15 :** Représentation schématique de l'architecture biomoléculaire élaborée avec les nanotubes de carbone (CNTs) mono- ou multi-parois. L'enzyme (hydrogénase NiFe) a été piégée dans le film de poly(pyrrole-viologène) électrogénéré.

Nous avons décidé de réaliser ces études par des mesures en voltammétrie cyclique mais il faut tout d'abord activer l'enzyme ; pour cela, nous avons choisi l'activation électrochimique afin de pouvoir réaliser l'activation et les études par voltammétrie cyclique de ces architectures dans la même cellule électrochimique.

Nous avons donc mis au point une cellule électrochimique la plus hermétique possible à l'oxygène qui est représentée sur le **Schéma III-16**. Nous avons inséré deux tubes d'arrivée de gaz (argon et hydrogène) dans cette cellule et placé un bulleur sur le tube de sortie des gaz

afin de vérifier que la cellule reste toujours en surpression et que l'on puisse alors admettre que l'oxygène ne pourra pas pénétrer dans celle-ci.

Après introduction dans la cellule de l'électrode de travail (carbone vitreux ;  $\varnothing = 3$  mm) modifiée par le dépôt de nanotubes de carbone et le film de poly(pyrrole-viologène) incorporant l'enzyme, la solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$  ;  $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ) est tout d'abord dégazée pendant 30 minutes avec de l'argon puis ensuite 30 minutes de plus avec de l'hydrogène afin de saturer la solution avec celui-ci. L'enzyme est finalement activée par chronoampérométrie à potentiel constant  $E = -0,8 \text{ V vs ECS}$  pendant 15 minutes en laissant le bullage de  $\text{H}_2$  dans la solution. L'architecture ainsi élaborée et activée est alors prête pour réaliser les études électrochimiques.



**Schéma III-16 :** Représentation schématique de la cellule électrochimique utilisée pour les expériences avec l'hydrogénase NiFe élaborée afin de permettre de travailler à l'extérieur d'une boîte à gants. Le flux d'argon est maintenu afin de rester en surpression dans la cellule et celle-ci est contrôlée grâce au bulleur placé en sortie de la cellule tandis que l'hydrogène est injecté dans la solution uniquement pour l'activation et les mesures de courant catalytique. Les notations sont : CVJ modifiée = électrode de travail en carbone vitreux modifiée, CE (Pt) = contre-électrode (fil de Platine) et Ref (ECS) = électrode de référence.

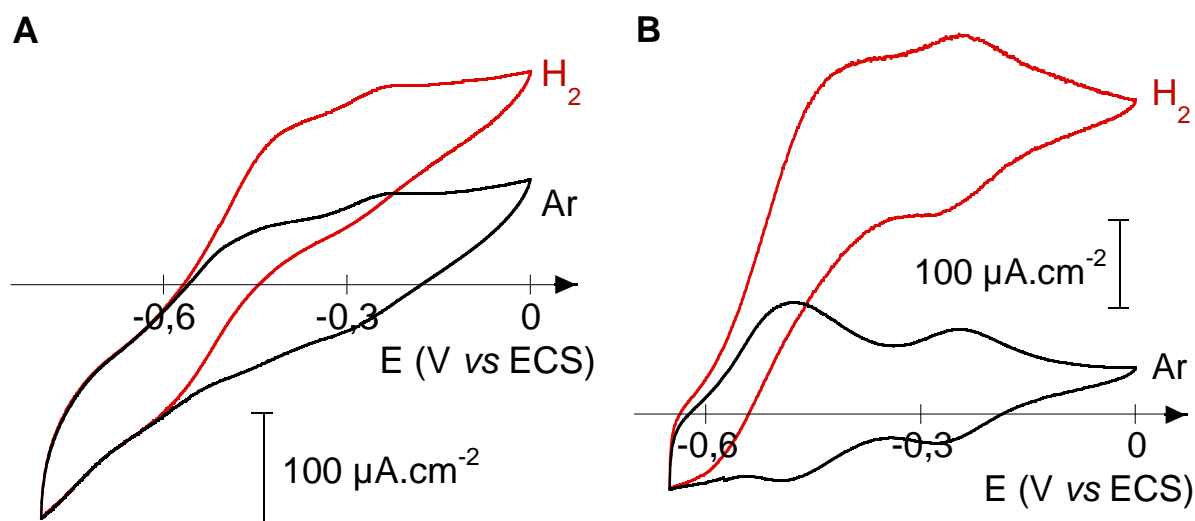
### III.3.2.c. Comparaison des performances électrochimiques obtenues avec les deux types de nanotubes de carbone : SWCNTs et MWCNTs

Afin de choisir quel type de nanotubes était le plus prometteur pour la réalisation de cette architecture, nous avons tout d'abord réalisé l'étude électrochimique sur les deux types de nanotubes de carbone en déposant  $5 \times 10 \mu\text{L}$  de chaque dispersion sur des électrodes de carbone vitreux ( $\varnothing = 3$  mm). L'architecture a ensuite été construite puis activée et nous avons enregistré une première courbe de voltammétrie cyclique en présence de  $\text{H}_2$  puis une



deuxième après avoir retiré l'hydrogène de la solution grâce à un dégazage avec de l'argon pendant 15 minutes. Les deux courbes de voltammétrie cyclique obtenues pour les nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs) sont présentées sur la **Figure III-24-A** tandis que celles obtenues avec les MWCNTs sont montrées sur la **Figure III-24-B**. Les courbes ont des allures similaires et on peut observer le courant catalytique dû à l'enzyme ; celui-ci est en effet un courant anodique car lors de l'oxydation de  $H_2$  par l'enzyme, celle-ci va se réduire de façon concomitante et utiliser les viologènes sous forme oxydée présents dans le film poly(pyrrole-viologène) pour se régénérer en les réduisant. Dès que les viologènes vont être oxydés de façon électrochimique, l'enzyme va alors agir pour réduire ceux-ci et provoquer une augmentation de l'intensité du pic d'oxydation (et une diminution du pic de réduction de ce dernier). Notre étude s'est focalisée sur le premier système de ce motif viologène centré vers  $-0,45 \text{ V vs ECS}$  du fait que le motif viologène s'adsorbe sur les électrodes de carbone lorsqu'il est totalement réduit et neutre.

Les courants catalytiques obtenus ont pour valeur  $J_{\text{cat}} = 103 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  avec les SWCNTs et  $J_{\text{cat}} = 301 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  avec les MWCNTs. Ces courants représentent la différence d'intensité mesurée à  $E = -0,4 \text{ V vs ECS}$  entre les courbes enregistrées sous hydrogène et sous argon.



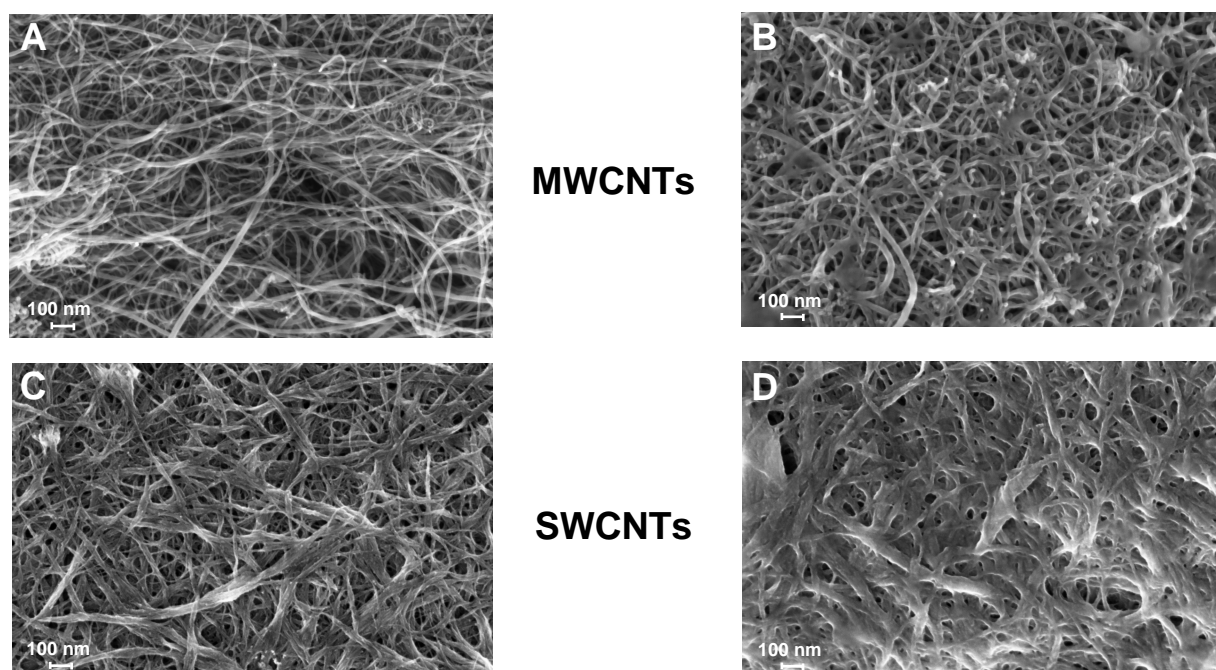
**Figure III-24 :** Courbes de voltammétrie cyclique obtenues avec des électrodes de carbone vitreux ( $\Phi = 3 \text{ mm}$ ) modifiées par un dépôt ( $5 \times 10 \mu\text{L}$  d'une dispersion à  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans le THF) de : **A** - nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs) et **B** - nanotubes de carbone multi-parois (MWCNTs), et un film de poly(pyrrole-viologène) ( $Q = 0,2 \text{ mC}$ ) incorporant l'hydrogénase NiFe ( $2 \mu\text{g}$ ) dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$  ;  $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ) sous argon puis sous hydrogène avec  $v = 10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

A quantité de monomère et d'enzyme égales, il apparaît clairement que l'activité bioélectrocatalytique est plus importante avec les nanotubes de carbone multi-parois qu'avec les nanotubes de carbone mono-paroi. Il faut également souligner l'excellente reproductibilité de cette activité enzymatique. En effet, quel que soit le type de nanotubes de carbone utilisé, l'intensité du courant catalytique pour trois électrodes modifiées conduit à des RSD de 8 % et 6 % pour les SWCNTs et les MWCNTs respectivement.

#### *III.3.2.d. Caractérisations par microscopie à balayage électronique (MEB)*

Nous avons voulu essayer de voir comment étaient les topographies de chaque type de nanotubes de carbone. Pour cela, nous avons enregistré un cliché des nanotubes de carbone directement après leur dépôt puis après leur fonctionnalisation par le film de poly(pyrrole-viologène) incorporant l'hydrogénase. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux nanotubes de carbone multi-parois (MWCNTs) avant (**Schéma III-17-A**) et après (**Schéma III-17-B**) leur fonctionnalisation. On remarque clairement sur ces images que ce type de nanotubes forme peu d'agrégats comme nous l'avions déjà observé précédemment (§ **III.1.1.a.**). La fonctionnalisation de ceux-ci avec le poly(pyrrole-viologène) incorporant l'enzyme semble permettre de conserver les pores formés dans l'échafaudage tridimensionnel de nanotubes de carbone ; en effet, les nanotubes apparaissent seulement plus gros que ceux qui ne sont pas fonctionnalisés ce qui peut être dû à la couche de polymère/enzyme à leur surface. Dans un second temps, nous avons regardé l'effet de la fonctionnalisation sur les nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs) : le **Schéma III-17-C** montre des SWCNTs non-fonctionnalisés tandis que le **Schéma III-17-D** représente ces derniers après la fonctionnalisation décrite précédemment. On peut remarquer la forte présence d'agrégats de SWCNTs dans le dépôt non-fonctionnalisé et il semble que lors de leur fonctionnalisation, ce type de nanotubes perd une grande partie des pores de la structure tridimensionnelle des SWCNTs. On peut donc effectivement relier les performances électrochimiques obtenues avec les deux types d'architecture à ces observations : il est possible que la présence des pores facilite le transfert de toutes les espèces mais aussi la diffusion de H<sub>2</sub> jusqu'à l'enzyme. Nous n'avons pas pu analyser ces dépôts en profondeur. Toutefois les SWCNTs ayant un caractère plus hydrophobe que les MWCNTs, le dépôt de SWCNTs est peut être moins imprégné de solution contenant le monomère et l'enzyme ; ceci conduirait alors à une polymérisation plus en surface et donc à la formation d'une couche plus

compacte. Dans le cas des MWCNTs, plus hydrophiles, cette polymérisation interviendrait dans la totalité du volume du dépôt d'une façon plus homogène.



**Schéma III-17 :** Clichés obtenus en microscopie électronique à balayage pour : **A** – un dépôt de nanotubes de carbone multi-parois (MWCNTs), **B** – un dépôt de MWCNTs modifié par le poly(pyrrole-viologène) incorporant l'hydrogénase NiFe, **C** – un dépôt de nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs) et **D** – un dépôt de SWCNTs modifié par le poly(pyrrole-viologène) incorporant l'hydrogénase NiFe.

### III.3.2.e. Etude électrochimique du système avec les MWCNTs

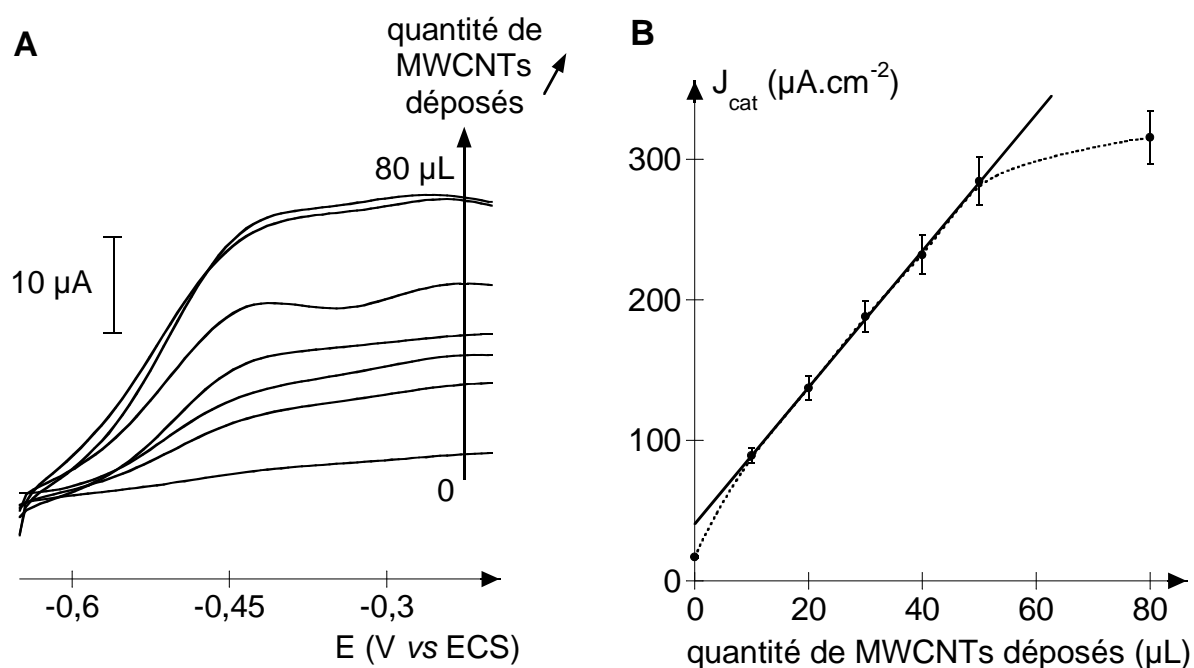
Comme nous avons vu précédemment que les nanotubes de carbone multi-parois semblent plus efficaces pour l'élaboration de l'architecture considérée, l'optimisation des électrodes a donc été entreprise avec les MWCNTs. Dans un premier temps, nous avons décidé de faire varier la quantité de MWCNTs déposés sur l'électrode en gardant tous les autres paramètres constants.

