



HAL
open science

Mise en oeuvre des surfaces spécifiques en vue de la détection de bactéries pathogènes par diffusion Raman

Rosine Pélagie Kengne-Momo

► **To cite this version:**

Rosine Pélagie Kengne-Momo. Mise en oeuvre des surfaces spécifiques en vue de la détection de bactéries pathogènes par diffusion Raman. Autre [cond-mat.other]. Université du Maine, 2011. Français. NNT : 2011LEMA1005 . tel-00604221

HAL Id: tel-00604221

<https://theses.hal.science/tel-00604221v1>

Submitted on 28 Jun 2011

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.

COTUTELLE INTERNATIONALE UNIVERSITE DE YAOUNDE I -
UNIVERSITE DU MAINE

THESE

Pour obtenir les grades de

**Docteur /PhD en Chimie Organique de l'Université de Yaoundé I et Docteur en
Physique de Université du Maine**

Spécialité : **Physico- Chimie**

Préparée au **Laboratoire de Physique de l'Etat Condensé (Université du Maine) et
Laboratoire de Chimie Organique (Université de Yaoundé I)**

Présentée et soutenue publiquement
Par

KENGNE - MOMO Rosine Pélagie

le 06 mai 2011

Titre :

**Mise en œuvre des surfaces spécifiques en vue de la détection de
bactéries pathogènes par diffusion Raman**

Devant le jury composé de :

| | |
|--|--|
| Mme Véronique PENLAP, MC Université de Yaoundé I | Rapporteur |
| M. Luc MBAZE, MC Université de Douala | Rapporteur et président de jury |
| M. Ganesh SOCKALINGUM, Pr Université de Reims Champagne-Ardenne | Rapporteur |
| Mme Fabienne Lagarde, MC Université de Nantes | Examineur |
| M. Jean François PILARD, Pr Université du Maine | Examineur |
| M. Etienne DONGO, Pr Université de Yaoundé I | Co-directeur |
| M. Philippe DANIEL, Pr Université du Maine | Co-directeur |
| M. Augustin NKENGFAK, Pr Université de Yaoundé I | Membre invité par l'Université de Yaoundé I |

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| Table des matières..... | i |
| Dédicace..... | viii |
| Préambule | ix |
| Remerciements..... | x |
| Liste des abréviations..... | xii |
| Liste des tableaux | xiii |
| Liste des figures | xiv |
| Résumé | xviii |
| Abstract | xx |
| | |
| Introduction générale | 1 |
| | |
| CHAPITRE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE | 3 |
| | |
| I-1- Les biocapteurs | 4 |
| | |
| I- 1-1- Généralités sur les biocapteurs..... | 4 |
| I-1-1-1- Principe de fonctionnement des biocapteurs..... | 5 |
| I-1-1-2- Types de biorécepteurs et de transducteurs..... | 6 |
| I- 1-1-3- Types de biocapteurs selon le transducteur..... | 6 |
| I-1-1-3-1- Transducteurs électrochimiques | 7 |
| I-1-1-3-2- Transducteurs optiques : biocapteurs optiques | 9 |
| I-1-1-3-3- Transducteurs gravimétriques..... | 9 |
| I-1-2- Immobilisation du biorécepteur | 12 |
| I-1-2- 1- Fixation directe | 12 |
| I-1-2- 1- 1- Adsorption physique | 12 |
| I-1-2- 1- 2- Confinement | 13 |
| I-1-2- 1- 3- Technique de Langmuir-Blodgett..... | 13 |
| I-1-2- 1- 4- Liaisons covalentes | 14 |
| I-1-2- 2- Fixation indirecte | 16 |
| I-1-3- Domaines typiques d'applications des biocapteurs | 17 |
| | |
| I-2- La fonctionnalisation de surfaces..... | 20 |
| | |
| I-2-1- Fonctionnalisation de surfaces pour l'immobilisation des biomolécules | 21 |
| I -2-1-1- Fonctionnalisation par le groupement Azlactone..... | 21 |

| | |
|---|-----------|
| I -2-1-2- Fonctionnalisation par les Self Mono-Assembled layer (SAM) | 22 |
| I-2-1-2-1- Fonctionnalisation par le SAM d'acide mercapto-undécanoïque... | 22 |
| I-2-1-2-2- Fonctionnalisation par le SAM du mélange d'acide 11-mercapto undecanoïque et 6-mercaptohexanol | 23 |
| I -2-1-2-3- Fonctionnalisation par les Self Mono-Assembled layer (SAM) de l'acide 16-mercapto-6-decanoïque (16-MHA) complexé par un métal..... | 23 |
| I -2-1-3- Fonctionnalisation par les hydrogels (dextran) | 24 |
| I-2-1- 4- Fonctionnalisation par un polymère contenant des unités sucres sulfonés | 25 |
| I -2-1-5- Fonctionnalisation par les molécules d'ester maléimide et succinimide | 26 |
| I -2-1-6- Fonctionnalisation des particules magnétiques par le dextran | 27 |
| I -2-1-7- Fonctionnalisation des nanoparticules de Fe ₃ O ₄ par le bleu de Prusse | 28 |
| I-2-1-8- Fonctionnalisation du polystyrène par des nanoparticules magnétiques..... | 28 |
| I -2-1-9- Fonctionnalisation par le sepharose NHS activé..... | 29 |
| I -2-1-10- Modification de la surface par plasma hors équilibre basse pression | 30 |
| | |
| I-3- Le polythiophène | 31 |
| I-3- 1- Applications des polythiophènes (PT) | 32 |
| I-3- 2- Principe de la conduction..... | 34 |
| I-3- 3- Stabilité et comportement des polymères conducteurs..... | 36 |
| I-3- 3- 1- régiorégularité des polythiophènes..... | 36 |
| I-3- 3- 2- Méthodes de synthèse des polythiophènes..... | 38 |
| I-3- 3- 2-1- Electropolymérisation..... | 38 |
| I-3- 3- 2-1-1- Mécanisme d'électropolymérisation..... | 38 |
| I-3- 3- 2-1-2- Dopage du polymère obtenu..... | 41 |
| I-3- 3- 2- 2- Synthèse par polymérisation chimique | 42 |
| I-3- 3- 2- 3- Synthèse par couplage organométallique | 43 |
| I-3- 4- Techniques de caractérisation des polythiophènes | 45 |
| | |
| I-4- Interaction rayonnement- matière | 47 |
| I-4-1- Absorption..... | 48 |
| I-4-2- Diffusion | 49 |
| I-4-3- Modes de vibration | 50 |

| | |
|---|-----------|
| I-5- La spectroscopie Raman | 52 |
| I-5-1- Historique..... | 52 |
| I-5-2- Mise en œuvre..... | 54 |
| I-5-2- 1- Principe de la spectrométrie Raman | 54 |
| I-5-2- 2- Structure d'un spectromètre Raman | 54 |
| I-5-2- 3- Imagerie Raman | 545 |
| I-5-3- Théorie de la diffusion Raman..... | 55 |
| I-5-3- 1- Traitement Classique | 56 |
| I-5-3- 2- Apport de la mécanique quantique | 58 |
| I-5-4- Avantages et inconvénients de la spectroscopie Raman..... | 60 |
| I-5-4- 1- Avantages | 60 |
| I-5-4- 2- Inconvénients..... | 61 |
| I-5-5- Application de la spectroscopie Raman..... | 62 |
| I-5-5-1- Application à la santé et aux milieux biologiques | 63 |
| I-5-5-2- Applications variées de la spectroscopie Raman..... | 64 |
| | |
| I-6- La microbalance à cristal de quartz | 66 |
| I-6-1- Principe de fonctionnement de la microbalance | 66 |
| I-6-2- Exemples d'applications de la microbalance à cristal de quartz..... | 67 |
| | |
| CHAPITRE II: RESULTATS ET DISCUSSIONS | 69 |
| | |
| II-1- Synthèse du polythiophène | 70 |
| II-1-1- Critère de choix du monomère : N,N-diéthyl-(2-thiophén-3yl-éthoxyméthyl)- benzènesulfonamide (M)..... | 71 |
| II-1-2- Synthèse du Monomère | 72 |
| II-1-3- Purification du monomère | 72 |
| II-1-4- Formation du poly (N,N-diéthyl-(2-thiophén-3yl-éthoxyméthyl) –benzènesulfonamide (PolyM) | 75 |
| II-1-5- Etude électrochimique du film poly (N,N-diéthyl-(2-thiophén-3yl-éthoxyméthyl) benzènesulfonamide | 78 |

| | |
|--|-----------|
| II-1-5-1- Comportement anodique | 78 |
| II-1-5-2- Comportement cathodique | 80 |
| II-1-6- Immobilisation des biomolécules sur le support polymère | 87 |
| II-1-6-1- Immobilisation de la protéine A..... | 87 |
| II-1-6-2- Immobilisation de l'IgG spécifique à <i>Salmonella</i> | 88 |
| II-1-6-3- Immobilisation de l'IgG fluorescence..... | 89 |
| II-1-6-4- Immobilisation de la bactérie | 91 |
| | |
| II-2- Modification de la surface d'or..... | 92 |
| | |
| II-2-1- Synthèse électrochimique du chlorure de parabenzènesulfonyle | 92 |
| II-2-1-1- Synthèse à partir du chlorure de 4-nitrobenzènesulfonyle | 92 |
| II-2-1-2- Synthèse à partir de l'acide sulfanilique (acide 4-amino benzènesulfonique) | 95 |
| II-2-2- Contrôle de la fonctionnalisation de la surface d'or par AFM..... | 99 |
| II-2-3- Immobilisation des biomolécules | 101 |
| II-2-3- 1- Immobilisation de la protéine A | 102 |
| II-2-3- 1- 1- Protocole d'immobilisation de la protéine A | 102 |
| II-2-3- 1- 2- Identification de la protéine A..... | 103 |
| II-2-3-2- Immobilisation de l'immunoglobuline : IgG humain..... | 106 |
| II-2-3-2- 1- Protocole d'immobilisation de l'immunoglobuline : IgG humain | 107 |
| II-2-3-2- 2- Identification de l'immunoglobuline: IgG humain | 107 |
| II-2-3-3- Reconnaissance anticorps-antigène | 110 |
| II-2-3-3-1- Protocole d'immobilisation de l'antigène | 112 |
| II-2-3-3-2- Identification de l'antigène..... | 112 |
| II-2-4- Contrôle d'immobilisation des biomolécules par AFM | 113 |
| II-2-4-1- Contrôle d'immobilisation de la protéine A..... | 113 |
| II-2-4-2- Contrôle d'immobilisation de l'IgG..... | 114 |
| II-2-4-3- Contrôle d'immobilisation de l'IgG Fluorescent | 116 |
| II-2-4-4- Contrôle d'immobilisation de l'IgG fluorescent par microscopie à fluorescence | 118 |

II-3- Interactions entre biomolécules119

| | |
|--|-----|
| II-3-1- Origine des interactions entre protéines | 119 |
| II-3-2- Nature des interactions | 121 |
| II-3-2-1- Les liaisons covalentes | 121 |
| II-3-2-2- Les interactions électrostatiques..... | 122 |
| II-3-2-3- Les liaisons hydrogènes | 122 |
| II-3-2-4- Les liaisons de Van der Waals | 123 |
| II-3-2-5- Les associations hydrophobes | 123 |
| II-3-3- Outils de détections des interactions | 124 |
| II-3-4- Identification des interactions..... | 125 |
| II-3-4-1- Fonctionnalisation du substrat..... | 125 |
| II-3-4-2- Immobilisation des protéines A et IgG..... | 126 |
| II-3-4-3- Identification des interactions..... | 126 |
| II-3-4-4- Interactions protéines- surface..... | 131 |
| II-3-5- Paramètres physicochimiques..... | 133 |

II-4- Synthèse du monomère photopolymérisable136

| | |
|--|-----|
| II-4-1- Généralités sur la photopolymérisation | 136 |
| II-4-1-1- Principe de base de la photopolymérisation..... | 136 |
| II-4-1-2- Photopolymérisation radicalaire | 138 |
| II-4-1-2-1- Photoamorceurs de type I..... | 140 |
| II-4-1-2-2- Photoamorceurs de type II..... | 141 |
| II-4-1-3- Photopolymérisation cationique | 141 |
| II-4-1-3-1- Photoamorceurs cationiques..... | 142 |
| II-4-1-3-2- Mécanisme de photopolymérisation cationique..... | 144 |
| II-4-1-4- Avantages du procédé photochimique..... | 144 |
| II-4-2- Synthèse du monomère..... | 145 |

| | |
|--|------------|
| II-4-2-1- Schéma du principe de synthèse..... | 146 |
| II-4-2-2- Protocole de synthèse du monomère | 147 |
| II-4-2-2-1- Refroidissement du milieu réactionnel..... | 148 |
| II-4-2-2-2- Synthèse du monomère à haute température | 154 |
| Conclusion générale et perspectives | 157 |
| | |
| CHAPITRE III: MATERIELS ET METHODES | 159 |
| III-1- Caractéristiques des produits chimiques utilisés. | 160 |
| III-1-1- Solvants et réactifs | 160 |
| III-1-1-1- Solvants..... | 160 |
| III-1-1-2- Réactifs | 160 |
| III-1-2- Techniques de caractérisation | 161 |
| III-1-2-1- Résonance magnétique Nucléaire (RMN) | 161 |
| III-1-2-2- Chromatographies | 161 |
| III-1-3- Modes opératoires des synthèses organiques | 161 |
| III-1-3-1- Synthèse du monomère N,N-diéthyl-(2-thiophén-3yl-éthoxy méthyl)- benzènesulfonamide..... | 161 |
| III-1-3-1-1- Synthèse du 4- bromométhyl-N,N-diéthylbenzènesulfonamide. 161 | |
| III-1-3-1-2- Synthèse du N,N-diéthyl-(2-thiophén-3yl-éthoxy méthyl) benzène sulfonamide..... | 162 |
| III-1-3-1-3- Synthèse de l'acide 4-méthacryloyloxybenzène sulfonique. | 163 |
| III-2- Instruments et procédures chimiques et électrochimiques..... | 164 |
| III-2-1- Cellules électrochimiques | 164 |
| III-2-2- Mesures électrochimiques | 165 |
| III-2-2-1- Potentiostat/galvanostat | 165 |
| III-2-2-2- Microbalance à Cristal de quartz | 166 |
| III-2-3- Synthèse et refonctionnalisation du poly(N,N-diéthyl-4-(2-thiophén-3yl- éthoxyméthyl)benzènesulfonamide..... | 166 |

| | |
|--|------------|
| III-2-3-1- Polymérisation anodique du monomère..... | 166 |
| III-2-3-2- Refonctionnalisation du poly (N,N-diéthyl-4-(2-thiophén-3yl-éthoxy méthyl) benzènesulfonamide en chlorure de poly(N,N-diéthyl-4-(2-thiophén-3yl-éthoxyméthyl)-benzènesulfonyle..... | 166 |
| III-2-3-3- Modification de la surface d'or par le chlorure de parabenzènesulfonyle.. | 167 |
| III-2-4- Synthèse du chlorure de 4-méthacryloyloxybenzènesulfonyle..... | 167 |
| III-2-4-1- Matériels nécessaires | 167 |
| III-2-4-2- Méthodes de synthèse | 167 |
| III-3- Procédures et matériels biologiques..... | 169 |
| III-3-1- Appareillage | 169 |
| III-3-1-1- Autoclave | 169 |
| III-3-1-2- Poste de sécurité microbiologique | 169 |
| III-3-2- Matériels biologiques | 170 |
| III-3-2-1- La protéine A | 170 |
| III-3-2-2- L'anticorps : IgG..... | 170 |
| III-3-2-3- L'antigène | 171 |
| III-3-3- Préparation des échantillons..... | 171 |
| III-3-3-1- Tampon phosphate (phosphate buffer solution : PBS)..... | 171 |
| III-3-3-2- Préparation de la solution de protéine A | 173 |
| III-3-3-3- Préparation de la solution d'IgG : (IgG anti E. coli et Salmonella) | 173 |
| III-3-3-4- Préparation de la bactérie E. coli et Salmonella | 173 |
| III-4- Spectroscopie Raman | 174 |
| III-5- Microscopie à Force Atomique..... | 176 |
| III-6- Microscopie à fluorescence | 177 |
| Références bibliographiques | 180 |

DEDICACE

Je dédie ce travail à :

Mon époux : Joseph Momo

Mon fils : Prince Tony Momo

Ma maman : Marie Djinelé

PREAMBULE

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une cotutelle entre l'Université de Yaoundé I (Cameroun) et l'Université du Maine (France) et fait partie du projet BIORAM intégré au réseau RMB (Réseau Matériaux Biologie).

Elle développe un programme pluridisciplinaire transversal Chimie-Physique-Biologie, qui vise à démontrer la faisabilité d'une nouvelle méthode physico-chimique de détection de microorganismes pathogènes au moyen d'une double signature et pouvant devenir à terme un biocapteur. Une telle stratégie met à contribution de multiples intervenants de compétences diverses.

Elle met donc à profit l'expertise de :

- l'équipe de recherche de Jean François PILARD du laboratoire LCOM (Laboratoire de chimie organique macromolécule) de l'Université du Maine (France) principalement dans la fonctionnalisation de surface et plus précisément la synthèse des polymères conducteurs, le dépôt de monocouche sur des substrats métalliques ;
- l'équipe de recherche de Gérald Thouand du laboratoire CBAC (Capteurs Bactériens pour l'Analyse et le Contrôle), GEPEA (Génie des Procédés, Environnement, Agroalimentaire) 6144, IUT de la Roche Sur Yon ; Université de Nantes (France) pour tout ce qui est microbiologie (cultures de bactéries, immobilisation des protéines, des anticorps et des bactéries) ;
- l'équipe de Philippe Daniel du laboratoire de physique de l'Etat Condensé ; Université du Maine (France) pour l'aspect caractérisation de surface et contrôle d'immobilisation.

Cette collaboration a conduit à l'obtention des résultats clairement décrits dans cette thèse, la rédaction de deux publications dont l'une déjà parue et bien d'autres à venir. Malgré les conditions financières limitées au cours de cette thèse, elle m'a permis d'acquérir de nombreuses compétences en biologie, en chimie et en physique où je suis attachée temporaire d'enseignement et de recherche (ATER). Toujours dans le cadre ce travail, j'ai participé à plusieurs réunions d'avancement du projet, des séminaires, des présentations orales dans le cadre de l'école doctorale et la participation à une conférence internationale : International Conference Of Raman Spectroscopy (ICORS 2010, Boston, USA).

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout d'abord ;

Au Directeur du laboratoire de Physique de l'Etat Condensé (LPEC) pour avoir accepté de m'accueillir dans son laboratoire et profiter des compétences qui s'y développent ;

Au jury qui aura la charge d'apprécier ce travail afin d'en améliorer la qualité ;

A mes directeurs de thèse et encadrants à savoir : Philippe Daniel, Etienne Dongo, Jean François Pilard, Gérard Thouand, Marie Josée Thouand, Fabienne Lagarde pour avoir dirigé ces travaux. Merci pour tout ce que vous m'avez appris et donné durant ces quelques années. Vous avez su me faire profiter de vos expériences et connaissances sans lesquelles je n'aurais pu mener de front les différents résultats présentés dans ce manuscrit ;

A mon comité de suivi de thèse (Alain Bulou et Guy Louarn) pour leur contribution au suivi de la thèse.

A l'Université du Maine pour sa contribution financière à travers l'aide à ma thèse en cotutelle;

Au Gouvernement Français pour sa contribution financière (2 mois de bourses) octroyés par le Service de Coopération et d'Action Culturelle (SCAC) ;

Particulièrement à Philippe Daniel pour les efforts consentis à la recherche du financement pour cette thèse.

Au Professeur Tsobnang de l'Ismans pour avoir élaboré le partenariat à travers le consortium EG@ ;

A toute l'équipe du LPEC pour l'accueil chaleureux en son sein ;

A mon colocataire de bureau Gilles Ripault qui s'est relayé pendant trois ans pour me supporter ;

A la secrétaire du LPEC : Jeannette Lemoine pour l'assistance dans l'intégration au laboratoire, sa gentillesse et les cadeaux régulièrement offerts à mon fils. J'ai passé de très bons moments avec elle et elle fut la première personne que j'ai rencontrée dans l'équipe de recherche du LPEC et aussitôt m'a conduite vers d'autres compatriotes ;

A Jean François Bardeau et Nicolas Delorme qui ont été une aide précieuse dans la conduite des expériences AFM, Microscopie à fluorescence et dans la préparation des surfaces d'or;

A toute l'équipe UCO2M particulièrement à Charles Esnault, Charles Cougnon, Irène Campistron, Faten Sadaga, Anuwat, Pamela qui m'ont aidé, guidé pour la réalisation des

expériences. Même si le passage entre les rouleaux n'est pas toujours agréable au premier abord, au final c'est génial et on en redemande encore !

A tout le personnel du département de Chimie Organique de l'Université de Yaoundé I pour la formation qui m'a permis d'obtenir le background nécessaire à la réalisation de ce travail ;

A l'équipe de recherche d'Etienne Dongo : Bouberte Meffo, Dagobert Tazo, Renadin Siagat, Bertin Vouffo, Béatrice, Nyonga et bien d'autres encore, pour leur conseil et leur bonne humeur ;

A mon tuteur et beau frère Paul Woafu ainsi qu'à son épouse Solange Woafu, pour leur suivi, soutien moral, et contribution au financement des études ;

A ma belle famille et en particulier à Pie Momo et son épouse pour leurs encouragements et leur disponibilité, mon beau père et ma belle mère pour leur compréhension et leur soutien ;

Je ne remercierai jamais assez mes parents, sans qui rien n'aurait été possible ;

Merci à ma sœur Vivianne Dassi et son beau frère Durand Lenou qui se sont particulièrement occupés de mon fils pendant toute mon absence. Ma petite sœur Stéphanie Kougang qui a été présente et disponible au moment opportun pour le suivi de mes dossiers ; Louisine Djontu, Colette Matcheu, Arcène Guelo pour leur soutien, mon petit frère Emmanuel et ma belle sœur Adeline qui ont su garder mon domicile durant mon absence ;

Mes remerciements vont également à la famille Kehem (Bafang), Tène (Yaoundé), Woafu (Yaoundé), Djontu (Nkongsamba), Fonkou (Bafoussam), Wamba (Balessing), grande famille Tesso (Bansoa, Douala, Yaoundé), Tchinda (Yaoundé), Guelo (Gabon), Momo (Dschang, Yaoundé) pour leur soutien moral, financier et leurs conseils ;

La thèse ne peut se faire sans des moments de stress, je tiens à remercier Merveille NONO pour le réconfort, et sa bonne humeur durant ces moments de stress. Je n'oublierai jamais ta présence dans les moments où j'étais en larmes.

Mes remerciements vont particulièrement à Dako Chiozem qui a été d'une aide précieuse dans la demande d'autorisation de soutenance.

A tous mes amis : Gilles Nekam, Jules Néabo, Roland Nguélé, Dagobert Tazo, Ali Assaf, Eric Siago, Patrice Tankam, Christèle Vanga, Safall Fall, Alphonsine Guedem, Louis Marie Kamdem, Christiane Nana, Marlyse Dongfack et bien d'autres encore. Merci pour votre disponibilité, vos bons conseils et votre bonne humeur ;

Enfin, à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, je leur exprime toute ma gratitude.