#### III.3.2.e.α. Evolution du courant catalytique en fonction de la quantité de MWCNTs déposés sur l'électrode

Selon le protocole utilisé lors de la comparaison des deux types de nanotubes de carbone, nous avons réalisé les mêmes expériences en regardant l'évolution du courant catalytique en fonction de la quantité de nanotubes de carbone multi-parois déposés sur

l'électrode. Pour cela, nous avons déposé sur différentes électrodes des volumes croissants de la dispersion de MWCNTs dans le THF ( $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) dont les valeurs sont les suivantes : 0, 10, 20, 30, 40, 50 et  $80 \text{ }\mu\text{L}$ .

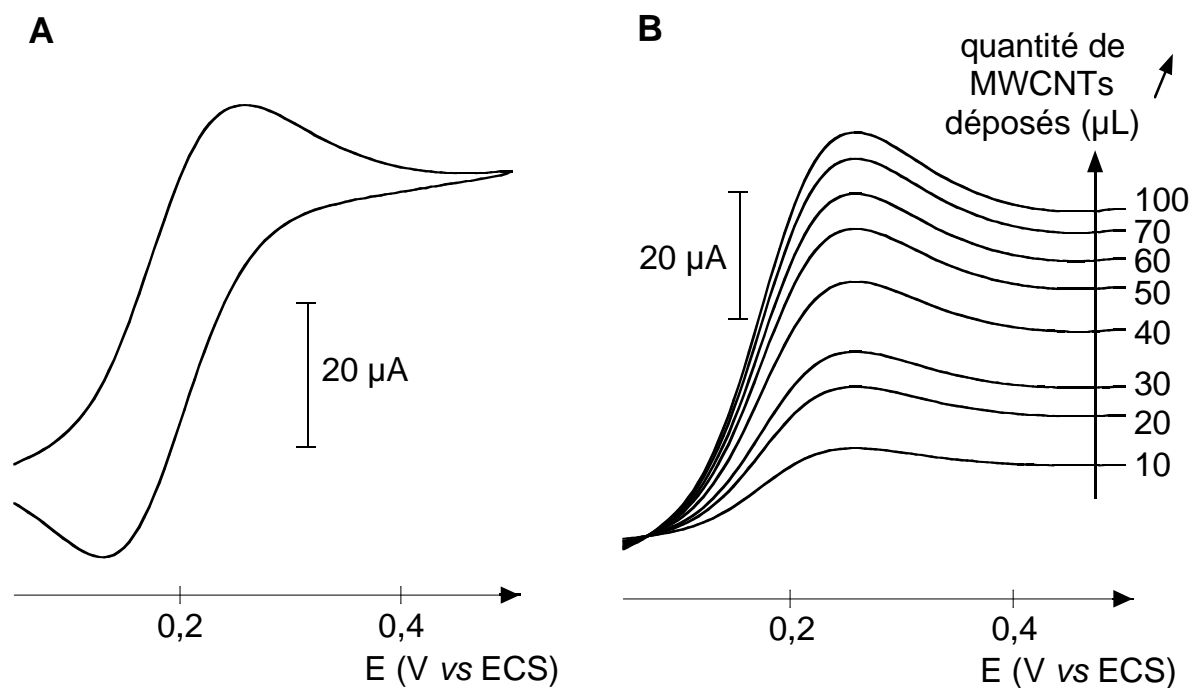
La **Figure III-25-A** présente, pour des raisons de clarté, uniquement la partie anodique des courbes de voltammétrie cyclique obtenues sous hydrogène lors de cette étude. On peut remarquer que le courant augmente lorsque la quantité de nanotubes de carbone multi-parois déposés sur l'électrode augmente jusqu'à une stabilisation puisque les courbes obtenues pour 50 et  $80 \text{ }\mu\text{L}$  de la dispersion de MWCNTs déposés sur l'électrode sont presque superposées. La **Figure III-25-B** montre, quant à elle l'évolution du courant catalytique (obtenu par la différence d'intensité entre les courbes sous  $\text{H}_2$  et Ar à  $E = -0,4 \text{ V vs ECS}$ ) en fonction de la quantité de MWCNTs déposés. On peut observer que l'évolution est linéaire pour des dépôts compris entre 10 et  $50 \text{ }\mu\text{L}$  de la dispersion de MWCNTs ( $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Il semblerait donc que les MWCNTs conduisent à des architectures tridimensionnelles dont la surface spécifique augmente avec l'augmentation de la quantité de MWCNTs déposée.



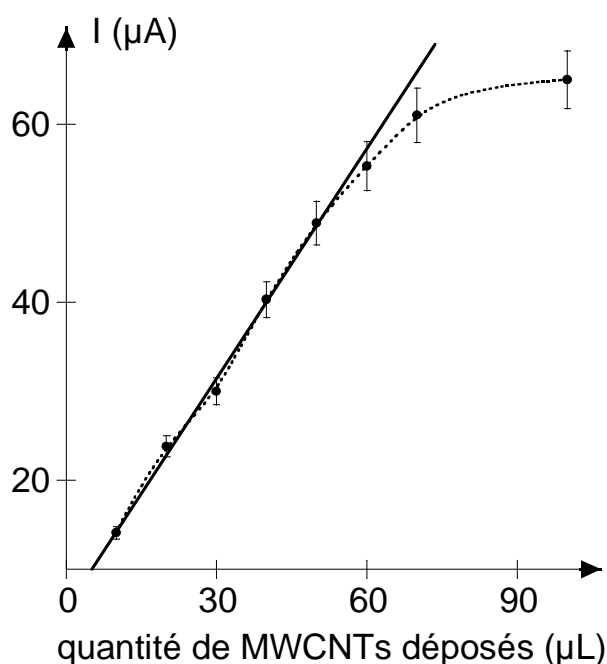
**Figure III-25** : **A** - Courbes de voltammétrie cyclique (parties anodiques) obtenues avec des électrodes de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ) modifiées par une quantité croissante de nanotubes de carbone multi-paroi (par incréments de  $10 \text{ }\mu\text{L}$  d'une dispersion de MWCNTs à  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le THF) et un film de poly(pyrrole-viologène) ( $Q = 0,2 \text{ mC}$ ) incorporant l'hydrogénase NiFe ( $2 \text{ }\mu\text{g}$ ) dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 7$ ;  $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ) sous hydrogène avec  $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ . Les courbes présentées correspondent aux dépôts de 0, 10, 20, 30, 40, 50 et  $80 \text{ }\mu\text{L}$  de MWCNTs. **B** - Evolution du courant catalytique obtenu sur les électrodes modifiées dont les courbes de voltammétrie cyclique (parties anodiques) sont présentées ci-contre (**Figure III-25-A**).  $\text{RSD} = 6 \%$ .

III.3.2.e.β. Caractérisation de la surface des électrodes modifiées par les MWCNTs avec une sonde électrochimique en solution

Afin de corroborer les observations faites au paragraphe précédent, nous avons caractérisé de façon électrochimique des électrodes de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ) sur lesquelles des volumes croissants de la dispersion de MWCNTs dans le THF ( $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) ont été déposés et dont les valeurs sont les suivantes : 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 et  $100 \mu\text{L}$ . Ces caractérisations ont été réalisées dans une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) contenant  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  ( $5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) comme sonde électrochimique étant donné que ce composé présente un comportement réversible sur ce type de nanotubes de carbone (MWCNTs).



**Figure III-26 :** **A** – Courbe de voltammétrie cyclique obtenue avec une électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ) modifiée par un dépôt de nanotubes de carbone multi-parois ( $5 \times 10 \mu\text{L}$  d'une dispersion de MWCNTs à  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le THF) dans une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) contenant  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  ( $5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) avec  $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$ . **B** - Partie anodique des courbes de voltammétrie cyclique obtenues dans les mêmes conditions que pour la courbe ci-contre (**Figure III-26-A**) mais en faisant varier la quantité de MWCNTs déposés (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 et  $100 \mu\text{L}$ ).



**Figure III-27 :** Evolution de l'intensité du signal de  $Fe(CN)_6^{4-}$  ( $5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) obtenu avec des électrodes de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ) modifiées par une quantité croissante de MWCNTs (les données présentées ont été extraites de la **Figure III-26-B**).

La **Figure III-26-A** montre le type de courbe de voltammétrie cyclique obtenues avec une électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ) modifiée par un dépôt de  $5 \times 10 \mu\text{L}$  de la dispersion de MWCNTs ( $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le THF) dans une solution de tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) contenant  $Fe(CN)_6^{4-}$  ( $5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) à une vitesse de balayage  $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$ .

On peut voir que le signal est bien réversible, centré sur  $E_{1/2} = 0,185 \text{ V vs ECS}$  et avec un écart de pic  $\Delta E = 130 \text{ mV}$ . Pour des raisons de clarté, la **Figure III-26-B** présente uniquement les parties anodiques des courbes de voltammétrie cyclique réalisées dans les mêmes conditions expérimentales que la courbe présentée sur la **Figure III-26-A**. Seule la quantité de MWCNTs déposés sur l'électrode a été modulée avec des volumes compris entre 10 et 100  $\mu\text{L}$  de dispersion de MWCNTs ( $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le THF) déposés sur les électrodes de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ).

On peut, ici aussi, noter que l'intensité du signal augmente avec la quantité de nanotubes de carbone multi-parois déposée et le tracé de l'intensité du signal d'oxydation de  $Fe(CN)_6^{4-}$  en fonction du volume de MWCNTs déposé (**Figure III-27**) est linéaire pour des volumes de dispersion de MWCNTs compris entre 10 et 60  $\mu\text{L}$ . Ces observations nous ont permis de valider que l'augmentation du courant catalytique est sûrement due à une augmentation de la surface spécifique des électrodes.

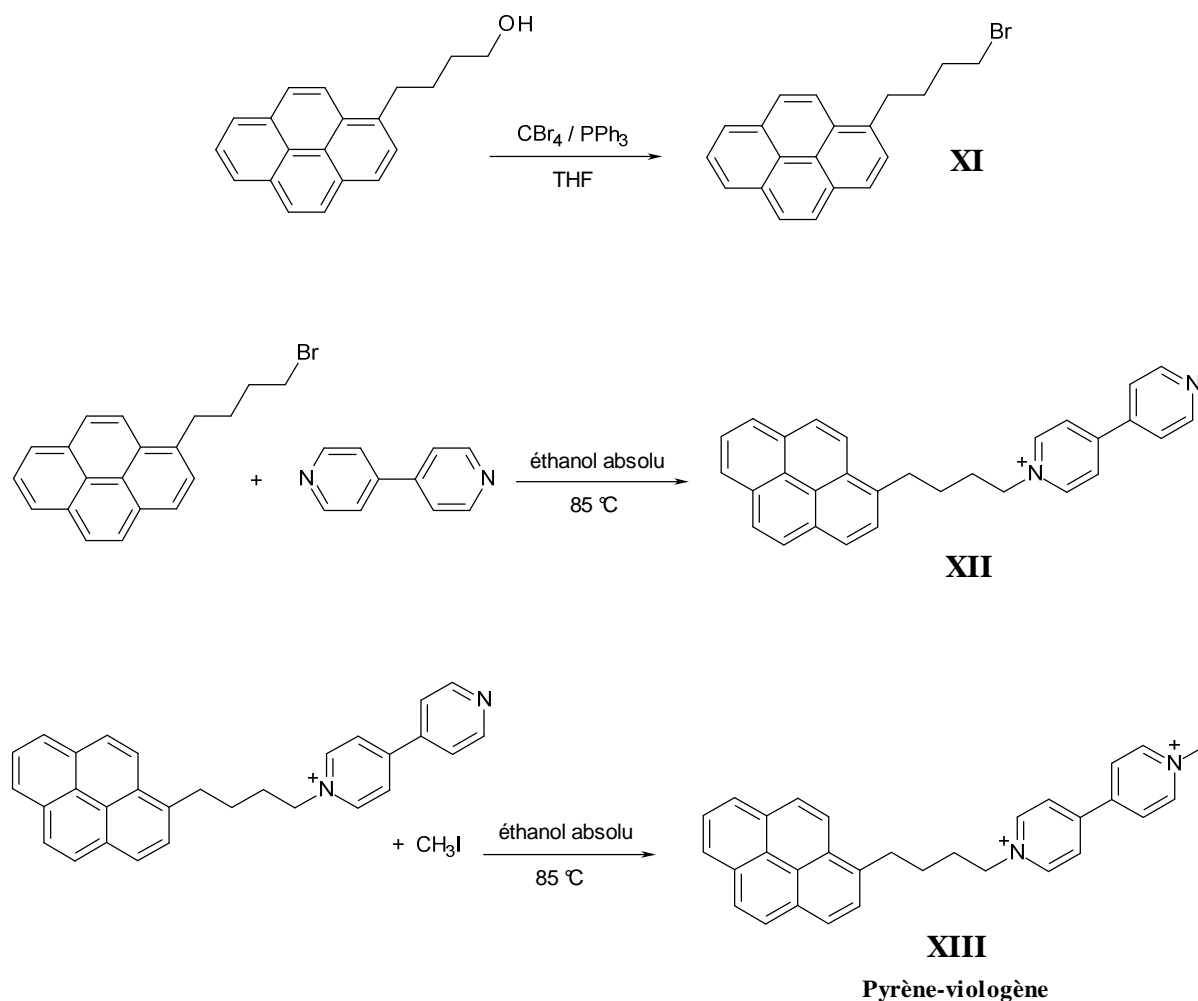
### III.3.3. Etude du système hybride MWCNTs/hydrogénase/pyrène-viologène

Ayant démontré la possibilité d'établir une connexion électrique entre l'hydrogénase, le viologène, les nanotubes de carbone multi-parois et l'électrode, nous avons voulu explorer, de manière préliminaire, les potentialités de connexion de cette enzyme via l'immobilisation du viologène sur les MWCNTs par des interactions  $\pi$ . Pour cela, nous avons réalisé la synthèse d'un dérivé du pyrène exhibant un motif viologène.