ABBREVIATIONS UTILISEES

| | |
|-----------|--|
| ADN: | Acide DésoxyriboNucléique |
| ABTS : | Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-AzinoBis-(3-éthylbenzoThiazoline-6-Sulfonique). |
| AFM : | <i>Atomic Force Microscopy</i> |
| ARN : | Acide RiboNucléique |
| COV : | Composés Organiques Volatils |
| DEPT : | <i>Distortionless Enhancement by polarization Transfer</i> |
| EDC : | <i>N'</i> -Ethyl- <i>N</i> -(3-Diméthylaminopropyl)Carbodiimide hydrochloride |
| ENFET: | <i>Enzyme Field Effect Transistor</i> |
| FET: | <i>Field Effect Transistor</i> |
| IRTF : | Infra Rouge à Transformée de Fourier |
| ISFET: | <i>Ion Sensitive Field Effect Transistor</i> |
| IUT: | Institut Universitaire de Technologie |
| LAPS: | <i>Light Adressable Potentiometric Sensors</i> |
| LCR: | <i>Ligase Chain Reaction</i> |
| MES : | 2- acide Sulfonique de l'Ethane (4- Morpholino) |
| MUA: | Acide 11-MercaptoUndecanoïque |
| NASBA: | <i>Nucleic Acid Strand Based Amplification</i> |
| NHS: | N-HydroxySuccinimide |
| OLED: | <i>Organic Light Emitting Diode</i> |
| PCR: | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PEDOTPSS: | Poly (3, 4-EthylèneDioxyThiophène)-Poly (StyrèneSulfonate) |
| PPM: | Partie Par Million |
| RMN : | Résonance Magnétique Nucléaire |
| SAM: | <i>Self Mono Assembled Layer</i> |
| SAW: | <i>Surface Acoustic Wave</i> |
| SERS: | <i>Surface Enhanced Raman Spectroscopy</i> |
| SPR: | <i>Surface Plasmon Resonance</i> |
| T.A: | Température Ambiante |
| TBA : | TerButylAzine |
| TIRF : | <i>Total Internal Reflection Fluorescence</i> |
| TMA: | <i>Transcription Mediated Amplification</i> |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Tableau I: Exemples de biocapteurs potentiométriques appliqués dans le contrôle environnemental | 8 |
| Tableau II: Avantages et inconvénients des différents types de biocapteurs | 11 |
| Tableau III: Eléments biologiques et techniques d'immobilisation associées..... | 12 |
| Tableau IV: Quelques exemples d'applications de greffage covalent | 15 |
| Tableau V: Domaines d'applications des biocapteurs | 17 |
| Tableau VI: Champs d'application de la diffusion Raman | 64 |
| Tableau VII: Interprétation du spectre Raman du poly[chlorure 4-(2-thiophén-3-yl-éthoxyméthyl)benzènesulfonyl] | 84 |
| Tableau VIII: Comparaison des bandes Raman de la protéine A et du poly[chlorure 4-(2-thiophén-3-yl-éthoxyméthyl)benzènesulfonyl] | 85 |
| Tableau IX: Types et origine des interactions | 111 |
| Tableau X: Interprétation du spectre RMN ^{13}C du produit brut | 150 |
| Tableau XI : Interprétations du spectre RMN ^1H du produit pur isolé..... | 152 |
| Tableau XII : Caractéristiques des produits chimiques utilisés..... | 160 |
| Tableau XIII : Composition du tampon phosphate | 172 |

LISTE DES SCHEMAS

| | |
|--|-----|
| Schéma 1 : Mécanisme de synthèse du monomère | 72 |
| Schéma 2 : Mécanisme de formation du produit secondaire..... | 94 |
| Schéma 3: Etapes de la photopolymérisation..... | 137 |
| Schéma 4: Monomères photopolymérisables par voie cationique. | 143 |
| Schéma 5: Schéma du principe de synthèse | 146 |
| Schéma 6: Mécanisme de formation du monomère | 147 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|-----|
| Figure 1: Schéma général d'un biocapteur | 5 |
| Figure 2: Familles de biorécepteurs et de transducteurs | 6 |
| Figure 3: Réalisation du dépôt de couche de Langmuir - Blodgett..... | 14 |
| Figure 5: Fonctionnalisation de l'or par le SAM de l'acide 11-mercaptopundécanoïque..... | 22 |
| Figure 6: Fonctionnalisation de l'or par le SAM du mélange acide 11-mercaptopundécanoïque et le 6-mercaptohexanol | 232 |
| Figure 7: Fonctionnalisation de l'or par le SAM de l'acide 16-mercaptohexadécanoïque | 24 |
| Figure 8: Fonctionnalisation du support par un hydrogel: carboxymethyldextran | 24 |
| Figure 9: Fonctionnalisation du Si par un polymère porteur de glucofurasose..... | 26 |
| Figure 10: Fonctionnalisation de l'or par l'ester N-maléoylsuccinimidyl | 26 |
| Figure 11: Fonctionnalisation des particules magnétiques de FeCl_2 et FeCl_3 par le dextran .. | 27 |
| Figure 12: Fonctionnalisation de nanoparticules de Fe_3O_4 par le bleu de Prusse et le gluco oxydase pour la détection du glucose..... | 28 |
| Figure 13: Fonctionnalisation du polystyrène sulfoné par des nanoparticules de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Fe}_2\text{O}_3$ pour la détection de la streptavidine | 29 |
| Figure 14: Fonctionnalisation par la sépharose activée pour la détection d'une protéine | 29 |
| Figure 15: Représentation des orbitales moléculaires ; a) Ethylène, b) Thiophène | 35 |
| Figure 16: Arrangement des chaînes de polythiophène à la surface de l'électrode..... | 37 |
| Figure 17: Image AFM du poly (3-hexylthiophène) régiorégulier sur verre et mode d'empilement des chaînes | 38 |
| Figure 18: Mécanisme de formation du polythiophène par couplage radical-radical..... | 39 |
| Figure 19: Mécanisme de formation du polythiophène par couplage radical- monomère..... | 39 |
| Figure 20: Mécanisme de synthèse électrochimique..... | 40 |
| Figure 21: Structures schématiques du polaron positif (a), bipolaron positif (b), deux polarons positifs(c) dans le polythiophène..... | 41 |
| Figure 22: Mécanisme de synthèse chimique du polythiophène..... | 43 |
| Figure 23: Mécanisme de McCullough d'une polymérisation contrôlée de poly (3-alkyl thiophène)..... | 44 |
| Figure 24: Valeurs respectives des contributions électroniques, vibrationnelles et rotationnelles d'une molécule | 47 |
| Figure 25: Modes de vibration : exemple des vibrations localisées du groupement CH_2 d'une molécule. | 50 |

| | |
|---|----|
| Figure 26: Correspondance entre les groupements d'une molécule et les pics observés..... | 51 |
| Figure 27: Histogramme du nombre de publication parues sur la diffusion Raman et la diffusion Raman de Résonance (par décennie) | 53 |
| Figure 28: Schéma simplifié d'un spectromètre Raman dispersif | 55 |
| Figure 29: Interaction entre un photon et la matière caractérisée par des niveaux d'énergie vibrationnelle..... | 58 |
| Figure 30: Spectre RMN ¹ H du N, N-diéthyl-(2-thiophén-3yl-éthoxyméthyl)benzène sulfonamide | 73 |
| Figure 31: Spectre RMN ¹³ C du N,N-diéthyl-(2-thiophén-3yl-éthoxyméthyl)benzène sulfonamide | 74 |
| Figure 32: Voltammogrammes cycliques successifs enregistrés sur une plaque de platine plongée dans une solution contenant le monomère dans CH ₃ CN/Bu ₄ NPF ₆ | 76 |
| Figure 33: Voltammogrammes cycliques successifs enregistrés sur un cristal de quartz platiné pour 11 cycles..... | 77 |
| Figure 34: Courbe de suivi gravimétrique observée sur du cristal de quartz platiné pour 11 cycles de voltamétrie cyclique. | 77 |
| Figure 35: Voltammogrammes cycliques enregistrés sur plaque de platine recouvert du film de poly(M) obtenu précédemment. Ce film est plongé dans la solution de CH ₃ CN/ Bu ₄ NPF ₆ (vitesse de balayage, 100 mVs ⁻¹ | 79 |
| Figure 36: Courbe de suivi gravimétrique du dopage p du poly(M)..... | 79 |
| Figure 37: Voltammogrammes cycliques enregistrés à 100 mV. s ⁻¹ de 0 V à -2,5V sur une plaque de platine recouverte d'un film de poly(M). Le film est plongé dans CH ₃ CN/Bu ₄ NPF ₆ | 81 |
| Figure 38: Voltammogrammes de coupure cathodique des liaisons S-N | 81 |
| Figure 39: Courbe de suivi gravimétrique de la coupure cathodique des liaisons S-N..... | 82 |
| Figure 40: Spectre Raman du poly [chlorure 4-(2-thiophèn-3-yl-éthoxyméthyle) benzène sulfonyle]..... | 83 |
| Figure 41: Comparaison entre le spectre Raman de la protéine A et le spectre du poly thiophène | 85 |
| Figure 42: Image de fluorescence du poly[chlorure 4-(2-thiophén-3-yl-éthoxyméthyl)benzènesulfonyle]..... | 87 |
| Figure 43: Courbe de suivi gravimétrique de l'immobilisation de la protéine A sur le poly(M) fonctionnalisé | 88 |
| Figure 44: Courbe de suivi gravimétrique de l'immobilisation de l'IgG | 89 |

| | |
|--|-----|
| Figure 45: Courbe de suivi gravimétrique de l'immobilisation de l'IgG fluorescent..... | 90 |
| Figure 46: Image de fluorescence après immobilisation de l'anticorps fluorescent sur deux endroits différents de la surface | 90 |
| Figure 47: Suivi de l'immobilisation de la salmonelle | 91 |
| Figure 48: Voltamétrie cyclique de modification de la surface d'or à partir du chlorure de 4-nitrobenzènesulfonyle | 94 |
| Figure 49: Suivi gravimétrique de la modification de la surface d'or à partir du chlorure de 4-nitrobenzènesulfonyle | 95 |
| Figure 50: Voltamétrie cyclique de modification de la surface d'or sur quartz à partir de l'acide sulfanilique | 96 |
| Figure 51: Suivi gravimétrique de la modification de la surface d'or..... | 97 |
| Figure 52: Spectre Raman de la surface d'or modifié au chlorure de parabenzènesulfonyle.. | 98 |
| Figure 53: Spectre comparatif du substrat et de la protéine A | 99 |
| Figure 54: Image AFM de la surface d'or non fonctionnalisée | 100 |
| Figure 55: Image AFM de la surface d'or fonctionnalisée | 100 |
| Figure 56: Spectre Raman de la poudre de protéine A..... | 103 |
| Figure 57: Spectre Raman de la protéine A immobilisée sur la surface d'or fonctionnalisée | 104 |
| Figure 58: Suivi gravimétrique de l'immobilisation de la protéine A | 105 |
| Figure 59: Contrôle d'adsorption de la protéine A | 106 |
| Figure 60: Spectre Raman de la poudre d'IgG | 108 |
| Figure 61: Spectre Raman de l'IgG immobilisé sur le substrat fonctionnalisé et la protéine A | 108 |
| Figure 62: Suivi gravimétrique de l'immobilisation de l'IgG | 110 |
| Figure 63: Illustration des interactions anticorps - antigène | 111 |
| Figure 64: Spectre Raman de l'anti IgG immobilisé | 112 |
| Figure 65: Suivi gravimétrique de l'immobilisation de l'anti IgG..... | 113 |
| Figure 66: Visualisation AFM de la protéine A immobilisée sur la surface d'or fonctionnalisée | 114 |
| Figure 67: Visualisation AFM de l'IgG immobilisé sur la surface fonctionnalisée | 115 |
| Figure 68: Profil de hauteur de l'IgG immobilisé..... | 115 |
| Figure 69: Structure de la molécule de fluoroscéine Isothiocyanate (FITC) | 116 |
| Figure 70: Visualisation AFM de l'IgG fluorescent | 117 |
| Figure 71: Profil de hauteur de l'IgG fluorescent immobilisé..... | 117 |
| Figure 72: Image de microscopie à fluorescence de l'IgG fluorescent..... | 118 |

| | |
|--|-----|
| Figure 73: a) Structure tridimensionnelle d'une protéine ; b) Représentation schématique de la structure tridimensionnelle | 120 |
| Figure 74: Structure secondaire d'une protéine | 120 |
| Figure 75: Illustration des structures α et β des protéines | 121 |
| Figure 76: Illustration des interactions type Van der Waals | 123 |
| Figure 77: Illustration des interactions protéiques | 124 |
| Figure 78: Représentation du site actif d'une protéine | 125 |
| Figure 79: Spectre de référence de la protéine A et de l'IgG (poudre)..... | 127 |
| Figure 80: Représentation des hélices α et β | 127 |
| Figure 81: Spectre Raman du mélange de la solution de Protéine A + IgG..... | 128 |
| Figure 82: Spectre Raman des biomolécules immobilisées successivement; a) Immobilisation de la protéine A ; b) Immobilisation de l'IgG | 129 |
| Figure 83: Spectre Raman de la protéine A et de l'IgG immobilisés simultanément..... | 130 |
| Figure 84: Contrôle d'adsorption, 2h d'incubation | 132 |
| Figure 85: Contrôle d'adsorption des protéines: 16 h d'incubation | 132 |
| Figure 86: Diverses voies de désactivation d'une molécule de photoamorceur excitée | 137 |
| Figure 87: Dispositif expérimental pour la synthèse du monomère..... | 148 |
| Figure 88: Spectre RMN ^1H du composé brut | 149 |
| Figure 89: Spectre RMN ^{13}C composé brut | 150 |
| Figure 90: Spectre RMN ^1H du produit pur isolé..... | 151 |
| Figure 91: Spectre RMN ^{13}C du produit pur isolé..... | 152 |
| Figure 92: Spectre RMN DEPTQ 135 du produit pur isolé | 153 |
| Figure 93: Spectre RMN ^1H du solide brut obtenu | 155 |
| Figure 94: Spectre RMN ^{13}C du composé brut obtenu | 155 |
| Figure 95: Photos du potentiostat, de la microbalance à cristal de quartz et les cellules utilisées pour la synthèse électrochimique | 165 |
| Figure 96: Autoclave utilisé pour la stérilisation des solutions biologiques..... | 169 |
| Figure 97: Poste de sécurité microbiologique | 170 |
| Figure 98: Structure d'un anticorps | 171 |
| Figure 99: Spectromètre Raman Xplora de Horiba Jobin Yvon | 174 |
| Figure 100: Principe de la microscopie à force atomique | 176 |
| Figure 101: Microscope à fluorescence (ZEISS) | 178 |

RESUME

L'objectif de cette thèse est de synthétiser de nouvelles surfaces spécifiques nécessaires à l'immobilisation des biomolécules ; visant à développer à terme un biocapteur pour la détection de pathogènes en industrie agroalimentaire. Cette nouvelle procédure de fonctionnalisation de surface consiste d'une part à greffer des molécules organiques sur un substrat métallique à partir d'une réaction électrochimique et d'autre part de synthétiser un monomère photopolymérisable sur tout type de surface. Ces surfaces sont enfin utilisées pour immobiliser les biomolécules. Ce procédé ainsi développé permet d'éliminer les multiples étapes, l'utilisation excessive de réactifs observés dans les protocoles classiques de fonctionnalisation de surface pour la capture de microorganismes. Deux stratégies de fonctionnalisation ont été investiguées : la polymérisation sur une plaque de platine et le dépôt de monocouche sur une surface d'or. La fonctionnalisation de surfaces ainsi que l'immobilisation de biomolécules ont été caractérisées par la spectroscopie Raman, la microbalance à cristal de quartz, la microscopie à force atomique (AFM) pour le premier et en plus la microscopie à fluorescence pour le second.

Les résultats de la fonctionnalisation de surfaces par dépôt de polymère ont montré, une déstabilisation du polymère en présence de l'eau. Afin d'optimiser la synthèse, nous avons travaillé en milieu inerte, sous alumine activée. De plus, on note une large couverture de la zone spectrale des biomolécules par les signaux du polymère ;

Pour le dépôt de monocouche, l'on a obtenu une surface très réactive, homogène. La diffusion Raman est la principale technique de caractérisation utilisée. Elle présente l'avantage d'être une méthode de caractérisation physico-chimique non destructive et non invasive. Longtemps délaissée dans les sciences du vivant, cette méthode apparaît maintenant particulièrement prometteuse grâce à un développement récent de spectromètres intégrés performants.

La diffusion Raman sur la monocouche déposée montre une intensité accrue des signaux par l'utilisation de la surface d'or et un spectre plus dégagé conduisant à l'identification aisée des biomolécules après fixation. Elle permet non seulement d'identifier les bandes de vibrations de chaque groupement mais aussi la conformation des structures.

Les résultats d'immobilisation ont montré que l'accroche des biomolécules sur les surfaces fonctionnalisées était spécifique.

La fonctionnalisation de surface d'or par dépôt de monocouche constitue finalement une technique très rapide à mettre en œuvre, peu coûteuse permettant d'ancrer efficacement les biomolécules et peut être utilisée pour diverses applications.

La synthèse du monomère photopolymérisable a été abordée et est en cours d'investigation.

Mots clés: fonctionnalisation de surface, immobilisation de biomolécules, Raman, microbalance à cristal de quartz, biocapteurs.

ABSTRACT

In food processing industry, detecting bacteria or viruses is crucial. Nowadays, it can be achieved with microbiological tests but, it requires several days. The objective of the project was to synthesize new specific surfaces capable of biomolecules immobilization in order to develop a biosensor for the detection of various pathogens in food-processing industry. This new procedure of surface functionalisation consists on one hand in anchoring organic molecules on a metallic substrate by an electrochemical reaction and on the other hand to synthesize a photocrosslinkable monomer on every type of surface. These surfaces are finally used to immobilize biomolecules.

Two strategies of surface functionalisation were investigated: the polymerization on a platinum surface and the deposition of monolayer on a gold surface. Both processes were characterized by spectroscopy Raman, Quartz Crystal Microbalance, Atomic Force Microscopy and Fluorescence Microscopy.

The results of the functionalisation of surfaces by deposition of polymer showed a destabilization of the polymer in presence of water. To optimize the synthesis, we worked in sluggish middle, under activated alumina. Furthermore, we noted a wide coverage of the spectral zone of biomolecules by the signals of the polymer;

For the monolayer deposition, we obtained a very reactive and homogeneous surface. The Raman spectroscopy was the main technique used to the characterization. It presented the advantage to be a non-destructive and non invasive physico-chemical method. This method seemed now particularly promising due to a recent development of successful integrated spectrometers.

Raman Spectroscopy showed an enhanced intensity of the signals by the use of the gold surface and a more clear spectrum well-to-do identification of biomolecules after binding. It allowed not only the identification of the bands of vibrations of every connection but also the conformation of the structures.

The results of the immobilization showed that the grafting of biomolecules on functionalised surfaces was specific and efficient.

The functionalisation of gold surface by monolayer deposition constituted at the end an efficient and low cost technique allowing to anchor biomolecules and can be used for multitude applications.

The last step consisting of the synthesis of photocrosslinkable monomer was started and still investigated.

***Keywords:* surface functionalisation, biomolecules immobilization, Raman, quartz crystal microbalance, biosensors.**

Introduction générale

La surveillance des maladies d'origine alimentaire et des flambées de mortalité dues à la contamination de la nourriture par des pathogènes constituent une priorité mondiale en terme d'efforts pour la santé par les pouvoirs publics et les industries agroalimentaires. Ces maladies infectieuses sont responsables de 40% des 50 millions de décès recensés chaque année dans le monde notamment en Afrique sub-saharienne. Il est donc nécessaire de trouver des techniques d'analyse efficaces, faciles à mettre en œuvre, très sensibles, spécifiques et permettant une détection rapide de ces pathogènes.

De nombreuses techniques d'analyse biologiques et de contrôle des produits manufacturés ont aussi été découvertes et permettent d'assurer une détection des agents pathogènes responsables de ces infections. Parmi ces méthodes standard largement mises en œuvre, nous pouvons citer la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), l'ADN branché, le NASBA (*Nucleic Acid Strand Based Amplification*), la LCR (*Ligase Chain Reaction*), le TMA (*Transcription Mediated Amplification*). Ces méthodes permettent d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante à détecter. Cependant, elles sont lourdes à mettre en œuvre, nécessitent un prétraitement de l'échantillon, un pré-enrichissement du milieu, des équipements coûteux et une main d'œuvre hautement qualifiée. Les techniques alternatives comme les biocapteurs (qui allient un élément biologique sélectif (anticorps, enzyme, cellule...) à un transducteur) permettent de quantifier rapidement certains constituants des matrices alimentaires et jouent un rôle prépondérant dans le contrôle de la qualité des aliments. Leur caractère compact, leur grande spécificité, leur sensibilité et leur caractère portatif font d'eux l'une des meilleures alternatives aux techniques existantes.

L'objectif général de cette thèse est de développer un biocapteur utilisable en industrie agroalimentaire pour le contrôle de la qualité des aliments.

L'objectif spécifique consiste à développer une méthode physico-chimique alternative de détection des microorganismes impliquant une double signature :

- capturer une bactérie sur une surface spécifique (que nous avons élaborée) greffée par un anticorps spécifique à cette bactérie ;
- confirmer la capture par microbalance à cristal de quartz et identifier la bactérie capturée par spectroscopie Raman.

Ce manuscrit de thèse est subdivisé en trois parties :

La première partie synthétise essentiellement les aspects bibliographiques sur le sujet : la présentation générale des biocapteurs, la fonctionnalisation de surface impliquée dans la détection de microorganismes, les techniques de caractérisation Raman et microbalance à cristal de quartz.

La deuxième partie présente les principaux résultats obtenus sur la fonctionnalisation de surface, principalement sur la synthèse des polymères conducteurs, la modification de la surface d'or, l'immobilisation des biomolécules sur ces surfaces, les interactions entre les biomolécules et enfin la synthèse d'un monomère photopolymérisable.

La troisième recense les différentes méthodologies de mise en œuvre des expériences, les caractéristiques des produits utilisés ainsi que les divers appareillages.

**CHAPITRE I :
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

I- 1- Les biocapteurs

I- 1-1- Généralités sur les biocapteurs

L'idée de biocapteur est née du besoin d'analyse en temps réel sans traitement préalable de l'échantillon et sans manipulation de produits dangereux [1]. Le marché et les applications des biocapteurs sont très larges. Ils concernent non seulement le domaine médical pour le diagnostic [2-4], mais aussi les analyses environnementales [5-9] et l'agroalimentaire [2, 8, 10-17]. Le développement des biocapteurs a débuté dans les années 1960 avec l'introduction des premières électrodes à enzymes. Elles se sont étendues dans les années 1980 par la commercialisation de biocapteurs ampérométriques pour la mesure du glucose et en 1990 dans le domaine médical. Plus de 40 biocapteurs ont été commercialisés pour le diagnostic médical, pour mesurer les paramètres aussi divers que le taux de glucose, taux de cholestérol et certains analytes¹ comme l'urée, les lactates [18]. Ces dernières années, le domaine des biocapteurs a connu un développement remarquable sous la pression de plusieurs facteurs selon les domaines d'application:

- le besoin en capteurs fiables (pharmacie);
- rapidité de mesure (monitoring médical) ;
- la généralisation de l'automatisation dans le génie des procédés;
- la recherche du moindre coût dans le domaine de l'analyse biomédicale ou environnementale. L'utilisation des techniques de microélectronique dans le domaine des biocapteurs permet en particulier d'envisager des productions massives à faible coût.

Pour le contrôle de la qualité des aliments et produits alimentaires, l'industrie agroalimentaire a de plus en plus besoin de techniques analytiques fiables et peu coûteuses. Ce besoin provient d'une part d'une demande des organismes de régulation mais aussi d'un plus grand intérêt porté par le consommateur à la fiabilité des produits qu'il consomme. La contribution des techniques analytiques devient de plus en plus importante pour le contrôle des matières premières, la vérification du contenu des produits, l'évaluation de leur fraîcheur et aussi la détection des contaminants. Plusieurs de ces techniques reposent le plus souvent sur des approches conventionnelles de mise en culture et d'enrichissement préalable. Ceci conduit à

¹ **Analyte** : constituant de l'échantillon devant être analysé

un procédé long, coûteux et ne permet pas une intervention rapide dans la chaîne alimentaire. Les techniques alternatives comme les biocapteurs qui allient un élément biologique sélectif (anticorps, enzyme ...) à un transducteur permettent de quantifier rapidement certains constituants des matrices alimentaires et jouent ainsi un rôle prépondérant dans le contrôle de la qualité des aliments. Leur caractère compact, leur grande spécificité, leur sensibilité et leur caractère portatif font d'eux une des meilleures alternatives aux techniques existantes.

I-1-1- 1- Principe de fonctionnement des biocapteurs

Un biocapteur est issu de l'association d'un élément biologique (enzyme, anticorps, antigène, fragment d'ADN, d'ARN, microorganisme) possédant une fonction de reconnaissance spécifique et un élément transducteur (électrode, microbalance à quartz, fibre optique) qui assure le transfert de l'événement biologique « reconnaissance de l'analyte » et la transforme en un signal exploitable (électrique ou lumineux).



Figure 1: Schéma général d'un biocapteur

La qualité du biorécepteur conditionne l'efficacité du dispositif en terme de sélectivité, sensibilité, répétabilité et reproductibilité. La couche bioreceptrice doit répondre à certains critères : une bonne conservation de l'immunoréactivité, une quantité importante de molécules immobilisées avec un faible taux de dénaturation et une bonne stabilité vis-à-vis des variations de pH, de force ionique [1].

Trois grands types de biomolécules sont généralement utilisés comme éléments de reconnaissance. On distingue : les enzymes, les immunoespèces (anticorps, antigènes), et les acides nucléiques. Dans le cas des biocapteurs enzymatiques, la mesure de l'analyte se fait par détection d'un produit de la réaction chimique provoquée par l'enzyme immobilisée, ou par détection d'une conséquence physique de cette réaction. Les biocapteurs basés sur des immunoespèces (immunocapteurs) détectent l'analyte par l'intermédiaire des modifications physiques de la couche sensible, modifications induites par la formation des complexes immuns (effets de géométrie, de masse, modification de propriétés électriques). Les

biocapteurs qui utilisent les fragments d'ADN exploitent l'appariement de deux monobrins d'oligonucléotides complémentaires. Avec un microréseau d'ADN, il est possible d'identifier la séquence d'un gène et de détecter des mutations génétiques.

I-1-1-2- Types de biorécepteurs et de transducteurs

Il existe un grand nombre de biorécepteurs et de transducteurs dans la littérature. Le choix est fait en fonction de l'application finale du biocapteur et des contraintes du problème. La figure 2 suivante représente les différents types de biorécepteurs et de transducteurs.

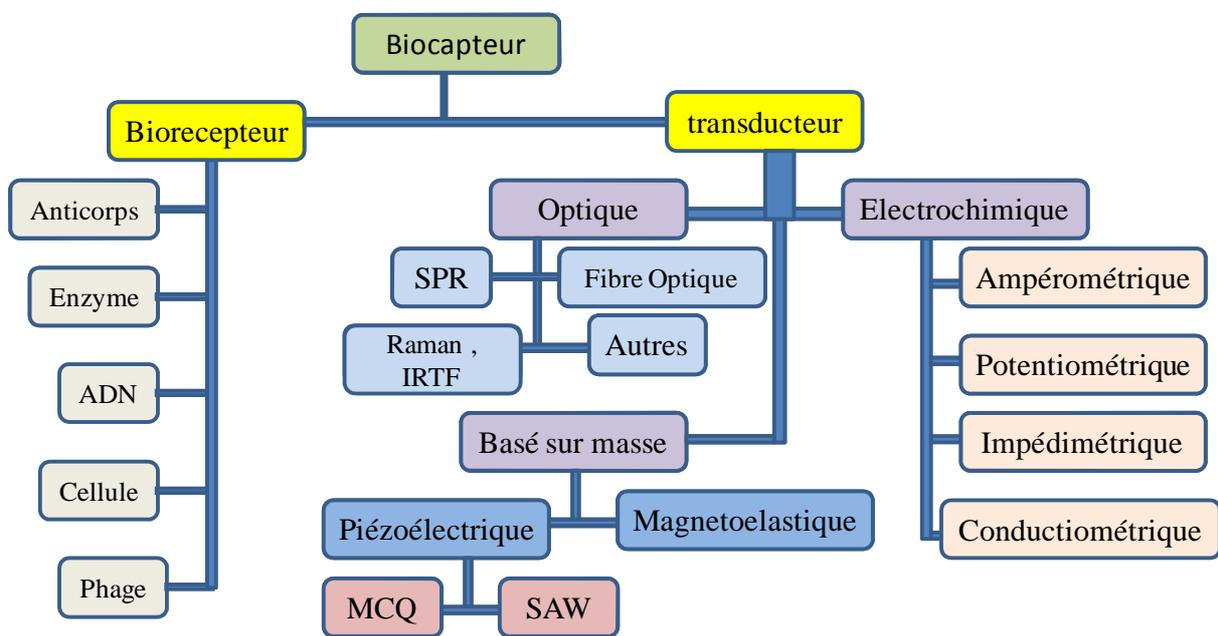


Figure 2: Familles de biorécepteurs et de transducteurs

L'anticorps est choisi comme biorécepteur dans ce travail dans le but de détecter un agent pathogène et comme mode de transduction, nous avons choisi la diffusion Raman parce qu'elle est non destructive, non invasive et permet d'analyser de très faibles quantités d'échantillons. La transduction piézoélectrique double la signature Raman par sa très haute sensibilité (mesure des masses de l'ordre du nanogramme).

I-1-1-3- Types de biocapteurs selon le transducteur

La nature du transducteur sert généralement de base pour la classification des différents biocapteurs.

I-1-1- 3-1- Transducteurs électrochimiques

Ils transforment l'effet d'une interaction électrochimique analyte-électrode en un signal primaire (signal porteur de l'information). De tels effets peuvent être stimulés électriquement ou résulter d'une interaction spontanée en condition de courant nul [19]. Dans cette catégorie, on distingue : les transducteurs ampérométriques, potentiométriques, impédimétriques et conductimétriques.

I-1-1- 3-1-1- Biocapteurs ampérométriques

Les biocapteurs ampérométriques mesurent le courant généré à un potentiel constant par une réaction de type oxydoréduction. Le facteur important pouvant influencer le fonctionnement du biocapteur ampérométrique est le transfert d'électrons entre la molécule catalytique et la surface de l'électrode [20]. Son principe repose sur l'application d'un potentiel constant entre une électrode de travail et une électrode de référence. Le potentiel imposé promeut une réaction redox qui produit un courant ; la valeur de ce courant est proportionnelle à la concentration d'espèces électroactives présentes en solution. De nombreux biocapteurs ampérométriques sont basés sur la mesure de la consommation d'oxygène, ou la génération de peroxyde d'hydrogène. Les électrodes à H_2O_2 sont plus sensibles mais moins sélectives que les électrodes à O_2 [19, 21]. Les biocapteurs ampérométriques sont rapides, plus sensibles, plus précis et plus justes que les biocapteurs potentiométriques [22].

Cependant, la sélectivité des biocapteurs ampérométriques est seulement gouvernée par le potentiel redox des espèces électroactives présentes. En conséquence, le courant mesuré par l'instrument peut inclure la contribution de plusieurs espèces chimiques différentes [20, 21, 23]. De plus, la spécificité du composant biologique peut être compromise par la sélectivité partielle de l'électrode. Cette absence de spécificité nécessite une préparation de l'échantillon, la séparation ou la compensation des signaux interfaciaux [20].

I-1-1- 3-1-2- Biocapteurs potentiométriques

Ils sont basés sur la mesure du potentiel d'une électrode de travail par rapport à une électrode de référence. Le composé biologique fixé est le plus souvent une enzyme mais peut également être une cellule entière [21]. La détermination des potentiels des électrodes permet de mesurer directement la concentration de l'analyte à doser.

Les biocapteurs potentiométriques ont l'avantage de disposer de temps de réponse très courts (entre 5 à 10 minutes). Leur fabrication est largement industrialisée et par conséquent est moins coûteuse. Le tableau I ci-dessous présente quelques biocapteurs potentiométriques destinés au contrôle environnemental.

Tableau I: Exemples de biocapteurs potentiométriques appliqués dans le contrôle environnemental

| Transducteur | Enzyme inhibée | Produits détectés Limite de détection | Références |
|--|--|--|-------------------|
| Capteur pH à FET ² Electrode de pH modifiée | Organophosphoré hydrolase(OPH) | Organophosphorés | [24] |
| | | Paraoxon : 1µM Dichlorvos : 1µM | [25] |
| LAPS ³ | Murine hybridoma clone (P ₆ A ₇) | Terbutylazine (TBA) : 1,5µg/l | [26] |
| LAPS | E. coli WP ₂ | Tryptophane : 0 - 12µM | [27] |
| Electrode de pH | Acétylcholinestérase (AcChE) | Dianizon : 0,2nM | [28] |
| Electrode de pH modifiée | Butyrylcholinestérase, choline oxydase et peroxydase | trichlorfon : 2.10 ⁻⁴ nM | [29] |

I-1-1-3-1-3- Biocapteurs conductimétriques

La conductimétrie est une technique électrochimique alternative à l'ampérométrie et à la potentiométrie [30]. Elle permet de mesurer les variations (consommation ou production) d'espèces chargées générées au cours des réactions enzymatiques. La conductance d'un corps est donnée par l'équation :

$$G = \gamma \frac{A}{\lambda}$$

γ (en S.cm⁻¹) est la constante caractéristique d'un produit connu et est appelée la conductance ou conductivité spécifique;

A/λ (en cm) la constante géométrique de la cellule.

² FET : Transistor à Effet de champ (Field Effect Transistor)

³ LAPS : Light Adressable Potentiometric Sensors

Les biocapteurs conductimétriques sont utilisés dans le domaine biomédical pour la quantification du glucose dans le sang et l'urine par exemple.

I-1-1-3-2- Les transducteurs optiques : biocapteurs optiques

Les transducteurs optiques utilisent des technologies diverses basées sur des phénomènes optiques et sont le résultat d'interactions entre l'analyte avec le récepteur. Ce groupe peut être subdivisé selon le type de propriétés optiques utilisées dans les capteurs :

- L'absorbance, mesurée dans un milieu transparent.
- La réflectance, mesurée en milieu non transparent, utilisant généralement un indicateur immobilisé.
- La luminescence, basée sur la mesure de l'intensité de la lumière émise au cours d'une réaction chimique dans le système récepteur.
- L'indice de réfraction, mesuré comme le résultat d'un changement de composition d'une solution. Il peut y avoir aussi un effet de résonance de plasmons de surface.
- L'effet optothermique, basé sur la mesure d'un effet thermique causé par l'absorption de la lumière.
- La diffusion de la lumière, basée sur des effets causés par des particules de taille définie présentes dans l'échantillon.

L'application de ces phénomènes à des capteurs est rendue possible grâce à l'utilisation de fibres optiques dans diverses configurations. Ces dispositifs sont appelés optodes ou optrodes⁴[19].

I-1-1-3-3- Transducteurs gravimétriques

Dans ce type de transducteurs, les capteurs sensibles à la masse transforment les variations de masse d'une surface spécialement modifiée en un changement de propriété du matériau support. La variation de masse est causée par une accumulation d'analyte.

I-1-1-3-3- 1- Biocapteurs piézoélectriques

Les dispositifs piézoélectriques mesurent une variation de fréquence d'un oscillateur à quartz, causée par l'accrochage d'une quantité d'analyte sur l'oscillateur. Ils peuvent être utilisés autant en solution qu'en phase gazeuse. La vibration des cristaux piézoélectriques produit un

⁴**Optode** : capteur optique qui mesure la concentration d'une substance spécifique par usage d'un transducteur chimique.

champ électrique oscillant dans lequel la fréquence de résonance du cristal dépend de sa nature chimique, de sa taille, de sa forme et de sa masse. En plaçant le cristal dans un circuit oscillant de mesure, la fréquence peut être mesurée en fonction de la masse. Lorsque la variation de masse Δm est très faible par rapport à la masse totale du cristal, la variation de fréquence Δf est liée à Δm par la relation :

$$\Delta f = c f_0^2 \frac{\Delta m}{A}$$

f_0 est la fréquence de vibration du cristal dans le circuit,

A la surface d'un cristal de quartz,

c la constante obtenue à partir du matériau du cristal et son épaisseur.

Les cristaux piézoélectriques, parfois appelés microbalances à cristal de quartz, sont typiquement constitués d'un cristal de quartz et fonctionnent à des fréquences entre 1 et 10 MHz. Ces instruments peuvent être utilisés pour des liquides, avec une limite de détermination des fréquences de l'ordre de 0,1 Hz ; la limite de détection de masse liée à la surface de l'électrode est de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-11} g.

Les biocapteurs piézoélectriques apportent une réponse rapide mais leurs inconvénients résident dans la fixation de composés non spécifiques [21].

I-1-1-3-3- 2- Biocapteurs acoustiques

Les dispositifs à ondes acoustiques de surface utilisent la modification de la vitesse de propagation d'une onde acoustique, affectée par le dépôt d'une masse définie d'analyte. Les biocapteurs basés sur une transduction acoustique sont surtout utilisés pour la détection de micro-organismes tels qu'*Escherichia coli*. D'autres exemples d'applications concernent la détection d'organismes génétiquement modifiés [19].

Le tableau II ci-dessous présente les avantages et les inconvénients des différents types de biocapteurs [31].

Tableau II: Avantages et inconvénients des différents types de biocapteurs

| Transduction | Avantages | Inconvénients | Applications |
|----------------------------------|---|---|--|
| Electrode sensible aux ions | <ul style="list-style-type: none"> - simple - fiable | <ul style="list-style-type: none"> - réponse lente - nécessité d'une électrode de référence stable | glutamate, urée, nitrites, acides aminés, pénicilline, cholestérol... |
| Electrode à oxygène | <ul style="list-style-type: none"> - simple - très spécifique | <ul style="list-style-type: none"> - faible sensibilité | glucose, sulfites, glutamate, éthanol, sucrose, lactate, cholestérol... |
| Electrode à peroxyde d'hydrogène | <ul style="list-style-type: none"> - simple - très sensible | <ul style="list-style-type: none"> - peu spécifique | sulfites, glucose, glutamate, acides aminés |
| Systemes optiques | <ul style="list-style-type: none"> - utilisation à distance - faibles coûts - miniaturisables - pas d'interférence électrique | <ul style="list-style-type: none"> - nécessité des sources de haute énergie - gamme de concentration étroite - interférence de la lumière incidente. | acétaldéhyde, nitrate, glucose, glycérol, éthanol, galactose... |
| Piézoélectrique | <ul style="list-style-type: none"> - réponse rapide - simple - faible coût - peu de manipulation de liquide | <ul style="list-style-type: none"> - faible sensibilité dans les applications sur liquide - fixation non spécifique | glucose, atrazine, bactéries, toxines microbiennes |
| Calorimétrie | <ul style="list-style-type: none"> - universalité - pas d'interférence optique comme la couleur et la turbidité. | <ul style="list-style-type: none"> - coûteux, - encombrant - nécessité d'importantes quantités d'enzyme | glucose, lactate, acide ascorbique, triglycérides, cholestérol, galactose, éthanol, lipides. |

Nous venons de faire ainsi une étude comparative des types de biocapteurs. Celle-ci nous a permis de comprendre le principe de fonctionnement, de recenser les avantages et inconvénients des uns et des autres et nous permet d'avoir une orientation préalable de la méthodologie à adopter pour la proposition d'une méthode alternative de détection de pathogènes.

I-1-2- Immobilisation du biorécepteur

Plusieurs techniques d'immobilisation mènent à ce procédé et le choix dépend de l'application et aussi des contraintes. Le tableau III ci-dessous regroupe les principaux éléments biologiques utilisés en tant que système de reconnaissance et les techniques d'immobilisation associées [32].

Tableau III: Eléments biologiques et techniques d'immobilisation associées

| Eléments biologiques | Techniques d'immobilisation sur le biorécepteur |
|----------------------|--|
| Enzyme | <ul style="list-style-type: none">• Adsorption physique• Greffage covalent• Confinement• Polymérisation• Inclusion |
| Anticorps | |
| Peptide | |
| Micro-organismes | |
| Tissus | |
| Lipides | |
| Acides nucléiques | |

Les techniques d'immobilisation utilisées pour accrocher les bioéléments sur le biorécepteur peuvent être classées selon le mode de fixation en deux catégories : le mode de fixation direct (ne faisant pas intervenir une couche d'accroche intermédiaire entre le substrat et l'élément biologique) et le mode indirect.

I-1-2- 1- Fixation directe

I-1-2- 1- 1- Adsorption physique

L'adsorption est un phénomène physique de fixation de molécules sur la surface d'un solide. La fixation provient de l'établissement de trois phénomènes entre le solide et les molécules :

- Les forces de dispersion (Van der Waals)
- Les forces polaires résultant de la présence de champs électriques dans les micropores.
- Les liaisons hydrogènes dues aux groupements hydroxyles ou amines.

Ce processus d'adsorption physique consiste à mettre la zone sensible du capteur en contact avec l'élément biologique à détecter pendant quelques instants, de rincer et de sécher[32]. Cette technique est peu dénaturante pour les biomolécules. De plus, la limite basse de la sensibilité du capteur va se trouver nettement améliorée puisqu'il n'existe aucun type de membrane ou de barrière entre le détecteur et le milieu à analyser [33]. La régénération du capteur et le dépôt d'une nouvelle couche sont facilités. En revanche, cette méthode présente l'inconvénient d'être basée sur des processus réversibles. La désorption peut survenir durant la phase de mesure et la faible quantité de produit fixé au substrat diminue fortement la limite de détection [32, 33]. Cette méthode peut s'avérer très coûteuse étant donnée la grande quantité de produit nécessaire pour obtenir le seuil de détection minimum.

Un autre inconvénient important de ce type de dépôt est le manque de reproductibilité [33, 34]. Pour limiter les phénomènes de désorption et pouvoir mieux contrôler les quantités fixées, il est possible d'établir des liaisons d'énergie beaucoup plus forte que celles entrant en jeu lors de l'adsorption physique.

I-1-2- 1- 2- Confinement

Il est également envisageable de conserver l'élément sensible près de la surface du capteur sans toutefois le lier physiquement à cette même surface. Il s'agit de la technique de confinement. Dans ce cas, le biorécepteur, qui va rester libre en solution à l'intérieur d'un compartiment fermé par une membrane sélective et semi-perméable, conserve une activité maximale. Cette technique, bien qu'offrant en théorie d'excellents résultats est très peu utilisée du fait de la complexité et du coût de sa mise en œuvre.

I-1-2- 1- 3- Technique de Langmuir-Blodgett

Cette technique consiste à emprisonner le biorécepteur entre deux monocouches de composés amphiphiles (composés possédant à la fois des groupes hydrophiles et des groupes hydrophobes) grâce à des forces électrostatiques.

La littérature [35, 36] décrit clairement la procédure de mise en œuvre de cette technique. En raison du phénomène de capillarité⁵, le film se fixe sur le substrat avec une bonne adhérence et constitue une structure mono-moléculaire pratiquement exempte de défauts. En procédant à plusieurs passages, il est possible d'empiler ainsi plusieurs dizaines de monocouches (la limite possible est dépendante du type de molécule). Cette technique présente l'avantage de créer des interfaces adaptées aux capteurs de gaz [35, 36].

Ses principaux atouts sont :

- l'organisation des couches au niveau moléculaire,
- la fabrication de la couche sensible en une seule étape,
- des temps de réponse très courts du fait de la très fine épaisseur de la membrane,
- enfin, un des grands avantages pour les biocapteurs concerne l'inclusion d'éléments biologiques. Dans ce cas, la structure des films obtenus est très proche de celle d'une membrane biologique [37].

En revanche, cette technique nécessite un appareillage très spécifique et un savoir faire du point de vue chimique très important. De plus, la stabilité de l'édifice moléculaire reste médiocre en solution.

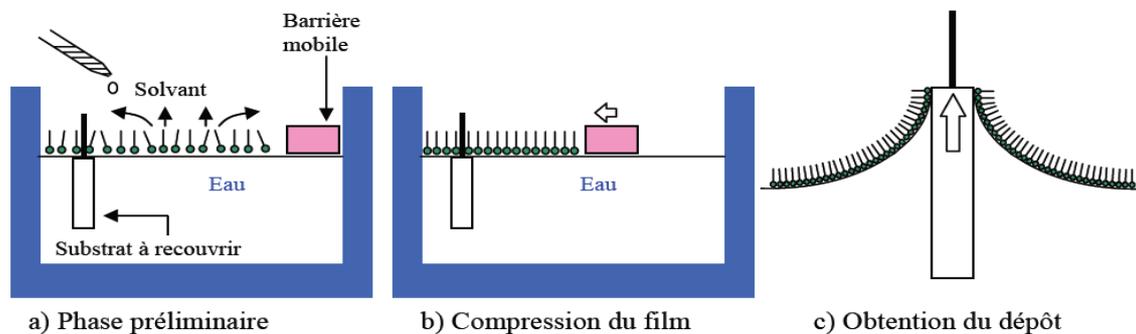


Figure 3: Réalisation du dépôt de couche de Langmuir - Blodgett

I-1-2- 1- 4- Liaisons covalentes

Un autre mode de fixation sur une surface est la création de liaisons covalentes entre le substrat et la particule à immobiliser. Le couplage covalent se fait généralement avec un support fonctionnalisé insoluble dans l'eau. Lorsque cette technique est utilisée avec un

⁵ **Capillarité** : étude des interfaces entre un liquide et une surface, un liquide et l'air ou entre deux liquides non miscibles. Elle est connue par l'effet d'un liquide à forte tension superficielle remontant contre la gravité dans un tube très fin (tube capillaire). La tension superficielle est proportionnelle à la force de cohésion intermoléculaire du liquide concerné. Plus les molécules du liquide ont une cohésion forte, plus le liquide est susceptible d'être transporté par capillarité.

élément biologique, la réaction ne doit pas impliquer les sites essentiels à l'activité biologique de la molécule.

De façon générale, l'attachement covalent d'une entité biologique (enzyme, anticorps, protéine...) à la surface d'un capteur se fait en deux étapes. La première étape consiste en l'activation de la surface inerte du capteur, afin de lui donner une réactivité chimique. La seconde étape nécessite de lier le biorécepteur à cette surface chimiquement activée. La nature exacte des réactions chimiques impliquées dépend fortement du type de surface choisi. Le tableau IV ci-dessous présente quelques exemples de capteurs réalisés par le biais de la fixation covalente de récepteurs chimiques ou biologiques [32].

Tableau IV: Quelques exemples d'applications de greffage covalent

| Récepteur immobilisé | Agent de fixation | Surface | Eléments détectés | Ref |
|--|--|--|--|----------|
| Acide dicarboxylique AE ₆ | Chlorure de p-toluène sulfonyle | Si/SiO ₂ | Fer | [38] |
| Chaînes aromatiques | Réactif de grignard, espèces lithium aryl | Si | NO _x , SO _x , CO, NH ₃ | [39] |
| Oligonucléotides | Epoxyasilane, 3-amino- propyltriéthoxysilane | Si/SiO ₂ | ADN | [40-51] |
| Anticorps | Ethoxysilane, alkylthiols | SiO ₂ , Au | Antigènes associés | [52-59] |
| Uréase | Carbodiimide | Si/SiO ₂ | Urée | [60, 61] |
| Pénicillinase | Carbodiimide | Non spécifié | Pénicilline | [32] |
| Laccase | ABTS ⁶ (sel d'ammonium) | Pt | p- phényl- diamine p-aminophénol | [62] |
| Glucose oxydase | MES ⁷ (acide sulfonique) | In ₂ O ₃ SnO ₂ | Glucose | [32] |
| Acétylcholinestérase Organophosphate hydrolase | Amine silanisation, sulfurhydryl-silanisation | SiO ₂ | Organo- phosphate | [63-66] |

⁶ **ABTS** : sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). Ce composé est utilisé pour tester l'activité antioxydante d'un produit. L'activité antioxydante totale d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical ABTS••, obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)).

⁷ **MES** : 2- acide sulfonique de l'éthane (4-Morpholino)

Cette technique peut être utilisée pour le greffage de récepteurs très variés sur des substrats tout aussi variés. La tendance générale laisse apparaître une méthode modifiée originale à la création de liaisons covalentes entre l'élément et le substrat. De plus en plus souvent, une couche intermédiaire est insérée. Cette technique d'immobilisation par liaison covalente est celle ciblée par nos travaux. En effet, au cours du processus, notre molécule d'ancrage doit être solidement liée au substrat si bien qu'il n'est pas possible par simple processus de lavage et/ou de désorption de les séparer. Ce processus doit utiliser en plus une molécule facilement et rapidement synthétisable, très réactive, nécessitant de faible coût de réactifs. Ce qui nous permet de gagner en temps et en coût de fabrication contrairement au processus classique d'immobilisation utilisant les SAM (Self Monoassembled Layer). Notre processus d'immobilisation sera revu et détaillé dans la partie expérimentale.

I-1-2- 2- Fixation indirecte

Il s'agit de lier le biorécepteur sur une surface via une couche de composé intermédiaire. L'utilisation des polymères est de plus en plus courante dans des domaines tels que la médecine où ils sont utilisés dans certains procédés chirurgicaux notamment oculaires, comme implants artificiels, prothèses ou bien dans les systèmes de distribution automatique de médicaments. Dans le domaine des biotechnologies, les polymères servent déjà couramment de support pour l'immobilisation des biorécepteurs classiques : protéines, anticorps, oligonucléotides... Les polymères sont sélectionnés suivant différents critères tels que leur résistance mécanique, leur dégradabilité, leur perméabilité, leur solubilité ou encore leur transparence. Et, dans tous les cas, il est nécessaire d'optimiser leurs propriétés surfaciques et volumiques. L'avantage des polymères par rapport aux autres matériaux comme les métaux ou les céramiques, est de pouvoir modifier leur composition pour obtenir une plus grande variété de structures et de propriétés.

Les polymères envisagés dans le cadre de cette thèse sont conducteurs, présentent l'avantage que le matériel biologique immobilisé peut être décroché électrochimiquement par application d'un potentiel cathodique. Ce qui constitue un réel avantage économique car le même substrat peut être utilisé pour détecter plusieurs types d'agents pathogènes. L'étude des polymères conducteurs et de leurs intérêts dans les biocapteurs sera détaillée au paragraphe I-3.

I-1-3- Domaines typiques d'applications des biocapteurs

Le but de notre travail étant de développer une méthode alternative de détection de microorganismes pathogènes présents dans l'agroalimentaire, nous avons dans un premier temps fait l'état des lieux de ce qui existe déjà sur le marché afin d'y apporter une valeur ajoutée par la méthode alternative (plus précisément une nouvelle surface spécifique et une méthode de caractérisation qui raccourcissent le procédé d'analyse) que nous développerons.

Le tableau V ci-dessous recense quelques domaines d'applications des biocapteurs et leurs usages.

Tableau V: Domaines d'applications des biocapteurs

| Domaine d'application | Types de biocapteur | Utilisation |
|-----------------------|---------------------|--|
| Agroalimentaire | optique | - quantification des divers acides carboxyliques comme l'acide ascorbique (dans les jus de fruits) et l'acide citrique (fruits, jus de fruits, boissons pour sportifs) [21] |
| | | - l'évaluation du taux d'antioxydant (les polyphénols) dans l'huile d'olive, le vin et le thé vert [67] - détection des contaminants (pathogènes, pesticides, microorganismes et toxine) [2, 8, 10-17]; - détection de sulfaméthazine dans le lait et dans des échantillons de bile de porc, en utilisant un seuil déterminé de 0,4 µg/ml ; |
| Station d'épuration | ampérométrique | - mesure des métaux lourds (Cr, Mn, Mo) [8, 9] - mesure de polluants organiques (cyanure d'éthyl-n-dimethylphosphoramide, phosphonofluorure d'isopropylmethyl, |

| | | |
|---------------|----------------|---|
| | | <p>phosphonofluorure de picacolyméthyle),</p> <ul style="list-style-type: none"> - détection de carbamate⁸(carbofuran : 0,01nM) [5-7, 68]; - mesure de pesticides organophosphorés de concentration de l'ordre de 10^{-12} mol /l [11] |
| Santé | ampérométrie | <ul style="list-style-type: none"> - estimation du glucose, urée [69], cholestérol, glutamate[2-4]; - concentration du lactate dans le sang des athlètes pour prévenir la fatigue musculaire et les crampes [16] ; - détection de l'éthanol dans le souffle, la salive et le sang humain [16] ; - permet d'étudier l'effet des pesticides sur les paramètres cytogénétiques et biochimiques des souris et leurs embryons [70] ; - détection des pathogènes à l'exemple du <i>Mycobacterium tuberculosis</i>, <i>Vibrio cholerae</i>, <i>Treponema pallidum</i> ; <i>salmonella</i> [71] ; - traitement de la maladie d'Alzheimer [72] |
| Environnement | potentiométrie | <ul style="list-style-type: none"> - détection du trichlorfon⁹(2.10^{-4}nM)[69] - détection des composés organophosphorés (toxiques)[5-7, 17, 22, 25, 28] |

⁸**Carbamate** : Les **carbamates** ou **uréthanes** sont une famille de composés organiques porteur d'une fonction R-HN-(C=O)O-R'. Il s'agit des esters substitués de l'acide carbamique ou d'un amide substitué.

⁹**Trichlorfon** : 2,2,2-Trichloro-1-hydroxyéthylphosphonate de diméthyle : une substance active ou une préparation phytopharmaceutique ayant la propriété de tuer les acariens.

| | | |
|--|--------------|--|
| | ampérométrie | - détection des composés phénoliques : phénols, catéchols ¹⁰ , guaiacols ¹¹ et crésols ¹² [73, 74] - détection de l'atrazine (5μM)[75] |
|--|--------------|--|

La miniaturisation et l'automatisation sont une nécessité permettant une diminution des temps d'analyse.

Pour de nouvelles applications, il convient de produire des supports de plus grande qualité permettant l'immobilisation d'une grande variété de sondes. Dans les parties suivantes, nous ferons le point sur les types de supports utilisés dans la littérature pour immobiliser les biomolécules et nous nous attarderons enfin sur les supports élaborés au cours de cette thèse pour une capture encore plus rapide, plus sensible et spécifique des microorganismes.

¹⁰ **Catéchol** : Le catéchol est un noyau benzène avec deux groupements hydroxyles substitués adjacents

¹¹ **Guaiacol** : Le guaiacol est un composé organique aromatique naturel retrouvé aussi dans la créosote de bois (présent dans la fumée de bois car produit de la combustion de la lignine). Cette substance peut provoquer les troubles neurologiques, l'acuité visuelle, le cancer et les troubles de reproduction chez l'homme.

¹² **Crésol** : Le crésol est un mélange des trois isomères du méthylphénol (CH₃-C₆H₄OH) en position ortho-, méta- et para-, qui sont tous d'odeur désagréable, mais moins toxiques que le phénol ordinaire.