#### *III.3.3.a. Synthèse et caractérisation du pyrène-viologène*

##### *III.3.3.a.a. Synthèse*

La synthèse du pyrène-viologène a été réalisée selon la stratégie présentée sur le **Schéma III-18**. Dans un premier temps, le pyrène-butanol a été bromé pour former le 1-bromo-4-pyrènebutane (composé **XI**) et ceci car le brome est un groupe partant plus adapté que la fonction tosylate qui permettra ensuite d'ancrer la 4,4'-bipyridine plus facilement. Cette substitution nucléophile a été réalisée en mélangeant le pyrène-butanol avec du tétrabromométhane et de la triphénylphosphine pendant 16 heures à température ambiante dans le THF. Ce composé **XI**, isolé et caractérisé, est ensuite mélangé avec de la 4,4'-bipyridine dans de l'éthanol absolu puis porté à reflux pendant 18 heures permettant d'obtenir le pyrène-4-(4'-pyridyl)pyridinium (composé **XII**). Après extraction et séchage de ce dernier, celui-ci a été finalement mis en présence d'un grand excès d'iodure de méthyle dans l'éthanol absolu et porté à nouveau à reflux pendant 36 heures ; on obtient alors le composé **XIII** (pyrène-viologène). Le solvant est ensuite évaporé et le brut réactionnel est repris dans  $\text{CH}_3\text{CN}$  car le pyrène-viologène n'y est pas soluble tandis que la bipyridine n'ayant pas réagi lors de l'étape précédente se solubilise. Le solvant est finalement évaporé entraînant avec lui l'excès d'iodure de méthyle restant. Enfin, l'échange des contre-ions ( $\text{I}^- \rightarrow \text{BF}_4^-$ ) a été réalisé sur une colonne échangeuse d'ions (résine Amberlite) conditionnée avec  $\text{HBF}_4$  dilué (1 % V/V dans  $\text{H}_2\text{O}$ ). Le pyrène-viologène,  $2\text{BF}_4^-$  (**XIII**) est finalement obtenu avec un rendement  $\eta = 58 \%$ . Ce composé a été caractérisé par RMN  $^1\text{H}$  et spectrométrie de masse (partie expérimentale).



**Schéma III-18** : Principe de la synthèse du pyrène-viologène.

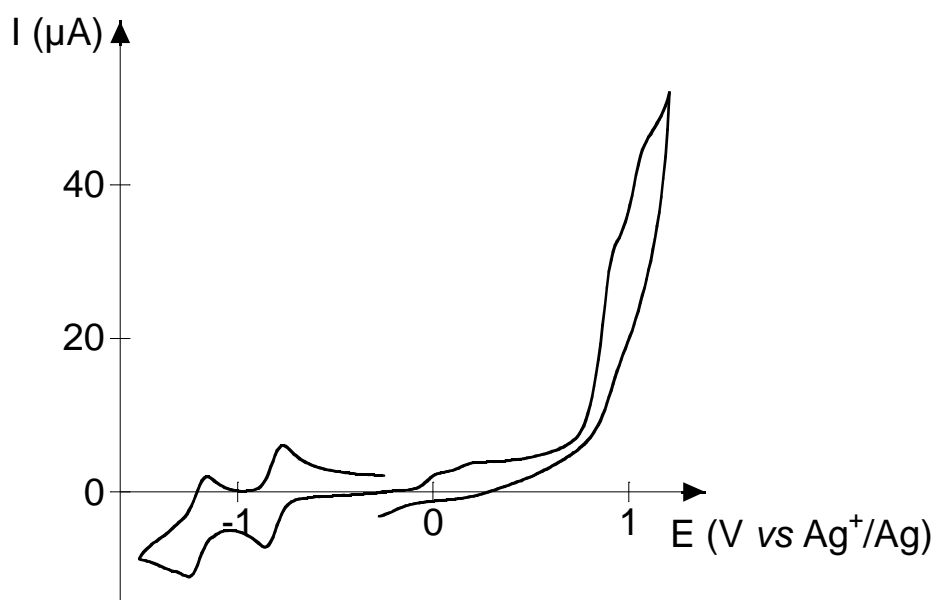
### III.3.3.a.β. Etude électrochimique sur électrode de carbone nue

Nous avons ensuite étudié le comportement électrochimique de ce monomère en solution électrolytique TBAP ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) dans le DMF car ce composé n'était pas soluble dans les solvants classiques utilisés en électrochimie. Cette étude a été réalisée sur électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ) et, dans le but d'obtenir des potentiels par rapport à la même référence que celle précédemment utilisée dans  $\text{CH}_3\text{CN}$ , nous avons utilisé l'électrode de référence  $\text{Ag}^+/\text{Ag}$  ( $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ ) dans TBAP ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) +  $\text{CH}_3\text{CN}$  munie d'une allonge remplie de solution électrolytique TBAP ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) + DMF.

Comme on peut le remarquer sur la **Figure III-28**, le composé présente deux pics anodiques à 0,91 et 1,05 V vs  $\text{Ag}^+/\text{Ag}$  correspondants aux oxydations irréversibles du motif pyrène et en bon accord avec les données de la littérature<sup>56</sup>. On peut aussi clairement voir



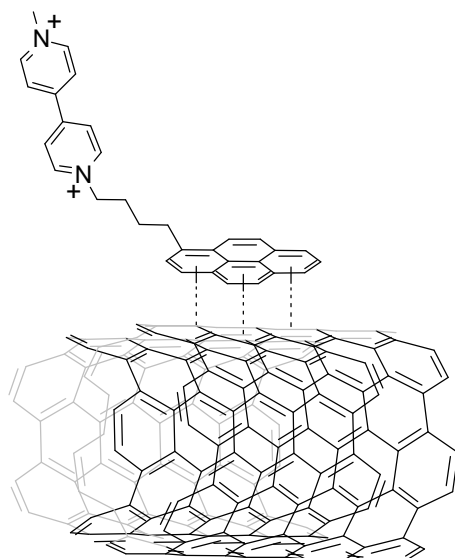
deux systèmes réversibles dans la partie cathodique de la courbe à -0,81 et -1,20 V vs Ag<sup>+</sup>/Ag relatifs aux deux réductions monoélectroniques successives du groupement viologène qui sont très proches de ceux obtenus lors de l'étude du pyrrole-viologène réalisée précédemment ( $\Delta E_{pic_1} = 60$  mV et  $\Delta E_{pic_2} = 80$  mV).



**Figure III-28 :** Voltampérogramme d'une solution de pyrène-viologène ( $1.10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>) dans DMF + 0,1 mol.L<sup>-1</sup> TBAP sur électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3$  mm) ;  $v = 0,1$  V.s<sup>-1</sup>.

### III.3.3.b. Modification d'électrodes par des MWCNTs fonctionnalisés avec le pyrène-viologène ( $\pi$ -stacking)

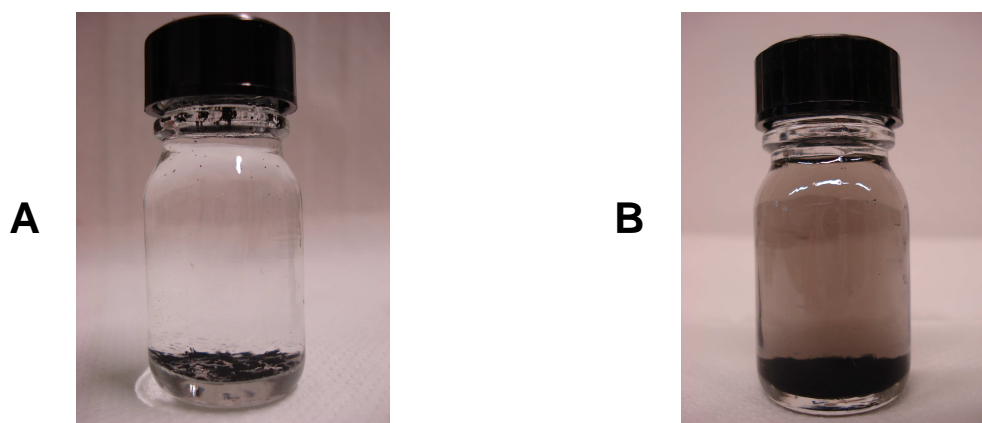
L'interaction qui existe entre les nanotubes de carbone et la molécule de pyrène a été largement illustrée dans la première partie de ce chapitre lors de la fonctionnalisation multiple d'électrodes modifiées par des CNTs. Dans le cas du pyrène-viologène, nous avons utilisé des nanotubes de carbone multi-parois afin de réaliser cette fonctionnalisation non-covalente des nanotubes de carbone comme représenté sur le **Schéma III-19**.



**Schéma III-19 :** Représentation schématique de l'interaction entre les nanotubes de carbone multi-parois (MWCNTs) et le pyrène-viologène.

Afin de réaliser cette fonctionnalisation, nous avons choisi de disperser les nanotubes de carbone multi-parois dans du méthanol car ce dernier permet la solubilisation du pyrène-viologène qui n'est pas soluble dans le solvant (THF) que nous avons utilisé pour les autres dispersions de CNTs réalisées. Cependant, nous nous sommes confrontés à un autre problème : les MWCNTs ne se dispersent pas dans le méthanol comme on peut le remarquer sur la **Figure III-29-A** qui correspond à une solution de méthanol contenant des MWCNTs ( $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) placés pendant 30 minutes au bain à ultrasons. Le pyrène-viologène est aussi soluble dans le DMF mais nous ne voulions pas utiliser ce solvant pour réaliser les dispersions de part la difficulté de l'évaporer par la suite ( $T_{\text{éb}} = 147 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Nous avons alors préparé une solution de méthanol contenant  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de MWCNTs et  $1,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  de pyrène-viologène puis placé celle-ci au bain à ultrasons pendant 30 minutes. La **Figure III-29-B** montre la dispersion obtenue après repos de celle-ci pendant 12 heures ; on peut noter que la dispersion est claire mais que les nanotubes ont quand même pu être dispersés ce qui nous a permis de penser qu'ils avaient bien été fonctionnalisés par le pyrène-viologène. Afin de ne garder que la partie supérieure de la dispersion et non pas les nombreux agrégats qui ont sédimenté, nous avons récupéré et filtré cette partie de la dispersion sur une membrane de Téflon<sup>®</sup> (PTFE ; diamètre des pores =  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ ). Le film de nanotubes de carbone fonctionnalisés avec le pyrène-viologène formé sur la membrane est alors décroché de celle-ci avec quelques millilitres d'éthanol absolu et les MWCNTs fonctionnalisés sont agités mécaniquement jusqu'à évaporation complète de l'éthanol puis finalement séchés à l'étuve

pendant 12 heures. Nous avons ensuite essayé de disperser à nouveau ce type de nanotubes de carbone modifiés dans du THF et de l'éthanol mais sans succès ; par contre, dans l'eau distillée, on obtient une dispersion très claire ( $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) après 1 heure dans le bain à ultrasons et repos pendant 12 heures. Cette solution aqueuse a alors été filtrée une nouvelle fois sur une membrane de cellulose ester (MCE ; diamètre des pores =  $0,22 \mu\text{m}$ ) ; cette membrane humide a ensuite été séchée sous vide. Cette membrane étant soluble dans l'acétone, nous avons ensuite découpé un disque de diamètre  $\varnothing = 3 \text{ mm}$  dans la membrane cellulose ester recouverte du film de MWCNTs fonctionnalisés par le pyrène-viologène puis déposé celui-ci sur une électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ). L'acétone est finalement ajoutée au goutte à goutte jusqu'à dissolution complète de la membrane et l'électrode est séchée sous vide afin d'éliminer toute trace d'acétone.



**Figure III-29** : Dispersions ( $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) de : **A** - nanotubes de carbone multi-parois (MWCNTs) et **B** - MWCNTs fonctionnalisés avec du pyrène-viologène ( $1,6.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ) dans le méthanol après 30 minutes dans le bain à ultrasons.

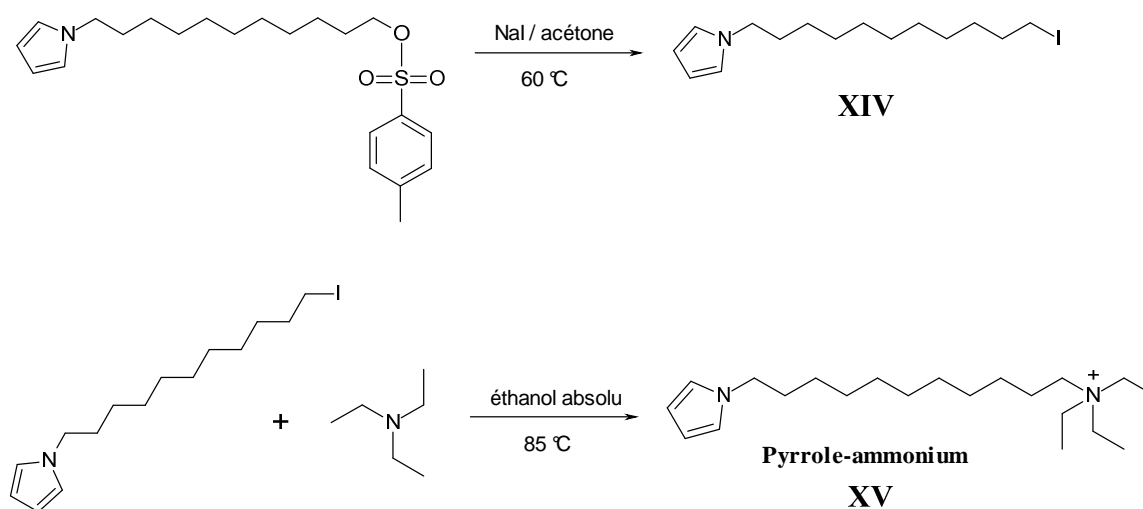
### *III.3.3.c. Piégeage de l'hydrogénase dans un film polymère à caractère hydrophile sur les MWCNTs fonctionnalisés avec le pyrène-viologène*

Dans l'étude précédente, le polymère exhibant des motifs viologènes, le poly(pyrrole-viologène), servait à piéger l'enzyme et donc à la maintenir à la surface du transducteur. Ici, ce n'est plus le cas puisque ce sont les nanotubes qui ont été fonctionnalisés par les groupements viologènes. Nous avons donc voulu ajouter un polymère à caractère hydrophile et ne possédant pas de groupement rédox tel que le viologène pour encapsuler l'hydrogénase sur l'électrode modifiée par les MWCNTs fonctionnalisés avec le pyrène-viologène. Nous avons donc retenu celle-ci dans un film de poly(pyrrole-triéthylammonium) qui est

communément utilisé au laboratoire depuis plus de 15 ans pour l'élaboration de biocapteurs enzymatiques<sup>57</sup>.

### III.3.3.c.a. Présentation du pyrrole-triéthylammonium

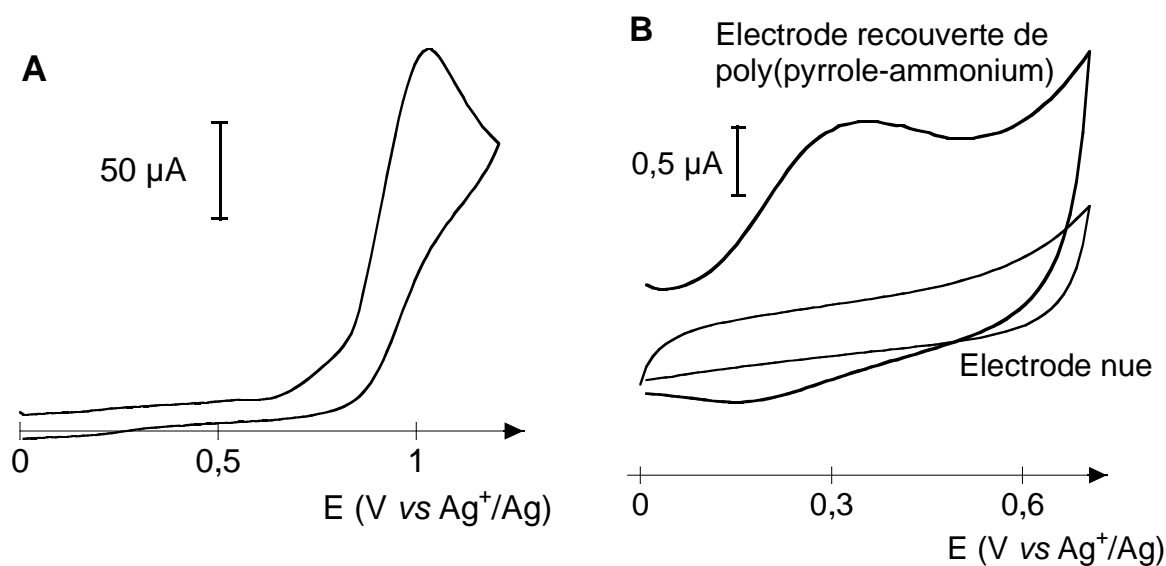
Le pyrrole-triéthylammonium (pyrrole-ammonium) a été synthétisé selon un protocole mixte de ceux déjà décrits au laboratoire<sup>58, 59</sup> et dont le principe est représenté sur le **Schéma III-20**.



**Schéma III-20** : Principe de la synthèse du pyrrole-ammonium.

La synthèse du composé 11-pyrrol-1-ylundécyl 4-méthylbenzènesulfonate (**VIII**) ayant été décrite lors de la synthèse du pyrrole-viologène (**Schéma III-14**), nous ne décrivons ici que la suite du protocole. Ce composé a ensuite été mélangé avec NaI dans de l'acétone pendant 3 heures sous reflux permettant d'obtenir le 1-(11-iodoundécyl)pyrrole (composé **XIV**) de façon quantitative. Ce dernier est ensuite solubilisé dans de l'éthanol absolu et un grand excès de triéthylamine est ajouté ; la solution est agitée pendant 16 heures sous reflux puis le solvant ainsi que l'excès de triéthylamine sont éliminés par évaporation. On obtient donc le pyrrole-ammonium (composé **XV**) avec des contre-ions iodures et dans une dernière étape, nous avons effectué l'échange des contre-ions ( $I^- \rightarrow BF_4^-$ ). Celui-ci a été réalisé sur une colonne échangeuse d'ions (résine Amberlite) conditionnée avec  $HBF_4$  dilué (1 % V/V dans  $H_2O$ ). Le pyrrole-ammonium,  $BF_4^-$  (**XV**) est finalement obtenu avec un rendement  $\eta = 67$  % puis caractérisé par RMN  $^1H$  et spectrométrie de masse (partie expérimentale).

Le comportement électrochimique de ce monomère en solution électrolytique  $\text{LiClO}_4$  ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) dans  $\text{CH}_3\text{CN}$  sur électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ) a finalement été étudié. Comme on peut le remarquer sur la **Figure III-30-A**, le composé présente le pic anodique caractéristique de l'oxydation irréversible du motif pyrrole<sup>52, 53</sup> vers  $1,03 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$ . L'électropolymérisation de ce monomère en solution électrolytique organique  $\text{LiClO}_4$  ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) dans  $\text{CH}_3\text{CN}$  a été réalisée par chronoampérométrie à potentiel imposé  $E = 0,85 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$  dans une solution contenant  $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de pyrrole-ammonium sur une électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$  ;  $Q = 0,2 \text{ mC}$ ). Le transfert de l'électrode ainsi modifiée dans  $\text{CH}_3\text{CN} + \text{LiClO}_4$  ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) exempt de monomère permet d'obtenir la courbe de voltammétrie cyclique présentant le signal électroactif du poly(pyrrole-ammonium) (**Figure III-30-B**). Ce signal est centré sur  $E_{1/2} = 0,25 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$  ( $E_{\text{ox}} = 0,35$  et  $E_{\text{red}} = 0,15 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$ ) ce qui correspond au signal électrochimique typique des films de poly(pyrrole-N-alkyl)<sup>52</sup>.



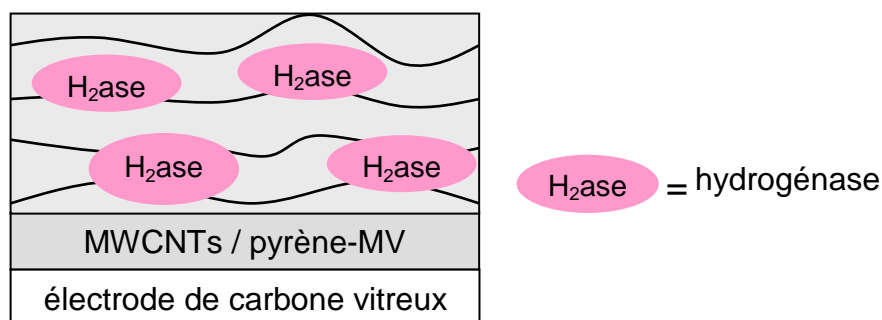
**Figure III-30** : **A** - Voltampérogramme d'une solution de pyrrole-ammonium ( $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$  sur électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ) ;  $v = 0,1 \text{ V.s}^{-1}$  et **B** - Electrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ) modifiée avec le poly(pyrrole-ammonium) polymérisé par électrolyse à potentiel constant  $E = 0,85 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$  ( $Q = 0,2 \text{ mC}$ ) et transférée dans  $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$  exempt de monomère avec  $v = 0,1 \text{ V.s}^{-1}$ .

### III.3.3.c.β. Elaboration de l'architecture

Le système étudié a été élaboré selon une procédure similaire à celle employée pour la construction de l'architecture hybride MWCNTs/poly(pyrrole-viologène)/hydrogénase NiFe.

Dans le cas présent, les nanotubes de carbone multi-parois étant déjà fonctionnalisés par du pyrène-viologène, nous avons piégé l'hydrogénase NiFe dans un poly(pyrrole) hydrophile : le poly(pyrrole-ammonium). Une représentation schématique de cette électrode modifiée est présentée sur le **Schéma III-21**.

Le dépôt des MWCNTs fonctionnalisés par le pyrène-viologène sur des électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ) a été formé comme décrit au paragraphe § **III.3.3.b.** et nous avons ensuite déposé sur ces électrodes  $10 \mu\text{L}$  d'une solution aqueuse contenant  $6.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  de pyrrole-ammonium et  $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$  d'hydrogénase. Afin d'imprégner le film de nanotubes de carbone fonctionnalisés avec ce mélange, nous avons laissé ce mélange incuber avec l'électrode pendant 30 minutes à  $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$  puis le dépôt a été finalement séché sous vide dans un dessiccateur. La polymérisation du pyrrole-ammonium a été effectuée par chronoampérométrie à potentiel constant  $E = 0,8 \text{ V vs ECS}$  en limitant la charge d'électro-oxydation à  $Q = 0,2 \text{ mC}$ . Cette électrode est finalement rincée dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$ ) sous vive agitation pendant 5 minutes.

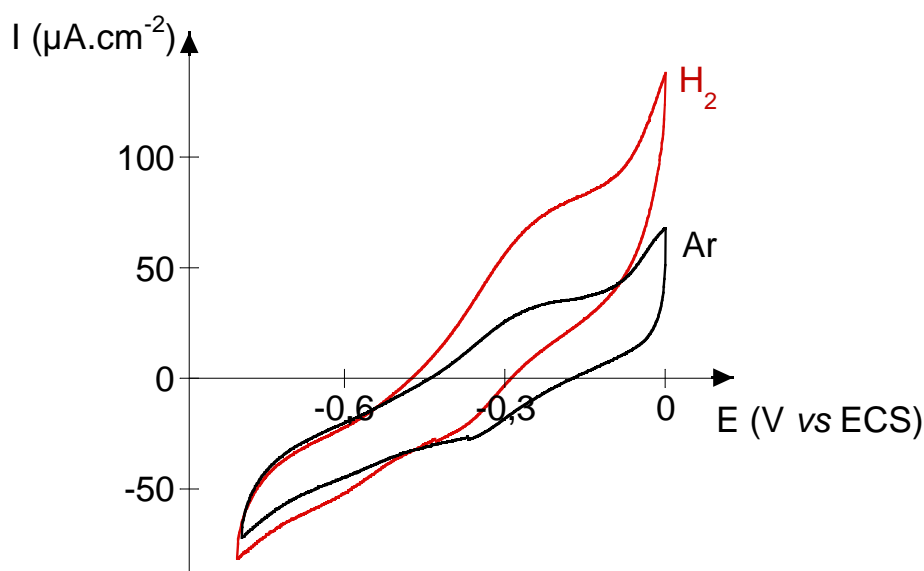


**Schéma III-21** : Représentation schématique de l'architecture élaborée sur les nanotubes de carbone multi-parois (MWCNTs) fonctionnalisés par  $\pi$ -stacking avec le pyrène-viologène. L'hydrogénase NiFe a ensuite été piégée dans le film de poly(pyrrole-ammonium) électrogénéré.

#### III.3.3.d.χ. Etude électrochimique

Pour l'activation et les études par voltammétrie cyclique, nous avons utilisé la même cellule électrochimique que précédemment afin de s'affranchir le plus possible des phénomènes d'inactivation de l'hydrogénase liées à l'oxygène (**Schéma III-16**). L'activation de l'enzyme a été effectuée électrochimiquement comme nous l'avons fait auparavant (§ **III.3.2.b.**). Une première courbe de voltammétrie cyclique en présence de  $\text{H}_2$  a été enregistrée puis une seconde après avoir retiré l'hydrogène de la solution grâce à un dégazage avec de

l'argon pendant 15 minutes. La **Figure III-31** montre les courbes obtenues pour cette étude ; on observe bien le courant catalytique de l'enzyme mais celui-ci reste assez faible et a pour valeur :  $J_{\text{cat}} = 43 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Cependant, dans cette architecture, les nanotubes ne sont recouverts que d'une monocouche de pyrène-viologène ; le groupement viologène servant au transfert d'électrons, si sa quantité diminue, il est probable que le transfert des électrons soit plus difficile à réaliser. De plus, dans l'architecture précédente, ces groupements étaient situés à proximité immédiate des enzymes et présents dans tout le film polymère favorisant alors la médiation des électrons jusqu'à l'électrode. Il apparaît toutefois extrêmement intéressant que cette stratégie de modification des nanotubes de carbone multi-parois puisse conduire à une connexion électrique de l'enzyme. Cette approche pourrait donc être combinée à la précédente afin d'améliorer le processus de connexion.



**Figure III-31** : Courbes de voltammétrie cyclique obtenues avec une électrode de carbone vitreux ( $\varnothing = 3 \text{ mm}$ ) modifiée par un dépôt de nanotubes de carbone multi-paroi fonctionnalisés avec le pyrène-viologène (MWCNTs/pyrène-viologène ;  $10 \times 10 \mu\text{L}$  d'une dispersion à  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans le méthanol) et un film de poly(pyrrole-ammonium) ( $Q = 0,2 \text{ mC}$ ) incorporant l'hydrogénase NiFe ( $2 \mu\text{g}$ ) dans du tampon phosphate ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ;  $\text{pH} = 7$  ;  $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ) sous argon puis sous hydrogène avec  $v = 10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

#### III.3.4. Comparaison des deux voies de connexion de l'hydrogénase

Dans cette partie du chapitre, nous avons réussi à connecter une hydrogénase NiFe avec les nanotubes de carbone mono- et multi-parois en incorporant le médiateur (viologène) nécessaire au transfert d'électrons de deux manières différentes : dans un premier temps,

celui-ci a été couplé à un motif pyrrole afin de réaliser le piégeage de l'enzyme par la même occasion lors de processus d'électropolymérisation tandis que dans un second temps, nous avons couplé ce médiateur à un motif pyrène qui a permis la fonctionnalisation des nanotubes de carbone multi-parois. Les résultats obtenus dans le premier cas, avec le pyrrole-viologène, sont plus conséquents mais aussi plus prometteurs et ceci peut être expliqué par le fait que dans cette architecture, le viologène est situé à proximité directe de l'enzyme et donc de son site actif permettant ainsi de faciliter le transfert des électrons. Dans le meilleur des cas, nous avons obtenu un courant catalytique  $J_{\text{cat}} = 301 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  qui est environ six fois plus grand que les valeurs récentes de la littérature concernant l'immobilisation de cette enzyme (hydrogénase NiFe de *Desulfovibrio fructosovorans*) sur les nanotubes de carbone<sup>48</sup> ; cependant, il faut tenir compte que ces auteurs ont utilisé des nanotubes de carbone mono-paroi (SWCNTs) et que nous avons clairement démontré que les MWCNTs utilisés ici permettent d'obtenir des signaux plus intenses. De plus, les résultats publiés par Lojou et al.<sup>48</sup> en 2008, concernaient l'immobilisation d'une monocouche d'hydrogénases tandis que, dans les résultats présentés ici, nous avons profité du volume créé par l'architecture hybride MWCNTs/poly(pyrrole-viologène) pour piéger l'enzyme qui doit donc être en quantité plus importante. Nous avons même réussi à obtenir des valeurs similaires à celles obtenues pour d'autres hydrogénases plus résistantes à l'oxygène connectées sur les nanotubes de carbone comme l'hydrogénase NiFe I de la bactérie *Aquifex aeolicus*<sup>60</sup> si on se place dans des conditions expérimentales comparables ( $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$  ;  $\sim 5 \mu\text{g}$  de nanotubes déposés). Ces deux architectures méritent d'être étudiées en profondeur en essayant d'optimiser certains paramètres tels que : la quantité de monomère utilisée pour le piégeage de l'enzyme, la quantité d'hydrogénase piégée dans le film polymère ou encore la température et le pH choisis pour réaliser l'étude.

#### **III.4. Conclusions du Chapitre III**

Tout au long de ce chapitre, nous avons illustré les possibilités offertes par les nanotubes de carbone pour l'élaboration de biocapteurs et d'une bioanode.

Dans la première partie du chapitre, nous avons démontré la possibilité de réaliser la fonctionnalisation multiple de nanotubes de carbone grâce à l'interaction non-covalente de type  $\pi$ - $\pi$  qui existe entre les nanotubes de carbone et la molécule de pyrène et la mise en œuvre de trois systèmes affins différents fonctionnalisés par un motif pyrène. Outre la facilité



de biofonctionnalisation des nanotubes de carbone par simple immersion, la possibilité d'immobiliser des biomolécules différentes et de moduler leurs rapports respectifs ouvre de nombreuses voies pour le développement d'architectures multienzymatiques à activités combinées ou d'immunocapteurs voire de capteurs à ADN associés à une amplification enzymatique du signal de reconnaissance. Cette approche peut éventuellement être appliquée à des nanotubes de carbone uniques. Nous avons pu également mettre en évidence par la même occasion que ce type de fonctionnalisation pourrait permettre de renforcer certains matériaux composites à base de nanotubes de carbone grâce à la réticulation de ces derniers.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la connexion d'une hydrogénase (NiFe de *Desulfovibrio fructosovorans*) sur les nanotubes de carbone en élaborant des architectures hybrides CNTs/médiateur rédox/enzyme de façon relativement rapide et simple. Nous avons ainsi démontré que l'électropolymérisation du pyrrole-viologène ou l'adsorption spécifique par interactions  $\pi$  du pyrène-viologène conduisait à des systèmes efficaces pour la transformation de  $H_2$  en courant électrique. Bien que ces configurations n'aient pas été optimisées, elles présentent des résultats prometteurs en comparaison avec les résultats présents dans la littérature.