I-2- La fonctionnalisation de surfaces

La fonctionnalisation des surfaces a fait depuis longtemps partie des procédés industriels de fabrication d'objets divers, que ce soit pour des raisons cosmétiques ou pour lutter contre la corrosion des métaux. De plus en plus, de nouvelles fonctions sont ajoutées aux surfaces des objets, et de nouveaux procédés sont mis au point pour assurer des fonctions déjà existantes, en réponse aux enjeux économiques ou environnementaux. Les procédés de traitement ou de « fonctionnalisation » des surfaces sont extrêmement variés, faisant intervenir des domaines technologiques tels que :

- Produire des groupes fonctionnels spécifiques à la surface pour des interactions spécifiques avec d'autres groupes fonctionnels (molécules, peptides, protéines, cellules) ;
- Augmenter l'énergie de surface ;
- Augmenter l'hydrophobicité ou l'hydrophilicité ;
- Rendre la surface plus inerte chimiquement ;
- Induire une réticulation de surface ;
- Nettoyer la surface de contaminants ;
- Modifier la morphologie de la surface – augmenter ou diminuer la cristallinité et la rugosité de la surface ;
- Augmenter la conductivité électrique en surface ;
- Diminuer le coefficient de frottement ;
- Rendre les surfaces imperméables aux gaz et aux liquides ;
- Augmenter la mouillabilité pour permettre l'impression (« dyeability » ou « printability »).

Les fonctions recherchées ont, par exemple, des propriétés données de réflectivité optique, d'anticorrosion, bactéricides, d'auto-nettoyage, d'adhésion, de mouillage, de frottement, de sensibilité à des espèces chimiques données. Nous nous intéresserons dans cette partie au cas du traitement de surfaces par greffage de fonctions moléculaires sur des substrats spécifiques conduisant à terme à la détection efficace et rapide d'un analyte cible.

I-2-1- Fonctionnalisation de surfaces pour l'immobilisation des biomolécules

La fonctionnalisation permet de créer à la surface du support des fonctions chimiques réactives, c'est-à-dire des fonctions permettant la fixation par liaison covalente d'une molécule biologique. L'immobilisation de biomolécules peut être définie comme toute technique qui limite la migration libre de ces biomolécules [76].

L'immobilisation de protéines, et en particulier d'enzymes, sur des supports solides, est à l'origine d'un grand nombre d'applications. Leur immobilisation sur support solide permet généralement d'augmenter leur stabilité au cours du temps. Le développement de capteurs demande initialement la mise au point de supports fonctionnalisés pour divers types de biomolécules (anticorps, enzymes, ADN).

La notion d'inertie chimique et le faible coût constituent les qualités primordiales recherchées pour les matériaux constituant les supports. D'où l'intérêt de fonctionnaliser les surfaces de manière covalente, utilisant des molécules très réactives, facilement et rapidement synthétisables. Opération qui permet de gagner un temps énorme par rapport au protocole traditionnel d'immobilisation de biomolécules. Plusieurs techniques existent pour fonctionnaliser un support et sont citées ci-après.

I -2-1- 1- Fonctionnalisation par le groupement Azlactone

Plusieurs travaux dans la littérature décrivent très clairement la fonctionnalisation d'un support par copolymérisation du vinyl-diméthylazlactone et du méthylènebisacrylamide. Le cycle azlactone positionné en surface permet d'immobiliser toute espèce nucléophile, par exemple des espèces possédant les fonctions amines [77-79]. Ainsi la fonctionnalisation du polypropylène (PP) avec du 2-vinyl-4,4-diméthylazlactone (VDM) a été réalisée dans le but d'immobiliser la séricine, une protéine contenue dans la soie [79]. Dans la littérature [77], l'azlactone est également utilisé pour immobiliser une enzyme comme la Penicilline G Acylase. Les interactions entre le support et l'enzyme dans ce cas sont de type liaison hydrogène et interaction hydrophobe entre les deux entités. L'auteur de la littérature [78] utilise le support fonctionnalisé à l'azlactone pour immobiliser les protéines A et G.

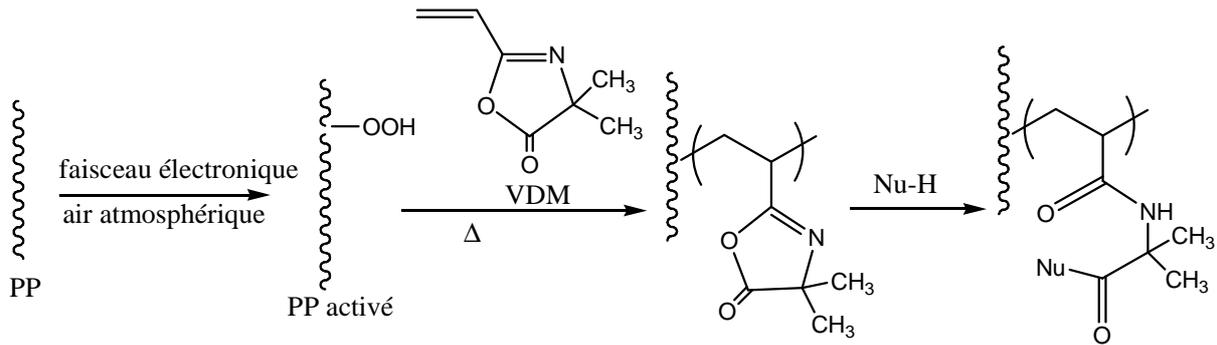


Figure 4: Fonctionnalisation du polypropylène par le 2-vinyl-4,4-diméthylazlactone

I-2-1-2- Fonctionnalisation par les Self Mono-Assembled layer (SAM)

I-2-1-2-1- Fonctionnalisation par le SAM d'acide mercapto-undécanoïque

Les SAM constituent une voie d'organisation de molécules biologiques à la surface d'un métal noble en utilisant des monocouches de longues chaînes de molécules organiques possédant des fonctionnalités diverses (-SH, -COOH, -NH₂). L'immobilisation des biomolécules à travers les SAM a déjà fait ses preuves d'efficacité dans plusieurs travaux récents dans la littérature. Les SAM sont connus pour former des liaisons stables dans le temps avec des thiols sur une surface d'or et pour leur reproductibilité [80].

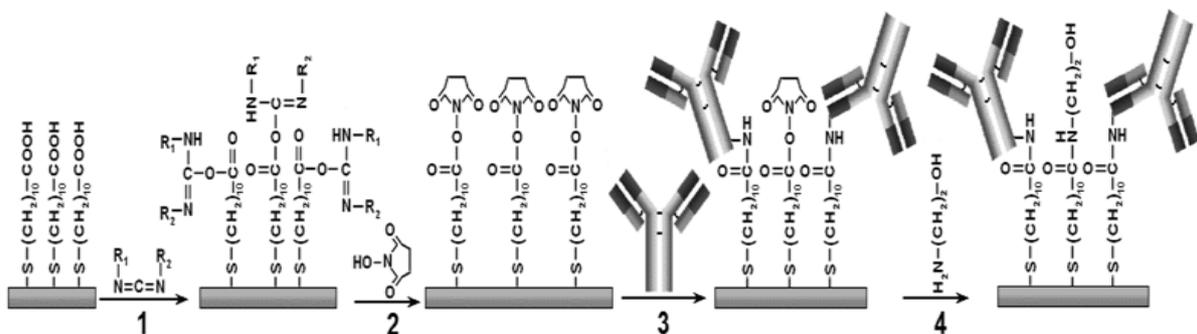


Figure 5: Fonctionnalisation de l'or par le SAM de l'acide 11-mercapto-undécanoïque[80]

Cette technique permet une flexibilité¹³ remarquable avec le respect de la fonctionnalité terminale, une bonne orientation du bioélément et limite des interactions non spécifiques [80]. Le cas présent du SAM a une extrémité terminale en groupement succinimide qui est connu

¹³ **Flexibilité** : La facilité avec laquelle un système ou composant peut-être modifié pour une utilisation dans des applications ou environnements autres que ceux pour lesquels il a été spécifiquement conçu.

comme un bon groupement partant. La présence d'un nucléophile substitue très rapidement ce groupement. Les systèmes SAM peuvent être réutilisés et trouvent également des applications dans les dispositifs de type fluide [80]. En revanche, la formation de SAM nécessite plusieurs types de réactifs, plusieurs étapes de préparation et donc des temps de réactions importants.

I-2-1-2-2- SAM du mélange d'acide 11-mercaptoundécanoïque et 6-mercaptohexanol

Ce protocole est explicité dans la littérature [81-84] et conduit à l'immobilisation de la protéine A sur le SAM formé. L'utilisation du N-hydroxysuccinimide(NHS) et du N'-ethyl-N-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimidehydrochlorure(EDC) permet d'estérifier les fonctions acides carboxyliques de l'acide 11-mercaptoundécanoïque. Cette fonctionnalisation avec l'acide et l'alcool possédant des longueurs de la chaîne carbonée différentes permet d'éviter les effets stériques lors de la fixation du groupement N-chlorosuccinimide et aussi lors de l'immobilisation du bioélément.

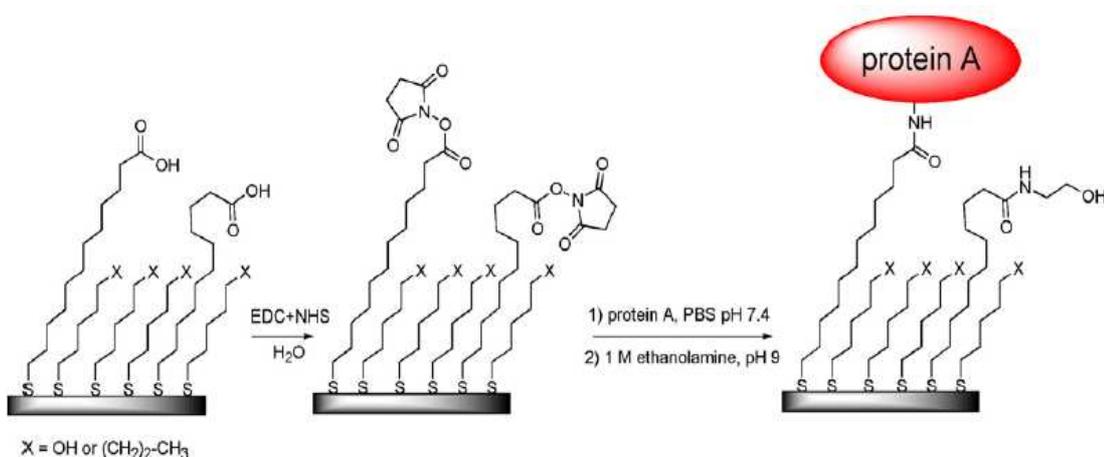


Figure 6: Fonctionnalisation de l'or par le SAM du mélange acide 11-mercaptoundécanoïque et le 6-mercaptohexanol

I -2-1-2-3- Fonctionnalisation par les Self Mono-Assembled layer (SAM) de l'acide 16-mercapto-6-decanoïque (16-MHA) complexé par un métal

Cette fonctionnalisation est utilisée dans la littérature [85] pour immobiliser efficacement un anticorps. Ici, le SAM est préparé à partir d'un mélange de thiols mixtes d'acide 16-mercapto-6-decanoïque (16-MHA) et du 1-undecanethiol de rapport molaire (1 :20). Le substrat utilisé est une plaque d'or. Les fonctions acides carboxyliques du 16-MHA ont été complexées par

le zinc (Zn) en exposant le substrat fonctionnalisé à la solution éthylque de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. Cette fonctionnalisation est particulièrement adaptée pour une détection de la cible avec la technique de résonance des plasmons de surface (SPR) et est inspirée de celle utilisée pour l'immobilisation des anticorps sur des supports chromatographiques en utilisant des ions métalliques [86, 87]. Les ions métalliques induisent l'orientation des anticorps et préservent leurs propriétés de reconnaissance biologique [85]. En revanche, le problème qui se pose pour les autres SAM se pose également ici en terme de perte de temps de conception.

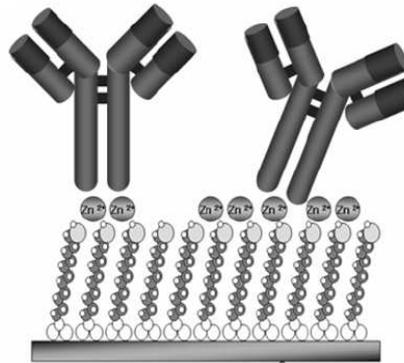


Figure 7: Fonctionnalisation de l'or par le SAM de l'acide 16-mercaptohexadécanoïque complexé par le Zn

I-2-1-3- Fonctionnalisation par les hydrogels (dextran)

Toujours pour orienter l'anticorps en surface, le dextran peut aussi être utilisé pour fonctionnaliser le substrat. Le dextran est un polysaccharide (composé de molécules de dextrose) de poids moléculaire très élevé. Comme dans le cas des SAM, la littérature [80] décrit le mode opératoire de cette fonctionnalisation.

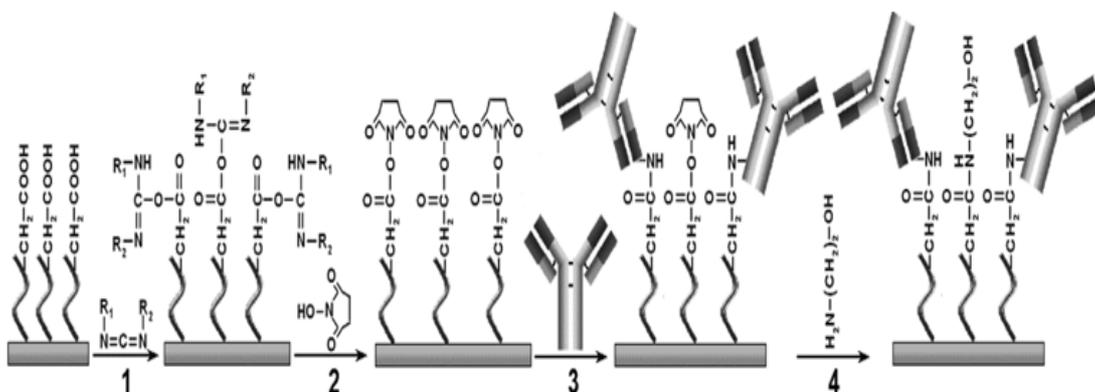


Figure 8: Fonctionnalisation du support par un hydrogel: carboxyméthyl dextran

L'orientation de l'anticorps pour la détection d'une cible spécifique exige que les sites de reconnaissance de la cible soient disponibles après la fixation de l'anticorps (ceci est détaillé au chapitre II sur l'immobilisation des biomolécules), ce qui oblige à choisir un processus qui permet à l'anticorps de se fixer sur la surface fonctionnalisée à travers son fragment Fc (Fragment cristallisable). La bonne orientation, comme illustrée à la figure 7, correspond à un positionnement en Y sur les fonctionnalisations. La fonctionnalisation de surface au dextran permet d'immobiliser une bonne partie de l'anticorps dans la bonne orientation et on note une augmentation de la concentration du bioélément à la surface [80]. Cependant, les molécules de bioélément sont orientées au hasard et beaucoup d'entre elles peuvent « dysfonctionner » à cause des effets stériques. La mauvaise orientation peut résulter du fait que les chaînes de l'anticorps, étant constituées d'acides aminés ; et l'immobilisation de l'anticorps sur la surface fonctionnalisée se faisant par réaction chimique entre une fonction amine de l'anticorps et le groupement carboxyle de la surface fonctionnalisée ; tout groupement amine de l'anticorps pourrait amorcer cette réaction. La polarité de la surface fonctionnalisée (molécule de dextrose) peut également induire l'adsorption de l'anticorps sur la surface.

I-2-1-4- Fonctionnalisation par un polymère contenant des unités sucres sulfonés

La procédure de cette fonctionnalisation est décrite dans la littérature [88]. Elle consiste à synthétiser les « brosses polymériques » (assemblage de polymères dont l'une des extrémités est reliée à une surface) dans le but de contrôler in vitro les problèmes de coagulation sanguine. D'autres travaux similaires utilisent cette procédure pour immobiliser un anticorps [89] et l'ARNase avec une reproductibilité d'immobilisation de l'enzyme 30 fois supérieure à celle observée avec les SAMs [90]. L'avantage d'utiliser ce type de fonctionnalisation est la possibilité de contrôler la quantité de polymère déposé, l'épaisseur de la couche et la structure (blocs de copolymères par exemple). De plus, elle présente l'avantage par rapport aux SAMs d'offrir des niveaux de fonctionnalité élevés, un revêtement plus important et possède une structure facile à modifier et à fonctionnaliser [88]. Cette synthèse consiste en l'estérification du ω -undécylénol par le bromure de 2-bromoisobutyle suivie une hydrosilylation à partir du trichlorosilane et du catalyseur de Karstedt. La figure 9 illustre le mécanisme de cette fonctionnalisation.

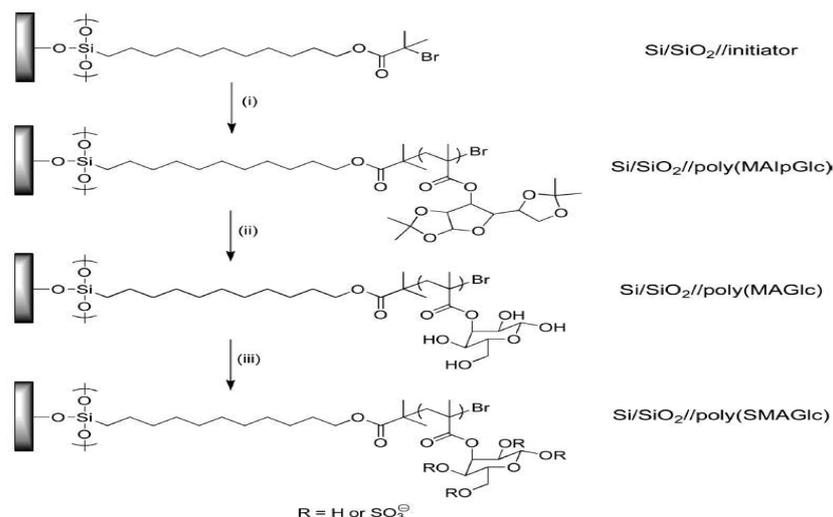


Figure 9: Fonctionnalisation du Si par un polymère porteur de glucofurasose

I-2-1-5- Fonctionnalisation par les molécules d'ester maléimide et succinimide

La littérature [91] illustre le protocole de cette fonctionnalisation. Celle-ci présente une alternative de fonctionnalisation de la surface d'or par un linker de maléimide. Cette fonctionnalisation a permis d'immobiliser une chaîne du fragment variable d'un anticorps humain d'extrémité C-cystéine terminale. L'avantage de cette fonctionnalisation est qu'elle ne procède que par deux étapes et est ainsi plus rapide que la fonctionnalisation par les SAMs.

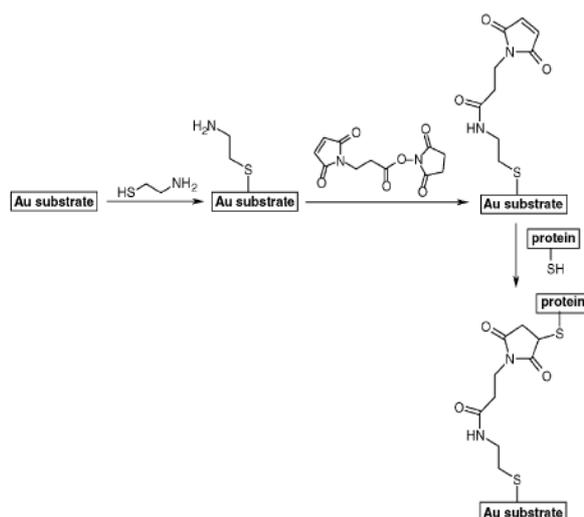


Figure 10: Fonctionnalisation de l'or par l'ester N-maléoylsuccinimidyl

I-2-1-6- Fonctionnalisation de particules magnétiques par le dextran

Un anticorps peut également être retenu sur une surface par des forces électromagnétiques [92]. Ici, les particules magnétiques sont utilisées comme support solide pour détecter une combinaison de protéines de choc thermique¹⁴ et les anticorps. Ces particules magnétiques peuvent être associées au dextran pour immobiliser les biomolécules et dans ce cas, l'association entre la biomolécule et le substrat se fera par réaction chimique. Il n'y a pas de lien covalent dans le cas d'immobilisation par les particules magnétiques ; et par conséquent, le capteur peut être réutilisé. De plus, les propriétés magnétiques de ces particules sont stables dans le temps car elles ne sont pas affectées par les produits chimiques et il ya possibilité de les utiliser en circulation microfluidique. Ces particules possèdent aussi une grande surface spécifique et peuvent être liées à plusieurs ligands à la fois [92]. La difficulté dans cette technique est qu'il y a formation d'agrégats, la nécessité de travailler sous atmosphère inerte et dans l'obscurité, avec plusieurs étapes de préparation. La figure 11 illustre la fonctionnalisation de surface à partir de particules magnétiques.

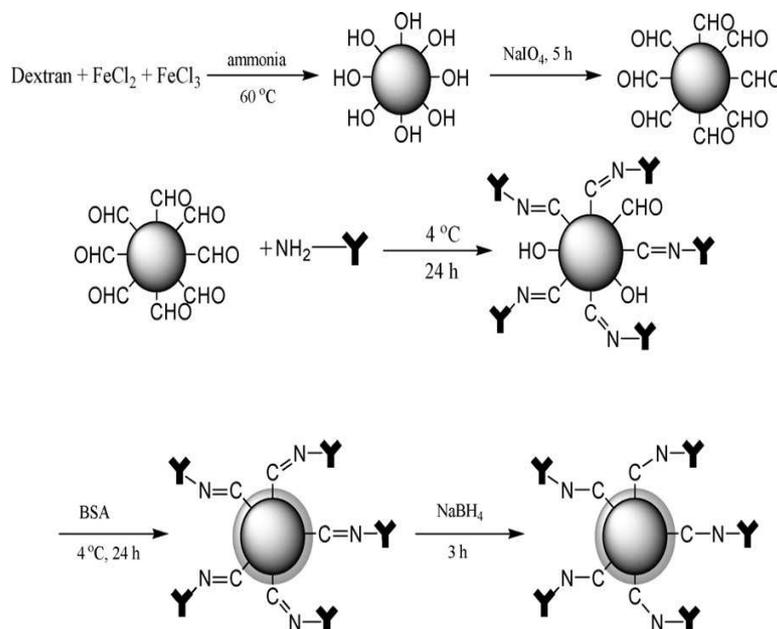


Figure 11: Fonctionnalisation des particules magnétiques de FeCl_2 et FeCl_3 par le dextran

¹⁴ **Protéine de choc thermique** : Tout groupe de protéines synthétisées en réponse à l'hyperthermie, l'hypoxie ou autres stress, qui permettraient aux cellules de se rétablir du stress, peut-être en favorisant le rétablissement de l'expression génétique.

I-2-1-7- Fonctionnalisation de nanoparticules de Fe_3O_4 par le bleu de Prusse et le glucooxydase pour la détection du glucose

Les nanoparticules magnétiques présentent plusieurs propriétés à savoir : grande surface active, grande bioactivité, excellente stabilité. Elles procurent un bon contrôle magnétique des procédés bio-électrocatalytiques de détection de l'analyte [93]. La procédure de fonctionnalisation est décrite dans la littérature [93] où elle est utilisée pour préparer un biocapteur de détection du glucose par des nanoparticules de Fe_3O_4 contenant du bleu de Prusse et du glucooxydase attiré à la surface du carbone par des forces magnétiques. La difficulté dans ce protocole reste le nombre d'étapes requis par conséquent une grande perte de temps pour la fonctionnalisation.

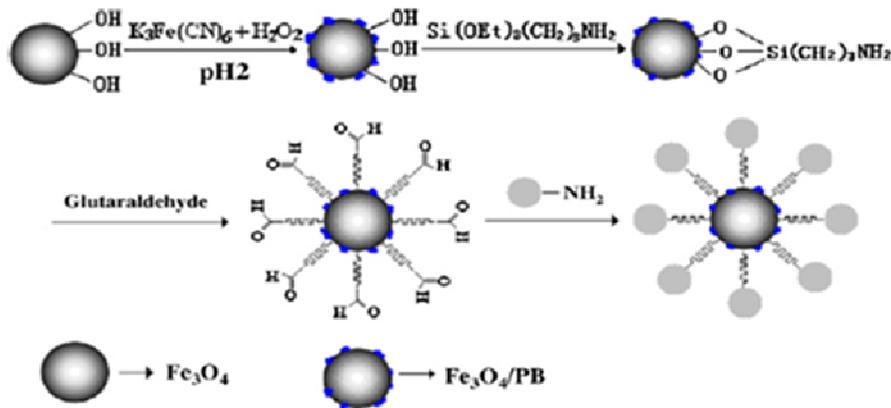


Figure 12: Fonctionnalisation de nanoparticules de Fe_3O_4 par le bleu de Prusse et le glucooxydase pour la détection du glucose

I-2-1-8- Fonctionnalisation du polystyrène par des nanoparticules magnétiques

Celle-ci est utilisée pour immobiliser des protéines spécifiquement la streptavidine via la biotine qui a une grande affinité avec cette dernière [94]. Les biomolécules immobilisées de manière covalente sur des supports solides sont très stables comparées à celles obtenues par adsorption, mais leur activité se trouve un peu réduite comparée à celle des biomolécules en solution [95].

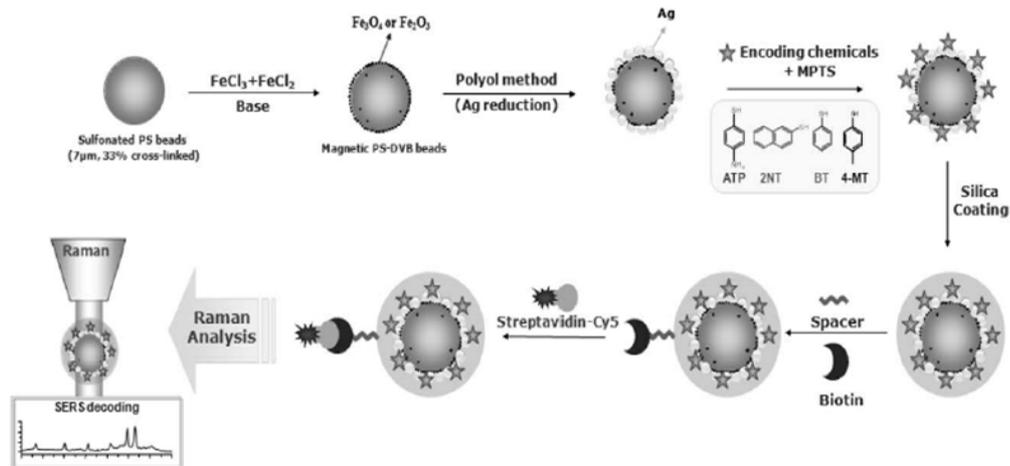


Figure 13: Fonctionnalisation du polystyrène sulfoné par des nanoparticules de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Fe}_2\text{O}_3$ pour la détection de la streptavidine

I-2-1-9- Fonctionnalisation par le sepharose NHS activé

Cette fonctionnalisation est décrite dans la littérature [96] et démontre une approche d'immobilisation des protéines (glutathione S-transferase et l'anti sérum bovine albumine) sur un support solide par une réaction catalytique de transglutaminase. Cette procédure préserve mieux la fonctionnalité des protéines après immobilisation que les autres techniques d'immobilisation. En revanche, le rendement d'immobilisation est faible comparé à ceux des autres techniques et l'excessivité des réactifs et étapes de fonctionnalisation perdue comme dans les autres protocoles.