Parmi les nanomatériaux, nous avons pu vérifier que les nanotubes de carbone représentent un candidat excellent en vue de l'élaboration de biocapteurs, biopiles ou même de matériaux bio-composites.

## Bibliographie

- (1) Peigney, A. ; Laurent, C. ; Flahaut, E. ; Bacsa, R. R. ; Rousset, A. *Carbon* **2001**, 39, 507.
- (2) Iijima, S. ; Brabec, C. ; Maiti, A. ; Bernholc, J. *J. Chem. Phys.* **1996**, 104, 2089.
- (3) Saito, R. ; Fujita, M. ; Dresselhaus, G. ; Dresselhaus, M. S. *Appl. Phys. Lett.* **1992**, 60, 2204.
- (4) Radushkevich, L. V. ; Lukyanovich, V. M. *Zurn. Fisic. Chim.* **1952**, 111, 88.
- (5) Oberlin, A. ; Endo, M. ; Koyama, T. *J. Cryst. Growth* **1976**, 32, 335-349.
- (6) Monthieux, M. ; Kuznetsov, V. L. *Carbon* **2006**, 44, 1621-1623.
- (7) Cadek, M. ; Murphy, R. ; McCarthy, B. ; Drury, A. ; Lahr, B. ; Barklie, R. C. ; In het Panhuis, M. ; Coleman, J. N. ; Blau, W. J. *Carbon* **2002**, 40, 923-928.
- (8) Shi, Z. ; Lian, Y. ; Liao, F. H. ; Zhou, X. ; Gu, Z. ; Zhang, Y. ; Iijima, S. ; Li, H. ; Yue, K. T. ; Zhang, S. *J. Phys. Chem. Solids* **2000**, 61, 1031-1036.
- (9) Kusaba, M. ; Tsunawaki, Y. *Thin Solid Films* **2006**, 506-507, 255-258.
- (10) Zhang, H. ; Ding, Y. ; Wu, C. ; Chen, Y. ; Zhu, Y. ; He, Y. ; Zhong, S. *Physica B* **2003**, 325, 224-229.
- (11) Luxembourg, D. ; Flamant, G. ; Laplaze, D. *Carbon* **2005**, 43, 2302-2310.
- (12) Laplaze, D. ; Alvarez, L. ; Guillard, T. ; Badie, J. M. ; Flamant, G. *Carbon* **2002**, 40, 1621-1634.
- (13) Venegoni, D. ; Serp, P. ; Feurer, R. ; Kihn, Y. ; Vahlas, C. ; Kalck, P. *Carbon* **2002**, 40, 1799-1807.
- (14) Bondi, S. ; Lackey, W. ; Johnson, R. ; Wang, X. ; Wang, Z. *Carbon* **2006**, 44, 1393-1403.
- (15) Nikolaev, P. ; Bronikowski, M. J. ; Bradley, R. K. ; Rohmund, F. ; Colbert, D. T. ; Smith, K. A. ; Smalley, R. E. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, 313, 91-97.
- (16) Mintmire, J. ; Dunlap, B. ; White, C. *Phys. Rev. Lett.* **1992**, 68, 631-634.
- (17) Hone, J. ; Whitney, M. ; Piskoti, C. ; Zettl, A. *Phys. Rev. B Condens. Matter Mater. Phys.* **1999**, 59, R2514.
- (18) Kim, P. ; Shi, L. ; Majumdar, A. ; McEuen, P. L. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, 87, 215502.
- (19) Popov, V. N. ; Van Doren, V. E. ; Balkanski, M. *Phys. Rev. B Condens. Matter Mater. Phys.* **2000**, 61, 3078.
- (20) Tasis, D. ; Tagmatarchis, N. ; Bianco, A. ; Prato, M. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 1105-1136.
- (21) Jaegfeldt, H. ; Kuwana, T. ; Johansson, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 1805-1814.
- (22) Katz, E. *J. Electroanal. Chem.* **1994**, 365, 157-164.
- (23) Neises, B. ; Steglich, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1978**, 17, 522-524.
- (24) Haddad, R. ; Cosnier, S. ; Maaref, A. ; Holzinger, M. *Analyst* **2009**, 134, 2412.

- (25) Holzinger, M. ; Haddad, R. ; Maaref, A. ; Cosnier, S. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2009**, *9*, 6042-6046.
- (26) Baur, J. ; Gondran, C. ; Holzinger, M. ; Defrancq, E. ; Perrot, H. ; Cosnier, S. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1066-1072.
- (27) Haddour, N. ; Cosnier, S. ; Gondran, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5752-5753.
- (28) Aravinda, C. ; Cosnier, S. ; Chen, W. ; Myung, N. V. ; Mulchandani, A. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1451-1455.
- (29) Lineweaver, H. ; Burk, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 658-666.
- (30) Mailley, P. ; Thèse de doctorat : « Immobilisation d'enzymes dans des poly(pyrrole-amphiphiles) : caractérisation et application à la biodétection ampérométrique du glucose. », Université Joseph Fourier, Grenoble, **1995**.
- (31) Eftink, M. R. ; Andy, M. L. ; Bystrom, K. ; Perlmutter, H. D. ; Kristol, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6765-6772.
- (32) Fragoso, A. ; Caballero, J. ; Almirall, E. ; Villalonga, R. ; Cao, R. *Langmuir* **2002**, *18*, 5051-5054.
- (33) Holzinger, M. ; Bouffier, L. ; Villalonga, R. ; Cosnier, S. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1128-1134.
- (34) Wilchek, M. ; Bayer, E. A. *Anal. Biochem.* **1988**, *171*, 1-32.
- (35) Swoboda, B. ; Massey, V. *J. Biol. Chem.* **1964**, *240*, 2209-2215.
- (36) Haddour, N. ; Thèse de doctorat : « Réalisation d'assemblages biologiques électroactifs : application aux biocapteurs d'affinité. », Université Joseph Fourier, Grenoble, **2005**.
- (37) Wessel, R. ; Thèse de doctorat : « Etude électrochimique de métallodeutéroporphyrines biomimétiques électropolymérisables. Application aux (bio)capteurs ampérométriques. », Université Joseph Fourier, Grenoble, 2001.
- (38) Cosnier, S. ; Gondran, C. ; Le Pellec, A. ; Senillou, A. *Anal. Lett.* **2001**, *34*, 61.
- (39) Lacey, A. L. D. ; Fernández, V. M. ; Rousset, M. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 1596-1608.
- (40) Armaroli, N. ; Balzani, V. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 52-66.
- (41) Volbeda, A. ; Charon, M. ; Piras, C. ; Hatchikian, E. C. ; Frey, M. ; Fontecilla-Camps, J. C. *Nature* **1995**, *373*, 580-587.
- (42) Fontecilla-Camps, J. C. ; Volbeda, A. ; Cavazza, C. ; Nicolet, Y. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4273-4303.
- (43) Volbeda, A. ; Montet, Y. ; Vernède, X. ; Hatchikian, E. C. ; Fontecilla-Camps, J. C. *Int. J. Hydrogen Energy* **2002**, *27*, 1449-1461.

- (44) Rousset, M. ; Dermoun, Z. ; Chippaux, M. ; Bélaich, J. *Mol. Microbiol.* **1991**, *5*, 1735-1740.
- (45) Malki, S. ; Luca, G. D. ; Fardeau, M. L. ; Rousset, M. ; Belaich, J. P. ; Dermoun, Z. *Arch. Microbiol.* **1997**, *167*, 38-45.
- (46) Dementin, S. ; Burlat, B. ; De Lacey, A. L. ; Pardo, A. ; Adryanczyk-Perrier, G. ; Guigliarelli, B. ; Fernandez, V. M. ; Rousset, M. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 10508-10513.
- (47) Schmidt, T. G. ; Skerra, A. *Nat. Protocols* **2007**, *2*, 1528-1535.
- (48) Lojou, É. ; Luo, X. ; Brugna, M. ; Candoni, N. ; Dementin, S. ; Giudici-Ortoni, M. T. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 1157-1167.
- (49) Bidan, G. ; Deronzier, A. ; Moutet, J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 1185-1186.
- (50) Cosnier, S. ; Innocent, C. ; Jouanneau, Y. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3198-3201.
- (51) Cosnier, S. ; Galland, B. ; Innocent, C. *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *433*, 113-119.
- (52) Diaz, A. F. ; Castillo, J. ; Kanazawa, K. K. ; Logan, J. A. ; Salmon, M. ; Fajardo, O. *J. Electroanal. Chem.* **1982**, *133*, 233-239.
- (53) Deronzier, A. ; Moutet, J. *C. Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 249-255.
- (54) Innocent, C. ; Thèse de doctorat : « Immobilisation de biomolécules dans des poly-pyrroles fonctionnalisés : application à l'électroanalyse. », Université Joseph Fourier, Grenoble, **1995**.
- (55) Eder, D. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1348-1385.
- (56) Weinberg, N. L. ; Weinberg, H. R. *Chem. Rev.* **1968**, *68*, 449-523.
- (57) Cosnier, S. *Electroanalysis* **1997**, *9*, 894-902.
- (58) Coche-Guerente, L. ; Deronzier, A. ; Galland, B. ; Labbe, P. ; Moutet, J. ; Reverdy, G. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 386-388.
- (59) Ionescu, R. E. ; Cosnier, S. ; Marks, R. S. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 6327-6331.
- (60) Luo, X. ; Brugna, M. ; Tron-Infossi, P. ; Giudici-Ortoni, M. T. ; Lojou, É. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 1275-1288.

# Conclusion générale



## Conclusion générale

L'objectif du travail présenté dans ce mémoire était de développer des assemblages hybrides macromolécules biologiques/polymères conducteurs en vue de leur utilisation dans les biocapteurs ou les biopiles. Nous avons pu confirmer le fait que les films de poly(pyrrole) fonctionnalisés occupent une place très importante dans ce domaine. Afin d'obtenir des architectures biomoléculaires plus sensibles et/ou spécifiques, ce travail a été divisé en deux grandes parties : l'utilisation d'un polymère très prometteur, le poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup>, et l'incorporation de nanotubes de carbone fonctionnalisés dans ces assemblages.

Dans la première partie de ces travaux de thèse, nos recherches se sont axées sur l'utilisation du poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup> pour l'élaboration de biocapteurs à ADN ou enzymatiques.

Dans un premier temps, nous avons choisi d'améliorer la sensibilité d'un capteur à ADN en utilisant le système d'affinité NTA/Cu<sup>2+</sup>/histidine comme plateforme d'ancrage d'oligonucléotides sondes combiné à une méthode de détection sans marquage de la cible (oligonucléotide complémentaire) : la spectroscopie d'impédance électrochimique. Ce système a permis l'obtention d'un seuil de détection le plus faible obtenu jusqu'à présent pour des biocapteurs à ADN impédancemétriques de 10<sup>-15</sup> mol.L<sup>-1</sup> et des possibilités de régénération comparables à celles obtenues précédemment avec des enzymes malgré la complexité de la biomolécule choisie : l'ADN.

Dans un second temps, nous avons introduit un concept original et novateur d'immobilisation de biorécepteurs biotinylés sur ce même film polymère. Celui-ci a été illustré par l'ancrage d'enzymes et d'ADN marqués avec des groupements biotines et offre une alternative intéressante au système avidine/biotine. Deux enzymes, la glucose oxydase et la polyphénol oxydase, ont été judicieusement choisies pour réaliser cette étude par chronoampérométrie à potentiel constant et montrer la large gamme de potentiels utilisables pour ce système (- 0,2 à + 0,6 V vs ECS). Par la suite, nous avons confirmé cette nouvelle voie d'immobilisation de biomolécules en réalisant la détection du phénomène d'hybridation de l'ADN par spectroscopie d'impédance électrochimique. L'intérêt de cette technique vient du fait que les molécules biotinylées ou les kits permettant l'ancrage de biotines sur les biomolécules sont disponibles dans le commerce.

Nous avons ensuite examiné une autre voie concernant l'élaboration de biomatériaux à base de nanotubes de carbone fonctionnalisés de façon non-covalente.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la fonctionnalisation multiple de nanotubes de carbone par la glucose oxydase en utilisant les trois systèmes d'affinité les plus courants dans le domaine des biocapteurs : avidine/biotine, NTA/Cu<sup>2+</sup>/histidine et adamantane/ $\beta$ -cyclodextrine. Cette étude a mis en évidence l'effet néfaste de couches enzymatiques trop compactes qui est un paramètre important à considérer dans le futur des biocapteurs. Cette architecture a été élaborée avec une enzyme modèle mais ouvre des perspectives pour le développement de capteurs électroenzymatiques à détection combinée.

Dans un second temps, nous avons entrepris la connexion électrique d'une hydrogénase par piégeage dans des films de poly(pyrrole) fonctionnalisés conducteurs en décrivant l'élaboration de matériaux hybrides CNTs/médiateur rédox/enzyme. Bien que ce ne soit qu'une étude préliminaire, nous avons pu mettre en évidence l'efficacité de ce type d'architectures pour la transformation du dihydrogène en courant électrique.

En résumé, ce travail démontre le potentiel remarquable des films conducteurs de poly(pyrrole) et des nanotubes de carbone pour l'obtention de biocapteurs très sensibles, d'architectures multifonctionnelles et de nouvelles méthodes d'immobilisation. Celui-ci a aussi permis d'entrouvrir la voie de production d'énergie propre.



# Partie expérimentale



## Partie expérimentale

### E.1. Organic compounds synthesis

#### E.1.1. Synthesis of pyrrole-NTA (**III**)

##### *E.1.1.a. Synthesis of pyrrole-COOH (I)*

To a solution of 11-aminoundecanoic acid (20.14 g, 0.1 mol) in a mixture of acetic acid (40 mL) and distilled water (60 mL) was added 2,5-dimethoxytetrahydrofuran (13 mL, 0.1 mol). The solution was stirred for 2 h at 100 °C before extraction with 3 x 50 mL of diethyl ether. Organic phases were basified using sodium carbonate and dried with sodium sulphate. The solution was evaporated to give 21.5 g (yield: 85 %) of pyrrole-COOH (**I**).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 11.29 (1H, s), 6.65 (2H, s), 6.15 (2H, s), 3.87 (2H, t), 2.36 (2H, t), 1.30-1.77 (16H, m).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 120.4 (2C), 107.7 (2C), 49.6 (1C), 34.0 (1C), 31.5 (1C), 29.4 (1C), 29.3 (1C), 29.1 (1C), 29.0 (1C), 26.7 (1C), 24.6 (1C).

ESI/MS:  $m/z$  = 250 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ,  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{NO}_2$ ).

IR (KBr):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3421, 2927, 2853, 1706, 722.