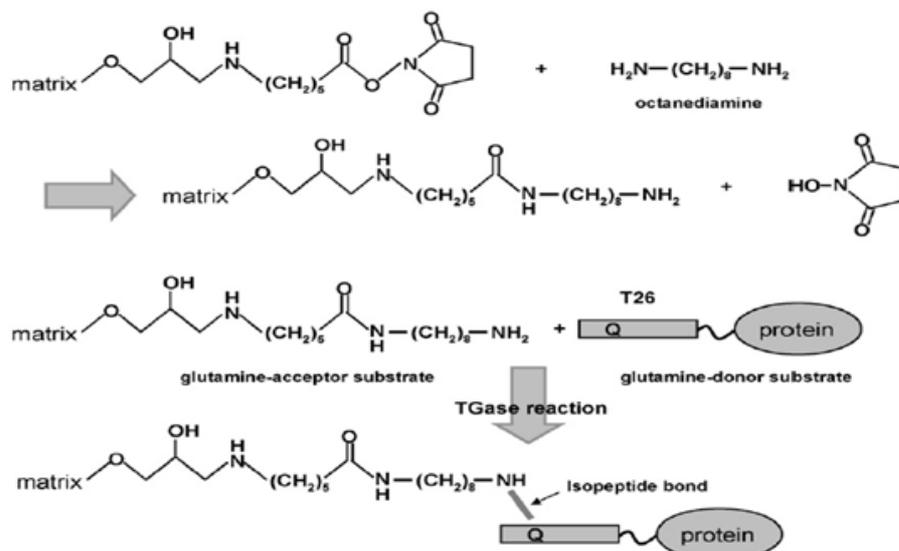


Figure 14: Fonctionnalisation par la sépharose activée pour la détection d'une protéine

I-2-1-10- Modification de la surface par plasma hors équilibre basse pression

Le plasma est un gaz ionisé, électriquement neutre dans lequel se côtoient des ions, des espèces moléculaires ou atomiques excitées, des radicaux, des électrons et des photons. Les plasmas froids basse pression sont des milieux lumineux obtenus en soumettant un gaz à l'action d'un champ électrique ou électromagnétique à basse pression (0,1 à 10^4 Pa). Les phénomènes de base de la physico-chimie des plasmas reposent sur le processus de collision et de transfert d'énergie entre une molécule ou un atome et un électron accéléré par un champ électromagnétique. Lors de ces collisions inélastiques, l'électron transfère une partie de son énergie à la molécule ou à l'atome et modifie leur énergie interne. Cela conduit à l'apparition d'espèces gazeuses réactives de type radicalaire permettant de développer la chimie spécifique au plasma [97]. Ce type de plasma est dit froid car la température macroscopique du gaz reste voisine de la température ambiante. Ceci permet de modifier chimiquement la surface sans altérer les propriétés de cœur des matériaux très sensibles aux effets de la température.

Les avantages de cette technique par rapport à la voie chimique sont les suivants [98] :

- une homogénéité de la surface ;
- une amélioration de l'adhésion de support ;
- une bonne résistance chimique et physique ;
- une modification de la surface sans modifier les propriétés du cœur (bulk) ;
- une possibilité d'application sur différents supports comme les métaux, les polymères, les céramiques, les verres avec différentes géométries de surface ;
- une possibilité d'introduction de différentes fonctions comme amines, aldéhydes, acides carboxyliques, hydroxyles.

En conclusion

Il existe de nombreuses techniques d'immobilisation des biomolécules sur supports, utilisées pour une grande variété d'applications :

- biomédicale ;
- biocapteur ;
- bioréacteur.

L'immobilisation se fait dans la majorité des cas par un ancrage covalent de la biomolécule via une modification chimique utilisant des aldéhydes, des esters activés, des maléimides ou des époxydes (les linkers). L'immobilisation par liaison covalente permet d'obtenir des liaisons solides entre bioélément et support et paraît ainsi la mieux adaptée pour réaliser des systèmes performants sur de longues durées. Bien que ces stratégies soient largement utilisées, elles souffrent de certaines limitations telles que la perte de fonctionnalité due à la dénaturation de la biomolécule, des adsorptions non spécifiques (surtout pour des substrats fonctionnalisés polaires) et parfois une orientation au hasard de la biomolécule durant le processus d'immobilisation. De plus, ces techniques nécessitent plusieurs étapes de préparations et donc des besoins en temps significatifs. Afin de répondre aux problèmes posés par ces différentes techniques, nous avons travaillé sur la synthèse de surfaces spécifiques très réactives, permettant un couplage covalent de la biomolécule, rapide et facile à mettre en œuvre, nécessitant peu de réactifs et d'étapes de synthèse. Nos travaux se sont orientés vers deux types de surface : le polythiophène décrit dans la partie qui présente l'avantage d'être conducteur et offre la possibilité de pouvoir décrocher les éléments biologiques après leur ancrage et une surface d'or fonctionnalisée selon une méthode alternative qui sera présentée dans la partie résultats de cette thèse.

I-3- Le polythiophène (PT)

Les polymères conducteurs constituent une classe de matériaux qui possèdent à la fois les propriétés des polymères organiques et les conducteurs inorganiques ou semi-conducteurs [99]. Le développement de ces derniers a commencé en 1970 avec la mise en évidence d'une conductivité de type métallique de l'ordre de 10^3 S/cm pour le polynitrure de soufre $(-S=N-)x$. Depuis lors, les chercheurs proposèrent d'autres composés présentant des propriétés analogues. C'est ainsi qu'en 1977, les professeurs Mac Diarmid, Heeger et Shirikawa découvrent qu'il est possible de moduler la conductivité électrique du polyacétylène moyennant l'introduction contrôlée de molécules donneuses ou accepteuses d'électrons faisant passer le polymère de l'état isolant à l'état conducteur. Cette découverte fut récompensée par le prix Nobel en 2000 [100].

I-3- 1- Applications des polythiophènes

Le polythiophène et ses dérivés obtenus par oxydation chimique ou électrochimique du monomère ont fait ces dernières années l'objet d'un grand nombre d'études de par leurs potentielles applications : dans les capteurs et biocapteurs, en électrochimie [101] et dans les cellules photovoltaïques [102-104], pour le stockage d'énergie, les transistors à effet de champs, les diodes électroluminescentes¹⁵ [102, 104-111] (on peut émettre de la lumière en appliquant une tension électrique à une fine couche d'un polymère conducteur), pour les capteurs de gaz [112]. Cette découverte a permis la mise au point d'écrans ultraplats, tels que les écrans utilisant des OLED (*organic light emitting diode*), des panneaux solaires ou des amplificateurs optiques et les protections de revêtements, les applications de stockage de mémoire [102-104, 106, 109, 111, 113-133]. Ces polythiophènes présentent plusieurs avantages : faible coût de fabrication, flexibilité de leurs structures et peuvent ainsi substituer la technique traditionnelle utilisant le silicium¹⁶ [123, 134-136].

¹⁵ **Principe de l'électroluminescence dans les films de polymère** : L'électron est injecté dans le polymère par la cathode et le trou par l'anode. Ainsi, le polymère peut être oxydé d'un côté et réduit d'un autre côté. L'électron et le trou migrent à l'intérieur du film de polymère. Lorsqu'ils se rencontrent, ils se combinent et émettent ainsi de la lumière. La fréquence de la lumière émise est à peu près égale à la différence entre le potentiel d'oxydation et de réduction du polymère.

¹⁶ **Technique traditionnelle du silicium** : Cette technique représente actuellement 99% du marché des modules photovoltaïques. Le silicium est l'un des éléments les plus abondants sur terre, parfaitement stable et non toxique. On trouve plusieurs technologies pour le photovoltaïque silicium : d'une part les cellules à base de silicium massif (monocristallin, polycristallin, rubans) dites de « première génération » et qui constituent à l'heure actuelle l'essentiel des modules photovoltaïques commercialisés et d'autre part la technologie à base de silicium en couche mince.

Ces polymères conjugués peuvent passer répétitivement de l'état isolant à l'état conducteur avec un fort contraste en couleur. Ce sont ainsi des matériaux électrochromiques¹⁷ dans la technologie d'outils électrochromiques [137]. En général, on peut considérer deux catégories d'applications pour les polymères conducteurs : Les applications statiques et les applications dynamiques. Les applications statiques sont basées sur la conductivité électrique intrinsèque des matériaux, combinée avec la facilité de traitement et les propriétés communes aux polymères. Les applications dynamiques utilisent les modifications des propriétés optiques (photo et électroluminescence, susceptibilité non-linéaire¹⁸) et de conduction dues soit à l'application de potentiels électriques, soit à des stimuli environnementaux.

Comme application statique, nous avons le poly(3,4-éthylènedioxythiophène)-poly(styrènesulfonate) (PEDOT:PSS) employé de manière extensive comme revêtement antistatique (comme matériau d'emballage pour composants électronique). Le PEDOT peut aussi être employé en application dynamique lorsqu'un potentiel est appliqué au film de polymère. Dans ce cas, les propriétés électrochimiques du PEDOT sont utilisées pour produire des miroirs pouvant devenir opaques ou réfléchissants lors de l'application respective d'un courant électrique.

Pour l'application des polythiophènes dans les transistors, les porteurs de charges doivent présenter une grande mobilité, un rapport de courant entrant/sortant élevé et une grande stabilité à long terme [123].

L'intérêt particulier des polythiophènes réside dans la possibilité de les fonctionnaliser en position 3 et 4 du cycle thiophène par un autre groupement fonctionnel, ce qui modifie également leurs propriétés physiques [121, 124]. Ils sont très stables et peuvent être dopés positivement et négativement. Les oligothiophènes sont très prometteurs pour les semi-conducteurs organiques de type p (capacité à donner les électrons). La facilité de modification de la structure chimique de ces composés permet de moduler leurs propriétés optiques¹⁹ et électriques²⁰[138]. Cependant, les unités thiophènes non substitués sont généralement insolubles dans les solvants organiques (à cause de leur forte polarisabilité)

¹⁷ **Electrochromisme** : Propriété démontrée par certaines espèces chimiques de changer de couleur de manière réversible lorsqu'une charge électrique leur est appliquée.

¹⁸ **Susceptibilité non linéaire** : la façon dont la polarisation d'un milieu dépend du champ électrique auquel il est soumis.

¹⁹ **Propriétés optiques** : Les propriétés optiques dépendent des stimuli environnementaux, avec des modifications drastiques de couleur selon le solvant, la température, le potentiel appliqué, et les liaisons à d'autres molécules. Les changements de couleurs et de conductivité sont induits par le même mécanisme ; la torsion du squelette polymère, rompant la conjugaison, ce qui fait d'eux des capteurs chimiques donnant une large gamme de réponses électroniques et optiques.

²⁰ **Propriétés électriques des matériaux** : Les propriétés électriques sont déterminées par la réponse que fournit un matériau lorsqu'il est soumis à un champ électrique. L'application d'un tel champ conduit à deux types de réactions distinctes. Il peut provoquer un flux de charges électriques dans le matériau, qui s'arrête dès que l'on supprime le champ, mais qui reste toutefois irréversible. Dans ce cas le matériau est dit conducteur. Tout au contraire, l'application de ce champ électrique peut provoquer une séparation entre les charges positives et les charges négatives, qui conduisent à la formation d'une structure dipolaire, mais qui disparaît à la suppression du champ. Le matériau est appelé diélectrique.

[139]. Ce qui permet d'accentuer les recherches sur les voies et méthodes de modification de la structure de ces unités pour les rendre plus solubles. Afin de mieux les solubiliser, une option consiste à ajouter des substituants volumineux sur les squelettes conjugués de manière à stabiliser stériquement les chaînes en solution [112, 129, 137-150]. Cette solubilité dans les solvants organiques courants augmente avec la longueur du groupe alkyle substitué en position 3 et la diminution du degré de polymérisation [145]. La substitution en position 3 du cycle thiophène avec un groupement donneur d'électron permet d'abaisser le potentiel d'oxydation et évite ainsi la suroxydation [101]. La substitution avec un groupement alkyl sulfonate permet d'accroître la solubilité dans l'eau. Ces différents substituants sont à l'origine d'une répulsion stérique entre les chaînes ce qui limite fortement leur agrégation. L'ajout d'un tel groupement modifie également la géométrie du monomère et introduit une dissymétrie au sein de la molécule. Cette dissymétrie a une double conséquence. D'une part, les sites du monomère capables de créer une liaison n'ont plus la même réactivité et/ou la même accessibilité et un certain type d'enchaînement est favorisé. D'autre part, la manière dont les unités répétitives s'enchaînent modifie la conjugaison. Une autre voie, beaucoup moins utilisée jusqu'à présent, consiste à introduire sur le squelette conjugué des chaînes latérales plus courtes mais porteuses de charges électrostatiques. Dans ce cas, les polymères conjugués deviennent des polyélectrolytes²¹ conjugués hydrosolubles. Le potentiel répulsif stabilisateur est cette fois à longue portée [151].

I-3- 2- Principe de la conduction

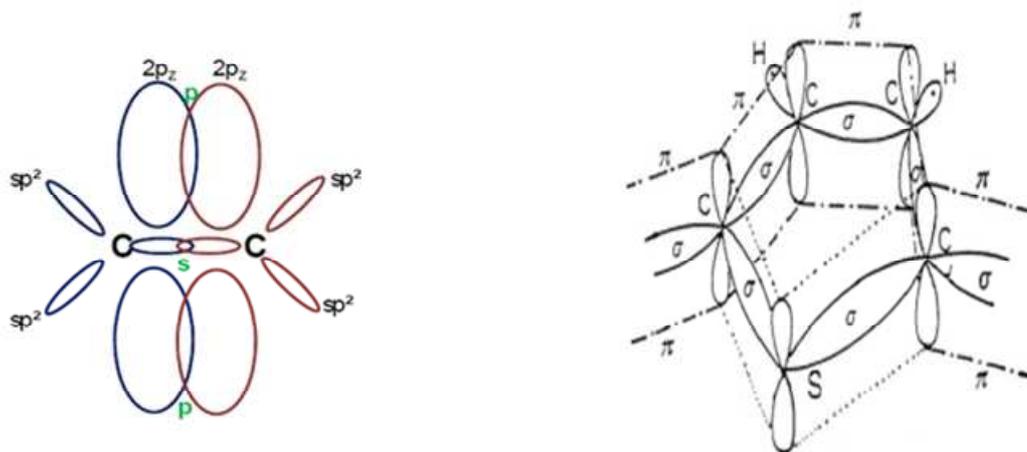
Dans tout matériau, la conductivité électrique résulte du transport de charges électriques. Les charges positives sont accélérées dans le sens du champ électrique appliqué, et les charges négatives sont accélérées dans le sens inverse. Lorsque ces charges sont des électrons, on parle de conduction électronique ; ce qui représente le cas le plus courant des matériaux conducteurs [131]. Dans les polymères, le caractère conducteur est dû à la présence d'un système conjugué, c'est à dire à l'alternance de liaisons simples et doubles entre atomes de carbone le long de la chaîne du polymère.

Lorsque deux atomes de carbone sont reliés par une double liaison, l'atome de carbone est dit d'hybridation sp^2 (carbone trigonal) : il possède 4 électrons de valence, mais n'a que 3 voisins. Ainsi, l'un des électrons de valence du carbone trigonal, appelé électron π , se situe

²¹ **Polyélectrolytes** : La structure des solutions de polyélectrolytes conjugués résulte de la compétition entre deux forces antagonistes : d'une part l'attraction de Van der Waals entre les squelettes conjugués rendus hydrophobes par la délocalisation des électrons ! et d'autre part la répulsion électrostatique induite par les charges localisées des groupements latéraux

sur une orbitale atomique p_z qui pointe perpendiculairement aux orbitales hybrides sp . Le recouvrement de deux orbitales p_z de deux carbones voisins, doublement liés, forme une orbitale moléculaire π (liaison π) comme le montre la figure 15 :

Ainsi, l'électron peut passer librement d'un atome de carbone à un autre. Si les atomes voisins possèdent eux aussi une orbitale p_z , comme dans le cas du thiophène, un système d'orbitales π délocalisées se crée le long de la chaîne. Ce système continu d'électrons π est à l'origine de la conduction dans les matériaux organiques.



a) Représentation des orbitales π et σ de la molécule simple d'éthylène

b) Représentation des orbitales π et σ du motif thiophène

Figure 15: Représentation des orbitales moléculaires ; a) Ethylène, b) Thiophène

La conductivité dépend aussi d'autres facteurs tels le nombre de porteurs de charge et leur déplacement le long de la chaîne du polymère. Le poly(3-alkylthiophène) dopé avec des accepteurs d'électrons tels que I_2 , $FeCl_3$, AsF_3 possède une conductivité plus élevée que sa forme originale [145]. Dans leur état initial (non dopé), les polymères conducteurs sont de simples semi-conducteurs ou des isolants [152, 153]. Leur caractère conducteur électrique apparaît lorsqu'ils sont dopés par des donneurs ou les accepteurs d'électrons (c'est-à-dire lorsque les électrons ou les trous sont injectés dans le système π conjugué de ces polymères). Dans le poly(3-alkyl thiophène), plus le groupement alkyl est long, plus la conductivité du film diminue [152].

Plusieurs études ont montré que la conductivité²² des films de polymères π conjugués varie avec l'exposition à certains gaz (N_xO_y , S_xO_y , CO , NH_3 , H_2S , H_2O , CH_4 , C_3H_8) [35, 112, 154, 155].

²² **Conductivité électrique** : La conductivité électrique est l'aptitude d'un matériau à laisser les charges électriques se déplacer librement. La conductivité est la résultante de la délocalisation électronique le long de la chaîne polymère, d'où parfois leur qualification de « métaux synthétiques ».

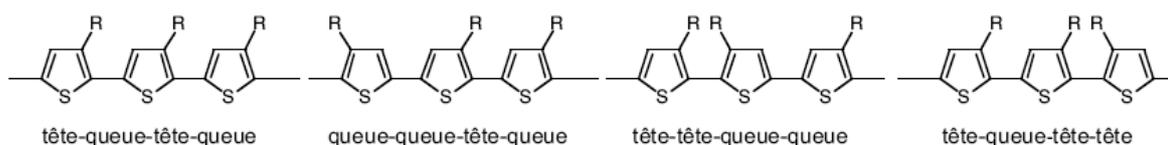
On note par exemple la sensibilité du polythiophène à l'oxyde d'azote (NO_2) et au sulfure d'hydrogène (H_2S) et celle du polypyrrole à l'ammoniac. La sensibilité du polypyrrole à l'ammoniac est due à la présence de l'atome d'hydrogène relié à l'atome d'azote sur le cycle pyrrole alors que le polythiophène ne présente pas de liaison hétéroatome - hydrogène dans sa structure. Hanawa *et al* ont rapporté dans leurs travaux que la résistance des polythiophènes est de l'ordre de plusieurs $\text{k}\Omega$ lorsqu'ils sont fabriqués avec des appareils sensibles aux gaz. En effet, le NO_2 décroît la résistance du film de polythiophène tandis que H_2S et NH_3 augmente cette résistance. Les autres gaz comme CH_4 , C_3H_8 , C_3H_6 , CO , SO_2 , NH_3 n'ont aucun effet remarquable sur la résistance du polythiophène [154]

I-3- 3- Stabilité et comportement des polymères conducteurs

Les polythiophènes sont thermodynamiquement stables [122, 156]. Ils sont plus stables en présence d'oxygène et d'humidité que leur homologue polypyrrole [154]. Leurs usages dans les batteries rechargeables, les fiches électrochromiques et les appareils électroniques ont été démontrés [154, 157].

I-3- 3- 1- Régiorégularité des polythiophènes

La régiorégularité est le taux d'enchaînement régulier de motifs monomères asymétriques le long de la chaîne polymère. Elle permet une bonne organisation des chaînes polymères entre elles qui se traduit par un π stacking et l'obtention d'une structuration lamellaire du polymère favorisant le transport de charge. Le taux de régiorégularité constitue le paramètre caractéristique des chaînes formées. Deux monomères peuvent s'enchaîner de trois manières différentes. L'enchaînement tête-queue (TQ) résulte d'un couplage entre les positions 2 et 5' de deux monomères successifs. Les enchaînements tête-tête (TT) et queue-queue (QQ) sont issus de couplages entre les positions 2 et 2' et 5 et 5' respectivement. La régiorégularité de la chaîne est définie à partir des enchaînements possibles de trois monomères successifs. Il existe statistiquement quatre différents arrangements possibles au sein d'une triade.



La régiorégularité des chaînes a une influence directe sur la délocalisation des électrons π . Celle-ci est maximale lorsque tous les motifs monomères sont en conformation planaire.

L'introduction de groupements latéraux génère une répulsion stérique entre eux et une rotation des unités répétitives le long de la chaîne. La planéité de la macromolécule est considérée comme maximale si l'enchaînement TQTQ prédomine. En première approximation, une maîtrise de la régiorégularité TQTQ des chaînes est donc essentielle pour maximiser les propriétés électroniques des polythiophènes. Toutefois, une plus grande conjugaison présente un inconvénient non négligeable. En effet, plus la délocalisation est importante, plus la polarisabilité des chaînes augmente. Dans le cas où la répulsion stérique due au groupement latéral est trop faible, les chaînes s'agrègent. Afin d'aboutir à des chaînes moléculairement dispersées possédant des caractéristiques satisfaisantes, il est nécessaire de trouver un compromis entre la taille du groupement latéral, la régiorégularité des chaînes et la délocalisation des électrons π . La figure 16 représente l'arrangement des chaînes de polythiophènes à la surface de l'électrode.

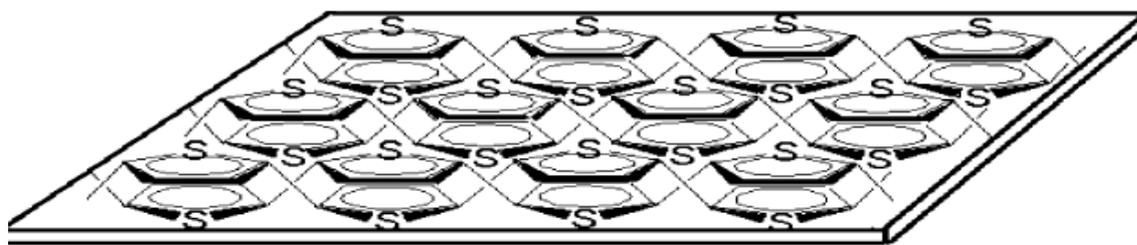


Figure 16: Arrangement des chaînes de polythiophène à la surface de l'électrode[158]

Les propriétés physiques (c'est à dire : conductivité, stabilité... etc) dépendent de la nature et de la régiorégularité des polymères. Il a été démontré que le degré de régiorégularité a une influence sur la conformation, la longueur de la conjugaison, la cristallinité et les propriétés des porteurs de charge[115]. Siringhaus *et al* ont également démontré que le degré de régiorégularité et la masse molaire ont un impact majeur sur l'organisation des chaînes de polymères (lorsque ceux-ci sont préparés par spin coating). Par exemple, lorsque l'on a une bonne régiorégularité (~ 96% de liaison T-Q) et une masse moléculaire élevée, le poly (3-hexylthiophène produit des cristallites²³ dans lesquelles les chaînes ont une direction d'empilement π parallèle au plan du film (voire figure 17). Ce qui est le contraire dans le cas des faibles masses moléculaires et faible régiorégularité (~81 % T-Q), où le poly(3-hexylthiophène forme de petites cristallites avec un empilement π perpendiculaire au plan du film [115].

²³ **Cristallites** : cristal de dimensions extrêmement réduites

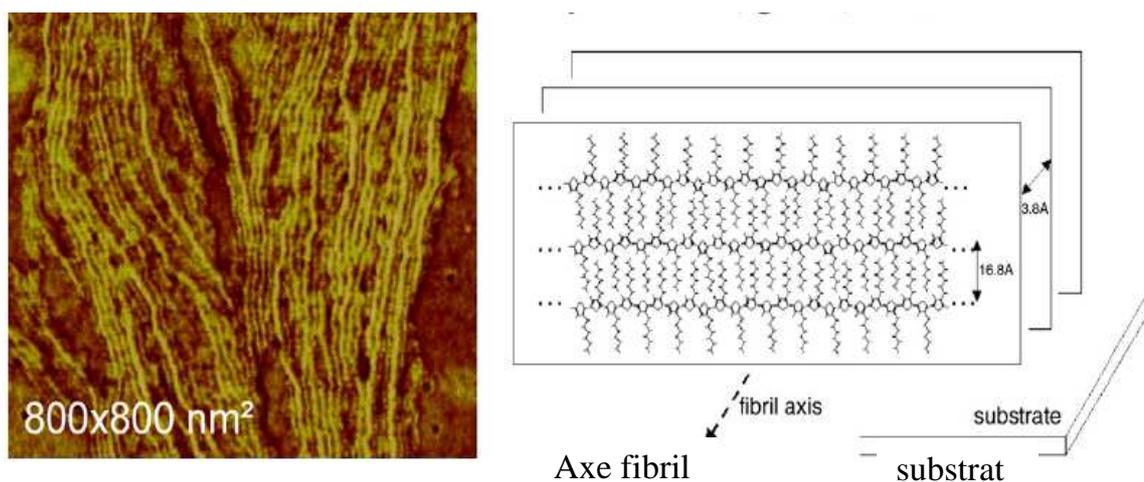


Figure 17: Image AFM du poly (3-hexylthiophène) régiorégulier sur verre et mode d'empilement des chaînes [115]

I-3- 3- 2- Méthodes de synthèse des polythiophènes

Les polythiophènes sont généralement synthétisés de trois manières :

- Par oxydation électrochimique (transformation de la matière sous l'influence d'un courant électrique) autrement appelée électropolymérisation. On obtient le polymère sous forme dopé.
- Par polymérisation chimique
- Par couplage organométallique [122, 137, 140, 159-162]. Ces deux dernières méthodes conduisent à la formation du polymère à l'état neutre.

I-3- 3- 2- 1- Electropolymérisation

I-3- 3- 2- 1-1- Mécanisme d'électropolymérisation

Dans une polymérisation électrochimique, le monomère, dissous dans un solvant approprié contenant le sel dopant est oxydé à la surface de l'électrode par application d'un potentiel anodique (d'oxydation). Le choix du solvant et de l'électrolyte (sel dopant) est d'une importance capitale car ils doivent être stables au potentiel d'oxydation du monomère et produire un milieu ionique conducteur. Deux mécanismes possibles sont proposés pour l'électropolymérisation oxydative des composés hétérocycliques à 5 atomes : Le couplage radical- radical et le couplage radical- monomère[99].

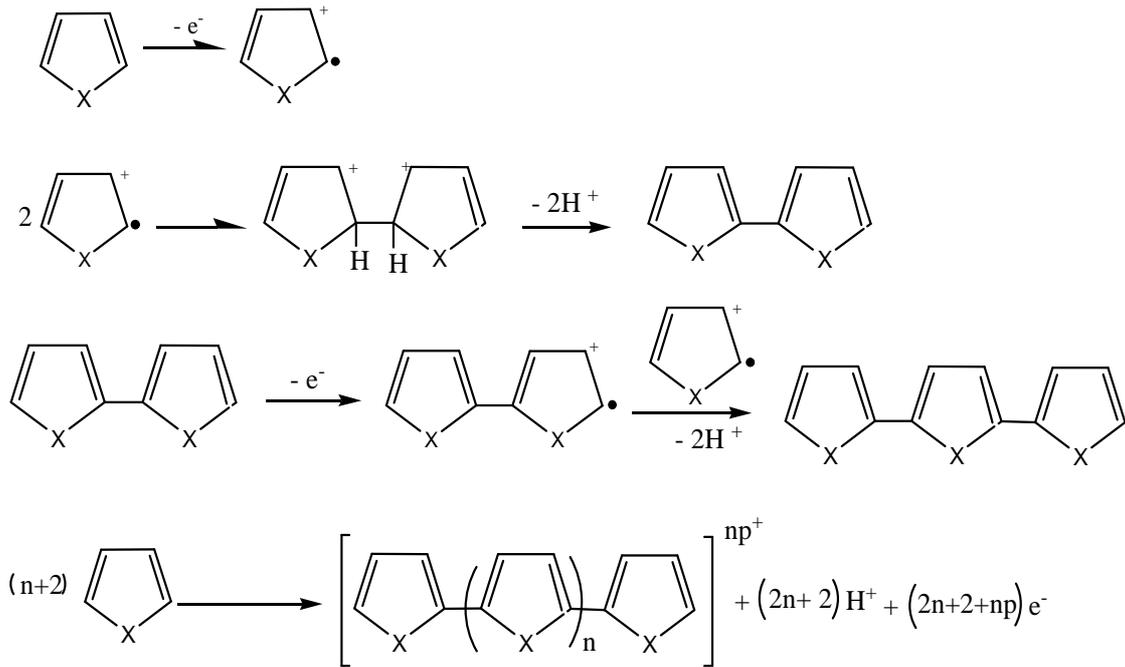


Figure 18: Mécanisme par couplage radical-radical

Après oxydation, le monomère donne un radical cation, qui se combine à un autre radical cation pour former un dimère bicationique qui va ensuite se déprotonner (perdre 2 hydrogènes) pour donner un dimère neutre. Ce dimère neutre va aussi s'oxyder pour donner un autre radical cation dimérique qui se combinera à un radical cation monomérique pour donner un trimère. La réaction s'enchaîne pour finalement former le polymère de chaîne plus étendue. Ce mécanisme est plus utilisé pour l'électropolymérisation du pyrrole en polypyrrole.

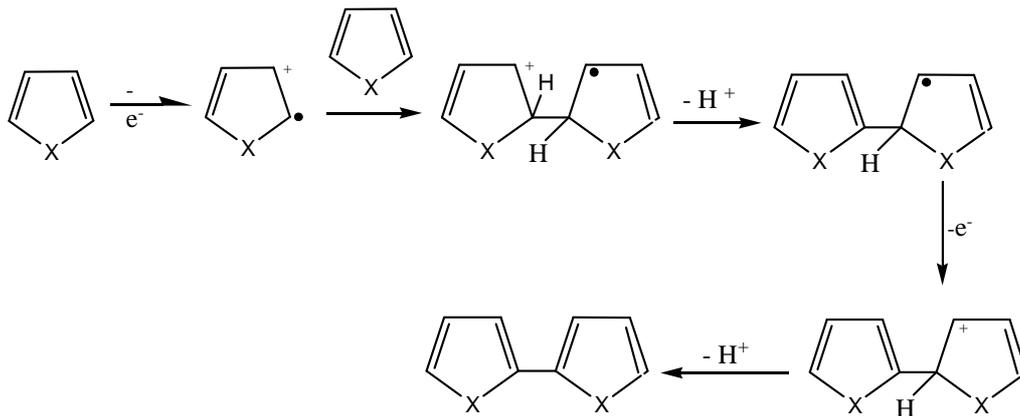


Figure 19: Mécanisme par couplage radical-monomère

Dans ce mécanisme, le radical cation formé par perte d'un électron au monomère réagit directement avec un autre monomère pour former un dimère cation. Ce dimère cation perd un autre électron et 2 protons pour former un dimère neutre. Ce deuxième mécanisme est celui

adopté pour l'électropolymérisation du thiophène et ses dérivés. Ce qui donne le mécanisme final suivant pour la synthèse électrochimique du polythiophène.

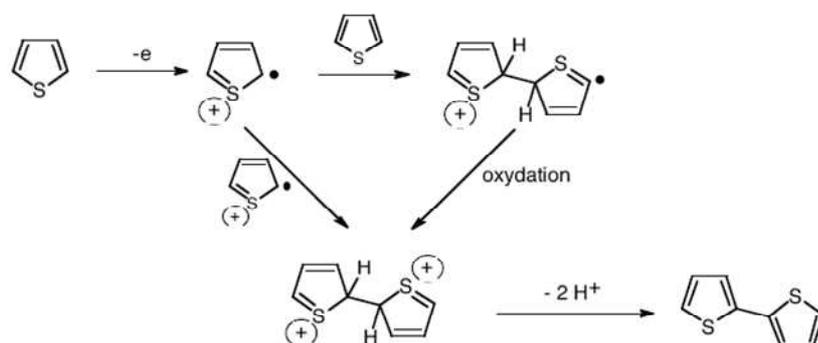


Figure 20: Mécanisme de synthèse électrochimique

L'état final des chaînes de polythiophène formées par électropolymérisation dépend grandement des paramètres expérimentaux. Suivant la nature de l'électrode, l'intensité du courant, la température, le solvant utilisé, la concentration en monomère, il est possible d'obtenir des chaînes linéaires ou branchées.

L'électropolymérisation présente plusieurs avantages [99] à savoir :

- De faibles quantités de monomères sont requises et on n'a pas besoin de catalyseurs ;
- Le polymère est obtenu directement sous forme de films minces ;
- L'épaisseur et la morphologie du polymère obtenu est contrôlable instrumentalement via les paramètres électrochimiques ;
- La thermodynamique du système peut être contrôlée par application de potentiel à l'électrode de travail ;
- La vitesse de la réaction peut être contrôlée via le courant à l'électrode de travail ;
- La polymérisation électrochimique donne rapidement des informations sur les caractéristiques et propriétés des matériaux électropolymérisés.

Néanmoins l'électropolymérisation présente quelques désavantages :

L'électrooxydation du thiophène requiert un haut potentiel (au dessus de 1,6V) avec l'électrode de calomel saturé comme électrode de référence dans la majorité des solvants. Ce haut potentiel pourrait irréversiblement dégrader la structure moléculaire conjuguée du film de polymère à cause de la suroxydation. Par conséquent, les films de polythiophène formés à partir des solvants électrochimiques sont de mauvaise qualité et d'assez faible conductivité [99].

Il est difficile de maîtriser parfaitement les masses des chaînes obtenues par cette méthode. De plus, la présence de nombreux couplages 2,4 entre monomères réduit de manière drastique

l'efficacité de la conjugaison. Enfin, les quantités de polymère sont généralement faibles et inférieures à celles obtenues par les synthèses chimiques.

Malgré tout, ce type de polymérisation est encore fréquemment utilisé car sa mise en oeuvre est pratique et ne nécessite aucune purification du produit.

I-3- 3- 2- 1-2- Dopage du polymère obtenu

Comme mentionné précédemment, le polymère conducteur à son état initial peut être semi-conducteur ou isolant. Pour le rendre conducteur, on procède à un dopage par un accepteur ou un donneur d'électron. Dans le cas d'accepteur d'électron, plusieurs électrons sont enlevés de la chaîne polymère. Lorsque la longueur de la chaîne du polymère est importante, les changements géométriques allant de l'état neutre à l'état ionique (monovalent ou divalent) sont limités à quelques cycles. La charge positive $+e$ et le spin $\frac{1}{2}$ sont localisés sur quelques cycles avec un changement de géométrie. Cette espèce ainsi formée est appelée polaron positif et correspond au radical cation [153] (voire figure 21). Le changement de géométrie et le transfert de charge sont dus aux interactions électron - trou. Lorsqu'un autre électron est enlevé au polaron positif, on obtient une charge $+2e^-$ localisée sur plusieurs cycles. L'espèce ainsi formée est appelée bipolaron positif (possède une charge $+2e^-$, le spin 0) et porte l'acronyme bication. Si le bipolaron est instable, il va conduire à la formation de deux polarons. Dans le cas du dopage par un donneur d'électron, le polaron négatif et le bipolaron négatif sont formés.

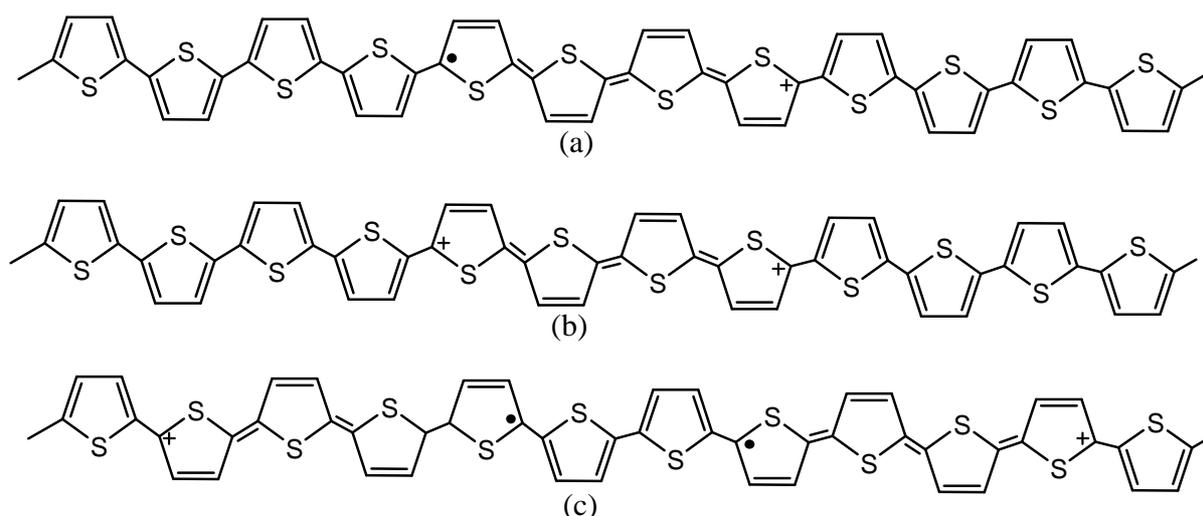


Figure 21: Structures schématiques du polaron positif (a), bipolaron positif (b), deux polarons positifs(c) dans le polythiophène

I-3- 3- 2- 2- Synthèse par polymérisation chimique

La polymérisation par voie oxydante a été décrite pour la première fois par Yoshino, Sugimoto et al. Elle consiste en une réaction chimique entre le monomère et un acide de Lewis²⁴. La plupart du temps, l'acide de Lewis considéré est le chlorure ferrique FeCl_3 mais d'autres réactifs sont également efficaces comme le chlorure de molybdène MoCl_5 , le chlorure de ruthénium RuCl_3 , le perchlorate de fer $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ ou l'acétylacétonate de vanadium ($\text{VO}(\text{acac})_2$) [151, 160].

Jen *et al.*, Osterholm *et al.* [163] se sont servis du réactif de Grignard²⁵ pour la préparation du poly (3-alkyl)thiophène. Sugimoto et al. quant à eux ont développé la polymérisation en une étape par oxydation du monomère à l'aide du chlorure ferrique (FeCl_3). Dans les deux cas de synthèse, on obtient un polymère dans lequel le cycle thiophène est essentiellement couplé 2,5 engendrant une délocalisation π accrue et complètement soluble dans les solvants organiques [122, 163, 164]. La polymérisation utilisant le chlorure ferrique comme oxydant/ catalyseur offre l'avantage par rapport au processus de Jen et al et Osterholm et al [163](utilisant le réactif de Grignard) d'être très facile à mettre en œuvre ; on obtient des polymères régioréguliers [165] et de plus haut poids moléculaire [157, 160].

Comme désavantage, cette méthode requiert une quantité stœchiométrique (condition qui consiste à mélanger les réactifs en respectant les proportions indiquées dans l'équation équilibrée) de chlorure ferrique et génère beaucoup d'effluents [122, 163].

Mécanisme de synthèse par FeCl_3

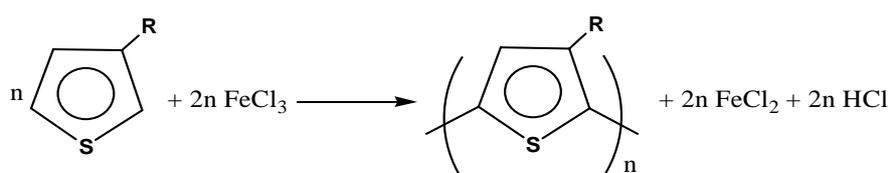
Malgré le nombre important d'études réalisées sur la polymérisation par voie oxydante, le mécanisme exact des réactions mises en jeu n'est pas encore parfaitement compris de même que les conditions expérimentales permettant un contrôle des masses molaires. Dans la littérature, il est généralement admis que la réaction a lieu à la surface des grains de chlorure ferrique FeCl_3 [163] qui possède un fort caractère d'acide de Lewis dû à l'orbitale vacante. C'est aussi ce caractère d'acide de Lewis qui explique la forte hygroscopie du FeCl_3 . Niemi *et al.* [163] ont décrit dans leurs travaux l'activité du FeCl_3 . Il en découle que la polymérisation à partir de cet acide de Lewis peut se réaliser en absence de solvant ou en

²⁴ **Acide de Lewis** : C'est une entité chimique dont un des atomes la constituant possède une lacune électronique, ce qui la rend susceptible d'accepter un doublet d'électrons

²⁵ **Réactif de Grignard** : C'est toute classe de réactifs organométalliques, ayant la formule générale RMgX , où R est un groupe organique et X est un atome d'halogène utilisé dans la synthèse de composés organiques.

présence de solvant qui ne solubilise pas complètement le chlorure ferrique. Par exemple, dans la synthèse où le FeCl_3 est complètement dissous dans le chloroforme, aucun polymère n'est formé. Le solvant est utilisé dans ce protocole pour dissoudre le polymère formé qui se précipitera ensuite à la surface de FeCl_3 et FeCl_2 et rendre le lavage du polymère difficile [163].

Selon la littérature, le monomère et le chlorure ferrique sont dissous dans le solvant à température ambiante suivant l'équation suivante :



Il a été démontré par *Niemi et al* que la polymérisation à partir du Chlorure ferrique par voie radicalaire procède comme suit :

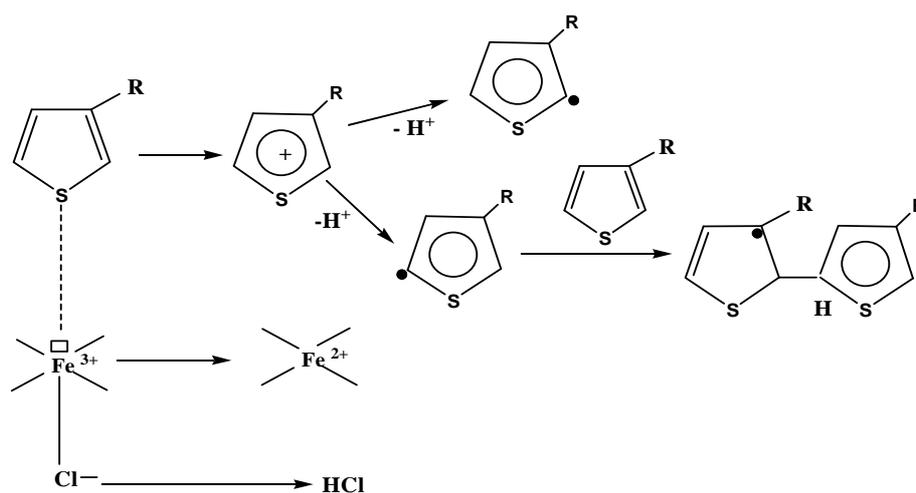


Figure 22: Mécanisme de synthèse chimique du polythiophène

I-3- 3- 2- 3- Synthèse par couplage organométallique

Pour parvenir à des chaînes de polymères présentant exclusivement un enchaînement tête – queue, tête- queue (TQTQ), différentes méthodes de synthèse ont été mises au point. L'idée principale est de synthétiser un monomère asymétrique pour lequel la réactivité des sites diffère. Dès le début des années 1990, l'utilisation d'halogènes pour fonctionnaliser les monomères a été largement développée. Cette méthode permet l'obtention de chaînes 100% régiorégulières TQ. L'activation du monomère doit être effectuée à très basse température (entre -40 et -80°C) pour n'aboutir qu'à un seul type de monomère substitué par un halogène

(en position 2) et un organomagnésien (en position 5). La polymérisation a lieu par ajout de catalyseur à température ambiante. Les conditions opératoires sont donc sévères. De plus, bien que la régiorégularité des chaînes soit améliorée, les produits synthétisés par cette méthode présentent une grande polydispersité. Une étape de fractionnement est donc indispensable comme dans le cas d'une synthèse par voie oxydante.

Cette synthèse a ainsi fait l'objet de plusieurs recherches par différentes équipes de recherche et les littératures [166-168] illustrent les protocoles expérimentales.

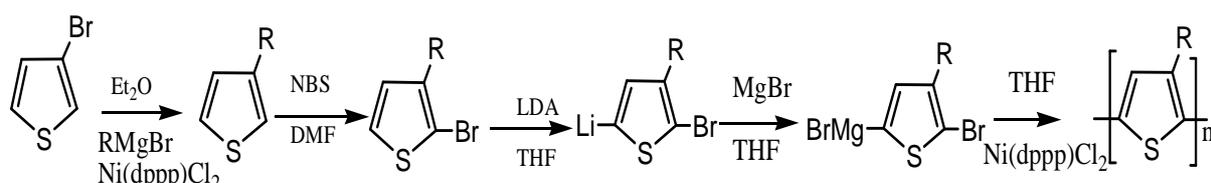
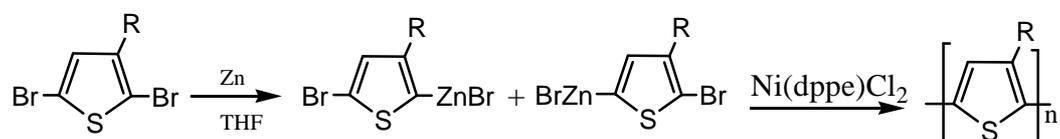


Figure 23: Mécanisme de McCullough d'une polymérisation contrôlée de poly(3-alkylthiophène)

La littérature [167] décrit la synthèse du même composé à partir de la réaction de Rieke (utilisant l'organozinc) et la régiorégularité a été obtenue avec un rendement de 98,5%. Voir le l'équation suivante :



Toutes ces techniques de polymérisation ont conduit à l'obtention d'un polymère régiorégulier de hauts poids moléculaires. En effet, la masse finale des chaînes est directement liée au rapport molaire entre les monomères et le catalyseur. De plus, la polydispersité²⁶ des échantillons reste faible (de l'ordre de 1.2) quelles que soient les masses des chaînes obtenues. Par cette méthode, il devient donc possible de synthétiser des poly(3-alkylthiophènes) à masse et à régiorégularité contrôlée. Cette voie est d'autant plus intéressante que les conditions réactionnelles sont peu exigeantes. En effet, la synthèse du monomère activé est faite à 0°C tandis que la polymérisation a lieu directement à température ambiante. A priori, cette stratégie de synthèse peut s'appliquer à d'autres substituants des thiophènes que les chaînes alkyles.

Elles présentent néanmoins un inconvénient du fait de l'usage des réactifs organométalliques souvent dangereux et toxiques et de la nécessité d'un monomère très pur pour le processus [122]. Dans le cadre de nos travaux, nous avons choisi une synthèse par voie électrochimique

²⁶ Polydispersité : La polydispersité est l'état d'une solution colloïdale dans laquelle les particules ont des dimensions très différentes

du poly(N,N-diéthyl-4-(2-thiophen-3-yl-éthoxyméthyl)benzènesulfonamide) qui est plus rapide, le polymère obtenu est autodopé et nécessite l'usage de très peu de solvants et de réactifs. Ce composé sera fonctionnalisé ensuite pour remplacer le groupement benzènesulfonamide en chlorure de benzènesulfonyle. Le groupement chlorure de sulfonyle constitue la fonction d'ancrage dans le cadre de notre projet pour capturer les molécules biologiques.

I-3- 4- Techniques de caractérisation des polythiophènes

Plusieurs techniques sont décrites dans la littérature pour caractériser les polymères conducteurs. Nous allons plus nous attarder sur celles concernant les polythiophènes. Nous pouvons citer la microscopie à force atomique (AFM) [127], la réflectivité des rayons X, l'absorption UV visible [140], la spectroscopie infrarouge [169], la résonance magnétique nucléaire proton et carbone (^1H et ^{13}C) [164], spectroscopie d'absorption électronique, la spectroscopie Raman. De toutes ces techniques, nous avons choisi la spectroscopie Raman comme principale technique de caractérisation et les raisons motivant notre choix sont décrites dans le paragraphe suivant.

Caractérisation par spectroscopie Raman

Beaucoup de travaux dans la littérature ont été réalisés sur les polythiophènes, à savoir leur synthèse et leur caractérisation par spectroscopie Raman. Nous citons le cas de *Louarn et al.* [170, 171] qui ont démontré dans leurs travaux que la spectroscopie Raman est un excellent outil pour l'étude des changements de structure induits par le dopage des chaînes de polymères conjugués. Le spectre Raman du poly (3-decylthiophène) est décrit ici et on note plusieurs bandes caractéristiques de ce polymère. Nous avons une bande à 1518 cm^{-1} attribuable à la vibration antisymétrique de liaison $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ du cycle thiophène, une bande entre 1445 et 1455 cm^{-1} attribuable à la vibration de déformation symétrique de la liaison $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$, une bande à 1378 cm^{-1} attribuable à la vibration de déformation $\text{C}_\beta\text{-C}_\beta$ du cycle thiophène. Deux bandes à 1210 et 1186 cm^{-1} dues à la vibration symétrique inter cycle $\text{C}_\alpha\text{-C}_\alpha'$ et la liaison de déformation $\text{C}_\beta\text{-H}$. Une bande à 1021 cm^{-1} due à la vibration $\text{C}_\beta\text{-C}_{\text{subst}}$. Cette bande serait absente dans le cas du monomère non substitué en position β et enfin une bande à 726 cm^{-1} caractéristique de la vibration de déformation de la liaison C-S-C du cycle thiophène. Outre les travaux de Louarn et al, Shi et al [172], Holze [173] ont rapporté les leurs

également sur la caractérisation des polythiophènes par spectroscopie Raman et ont observé les mêmes effets.

Il existe donc de nombreuses techniques d'investigation des polymères conducteurs plus particulièrement le polythiophène dont il est important de connaître les caractéristiques et les possibilités pour en faire une utilisation judicieuse. Les unes et les autres présentent des avantages et des inconvénients ; deux critères nous paraissent importants pour guider le choix :

- la quantité de matière nécessaire et le caractère non destructif de leur utilisation
- le type d'information atteint, analyse élémentaire ou moléculaire, structure cristalline, composition s'il y a mélange.

Dans cette optique, la spectrométrie Raman présente une spécificité intéressante qui en fait un outil analytique bien adapté à l'étude des matériaux polymères. Cette technique fera l'objet de notre prochaine partie et sera utilisée dans notre projet pour le suivi étape par étape du processus de synthèse et d'immobilisation des biomolécules. En outre, même si comme nous l'avons déjà souligné, la diffusion Raman n'est pas la seule technique adaptée à la caractérisation des polythiophènes. Elle est dans le cadre de ce projet de mise en œuvre d'un biocapteur via une double signature, la technique centrale de reconnaissance des éléments biologiques d'où son utilisation naturelle en amont pour l'étude des polymères.

I-4- Interaction rayonnement- matière

L'objet de ce paragraphe est d'expliciter la relation entre la matière et le rayonnement, qui véhicule une énergie liée à sa fréquence. Ainsi, par action d'une radiation lumineuse, il est possible de faire passer une molécule d'un état d'énergie E_1 vers un état d'énergie supérieure E_2 . Comme l'illustre la figure 24, si les radiations incidentes sont de faible énergie (longueur d'onde de l'ordre du millimètre), seule l'énergie de rotation de la molécule est modifiée : c'est la spectroscopie micro-onde ou hertzienne. Si le rayonnement incident est de forte énergie (visible et proche ultraviolet), le spectre obtenu est en général complexe en raison de la superposition de transitions de vibration et de rotation. L'interaction rayonnement - matière peut très schématiquement se diviser en trois classes de phénomènes : l'absorption, la diffusion et l'émission. L'absorption et la diffusion sont des phénomènes contribuant à l'affaiblissement d'un faisceau traversant un milieu matériel alors que l'émission correspond au rayonnement thermique émis par tout corps en équilibre thermique avec son environnement, à la température T [174].