##### *E.1.1.b. Synthesis of pyrrole-NHS (II)*

To a solution of 11-pyrrol-1-yl-undecanoic acid (**I**) (2.1 g,  $8.3 \cdot 10^{-3}$  mol) and *N*-hydroxysuccinimide (978.4 mg,  $8.5 \cdot 10^{-3}$  mol) in distilled THF (15 mL) was added a solution of 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (1.8 g,  $8.7 \cdot 10^{-3}$  mol) in distilled THF (5 mL). The mixture was stirred for 23 h at room temperature under argon atmosphere and concentrated in vacuo. The crude was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2-3 mL) and, after filtration, the resulting solution was evaporated to give 2.4 g (yield: 83%) of pyrrole-NHS (**II**).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 7.19 (1H, s), 6.57 (2H, s), 6.06 (2H, s), 3.79 (2H, t), 2.76 (4H, s), 2.53 (2H, t), 1.21-1.68 (15H, m).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 169.2 (1C), 120.4 (2C), 107.7 (2C), 49.6 (1C), 31.5 (1C), 31.0 (1C), 31.5 (1C), 29.4 (1C), 29.3 (1C), 29.2 (1C), 29.1 (1C), 29.0 (1C), 28.7 (1C), 26.7 (1C), 25.6 (1C), 24.5 (1C).

ESI/MS:  $m/z$  = 349.2 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_4$ ), 371.1 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$ ), 387.1 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ ,  $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4\text{K}$ ).

IR (KBr):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2925, 2854, 1741, 1654, 721.

### *E.1.1.c. Synthesis of pyrrole-NTA (III)*

11-Pyrrol-1-yl-undecanoic acid succinimid ester (288.5 mg,  $8.3 \cdot 10^{-4}$  mol) was dissolved with  $\text{N}_{\alpha}'\text{N}_{\alpha}$ -bis(carboxymethyl)-L-lysine (328.3 mg,  $1.25 \cdot 10^{-3}$  mol) in DMF (5 mL), TEA (300  $\mu\text{L}$ ,  $2.15 \cdot 10^{-3}$  mol), NaOH (69.2 mg,  $1.73 \cdot 10^{-3}$  mol), and water (2 mL). The solution was stirred for 48 h at 55 °C. After evaporation of the solvent under vacuum atmosphere, the crude product was redissolved in water (2 mL) and the aqueous solution was filtered. 210.5 mg of pyrrole-NTA (**III**) was then obtained as oil (yield: 51%) after water evaporation.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 6.65 (2H, s), 6.01 (2H, s), 3.88 (2H, t), 3.62 (5H, q), 3.18-3.46 (4H, m), 2.17 (2H, t), 1.30-1.77 (20H, m).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 193.4 (1C), 191.6 (1C), 179.6 (1C), 176.3 (1C), 175.9 (1C), 171.3 (1C), 121.3 (1C), 108.5 (1C), 55.3 (1C), 32.8 (1C), 30.5 (1C), 30.3 (1C), 27.7 (1C).

ESI/MS:  $m/z$  = 496 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_7$ ).

### *E.1.2. Synthesis of pyrene-NTA (IV)*

To a solution of pyrene butyric acid succinimid ester (400 mg,  $10^{-3}$  mol) in 50 mL of dry DMF,  $\text{N}_{\alpha}'\text{N}_{\alpha}$ -bis(carboxymethyl)-L-lysine (350 mg,  $1.25 \cdot 10^{-3}$  mol) was added. To dissolve the NTA, NaOH (50 mg, one pellet) solubilised in 2 mL of water was added and one drop of triethylamine was also added to assure the basic environment in the organic phase. The mixture was stirred for 3 days at 60 °C. After removal of the volatiles, the residue was dissolved in water and the product **IV** (pyrene-NTA) was precipitated after titration with HCl ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ). 450 mg of pyrene-NTA (**IV**) was obtained as slight yellow solid and then filtered and washed with water (yield: 83 %).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 8.38 (1H, d), 8.17 (1H, dd), 8.15 (1H, d), 8.11 (2H, 2d), 8.02 (2H, 2d), 8.00 (1H, d), 7.93 (1H,d), 3.87 (2H, t), 3.63 (4H, q), 3.45 (1H, t), 3.39 (2H, t), 3.17 (2H, t), 2.17 (2H, t), 1.95-1.23 (6H, m).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 174.0 (1C), 173.2 (2C), 171.6 (1C), 136.6 (1C), 130.8 (1C), 130.4 (1C), 129.3 (1C), 128.1 (1C), 127.5 (1C), 127.4 (1C), 127.2 (1C), 126.5 (1C), 126.1 (1C), 124.9 (1C), 124.8 (1C), 124.7 (1C), 124.2 (1C) 124.1 (1C), 123.5 (1C), 64.3 (1C), 53.5 (2C), 38.3 (1C), 35.0 (1C), 32.2 (1C), 29.3 (1C), 28.9 (1C), 27.5 (1C), 23.1 (1C).

MS (EI, 200 °C):  $m/z$  = 534 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_7$ ).

IR (KBr):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3399, 3313, 3032, 2932, 2861, 1730, 1641, 1536, 1451, 1349, 1179, 841, 705.

UV/Vis (THF):  $\lambda_{\text{max}}$  (nm) = 243, 255.5, 266, 276.5, 313.5, 327.5, 343.5.

### E.1.3. Synthesis of pyrene-adamantane (V)

To a solution of pyrene butyric acid (290 mg,  $10^{-3}$  mol) in 50 mL dry dichloromethane, adamantylamine (150 mg,  $10^{-3}$  mol) and DCC (280 mg,  $1.2 \cdot 10^{-3}$  mol) were added. The reaction mixture was stirred for 72 h at room temperature under reaction control by TLC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 100%). The produced solid was then filtered and the obtained yellow liquid was concentrated to obtain 320 mg of pure pyrene-adamantane (V) as slightly yellow powder after flash chromatography ( $\text{SiO}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  100 %) (yield: 74%).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 8.31 (1H, d), 8.17 (1H, dd), 8.15 (1H, d), 8.11 (2H, 2d), 8.02 (2H, 2d), 8.00 (1H, d), 7.87 (1H,d), 5.02 (1H, s), 3.39 (2H, t), 2.05 (2H, q), 2.18 (2H, t), 2.16 (3H, m), 1.98 (6H, d), 1.66 (6H, t).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 171.0 (1C), 136.0 (1C), 131.4 (1C), 130.8 (1C), 129.8 (1C), 128.7 (1C), 127.4 (1C), 127.3 (1C), 126.6 (1C), 125.8 (1C), 125.1 (1C), 124.9 (1C), 124.9 (1C), 124.8 (1C), 124.7 (1C) 124.7 (1C), 123.4 (1C), 75.1 (1C), 51.8 (1C), 41.6 (3C), 36.3 (3C), 32.6 (1C), 29.4 (3C), 27.5 (1C).

MS (EI, 200 °C):  $m/z$  = 424 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{NO}$ ).

IR (KBr):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3411, 3291, 3035, 2904, 2848, 1641, 1542, 1453, 1359, 1181, 1095, 842, 752, 719, 679.

UV/Vis (THF):  $\lambda_{\text{max}}$  (nm) = 243, 256, 266, 276.5, 313.5, 327.5, 343.5.

#### E.1.4. Synthesis of pyrene-biotin (VI)

Pyrenebutanol (280 mg,  $10^{-3}$  mol) was dissolved in 20 mL DMF under argon atmosphere. The coupling reagents DCC (280 mg,  $1.35 \cdot 10^{-3}$  mol) and DMAP (100 mg,  $4.2 \cdot 10^{-3}$  mol) were added to this solution as well as biotin (250 mg,  $10^{-3}$  mol). The reaction was observed by TLC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  95% / EtOH 5%). After one week reaction time, the solvent was evaporated and the yellow solid was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Biotin pyrene was purified by flash chromatography (mobile phase  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / EtOH 95:5) on silica gel 60  $\mu\text{m}$  particle size as stationary phase. 200 mg of pure pyrene-biotin (VI) were obtained as slightly brown powder (yield: 40 %).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 8.23 (1H, d), 8.17 (1H, dd), 8.15 (1H, d), 8.11 (2H, 2d), 8.02 (2H, 2d), 8.00 (1H, d), 7.85 (1H,d), 5.52 (1H, s), 5.12 (1H, s), 4.25 (1H, t), 4.12 (2H, t), 4.05 (1H, d), 3.35 (2H, t), 2.92 (1H, d), 2.72 (2H, 2 x dd), 2.27 (2H, t), 1.90-1.23 (10H, m).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 173.7 (1C), 163.4 (1C), 136.3 (1C), 131.4 (1C), 130.8 (1C), 129.8 (1C), 128.5 (1C), 127.4 (1C), 127.3 (1C), 127.2 (1C), 126.6 (1C), 125.8 (1C), 125.1 (1C), 125.0 (1C), 124.9 (1C), 124.8 (1C) 124.7 (1C), 123.2 (1C), 64.2 (1C), 61.7 (1C), 60.0 (1C), 55.2 (1C), 40.4 (1C), 33.9 (1C), 33.0 (1C), 28.6 (1C), 28.2 (1C), 28.1 (2C), 28.1 (2C), 24.7 (1C).

MS (EI, 200 °C):  $m/z$  = 503 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ ).

IR (KBr):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3502, 3237, 3037, 2930, 2858, 1694, 1601, 1459, 1431, 1262, 1171, 842, 757, 707, 681.

UV/Vis (THF):  $\lambda_{\text{max}}$  (nm) = 243, 256, 266, 276.5, 313.5, 327.0, 343.5.

#### E.1.5. Synthesis of pyrrole-viologen (X)

##### *E.1.5.a. Synthesis of pyrrole-OH (VII)*

To a solution of  $\text{LiAlH}_4$  (1.15 g,  $3 \cdot 10^{-2}$  mol) in diethyl ether (10 mL) was slowly added a solution pyrrole-COOH (I) (5 g,  $1.99 \cdot 10^{-2}$  mol) in diethyl ether (40 mL). The solution was stirred for 2 h at 35 °C and let to return at room temperature. Water was added (3 x 50 mL) to remove completely remaining  $\text{LiAlH}_4$ . Organic phases were then dried with

sodium sulphate. The solution was evaporated to give 4.5 g of pure pyrrole-OH (**VII**) (yield: 95 %).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 6.65 (2H, s), 6.14 (2H, s), 3.87 (2H, t), 3.64 (2H, t), 1.29-1.79 (18H, m).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 120.4 (2C), 107.7 (2C), 63 (1C), 49.6 (1C), 32.7 (1C), 31.5 (1C), 29.5 (1C), 29.4 (1C), 29.3 (1C), 29.1 (1C), 26.7 (1C), 25.7 (1C).

#### *E.1.5.b. Synthesis of pyrrole-Tosylate (VIII)*

To a solution of pyrrole-OH (**VII**) (2.3 g,  $10^{-2}$  mol) in distilled pyridine (50 mL) was added toluenesulfonylchloride (2.1 g,  $1.1 \cdot 10^{-2}$  mol). The solution was stirred for 10 h at 4 °C and let to return overnight at room temperature under stirring condition. Diethyl ether (50 mL) was added and the solution was first washed with HCl (50 mL) and then with water (3 x 50mL). Aqueous phase was then washed another time with diethyl ether and all organic phases were then dried with sodium sulphate. The solution was evaporated and the crude product was purified by flash chromatography (mobile phase  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  100 %) on silica gel 60  $\mu\text{m}$  particle size as stationary phase. 3.28 g of pure pyrrole-Tosylate (**VIII**) was obtained as slightly yellow oil (yield: 86 %).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 7.79 (2H, d), 7.34 (2H, d), 6.65 (2H, s), 6.14 (2H, s), 4.03 (2H, t), 3.87 (2H, t), 2.46 (3H, s), 1.23-1.80 (18H, m).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 129.7 (2C), 127.8 (2C), 120.4 (2C), 107.7 (2C), 70.6 (1C), 49.8 (1C), 32.6 (1C), 31.5 (1C), 29.4 (1C), 29.3 (1C), 29.1 (1C), 28.8 (2 x 1C), 26.7 (1C), 25.3 (1C), 21.6 (1C).

ESI/MS:  $m/z = 376$  ( $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ ,  $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{NO}_3\text{S}$ ).

#### *E.1.5.c. Synthesis of pyrrole-Bipyridine (IX)*

To a solution of pyrrole-Tosylate (**VIII**) (1.38 g,  $3.52 \cdot 10^{-3}$  mol) in dry toluene (40 mL) was added 4,4'-bipyridine (366.1 mg,  $2.35 \cdot 10^{-3}$  mol). The solution was stirred for 18 h at 100 °C and the obtained precipitate was filtered off and rinsed with dry toluene. The solution was evaporated and the product was purified by flash chromatography (mobile phase  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  /

EtOH 80:20) on silica gel 60  $\mu\text{m}$  particle size as stationary phase. 1.355 g of pure pyrrole-Bipyridine (**IX**) was obtained (yield: 70 %).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 9.25 (2H, d), 8.72 (2H, d), 8.21 (2H, d), 7.70 (2H, d), 7.54 (2H, d), 7.03 (2H, d), 6.61 (2H, s), 6.09 (2H, s), 5.27 (4H, s), 4.62 (2H, t), 3.84 (2H, t), 2.21 (3H, s), 1.12-1.87 (15H, m).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 151.1 (2C), 145.7 (2C), 128.5 (2C), 125.8 (2C), 125.5 (2C), 121.3 (2C), 120.2 (3C), 107.6 (3C), 61.4 (1C), 53.3 (2C), 49.4 (2C), 31.4 (1C), 31.3 (2C), 29.2 (2C), 29.1 (2C), 29.0 (1C), 28.8 (1C), 26.5 (2C), 25.8 (1C), 21.0 (1C).

ESI/MS:  $m/z = 376$  ( $\text{M}^+$ ,  $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_3$ ).

#### *E.1.5.d. Synthesis of pyrrole-Viologen (X)*

To a solution of pyrrole-bipyridine (**IX**) (243 mg,  $4.4 \cdot 10^{-4}$  mol) in absolute ethanol (10 mL) was added a 3-fold molar excess of methyl iodide (190 mg,  $1.33 \cdot 10^{-3}$  mol). The solution was stirred for 18 h at 85 °C and the obtained precipitate was filtered off and rinsed with absolute ethanol. The solution was evaporated and the product was dissolved in methanol to realize anion exchange  $\text{I}^- \rightarrow \text{BF}_4^-$  by deposition on the column conditioned with tetrafluoroborhydric acid (1 % V/V in water). After rinsing step of the column with acetonitrile and evaporation of the solvents, 221.3 mg of pyrrole-Viologen (**X**) was obtained (yield: 91 %).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 9.01 (2H, d), 8.81 (2H, d), 8.44 (2H, d), 8.28 (2H, d), 6.44 (2H, s), 6.08 (2H, s), 4.66 (3H, m), 3.32-3.94 (4H, m), 1.68-2.20 (4H, m), 1.10-1.28 (14H, m).

#### E.1.6. Synthesis of pyrene-viologène (**XIII**)

##### *E.1.6.a. Synthesis of pyrene-Brome (XI)*

Pyrenebutanol (1 g,  $3.65 \cdot 10^{-3}$  mol) and tetrabromomethane (1.46 g,  $4.4 \cdot 10^{-3}$  mol) were dissolved in 50 mL THF under argon atmosphere. Triphenylphosphine (1.15 g,  $4.4 \cdot 10^{-3}$  mol) dissolved in a few mL of THF was then slowly added because of the exothermic reaction. The mixture was stirred for 16 h at room temperature. Triphenylphosphine oxide which is a by-



product of the reaction precipitates in THF due to its poor solubility and was removed by filtration and the solution was evaporated. Bromo-pyrene was purified by flash chromatography (mobile phase CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / cyclohexane 95:5) on silica gel 60 μm particle size as stationary phase. 1.2 g of pure bromo-pyrene (**XI**) was obtained (yield: 97.5 %).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ (ppm) = 7.96-8.32 (8H, m), 7.85 (1H, d), 3.55 (2H, t), 3.45 (2H, t), 2.05 (4H, m), 1.52 (2H, m).