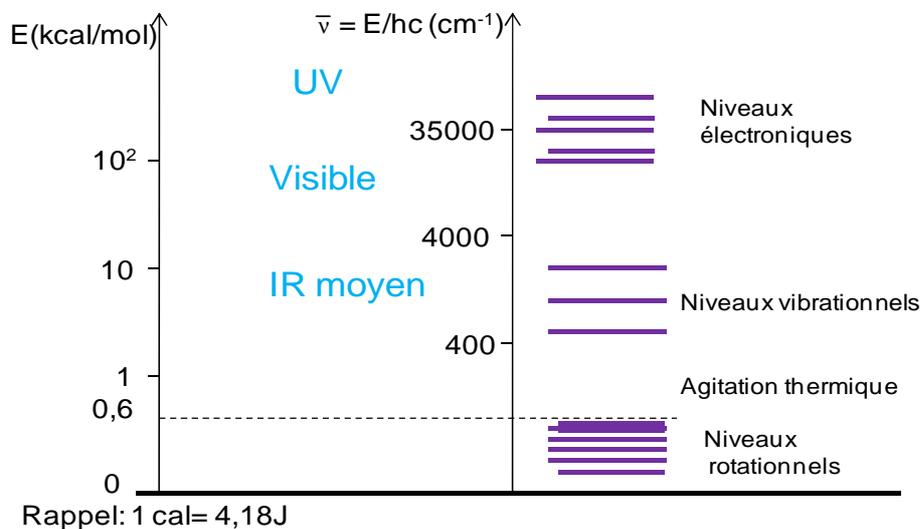


Figure 24: Valeurs respectives des contributions électroniques, vibrationnelles et rotationnelles d'une molécule

La mécanique quantique établit que l'énergie d'un tel oscillateur est quantifiée et dépend d'un nombre entier n, dit nombre quantique de vibration :

$$E_n = h\nu_0 \left(n + \frac{1}{2} \right)$$

En fait, la courbe réelle d'énergie potentielle d'une molécule diatomique, ne s'identifie à celle de l'oscillateur harmonique que pour de faibles déplacements par rapport à la distance internucléaire d'équilibre. Au contraire, elle s'en démarque pour les très faibles distances internucléaires, (elle croît très vite à cause de la difficulté d'un trop grand rapprochement des noyaux), et pour les grandes distances internucléaires (au-delà d'une certaine séparation des noyaux, la molécule est dissociée). Toutes ces caractéristiques de l'énergie sont incompatibles avec l'hypothèse de vibration strictement harmonique ; cependant elles apparaissent naturellement en supposant la vibration *anharmonique* : la force de rappel exercée par l'oscillateur n'étant plus uniquement proportionnelle au déplacement. La théorie montre qu'alors l'énergie de l'oscillateur dépend en outre d'un nouveau paramètre : le paramètre d'anharmonicité χ_e .

$$E_n = (n + \frac{1}{2})h\nu_0 - (n + \frac{1}{2})^2 \chi_e h\nu_0$$

I-4-1- Absorption

Un milieu matériel est caractérisé par un ensemble de niveaux d'énergie. Si un faisceau lumineux le traverse, et si la fréquence du rayonnement est telle que l'énergie véhiculée par l'onde correspond à une différence d'énergie entre deux niveaux, alors il pourra y avoir absorption par l'échantillon des photons de la fréquence correspondante. La molécule sera alors portée à un état excité. L'absorption aura effectivement lieu (c'est-à-dire avec une probabilité *non négligeable*) si les niveaux d'énergie concernés et la polarisation du rayonnement incident vérifient certaines propriétés : on parle de règles de sélection. Une condition nécessaire d'absorption s'exprime donc par :

$$\Delta E = h\nu_0$$

avec :

ν_0 : fréquence du rayonnement incident

h : constante de Planck

ΔE : différence entre deux niveaux d'énergie (électroniques, vibrationnels ou rotationnels) caractérisée par des nombres quantiques différents.

Macroscopiquement, l'atténuation du rayonnement traversant un échantillon homogène d'épaisseur d s'exprime par :

$$\frac{I_t}{I_0} = \exp(-kd)$$

avec :

I_0 : intensité du rayonnement incident

I_t : intensité du rayonnement transmis.

Le coefficient k est le coefficient d'absorption de l'échantillon ; il dépend de la longueur d'onde et a les dimensions de l'inverse d'une longueur (pour l'eau : $k = 2,4 \text{ m}^{-1}$ pour $\lambda = 0,8 \mu\text{m}$). Pour les gaz, on trouve fréquemment que k est proportionnel à la masse volumique. Dans le cas d'une substance liquide absorbante dissoute dans un solvant transparent, on considère que k est égal à la concentration C . On définit l'absorbance par la loi de Bouguer – Beer- Lambert :

$$A(\lambda) = \log(I_0/I_t) = \varepsilon(\lambda) \cdot C \cdot d$$

ε : ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) coefficient d'extinction molaire dont la valeur reflète la probabilité de la transition : une forte valeur de ε caractérise une transition autorisée par les règles de sélection. Remarquons que, pour l'absorbance, l'atténuation est définie à partir du logarithme décimal. L'atténuation est par contre définie à partir du logarithme népérien pour le coefficient d'absorption k . Si ε et d sont donnés, l'absorbance apparaît comme proportionnelle à la concentration. Cependant, cette linéarité n'est observée en pratique que pour les solutions très diluées, en l'absence d'interactions soluté / solvant. Par ailleurs, compte tenu de la sensibilité des détecteurs usuels, la loi de Beer - Lambert n'est vérifiée que dans un domaine limité d'absorbance, situé en général entre 0 et 2.

I-4-2- Diffusion

La diffusion rassemble l'ensemble des phénomènes par lesquels le rayonnement change de direction de propagation à la traversée d'un milieu. La diffusion peut être avec changement de longueur d'onde (diffusion inélastique) ou sans changement de longueur d'onde (diffusion élastique). Citons comme exemple de diffusion inélastique le cas de la diffusion Raman [175], ce qui permet d'obtenir des informations sur l'état vibrationnel des molécules et que nous détaillerons dans le paragraphe suivant. Les origines de la diffusion élastique sont variées : elle peut être due à des fluctuations locales de l'indice de réfraction ou à des phénomènes de diffraction par les bords de grains ou de particules (obstacles). Dans ce dernier cas, la diffusion est maximale lorsque les grains ont une taille sensiblement de l'ordre de la longueur d'onde du rayonnement.

I-4-3- Modes de vibration d'une molécule

Une molécule formée de N atomes possède $3N$ degrés de liberté. Parmi eux, trois représentent la translation de la molécule dans son ensemble (le long des trois axes du repère x, y, z) et trois autres définissent la rotation de la molécule autour de chacun de ces axes. Finalement, les mouvements internes de vibration de la molécule seront déterminés par les $3N - 6$ coordonnées restantes, ($3N - 5$ si la molécule est linéaire). Les fréquences de vibration dépendent des masses des atomes et des forces de liaison. Il est d'usage de classer en deux groupes les vibrations moléculaires. On distingue, d'une part, les vibrations de valence ou d'élongation (symétriques ou antisymétriques) qui font intervenir une (des) variation(s) de(s) longueur(s) de liaison(s), les angles que forment ces liaisons restant constants, et, d'autre part, les modes de déformation, pour lesquels, l'angle des liaisons varie alors que les longueurs restent constantes (figures 25).

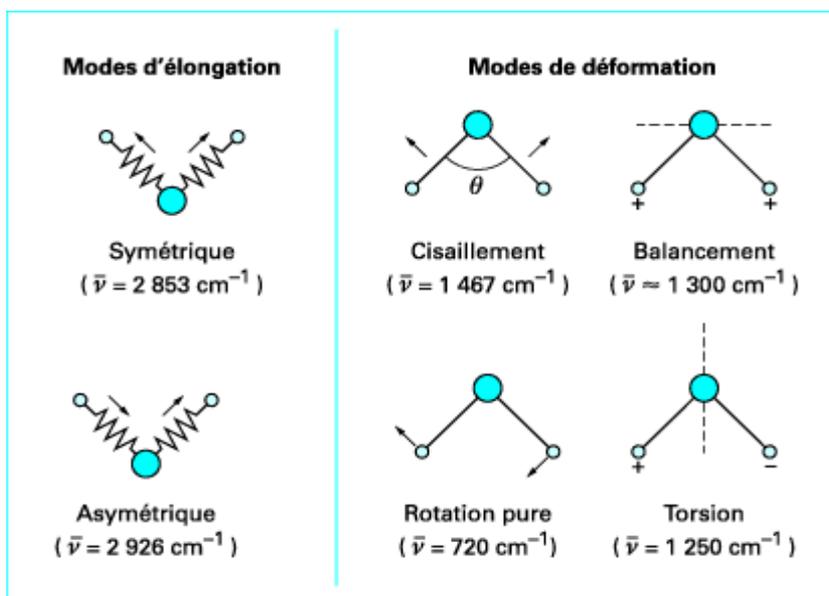


Figure 25: Modes de vibration : exemple des vibrations localisées du groupement CH₂ d'une molécule.

Il a été observé expérimentalement que la présence dans un spectre de certaines fréquences caractérise un groupe chimique donné. Le mouvement de la vibration de la molécule est essentiellement localisé dans le groupe chimique considéré.

La figure 26 résume les fréquences de vibrations des principaux groupes moléculaires rencontrés.

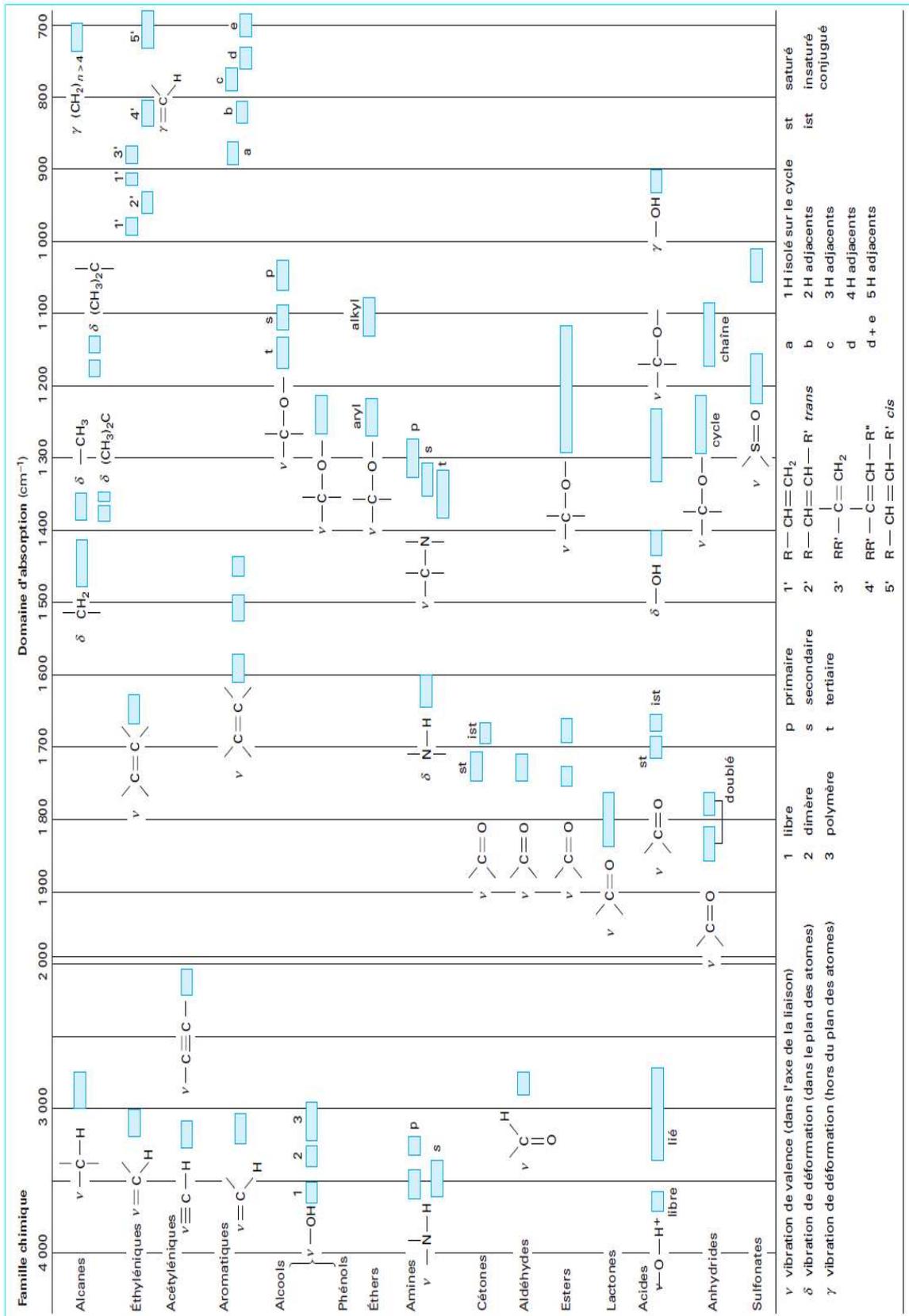


Figure 26: Correspondance entre les groupes d'une molécule et les pics observés

I-5- La spectroscopie Raman

I-5-1- Historique

L'effet Raman fut découvert simultanément en 1928 Par Raman et Krishman lors de l'étude de la diffusion de la lumière par les liquides et par Landsberg et Mandelstam dans des travaux sur les solides [175-179]. Raman en fut récompensé par l'attribution du prix Nobel de physique en 1930 [175, 180-182]. Cet effet correspond globalement à un phénomène de diffusion inélastique de la lumière émise par un échantillon soumis à une radiation lumineuse monochromatique. Le spectre obtenu est la signature vibrationnelle du matériau étudié et est unique par type de composé. Le spectre d'intensité très faible est difficile à observer près de la lumière diffusée sans changement de fréquence. Le rayonnement émis par des molécules éclairées contient donc des photons de même fréquence que ceux du rayonnement incident, mais aussi des photons de fréquences différentes (approximativement 1 photon sur 1 million (0.0001%). Ce processus a été ensuite appelé du nom de Sir Chandrashekhara Venkata Raman, premier à l'avoir observé [183-187]. A la fin des années 1930, la spectroscopie Raman était devenue une méthode courante non-destructive d'analyse chimique.

Mais après la Seconde Guerre Mondiale, la spectroscopie infrarouge est devenue la méthode la plus répandue, principalement du fait qu'elle s'avère être beaucoup plus facile à utiliser, mais aussi grâce au développement de capteurs infrarouges très sensibles, de nouvelles sources IR et des progrès de l'électronique. Les mesures par spectroscopie infrarouge devinrent une pure routine, alors que la spectroscopie Raman nécessitait des physiciens qualifiés. Le système nécessitait d'être constamment réglé et calibré car les longueurs d'onde utilisées dépendaient largement des conditions ambiantes. En outre, des analyses fiables et des données bibliographiques tabulées n'étant pas répandues à l'époque voire figure 27 [184]. Pendant les trois premières décennies qui ont suivi sa découverte, des milliers de spectres Raman de toutes sortes de substances à l'état liquide, solide ou même gazeux ont été répertoriés et ont apporté des données essentielles à l'établissement des structures et conformations moléculaires [188]. Bien que la complémentarité des spectres IR et Raman et la nécessité de les utiliser conjointement soient reconnues, le développement des spectromètres infrarouge industriels, d'emploi facile et adaptés aux besoins analytiques vers les années 1940 et 1950 sonna le déclin de la techniques Raman [175] jusque dans les années 1960. Pendant de nombreuses années, elle est ainsi restée une technique confidentielle, basée

sur la diffusion inélastique de la lumière pour laquelle une lampe à arc au mercure couplée à un prisme pour la monochromaticité était utilisée dans les premiers stades de son développement. Elle nécessitait de longues durées d'acquisition (exposition de films) pour atteindre des niveaux de signaux acceptables. Puis, l'effet Raman connut deux périodes importantes de croissance et un intérêt renouvelé: (i) dans les années 1960 avec la généralisation des lasers comme sources intenses de lumière monochromatique, (ii) dans les années 1980 avec les progrès des détecteurs en particulier, CCD (charge coupled device), le couplage avec des microscopes pour l'analyse de petits échantillons [180, 184, 189-191].

Mais, c'est probablement dans les deux dernières décennies, après 1990, que le phénomène de diffusion Raman a connu sa plus forte croissance en termes de champ d'application à des problématiques scientifiques mais aussi en terme de développement en ligne appliqué à l'industrie.

Le Laser fut donc le germe d'une véritable révolution pour la spectroscopie Raman qui s'est depuis poursuivie et amplifiée par l'apport de multiples améliorations. La spectroscopie Raman devint dès lors un nouvel outil de caractérisation de routine avec de larges applications: matériaux cristallisés, amorphes, polymères, analyses environnementales, contrôles de procédés industriels, diagnostics médicaux [188, 192]. les spectres de très petits volumes d'échantillons, des échantillons colorés, des solides, des liquides, des gaz, des échantillons de hautes températures, des solutions très diluées et des échantillons dans des conditions non standard peuvent être obtenus [192].

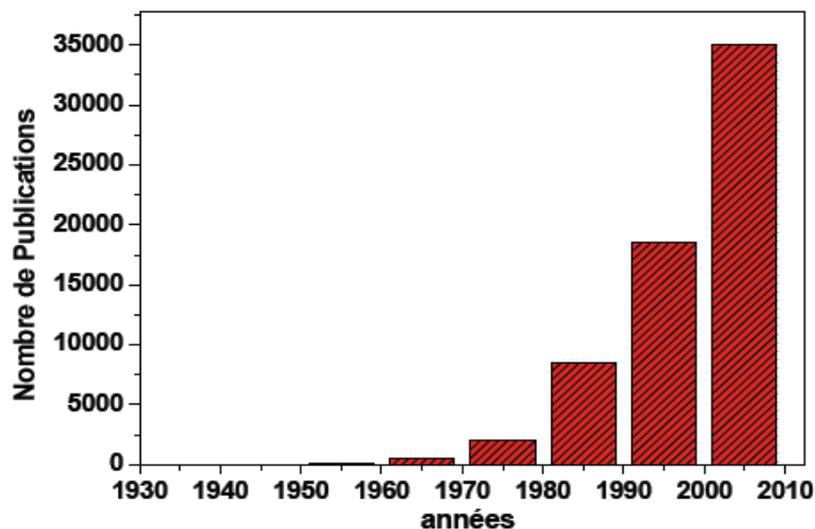


Figure 27: Histogramme du nombre de publication parues sur la diffusion Raman et la diffusion Raman de Résonance (par décennie) [184]

Comme déjà indiqué, le spectre Raman est caractéristique de l'échantillon étudié et est lié aux vibrations des édifices atomiques constituant l'échantillon observé. La spectroscopie Raman constitue avec la spectroscopie IR et la diffusion inélastique de neutrons, une des branches de la spectroscopie de vibration. Elle permet à ce titre la caractérisation d'échantillons et des applications en analyse qualitative ou quantitative.

I-5-2- Mise en œuvre

I-5-2- 1- Principe de la spectrométrie Raman

En spectrométrie Raman, l'analyse se fait par excitation du matériau. Porté à un niveau énergétique virtuel par une puissante source lumineuse monochromatique de type laser, il réémet ensuite une radiation de fréquence ou énergie différente qui est collectée puis analysée par un détecteur adéquat. Cette radiation comporte deux types de signaux. Le premier très majoritaire correspond à la diffusion Rayleigh : la radiation incidente étant diffusée élastiquement (c'est-à-dire sans changement d'énergie). Le second correspond à des photons en nombre très limité pouvant interagir avec la matière. Celle-ci absorbe (ou cède) de l'énergie aux photons incidents produisant ainsi les radiations Stokes (ou anti-Stokes). La variation d'énergie observée sur le photon nous renseigne alors sur les niveaux énergétiques de rotation et de vibration de la molécule concernée.

I-5-2- 2- Structure d'un spectromètre Raman

Un spectromètre Raman dispersif est constitué :

- d'une source de lumière monochromatique qui est généralement un laser ;
- d'un monochromateur, élément dispersif à haute résolution pour la séparation de fréquences (souvent un ou plusieurs réseaux) ;
- d'un détecteur pouvant être monocanal (photomultiplicateur) ou multicanal (détecteur CCD) ;
- d'une platine porte échantillon couplé à un microscope équipé en transmission ou/et en réflexion. Ce microscope permet de sélectionner des zones particulières dans l'échantillon et d'accéder simultanément à l'information spatiale et spectrale ;
- un système d'amplification et d'enregistrement ;
- tous les spectromètres en fonction de leur destination ne sont pas équipés d'un microscope et peuvent seulement avoir une entrée dite macroscopique ;

- d'un ordinateur de pilotage équipé d'un logiciel d'acquisition et éventuellement de traitement des spectres.

La figure 28 le schéma général d'un spectromètre Raman multicanal.

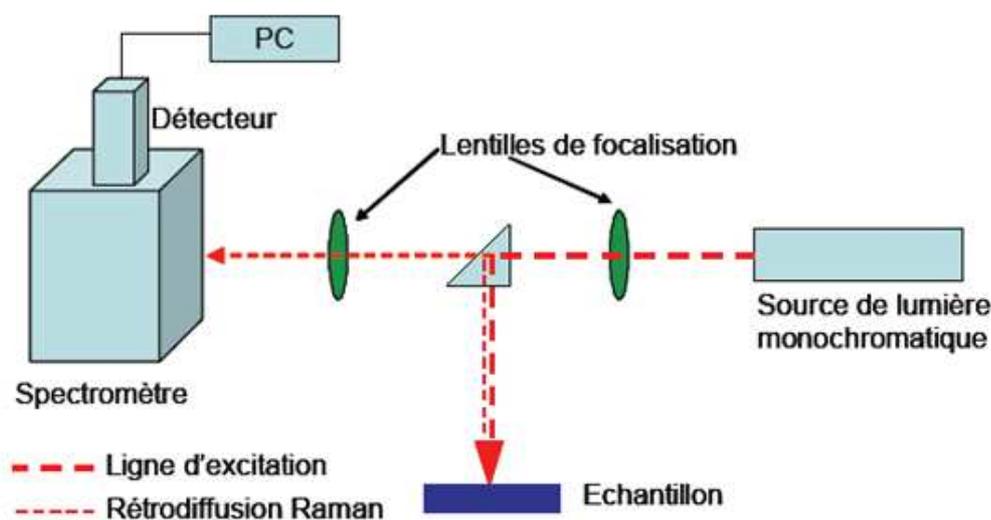


Figure 28: Schéma simplifié d'un spectromètre Raman dispersif

I-5-2- 3- Imagerie Raman

L'imagerie par spectroscopie Raman permet, de manière non destructive et sans préparation d'échantillon, d'identifier les phases constituantes d'un matériau et d'en visualiser leur répartition en 2D et/ou en 3D (microscope confocal). Les analyses peuvent se faire sous contrainte dynamique pour comparer des échantillons entre eux ou pour comprendre et expliquer des phénomènes de vieillissement ou de rupture. Cette technique peut être utilisée pour analyser des substances ayant un signal Raman à l'exemple des produits pharmaceutiques, agro-alimentaires, peintures ou vernis, fibres en science du vivant, matières et films plastiques.

I-5-3- Théorie de la diffusion Raman

L'effet Raman est la diffusion inélastique d'un photon par un milieu. Cette inélasticité implique l'échange d'énergie entre le photon et la molécule. Deux types d'approches peuvent être menés pour expliquer l'effet : une approche électromagnétique classique, une approche quantique.

I-5-3- 1- Traitement classique

Lorsqu'une molécule est placée dans un champ électrique, les électrons sont repartis relativement au noyau et de ce fait créent un moment dipolaire électrique [192, 193] de par la distorsion du nuage électronique. Ce moment dipolaire induit $\vec{\mu}_i$ sous l'effet du champ électrique \vec{E} s'écrit :

$$\vec{\mu}_i = \alpha \vec{E}$$

A l'exception des molécules isotropiques²⁷ (par exemple CCl₄), la polarisabilité montre les propriétés directionnelles et le moment dipolaire $\vec{\mu}_i$ n'est pas parallèle au vecteur champ électrique [190].

$$[\alpha] = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix}$$

$$\vec{\mu} = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{pmatrix}$$

α est la polarisabilité (facilité avec laquelle le nuage électronique peut se déformer sous l'effet d'un champ électrique appliqué) de la molécule. Les fluctuations du champ électrique produisent une fluctuation du moment dipolaire de la même fréquence. Les radiations électromagnétiques génèrent un champ électrique d'expression :

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos 2\pi\nu_0 t \quad (2)$$

E_0 est la valeur du champ à l'équilibre et ν_0 est la fréquence angulaire de la radiation. Considérons le cas particulier d'une molécule diatomique qui vibre avec une fréquence ν_v . Si elle est représentée par une simple vibration harmonique, la coordonnée q_v le long de l'axe de vibration à un instant t est donnée par :

$$q_v = q_0 \cos 2\pi\nu_v t \quad (3)$$

En se limitant à une polarisabilité scalaire, si la polarisabilité change pendant la vibration, sa valeur pour une petite amplitude de vibration sera donnée par :

²⁷ **Isotropique** : même propriété dans toutes les directions

$$\alpha = \alpha^0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q_v} \right)_0 q_v \quad (4)$$

Substitution de l'équation (3) dans l'équation (4) :

$$\alpha = \alpha^0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q_v} \right)_0 q_0 \cos 2\pi\nu_v t \quad (5)$$

Si la radiation incidente de fréquence ν_0 interagit avec la molécule, de l'équation (1) et (2), on a :

$$\vec{\mu}_i = \alpha \vec{E} = \alpha \vec{E}_0 \cos 2\pi\nu_0 t \quad (6)$$

Substitution de l'équation (5) dans l'équation (6) :

$$\mu_i = \alpha^0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q_v} \right)_0 E_0 q_0 \cos 2\pi\nu_v t \cos 2\pi\nu_0 t$$

$$\text{Soit } \mu_i = \alpha^0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q_v} \right)_0 \frac{E_0 q_0}{2} \times [\cos 2\pi(\nu_0 + \nu_v) t + \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_v) t]$$

(7)

Le premier terme de l'équation 7 (terme en ν_0) correspond à la diffusion Rayleigh. L'émission de la lumière se fait à la même fréquence que celle de l'onde incidente. Ce phénomène se produit pour 1 photon incident sur 10000.