IR (KBr): ν (cm<sup>-1</sup>) = 3024, 2965, 2918, 1582, 1465, 1188, 841, 712.

#### *E.1.6.b. Synthesis of pyrene-Bipyridine (XII)*

A solution of bromo-pyrene (**XI**) (500 mg, 1.48 10<sup>-3</sup> mol) and 4,4'-bipyridine (694 mg, 4.44 10<sup>-3</sup> mol) in absolute ethanol was stirred for 18 h at 85 °C. The solution was evaporated and the crude product was washed with diethyl ether and cyclohexane. 1.355 g of pyrene-Bipyridine (**XII**) was obtained as slightly brown solid (yield: 83 %).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ (ppm) = 9.24 (2H, d), 8.74 (2H, d), 8.24 (2H, d), 8.22 (1H, d), 8.15 (1H, dd), 8.14 (1H, d), 8.10 (2H, 2d), 8.03 (2H, 2d), 8.00 (1H, d), 7.84 (1H, d), 7.83 (2H, d), 3.57 (2H, t), 1.45-2.08 (6H, m).

ESI/MS: m/z = 413 (M<sup>+</sup>, C<sub>30</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>).

IR (KBr): ν (cm<sup>-1</sup>) = 3024, 2984, 2922, 2863, 1497, 1265, 1218, 843.

#### *E.1.6.c. Synthesis of pyrene-Viologen (XIII)*

To a solution of pyrene-bipyridine (**XII**) (100 mg, 2 10<sup>-4</sup> mol) in absolute ethanol (20 mL) was added a 3-fold molar excess of methyl iodide (84.4 mg, 6 10<sup>-4</sup> mol). The solution was stirred for 36 h at 85 °C and, after solvent evaporation, the crude product dissolved in acetonitrile. The solvent was evaporated allowing the removal of excess methyl iodide and the product was dissolved in methanol to realize anion exchange I<sup>-</sup> → BF<sub>4</sub><sup>-</sup> by deposition on the column conditioned with tetrafluoroborhydric acid (1 % V/V in water). After rinsing step of the column with acetonitrile and evaporation of the solvents, 92.5 mg of pyrene-Viologen (**XIII**) was obtained (yield: 72 %).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) = 9.17 (2H, d), 8.74 (2H, d), 8.18 (1H, d), 8.17 (1H, d), 8.14 (1H, d), 8.12 (2H, 2d), 8.03 (2H, 2d), 7.99 (1H, d), 7.83 (1H,d), 7.74 (2H, d), 7.23 (2H, d), 3.57 (2H, m), 2.08 (2H, d), 2.00 (2H, m), 1.41 (3H, s), 1.61-1.78 (4H, m).

ESI/MS:  $m/z$  = 413 ( $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ ,  $\text{C}_{30}\text{H}_{25}\text{N}_2$ ), 214 ( $[\text{M}]^{2+}$ ,  $\text{C}_{31}\text{H}_{28}\text{N}_2$ ).

### E.1.7. Synthesis of pyrrole-ammonium (**XV**)

#### *E.1.7.a. Synthesis of pyrrole-Iode (XIV)*

Pyrrole-Tosylate (**VIII**) (1.25 g,  $3.2 \cdot 10^{-3}$  mol) was dissolved in a fresh solution of acetone saturated with sodium iodide and the solution was stirred for 3 h at 60 °C. After the mixture has been left overnight at room temperature, 20 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and 20 mL of water were added. Organic phases were washed with water (3 x 50mL) and dried with sodium sulphate. The solution was filtrated and evaporated to give 1.1 g of pyrrole-I (**XIV**) (yield: 99 %).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 6.65 (2H, s), 6.13 (2H, s), 3.86 (2H, t), 3.19 (2H, t), 1.27-1.85 (18H, m).

ESI/MS:  $m/z$  = 348 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NI}$ ), 220 ( $[\text{M}-\text{I}]^+$ ,  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}$ ).

#### *E.1.7.b. Synthesis of pyrrole-ammonium (XV)*

Pyrrole-Iode (**XIV**) (1.11 g,  $3.2 \cdot 10^{-3}$  mol) was dissolved in 30 mL of absolute ethanol and a 4-fold molar excess of triethylamine (1.6 mL,  $12 \cdot 10^{-3}$  mol) was added; the solution was stirred overnight at 85 °C. Excess of triethylamine and the solvent were evaporated and the product was dissolved in methanol to realize anion exchange  $\text{I}^- \rightarrow \text{BF}_4^-$  by deposition on the column conditioned with tetrafluoroborhydric acic (1 % V/V in water). After rinsing step of the column with acetonitrile and evaporation of the solvents, 1.4 g of pyrrole-ammonium (**XV**) was obtained (yield: 98 %).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 6.60 (2H, s), 6.06 (2H, s), 3.83 (2H, t), 3.63 (6H, q), 3.45 (2H, t), 3.21 (2H, m), 1.16-1.73 (25H, m).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) = 120.3 (2C), 107.5 (2C), 53.6 (1C), 49.4 (1C), 31.3 (1C), 29.1 (2C), 28.9 (1C), 26.5 (1C), 22.0 (1C), 8.1 (3C).

ESI/MS:  $m/z = 321$  ( $M^+$ ,  $C_{21}H_{41}N_2$ ).

## **E.2. Tagged biomolecules synthesis**

### **E.2.1. Histidine-tagged glucose oxidase (His-GOX)**

#### *E.2.1.a. Synthesis of His-GOX*

(S)-2-Amino-3-(4-imidazolyl)propionic acid (L-histidine, 6.07 mg,  $39.1 \cdot 10^{-6}$  mol) and 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid hydrochloride (EDC, 5.08 mg,  $26.5 \cdot 10^{-6}$  mol) were dispersed in phosphate buffer ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 6$ ) using an ultrasound bath. To this solution, glucose oxidase ( $5.148 \text{ mg}$ ,  $32.2 \cdot 10^{-9}$  mol) was added. The reaction mixture was vigorously stirred for 24 h at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

His-GOX was purified by centrifugation using a 30000 MWCO concentrator with PES membrane at 6000 G maintained at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

The obtained His-GOX in phosphate buffer ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 7$ ) solution was quantified using UV spectroscopy. After ten-times dilution of the solution obtained after purification, the 280 nm-band intensity of the solution was 0.319 corresponding to a concentration of His-GOX of  $1.91 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (yield: 37 %). Stock solutions of His-GOX ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) were prepared with phosphate buffer ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 7$ ) and stored at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  as aliquots ( $25 \text{ }\mu\text{L}$ ) until needed.

#### *E.2.1.b. His-GOX enzymatic activity determination*

His-GOX enzymatic activity was determined using amperometry at  $0.6 \text{ V vs SCE}$ . An electrochemical three-electrode cell was employed; platinum electrode, saturated calomel electrode (SCE) and a platinum wire placed in a separated compartment containing phosphate buffer ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 7$ ) were used as working, reference and counter electrodes respectively.  $10 \text{ mL}$  of phosphate buffer ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 7$ ) was thermostated at  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$  in this electrochemical cell in presence of  $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  of glucose. After stabilization of the current during almost 1 hour,  $200 \text{ }\mu\text{L}$  of  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  His-GOX solution were added in the solution to have a His-GOX final concentration of  $2 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  in the electrochemical cell. Activity of the enzyme was determined by measuring the slope of the linear part of the curve after His-GOX injection which had a value of  $5.9 \text{ }\mu\text{A min}^{-1}$ . The same experiment was done

with unmodified glucose oxidase (enzymatic activity: 235.5 U mg<sup>-1</sup>) and gave a slope value of 9.3 μA min<sup>-1</sup>. His-GOX enzymatic activity was calculated by comparison of these values and was 150 U mg<sup>-1</sup>.

## E.2.2. β-cyclodextrines-tagged glucose oxidase (β-CD-GOX)

### *E.2.2.a. Synthesis of β-CD-GOX*

Mono-6-deoxy-6-amino-β-cyclodextrin (14.91 mg, 13.1 10<sup>-6</sup> mol) and 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid hydrochloride (EDC, 5.13 mg, 26.8 10<sup>-6</sup> mol) were dispersed in phosphate buffer (0.1 mol L<sup>-1</sup>; pH = 6) using an ultrasound bath. To this solution, glucose oxidase (5.145 mg, 32.2 10<sup>-9</sup> mol) was added. The reaction mixture was vigorously stirred for 24 h at 4 °C.

β-CD-GOX was purified by centrifugation using a 30000 MWCO concentrator with PES membrane at 6000 G maintained at 4 °C.

The obtained β-CD-GOX in phosphate buffer (0.1 mol L<sup>-1</sup>; pH = 7) solution was quantified using UV spectroscopy. After ten-times dilution of the solution obtained after purification, the 280 nm-band intensity of the solution was 0.306 corresponding to a concentration of β-CD-GOX of 1.83 mg.mL<sup>-1</sup> (yield: 36 %). Stock solutions of β-CD-GOX (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) were prepared with phosphate buffer (0.1 mol L<sup>-1</sup>; pH = 7) and stored at -20 °C as aliquots (25 μL) until needed.

### *E.2.2.b. β-CD-GOX enzymatic activity determination*

β-CD-GOX enzymatic activity was determined using amperometry at 0.6 V vs SCE following the same procedure as the one described for His-GOX. Activity of the enzyme was determined by measuring the slope of the linear part of the curve after β-CD-GOX injection which had a value of 9.2 μA min<sup>-1</sup>. The same experiment was done with unmodified glucose oxidase (enzymatic activity: 235.5 U mg<sup>-1</sup>) and gave a slope value of 9.3 μA min<sup>-1</sup>. β-CD-GOX enzymatic activity was calculated by comparison of these values and was 230 U mg<sup>-1</sup>.

### E.2.3. Biotin-tagged glucose oxidase (B-GOX)

#### *E.2.3.a. Synthesis of B-GOX*

Glucose oxidase (5.307 mg,  $33.2 \cdot 10^{-9}$  mol) was biotinylated with sulfo-NHS-LC-biotin (67  $\mu$ L of  $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> solution,  $675.4 \cdot 10^{-9}$  mol) in 5 mL phosphate buffer (0.1 mol L<sup>-1</sup>; pH = 6) during 2 h at 4 °C.

B-GOX was purified by centrifugation using a 30000 MWCO concentrator with PES membrane at 6000 G maintained at 4 °C.

The obtained B-GOX in phosphate buffer solution was quantified using UV spectroscopy. After ten-times dilution of the solution obtained after purification, the 280 nm-band intensity of the solution was 0.359 corresponding to a concentration of B-GOX of 2.15 mg.mL<sup>-1</sup> (yield: 41 %). Stock solutions of B-GOX (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) were prepared with phosphate buffer (0.1 mol L<sup>-1</sup>; pH = 7) and stored at -20 °C as aliquots (25  $\mu$ L) until needed.

#### *E.2.3.b. B-GOX enzymatic activity determination*

B-GOX enzymatic activity was determined using amperometry at 0.6 V vs SCE following the same procedure as the one described for His-GOX. Activity of the enzyme was determined by measuring the slope of the linear part of the curve after B-GOX injection which had a value of 8.6  $\mu$ A min<sup>-1</sup>. The same experiment was done with unmodified glucose oxidase (enzymatic activity: 235.5 U mg<sup>-1</sup>) and gave a slope value of 9.3  $\mu$ A min<sup>-1</sup>. B-GOX enzymatic activity was calculated by comparison of these values and was 220 U mg<sup>-1</sup>.

### E.2.4. Biotin-tagged polyphenol oxidase (B-PPO)

#### *E.2.4.a. Synthesis of B-PPO*

Polyphenol oxidase (5.0 mg,  $39.1 \cdot 10^{-9}$  mol) was biotinylated with sulfo-NHS-LC-biotin (78  $\mu$ L of  $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> solution,  $780 \cdot 10^{-9}$  mol) in 5 mL phosphate buffer (0.1 mol L<sup>-1</sup>; pH = 6) during 2 h at 4 °C.

B-PPO was purified by centrifugation using a 30000 MWCO concentrator with PES membrane at 6000 G maintained at 4 °C.

The obtained B-PPO in phosphate buffer solution was quantified using UV spectroscopy. After three-times dilution of the solution obtained after purification, the 280 nm-band intensity of the solution was 0.374 corresponding to a concentration of B-PPO of  $0.723 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (yield: 51 %). Stock solutions of B-PPO ( $0.3 \text{ mg mL}^{-1}$ ) were prepared with phosphate buffer ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH = 7) and stored at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  as aliquots ( $25 \text{ }\mu\text{L}$ ) until needed.

#### *E.2.4.b. B-PPO enzymatic activity determination*

B-PPO enzymatic activity was determined in phosphate buffer solution ( $16.7 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; pH = 6.5) containing catechol ( $6.7 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) and  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  ( $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ). This solution was mixed and kept until equilibration at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  during 10 min. Biotinylated or wild PPO ( $500 \text{ }\mu\text{L}$  of  $24 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  to obtain  $4 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  in the spectroscopic cuvette) were added to this solution. The 420 nm-band intensity was recorded as the function of time for 5 min allowing the enzymatic activity determination. The slope of the linear part of the curve after PPO and B-PPO injections were  $0.247 \text{ AU min}^{-1}$  and  $0.234 \text{ AU min}^{-1}$  respectively. As we know that wild PPO enzymatic activity is  $5370 \text{ U mg}^{-1}$ , B-PPO enzymatic activity was calculated by comparison of these values and was  $5080 \text{ U mg}^{-1}$ .

### **E.3. Apparatus, solvents and reagents**

#### E.3.1. Solvents

All aqueous solutions were prepared with ultrapure water obtained from Milli-Q Purelab UHQ system (ELGA), resistivity:  $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ .

Organic solutions for electrochemistry were prepared with acetonitrile (Rathburn, HPLC grade,  $[\text{H}_2\text{O}] \leq 100 \text{ ppm}$ ). Dimethylformamide (DMF): CHROMASOLV<sup>®</sup> Plus, for HPLC ( $\geq 99.9 \%$ ) was used for electrochemistry of pyrene-viologen only.

#### E.3.2. Biomolecules

Glucose oxidase (GOX, EC 1.1.3.4.) from *Aspergillus niger*, polyphenol oxidase (PPO, EC 1.4.18.1.) from *Mushroom*, avidin (EC 2.15.783.6) from *Hen egg white*, FITC-labelled avidin from *Egg white* and biotin (EC 200.399.3) were obtained from Sigma-Aldrich.

Hydrogenase NiFe (H<sub>2</sub>ase, EC 1.12.1.3.) from *Desulfovibrio fructosovorans* periplasm was extracted and purified in BIP laboratory (Marseille) in collaboration with Marc Rousset and Sébastien Dementin.

DNA oligonucléotides were synthesized in DCM laboratory (Grenoble) in by Eric Defrancq and the sequences were the following :

- Interaction NTA/Cu<sup>2+</sup>/histidine:

- Histidine-tagged “ADN<sub>sonde</sub>” (22 mer):

5'-NH<sub>2</sub>-(His)<sub>5</sub>-GAGACCATCAATGAGGAAGCTG-3'.

- Biotin-tagged “ADN<sub>cible</sub>” (33 mer):

5'-biotin-ATCCCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGTCTC-3'.

- Unlabelled “ADN<sub>cible</sub>” (48 mer):

5'-GCTATTTGGCTACCGATCCCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGTCTC-3'.

- Non-complementary “ADN<sub>cible</sub>” (48 mer):

5'-GCTATTTGGCTACCGATCCCATTCTGTTATCCTTCTTCCATCAACTCT-3'.

- Interaction NTA/Cu<sup>2+</sup>/biotin:

- Biotin-tagged “ADN<sub>sonde</sub>” (15 mer):

5'-CGGTAGCCAAATAGC-3'.

- Unlabelled “ADN<sub>cible</sub>” (48 mer):

5'-GCTATTTGGCTACCGATCCCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGTCTC-3'.

### E.3.3. Other reagents

Lithium perchlorate (LiClO<sub>4</sub>) and tetrabutylammonium perchlorate (TBAP) were obtained from Fluka (purified, electrochemical grade, ≥ 99.9 %)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dimethylviologen, sodium acetate, potassium ferrocyanide, imidazole and catechol were provided from Sigma-Aldrich.

AgNO<sub>3</sub>, glucose, hydroquinone and CuCl<sub>2</sub> were purchased from Prolabo

EZ-link Sulfo-NHS-LC-biotin for biotinylation of biomolecules was acquired from Pierce.

All chemicals were of analytical grade and used as received.

Solutions of glucose were allowed to mutarotate at room temperature for one day and were kept refrigerated.

#### E.3.4. Apparatus

##### *E.3.4.a. Electrochemistry*

Cyclic voltammetry and electropolymerization experiments were performed with a VMP3 multipotentiostat controlled by the EC-Lab software (Biologic, France). Amperometric measurements were carried out with a PRG-DEL potentiostat (Tacussel, France) connected to a computer with E-corder interface and controlled by the E-chart software (eDAQ, Australia). Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) was carried out with an Autolab potentiostat 100 (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands) using FRA software. A ZView software (Scribner Associates Inc.) was used to simulate the data obtained using an appropriate equivalent electrical circuit.

An electrochemical three-electrode cell (Metrohm) was employed. Platinum or glassy carbon disk electrodes ( $\text{\O} = 3 - 5 \text{ mm}$ ) were used as working electrodes and polished with 2  $\mu\text{m}$  diamond paste (MECAPREX Press PM) before use. A  $\text{Ag/Ag}^+$  ( $\text{AgNO}_3 \text{ } 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  in  $\text{CH}_3\text{CN} + 0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ ) electrode and a saturated calomel electrode (SCE) were used as reference electrode in acetonitrile electrolyte and aqueous solutions, respectively. A Pt wire placed in a separated compartment containing the supporting electrolyte was used as a counter electrode.

All experimental impedance spectra were recorded at a rotation rate of 500 rpm at 25  $^\circ\text{C}$  in phosphate buffer solution ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 7$ ) containing hydroquinone ( $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) as redox probe. The frequency sweep ranges from 500 kHz to 0.1 Hz at 0.4 V vs SCE with a sine wave potential modulation of 5 mV rms. A Pt wire used as counter electrode was directly placed in the cell.

##### *E.3.4.b. Spectroscopies*

Electron spray ionisation Mass spectra (ESI/MS/LC) were obtained on an Esquire 3000 (Bruker) and Electron impact Mass spectra (EI/MS/GC) on an Agilent 6850 or 5975.



NMR spectra were recorded on BRUKER Avance 300 and 400 spectrometers. UV-visible scans were recorded with Cary 100 spectrometer.

#### *E.3.4.c. Microscopies*

Fluorescence microscopic images were recorded with an OLYMPUS BX61 microscope (exciter: HQ470/40, emitter: HQ522/40, beamsplitter: Q4971p; Japan). Experiments were performed on platinum microelectrode array wafers provided by the Biosensors and Biocatalysis Group of the University of Leeds (U.K.).

FEG-SEM images were recorded using ULTRA 55 FESEM based on the GEMINI FESEM column with beam booster (Nanotechnology Systems Division, Carl Zeiss NTS GmbH, Germany) and tungsten gun.

#### *E.3.4.d. Quartz Crystal microbalance (QCM)*

QCM experiments were carried out with AT-cut 9-MHz quartz crystals (CQE, Troyes, France) coated with two identical Au layers ( $\varnothing = 5$  mm, thickness = 200 nm). One gold layer was modified with an electrogenerated poly(pyrrole-NTA) film by oxidative electrolysis (0.1 mC). A Plexiglas cell ( $V_{\text{cell}} = 50 \mu\text{L}$ ) connected to a micro pump (P1, Pharmacia) was used with an applied constant flow rate of  $50 \mu\text{L min}^{-1}$ . The inlet and outlet tubes were placed in the same sample for circulating flow. A labmade oscillator was used to drive the crystal at 27 MHz which corresponds to the third overtone of a quartz resonator (9 MHz). Gravimetric measurements were realized in phosphate buffer ( $0.05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH = 7) containing  $0.5 \text{ mol L}^{-1}$  of NaCl (PBS). The microbalance frequency shift was monitored by a frequency counter (Fluke PM6685) as a function of time.



# Liste des abréviations



## Liste des abréviations

### Notations

$\text{Ag}^+/\text{Ag}$  : électrode de référence en solution organique avec  $[\text{Ag}^+] = [\text{NO}_3^-] = 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ .

ADN : acide désoxyribonucléique.

$\text{ADN}_{\text{cible}}$ ,  $\text{B-ADN}_{\text{cible}}$  : oligonucléotide cible non marqué ou biotinylé.

$\text{ADN}_{\text{sonde}}$ ,  $\text{B-ADN}_{\text{sonde}}$  : oligonucléotide sonde non marqué ou biotinylé.

B-GOX : glucose oxydase marquée avec des biotines.

CNTs : nanotubes de carbone.

EC : numéro attribué aux enzymes par l' « Enzyme Commission ».

ECS : électrode de référence en solution aqueuse (électrode au calomel saturée).

F : constante de Faraday (1 faraday = 96 485,3415 C).

GOX : glucose oxydase.

$\text{H}_2\text{ase}$  : hydrogénase.

His-GOX : glucose oxydase marquée avec des histidines.

$\text{HClO}_4$  : acide perchlorique.

$J_{\text{max}}$  : courant de saturation.

$K_M$  : constante de Michaelis-Menten.

$K_M^{\text{app}}$  : constante apparente de Michaelis-Menten.

$\text{LiClO}_4$  : lithium perchlorate.

$\text{Me}^{2+}$  : cation métallique chargé 2 fois.

MCE : membrane en ester de cellulose.

MEB : microscopie électronique à balayage.

MWCNTs : nanotubes de carbone multi-parois.

NHS : N-hydroxysuccinimide.

NTA : acide nitrilotriacétique.

Q : charge.

$P_m$  : coefficient de perméabilité d'une membrane.

PBS : tampon phosphate salin.

PPO : polyphénol oxydase.

PTFE : Polytétrafluoroéthylène (Téflon<sup>®</sup>).

QCM : microbalance à quartz.

SWCNTs : nanotubes de carbone mono-paroi.

TBAP : tétrabutylammonium perchlorate.

UA : unités arbitraires.

v : vitesses de réactions.

$\beta$ -CD-GOX : glucose oxydase marquée avec des  $\beta$ -cyclodextrines.

$\lambda$  : longueur d'onde.

$\eta$  : rendement.

$\Omega$  : vitesse de rotation de l'électrode tournante.

$\emptyset$  : diamètre.

### Notations en synthèse organique (partie expérimentale)

$\text{CDCl}_3$  : chloroforme deutéré.

$\text{CD}_3\text{OD}$  : méthanol deutéré.

$\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : dichlorométhane.

$\text{CH}_3\text{CN}$  : acétonitrile.

$\text{C}_n$  ( $\text{C}_{11}$ ,  $\text{C}_{12}$ ) : nombre de carbone  $n = 11, 12$ .

DCC : dicyclohexylcarbodiimide.

DMF : diméthylformamide.

$\text{DMSO-d}_6$  : diméthylsulfoxyde deutéré.

EDC : *N*-(3-Diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide.

EI : ionisation électronique.

ESI : ionisation par électrospray.

EtOH : éthanol.

IR : spectroscopie infra-rouge.

$m/z$  : rapport masse/charge d'un composé (en MS, partie expérimentale).

MeOH : méthanol.

MS : spectrométrie de masse.

RMN (ou NMR) : spectroscopie de résonance magnétique nucléaire ( $^1\text{H}$  : proton,  $^{13}\text{C}$  : carbone).

THF : tétrahydrofurane.

UV/Vis : spectroscopie UV-visible.

$\delta$  (ppm) : déplacement chimique (en RMN, partie expérimentale).

$\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) : nombre d'onde (en IR).

### Noms IUPAC des produits organiques synthétisés (par ordre de numérotation)

**I** – pyrrole-COOH : 11-pyrrol-1-ylundecanoic acid.

**II** – pyrrole-NHS : 1-(11-pyrrol-1-ylundecanoyl)pyrrolidine-2,5-dione.

**III** – pyrrole-NTA :

2-[bis(carboxymethyl)amino]-5-(11-pyrrol-1-ylundecanoylamino)pentanoic acid.

**IV** – pyrène-NTA :

2-[bis(carboxymethyl)amino]-6-(4-pyren-1-ylbutanoylamino)hexanoic acid.

**V** – pyrène-adamantane : N-(1-adamantyl)-4-pyren-1-yl-butanamide.

**VI** – pyrène-biotine :

4-pyren-1-ylbutyl 5-(2-oxo-1,3,3a,4,6,6a-hexahydrothieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanoate.

**VII** – pyrrole-OH : 1-dodecanol-pyrrole.

**VIII** – pyrrole-tosylate : 11-pyrrol-1-ylundecyl-4-methylbenzenesulfonate.

**IX** – pyrrole-bipyridine : 1-(11-pyrrol-1-ylundecyl)-4-4'-bipyridinium, tetrafluoroborate.

**X** – pyrrole-viologène :

N-methyl-1-(11-pyrrol-1-ylundecyl)-4-4'-bipyridinium, di(tetrafluoroborate).

**XI** – pyrène-brome : 1-(4-bromobutyl)pyrene.

**XII** – pyrène-bipyridine : 1-(4-pyren-1-ylbutyl)-4-4'-bipyridinium, tetrafluoroborate.

**XIII** – pyrène-viologène :

N-methyl-1-(4-pyren-1-ylbutyl)-4-4'-bipyridinium, di(tetrafluoroborate).

**XIV** – pyrrole-iode : 1-(11-iodoundecyl)pyrrole.

**XV** – pyrrole-ammonium : 11-pyrrol-1-ylundecyl-tri(ethyl)ammonium,tetrafluoroborate.





## Liste des publications

Jessica Baur, Chantal Gondran, Michael Holzinger, Eric Defrancq, Hubert Perrot, Serge Cosnier, *Analytical Chemistry*, **2010**, 82 (3) 1066-1072.

Jessica Baur, Michael Holzinger, Chantal Gondran, Serge Cosnier, *Electrochemistry Communications*, **2010**, 12 (10) 1287-1290.

Célia M. Silveira, Jessica Baur, Michael Holzinger, José J. G. Moura, Serge Cosnier, M. Gabriela Almeida, *Electroanalysis*, en ligne.



## Résumé

Ce mémoire est consacré au développement d'assemblages hybrides à base de biomolécules et de polymères avec ou sans nanotubes de carbone en vue de leur application dans des domaines tels que les biocapteurs ou les biopiles.

Dans un premier temps, le poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup> a été utilisé pour l'élaboration de capteurs à ADN ou de biocapteurs enzymatiques. Ainsi, il a pu être utilisé avec son partenaire d'affinité, l'histidine, pour l'immobilisation réversible d'oligonucléotides sondes marqués avec des histidines. Grâce à une détection sans marquage de la cible, la spectroscopie d'impédance électrochimique, le plus faible seuil de détection de la littérature (10<sup>-15</sup> mol.L<sup>-1</sup>) pour les biocapteurs à détection impédancemétrique a été décrit. Par la suite, un concept totalement novateur et original a été étudié pour l'utilisation ce polymère afin de réaliser l'immobilisation de biomolécules biotinylées. Cette nouvelle interaction NTA/Cu<sup>2+</sup>/biotine a été illustrée par l'ancrage d'enzymes et d'oligonucléotides marqués avec des biotines.

Dans un second temps, des architectures tridimensionnelles à base de nanotubes de carbone fonctionnalisés de façon non-covalente ont été considérées. Tout d'abord, la fonctionnalisation multiple de nanotubes de carbone par interactions  $\pi$ - $\pi$  avec des pyrènes modifiés en utilisant les trois systèmes affins les plus courants (adamantane/ $\beta$ -cyclodextrine, avidine/biotine et NTA/Cu<sup>2+</sup>/histidine) a été entreprise. Cette étude a permis d'ouvrir de nombreuses perspectives dans le domaine des biocapteurs ou des biomatériaux. Ensuite, la connexion d'une hydrogénase sur des matériaux hybrides polymère rédox/nanotubes de carbone a été réalisée. Bien que ce ne soit qu'une étude préliminaire, les résultats obtenus ont montré l'efficacité de ce type d'architecture pour la production d'énergie propre à partir du dihydrogène.

**Mots-clés :** Electrochimie, Biocapteurs, Polymères, Nanotubes de carbone, Capteur à ADN, Hydrogénase.

## Abstract

This work is dedicated to the development of hybrid assemblies based on polymers and biomolecules with or without carbon nanotubes with the aim to show their applications in different areas such as biosensors or bio-fuel cells.

Firstly, poly(pyrrole-NTA)/Cu<sup>2+</sup> was used for the elaboration of DNA or enzymatic biosensors. So, it was able to be used with its affinity partner, histidine, for the reversible immobilization of oligonucleotide probes tagged with histidines. Thanks to a detection without labelling step of the target, the electrochemical impedance spectroscopy, the lowest detection limit described in the literature (namely 10<sup>-15</sup> mol L<sup>-1</sup>) for impedimetric DNA sensors was reached. Following this, an innovative and original concept was studied for the immobilization of biotinylated biomolecules on this polymer. This new interaction between NTA/Cu<sup>2+</sup> and biotin was illustrated by biotinylated biomolecules (enzymes and oligonucleotides) anchoring.

Secondly, three-dimensional architectures based on non-covalent functionalization of carbon nanotubes were considered. First of all, the multiple functionalization of carbon nanotubes by  $\pi$ - $\pi$  interactions with modified pyrenes by using the most common affinity systems (adamantane/ $\beta$ -cyclodextrine, avidine/biotin and NTA/Cu<sup>2+</sup>/histidine) was studied. These experiments elucidated numerous perspectives in the field of biosensors and biomaterials. Then, the hydrogenase electrical connection on hybrid materials based on redox polymer/carbon nanotubes was realized. Although it is only a preliminary study, the obtained results showed the efficiency of this kind of architecture for the clean energy production from dihydrogen.

**Keywords :** Electrochemistry, Biosensors, Polymers, Carbon nanotubes, DNA sensor, Hydrogenase.