Le deuxième terme correspond à la diffusion Raman. Un phénomène plus faible que le précédent. On estime en effet que 1 photon sur 1 000 000 est diffusé inélastiquement. Cette équation 7 montre donc que la lumière est diffusée avec une fréquence selon trois contributions :

ν_0 correspond à la diffusion Rayleigh

$\nu_0 \pm \nu_v$ correspond à la diffusion Raman

Cette équation 7 montre aussi que la diffusion Raman ne peut avoir lieu que lorsque la polarisabilité de la molécule au cours de la vibration est non nulle. $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial q_v} \right)_0 \neq 0$

Donc, la diffusion Raman existe uniquement pour les mouvements donnant lieu à une variation de la polarisabilité de la molécule, ce qui détermine les règles de sélection de la technique.

I-5-3- 2- Apport de la mécanique quantique

Une molécule non linéaire possède $3N-6$ modes normaux de vibration et une molécule linéaire en possède $3N-5$ (N étant le nombre d'atomes contenus dans la molécule) et l'énergie de chacune des vibrations est quantifiée et s'écrit :

$$E_n = h\nu(n + \frac{1}{2})$$

h est la constante de Planck ($6,6260755 \cdot 10^{-34}$ J. s),

n est le nombre quantique de vibration de la molécule.

Dans la plupart des cas réels, cette approximation harmonique n'est pas valable et il faut alors prendre en compte le terme du 3^e ordre. L'énergie devient alors :

$$E_n = h\nu(n + \frac{1}{2}) + h\nu'(n + \frac{1}{2})^2$$

$$\nu' \text{ étant une fonction de } \left(\frac{\partial^3 V}{\partial x^3} \right)$$

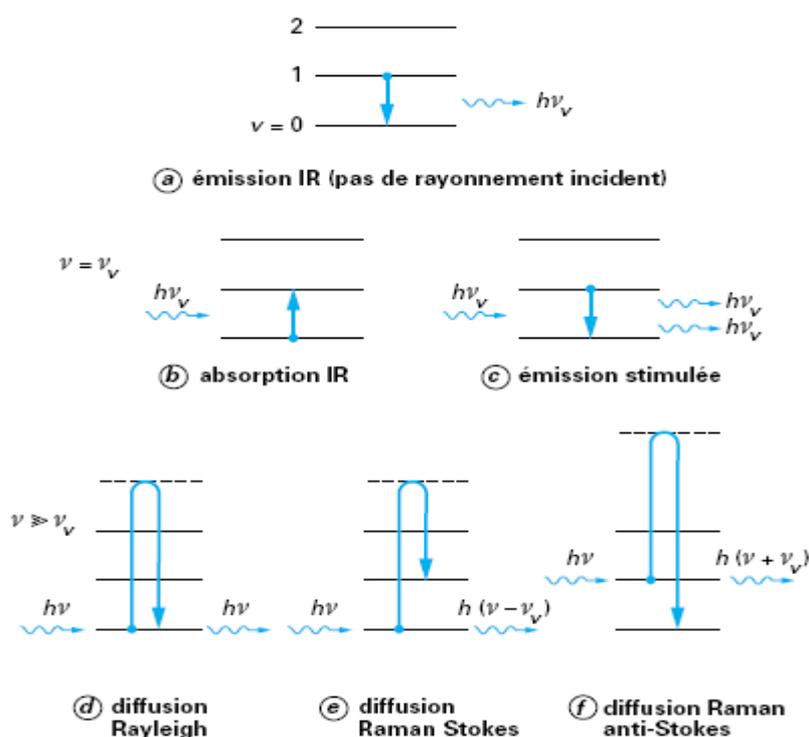


Figure 29: Interaction entre un photon et la matière caractérisée par des niveaux d'énergie vibrationnelle

Dans ce formalisme où l'énergie de vibration est quantifiée en niveaux discrets, l'interaction entre la lumière caractérisée par un photon d'énergie $h\nu$ et une molécule se trouvant dans un état donné peut engendrer différents phénomènes :

Si $\nu = \nu_v$, la transition la plus probable est la transition $\nu \rightarrow \nu + 1$. C'est le phénomène d'absorption infrarouge. Pour la possibilité $\nu \rightarrow \nu - 1$, on a l'émission stimulée (base du rayonnement laser).

Si $\nu \gg \nu_v$, le phénomène le plus probable est la diffusion et le mécanisme est décrit comme suit : lors de l'excitation par le photon d'énergie $h\nu$, la molécule transite dans un état virtuel et redescend sur un niveau réel. Seuls les niveaux $\nu - 1$, ν et $\nu + 1$ sont possibles, ce qui amène à une diffusion de photons d'énergie $h\nu$ (diffusion Rayleigh), $h(\nu - \nu_v)$ appelé diffusion Raman Stokes et $h(\nu + \nu_v)$ la diffusion Raman anti Stokes. La diffusion Rayleigh est la plus probable, alors que les diffusions Stokes et anti-Stokes sont très peu favorisées.

À une température donnée, la répartition en niveaux d'énergie d'un ensemble de molécules obéit à une distribution de Maxwell-Boltzmann et seules celles se trouvant dans un état excité pourront donner une transition anti-Stokes de type $\nu \rightarrow \nu - 1$. Cela explique le fait expérimentalement observé que les raies Stokes sont plus intenses que les raies anti-Stokes.

Le rapport des intensités des raies Stokes I_S et anti-Stokes I_{AS} est déterminé par la relation :

$$\frac{I_{AS}}{I_A} = \left(\frac{\nu_0 + \nu_v}{\nu_0 - \nu_v} \right) \exp\left(-\frac{h\nu_v}{kT} \right)$$

k = constante de Boltzmann ($1,380658 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$)

T = température thermodynamique

ν_0 = fréquence de l'onde excitatrice

En conclusion : comme la spectroscopie IR, la spectroscopie Raman met en jeu les états d'énergies vibrationnels d'une molécule et donne des renseignements sur la structure des composés : nature et environnement atomes, distances interatomiques, symétrie, constantes de force, structures cristallines. Un spectre Raman constitue donc une forme d'emprunte vibrationnelle (voire rotationnelle) du composé analysé au niveau moléculaire et/ou cristallin. Il se présente comme un ensemble de raies d'intensités variables dont les positions correspondent aux fréquences de vibrations existantes dans la molécule (ou groupement moléculaire) et dont l'observation est permise par les règles de sélection de la symétrie moléculaire.

I-5-4- Avantages et inconvénients de la spectroscopie Raman

I-5-4- 1- Avantages

- La spectroscopie Raman est utilisée pour la caractérisation de presque tous les types de matériaux : matériaux cristallisés, amorphes, verres, catalyseurs, semi- conducteurs, matériaux carbonés, composés inorganiques et organométalliques, minéraux, polymères. Elle est utilisée aussi pour l'étude des transitions de phase sous contraintes (haute pression, haute et basse température).
- L'échantillon n'est pas dégradé. La méthode est non-destructive et non intrusive, ce qui permet de l'appliquer à des systèmes réels.
- Elle est facile à mettre en oeuvre. Le temps de préparation est nul ou quasi nul.
- La nature des échantillons solide, liquide, ou gazeuse n'intervient pas. Elle ne requiert de plus qu'une faible quantité d'échantillon.
- Elle peut être utilisée dans un grand nombre de cas (matériaux hétérogènes, échantillons dont la structure peut être orientée ou non).
- Elle peut être couplée avec d'autres méthodes analytiques, et offre la possibilité de mesures in situ.
- Elle est applicable aux solides atomiques
- Elle est utilisable sur des échantillons de très petite taille (jusqu'à 10^{-18} m^3)
- Elle permet de travailler en milieu 'hostile', notamment à haute température, en présence de phénomènes radioactifs ou sous atmosphère contrôlée.
- Elle est sensible aux petites structures (identification des systèmes amorphes, analyses des films très fins pour lesquels les méthodes de diffraction sont parfois difficiles à réaliser).
- aucune polarisation permanente des molécules n'est nécessaire (méthode efficace sur les molécules diatomiques homonucléaires)
- la présence d'eau n'est pas gênante car l'eau diffuse très peu en Raman (l'eau peut ainsi être utilisée comme solvant)
- l'utilisation de cellules en verre est possible car le verre est transparent dans les domaines spectraux concernés et son spectre Raman est assez faible (dépend cependant des applications).
- les échantillons peuvent être utilisés sous n'importe quelle forme, sans être dilués ni altérés ;

Dans la plupart des cas, la spectroscopie Raman permet d'obtenir le même type d'informations que la spectroscopie infrarouge, bien que le principe de la méthode soit différent et que les modes de vibrations observés soient parfois complémentaires. L'effet Raman est indépendant de la longueur d'onde excitatrice utilisée, ce qui permet de supprimer certains phénomènes indésirables (fluorescence, décomposition des substances colorées...) en choisissant une longueur d'onde adéquate.

La spectroscopie Raman est une technique optique qui permet de mesurer des excitations de faibles énergies dans les cristaux, tels que les phonons, les plasmons, les magnons [194]. Elle est aussi très sensible aux excitations "Zeeman": transition de spin (retournement de spin ou "spin-flip" électronique et magnétique).

La vitesse avec laquelle un spectre Raman est obtenu dépend du système de détection et de l'utilisation des analyseurs multicanaux. Un spectre Raman peut par exemple sur des cas simples être obtenu moins d'une seconde [192].

I-5-4- 2- Inconvénients

- L'intensité du signal Raman est faible et est proportionnelle à la quatrième puissance de la fréquence excitatrice. Il vaudrait donc mieux utiliser de courtes longueurs d'ondes, ainsi, cette propriété conduit à un signal plus faible dans le proche IR (à 1064 nm) que dans le visible (488 nm) [195].
- L'émission du corps noir dû à l'échauffement de l'échantillon peut parfois gêner les enregistrements.
- La luminescence²⁸: elle peut être plus intense que l'effet Raman en fonction de l'échantillon à étudier et de la longueur excitatrice. La luminescence masque parfois la totalité du signal Raman, mais on peut l'éviter en sélectionnant une longueur d'onde ad-hoc. Pour les systèmes biologiques, les longueurs d'ondes rouges sont recommandées. La décomposition des substances colorées par réactions photochimiques.
- La décomposition des échantillons par échauffement.

Ces inconvénients peuvent parfois être contrebalancés par la spectroscopie Raman à Transformée de Fourier.

²⁸ **Luminescence** : c'est l'émission de lumière à basse température lors d'une excitation par des rayonnements qui ne sont ni lumineux, ni thermiques

Cette technique nécessite l'utilisation d'une raie excitatrice peu énergétique (radiation à 1064 nm du laser Nd : YAG dans le proche infrarouge). Ce qui permet de pallier au problème de luminescence. Les substances colorées ne risquent pas de se décomposer. Cette technique évite de plus l'échauffement et la dégradation des échantillons. L'analyse est plus rapide car tous les éléments spectraux sont mesurés simultanément. La sensibilité est meilleure car une plus grande quantité de photons est détectée dans le même temps ;

Les fréquences sont déterminées avec précision grâce à un laser qui mesure la position du miroir mobile de l'interféromètre.

La diffusion Raman dans l'UV est aussi parfois utilisée notamment en biologie.

I-5-5- Applications de la spectroscopie Raman

Les domaines d'applications sont extrêmement vastes et pas encore complètement explorés car un échantillon peut avoir n'importe quelle origine:

- minérale,
- biologique,
- organique,
- géologique,
- synthétique

Avec l'amélioration et l'automatisation des instruments, la spectrométrie Raman s'est maintenant bien implantée dans l'industrie, aussi bien pour le contrôle-qualité que pour le contrôle en ligne dans les unités de fabrication. Cette évolution est essentiellement due, d'une part à l'apparition sur le marché de microspectromètres Raman compacts très performants permettant aux laboratoires industriels à l'aide du même appareil, de mener des recherches fondamentales et d'effectuer du contrôle (analyse de défauts par exemple), et d'autre part, à la possibilité d'effectuer des analyses à distance par utilisation de fibres optiques ; l'unité d'analyse et de contrôle pouvant ainsi se trouver à plusieurs centaines de mètres du site de production.

Les informations apportées par la spectroscopie Raman sont relativement étendues:

- identification de phases ou de composés chimiques ;
- caractérisation des matériaux (au sens large) ;
- détermination de la structure moléculaire ;
- détermination de concentration ;
- imagerie chimique;

- La méthode spectroscopique dotée de la meilleure résolution (un micron) pour l'identification et la caractérisation de composés ou de phases.

Remarque : L'augmentation résonante du signal Raman permet de l'appliquer à l'étude des excitations de faibles énergies dans les structures de puits quantique. La spectroscopie Raman permet de sonder les transitions de spins électroniques et magnétiques (ions Mn^{2+}) de façon continue en fonction du champ magnétique [194].

I-5-5-1- Applications à la santé et aux milieux biologiques

Brands et al ont rapporté dans leur travaux que la spectroscopie Raman est utilisée pour le suivi de la progression/régression des plaques athérosclérotiques chez l'homme ou l'animal [196]. Il a été également démontré par Witkowski que la spectroscopie Raman est une technique expérimentale douée pour l'analyse des contrefaçons suspectes des dosages pharmaceutiques [192, 197], le contrôle de production en pharmacie [198], la discrimination de deux fournisseurs d'un même excipient a été possible par l'obtention et la comparaison des spectres Raman de leurs produits respectifs [198], dans les tests biologiques et diagnostic médical [180, 196, 198-210].

Cette technique est utilisée dans les laboratoires judiciaires pour analyser les traces d'ADN présents sur le vêtement des victimes en cas de crimes sexuels et également la drogue dissimulée dans le tissu [211]. Il a été démontré que la spectroscopie Raman est utilisée dans l'analyse de calculs urinaires, les microcristaux dans les myxomycètes, les concrétions intracellulaires [212]. L'identification rapide des bactéries et des champignons est opérée grâce à cette technique [213] et également la détection de disfonctionnement de vésicules chez les enfants et adulte [204]. L'étude des virus et des cellules infectées peut être menée en utilisant cette méthode [180].

Tout comme la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie Raman donne des informations sur la composition chimique, la structure moléculaire et les interactions moléculaires d'une cellule ou d'un tissu. Il est également possible d'analyser les systèmes biologiques complexes comme les cellules ou les tissus dans le domaine du cancer [214-216] ou d'identifier les microorganismes [217]. Plusieurs travaux dans la littérature rapportent l'utilisation de la spectroscopie Raman en biologie. Notons ceux de Schwartz et al pour la caractérisation par spectroscopie Raman de la composition chimique des biofilms [218] sur les filtres tels que le sable et le charbon actif. Ces biofilms agissent comme des filtres biologiques et constituent finalement un élément très important dans le traitement des eaux.

L'étude des microorganismes par spectroscopie Raman apparaît être une méthode fiable, non destructive, rapide et sensible pour la caractérisation et l'identification des cellules biologiques. Les méthodes biologiques, bien qu'elles soient de plus en plus perfectionnées sont limitées. Elles nécessitent un temps considérable environ 3 à 4 jours selon les analyses.

La spectroscopie Raman est capable de rendre compte de l'état physicochimique d'une bactérie qui varie avec l'état physiologique de la cellule, son âge et son environnement. Cette méthode est sensible aux changements moléculaires induits par les variations de composition chimique. Le spectre d'une bactérie est spécifique, car la proportion des différents constituants protéiques, lipidiques, glucides et minéraux varie selon la nature des microorganismes.

La technique de diffusion Raman est la principale technique de caractérisation utilisée dans notre projet car comme nous l'avons déjà spécifié, elle ne nécessite que de très faibles volumes d'échantillons, elle est très rapide à mettre en œuvre, ne nécessite pas de préparation de l'échantillon, donne la possibilité d'utiliser l'eau comme solvant et permet précisément dans notre projet d'explorer la zone de faible fréquence ($< 1000 \text{ cm}^{-1}$) correspondant aux acides nucléiques, détails que la spectroscopie infrarouge par exemple ne peut fournir.

I-5-5-2- Applications variées de la spectroscopie Raman

Pour résumer l'ensemble, le tableau VI regroupe l'ensemble des champs d'applications de la diffusion Raman.

Tableau VI: Champs d'application de la diffusion Raman

| Domaines d'applications | Utilisations |
|-------------------------|--|
| Art et musées | <ul style="list-style-type: none">- analyse des pigments,- des anciennes poteries,- des peintures murales des églises en Macédoie, |
| Nanomatériaux | <ul style="list-style-type: none">- caractérisation des nanotubes de carbone,- des films de polymères, |
| Biologie | <ul style="list-style-type: none">- caractérisation in vivo du corps humain,- analyse des lymphocytes,- détection des microorganismes sur les cellules,- investigation du processus d'athérosclérose pour le contrôle |

| | |
|----------------------------|---|
| | de dépôts de cholestérol et d'acide gras, |
| Pharmacie | - contrôle des produits pharmaceutiques, - caractérisations des excipients dans les comprimés, |
| Chimie du carbone | - caractérisation du diamant coloré, - évaluation de le dureté du carbone, |
| Polymères | - prédiction des propriétés physiques et chimiques, |
| Etat solide | - caractérisation insitu des réactions catalytiques hétérogènes, |
| Suivi insitu des réactions | - études des batteries au lithium, - suivi en chaîne de la fabrication de produits chimiques, - chimie du phosphore en industrie, - étude microscopique de la diffusion, |
| Corrosion | - suivi de la cinétique d'oxydation sur les surfaces d'alliages en aluminium, |
| Semi conducteur | - contrôle de dépôts des couches de Si sur les substrats SiGe, |
| Composites | - caractérisations des circuits intégrés, - analyse des réactions chimiques à l'état solide dans les matériaux composites, |
| Justice | - identifications des stupéfiants, - identifications des explosifs, - analyse des encres (empruntes digitales), |
| Géologie | - analyse des matériaux géologiques, |
| Verre | - analyse des matériaux en verre. |

I- 6 - La microbalance à cristal de quartz

Les mesures de variation de masse sont généralement réalisées à l'aide de balances dont le fonctionnement est basé sur une mesure mécanique ou électromagnétique de forces. Cependant, ces instruments ne permettent, en général, qu'une mesure à l'air. Dans le cas de phénomènes de dépôt ou de dissolution en solution, la mesure ne peut donc être réalisée qu'ex situ et les processus ne peuvent pas être suivis en continu. De plus, la limite de détection d'une ultramicrobalance d'analyse se situe autour de 0,1 µg [219]. Cette limite est insuffisante pour la mesure d'une ou plusieurs monocouches d'atomes sur une surface. La microbalance à quartz offre une sensibilité 100 fois plus élevée, se situant dans le domaine du nanogramme [219]. Cette méthode permet la réalisation de mesures dans des milieux variés, notamment les milieux liquides. Un autre avantage est que la précision de la mesure résulte de la géométrie du capteur, appelé résonateur, et de l'électronique qui mesure les variations de propriétés de ce capteur, ceci rend l'étalonnage à priori inutile si ces paramètres sont parfaitement contrôlés.

I-6-1- Principe de fonctionnement de la microbalance

Un cristal piézoélectrique subit une oscillation suite à une stimulation piézoélectrique appliquée par des électrodes. La fréquence de résonance du cristal est corrélée à sa masse. Tout ajout ou retrait de masse provoque une variation de la fréquence de résonance ; en mesurant cette différence de fréquence Δf , on peut calculer la différence de masse Δm grâce à la relation de Sauerbrey [220].

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

Δf = variation de la fréquence de résonance du cristal de quartz

Δm = variation de la masse du cristal de quartz

f_0 = fréquence de résonance propre du cristal de quartz

A = surface active (métallisée) du cristal de quartz

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

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

Le quartz présente un certain nombre d'avantages par rapport à d'autres matériaux :

- il offre une faible résistance à la propagation des ondes acoustiques et un module de cisaillement élevé ;
- il peut être préparé sous une forme très pure et très bien cristallisée ;
- il présente une très grande stabilité chimique, notamment au contact de solutions.

I-6-2- Exemples d'applications de la microbalance à cristal de quartz

Les matériaux piézoélectriques possèdent la propriété de se polariser électriquement sous l'action d'une force mécanique (effet direct) et, réciproquement, de se déformer lorsqu'on leur applique un champ électrique (effet inverse). Ces caractéristiques particulières en font des matériaux de choix pour la réalisation de capteurs, de moteurs, de transducteurs ou de transformateurs.

Ce dispositif peut se révéler très utile pour évaluer l'accrochage d'ADN sur un substrat lors des étapes d'immobilisation ou d'hybridation et permet le suivi in situ de la fréquence de résonance du cristal de quartz [221-223]. Ce dispositif est largement utilisé pour étudier les interactions entre les biomolécules en raison de sa haute sensibilité et la mesure des interactions en temps réel [224]. Ce qui justifie son utilisation pour le suivi de l'immobilisation des protéines et des anticorps [224] et l'étude des réactions anticorps antigènes [222]. La littérature abondante concernant la microbalance à cristal de quartz utilisée dans le domaine de la biologie témoigne de ses multiples possibilités d'applications. Outre ses capacités d'immunodosage et d'immunodétection, cette technique est utilisée pour détecter l'agglutination de billes de latex recouvertes d'anticorps [225], pour doser les protéines totales urinaires après précipitation, pour contrôler la croissance bactérienne [1]. Pour ses applications en immunocapteur, la microbalance est utilisée pour détecter les entérobactéries par immobilisation d'anticorps spécifiques sur l'électrode du quartz et pour détecter la présence d'anticorps anti-VIH dans le sérum en quelques minutes par un revêtement de peptides de VIH sur la surface. L'immunocapteur piézoélectrique est aussi employé pour contrôler l'adsorption des protéines sur l'or [226] et pour étudier la cinétique de fixation d'immunoglobulines sur une couche de protéine A immobilisée sur le transducteur.

Ce dispositif constitue ainsi une base intéressante pour élaborer un biocapteur car elle permet de déterminer en temps réel la masse des molécules retenues sélectivement par la partie

bioreceptrice de la surface du transducteur. C'est ce qui a motivé notre choix de cette technique comme outil d'analyse complémentaire à la diffusion Raman. Nous avons ainsi la deuxième technique parfaitement complémentaire, l'une quantitative mais non spécifique (la microbalance à cristal de quartz) et l'autre parfaitement qualitative (la diffusion Raman).

Conclusion :

Cette étude bibliographique nous a ainsi permis de comprendre ce qu'est un biocapteur, son principe de fonctionnement ainsi que les éléments constitutifs. Elle nous a permis également de comprendre les modes d'accroche du bioélément ; de recenser les techniques de fonctionnalisation de surface généralement utilisées dans l'immobilisation des biomolécules en identifiant leurs avantages et leurs inconvénients et enfin les techniques de caractérisation comme la diffusion Raman et la microbalance à cristal de quartz. Notre choix s'est orienté vers un mode d'accroche covalent et une fonctionnalisation de surface par voie électrochimique. En effet, l'accroche covalente permet de former des liaisons très stables et irréversibles et est ainsi adaptée pour réaliser des systèmes performants sur de longues durées. Nous avons également choisi une fonctionnalisation par voie électrochimique dans le but de former plus rapidement nos surfaces, de limiter les étapes de réaction et l'utilisation des réactifs, par conséquent limiter les coûts de synthèse. Dans la même optique, nous avons choisi une technique de caractérisation comme la diffusion Raman aussi rapide à mettre en œuvre et nécessitant de très faible volume d'échantillon pour l'analyse.

CHAPITRE II
RESULTATS ET DISCUSSION

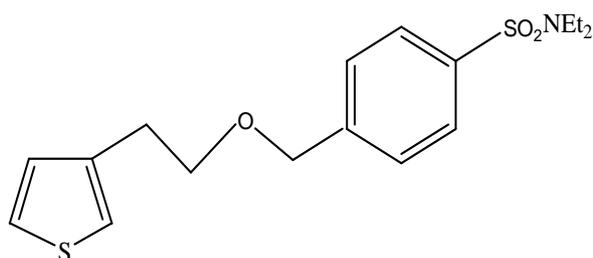
II- 1- Synthèse du polythiophène

Cette partie concerne la synthèse du polymère conducteur qui servira par la suite de support d'immobilisation d'éléments biologiques détectables par spectroscopie vibrationnelle.

Nous avons rappelé que d'après la littérature, les matériaux polymères avec des composants biologiquement actifs sont d'une grande importance dans le domaine des biotechnologies. Dans le même ordre d'idée, le poly (N,N-diéthyl-(2-thiophén-3yl-éthoxyméthyl)benzène-sulfonamide) a été synthétisé. Après dopage et transformation du groupement sulfonamide en chlorure de sulfonyle, une protéine a été immobilisée de façon covalente pour orienter un anticorps spécifique en surface capable de détecter une bactérie. Le polythiophène a été choisi pour plusieurs raisons :

- Sa stabilité électrochimique ;
- La possibilité de dopage n (décrochage potentiel des entités biologiques accrochées d'où la recyclabilité de la surface),
- Il maintient son électroactivité sur les différents cycles et on peut le rendre conducteur par dopage électrochimique ou chimique.

II-1-1- Critère de choix du monomère : N,N-diéthyl-(2-thiophén-3yl-éthoxyméthyl)-benzènesulfonamide (M)



La méthode de synthèse est issue de la littérature [227]. Notre travail a consisté à cette étape à la purification du monomère déjà présent au laboratoire UCO₂M (UMR 6011) de l'Université du Maine.

Le choix du monomère s'est fait par leurs propriétés intéressantes en milieu organique et aqueux. Ce monomère possède :

- un motif thiophène dont les positions α α' à l'atome de soufre sont libres et peuvent être engagées par oxydation dans la formation des chaînes de polymères ;

- un groupement arylsulfonamide qui conduira au groupement chlorure de sulfonyle: fonction d'ancrage de l'anticorps ;
- une chaîne carbonée qui sépare le groupement électropolymérisable de la fonction d'ancrage, ce qui permet l'accessibilité du groupement fonctionnel. La présence d'un atome d'oxygène dans la chaîne carbonée augmente la mouillabilité des chaînes de polymère et améliore son électroactivité en milieu aqueux.

II-1-2- Synthèse du monomère

Le monomère est obtenu en deux étapes avec un rendement de 59%. La première étape est la substitution nucléophile du chlore de la fonction chlorure de sulfonyle par la diéthylamine conduisant au sulfonamide avec un rendement de 90%. Cette première réaction constitue une étape de protection du chlorure de sulfonyle. La deuxième étape consiste en une substitution nucléophile du brome par le 2-thiophén-3-yl-éthanolate et conduit au monomère avec un rendement de 65%.

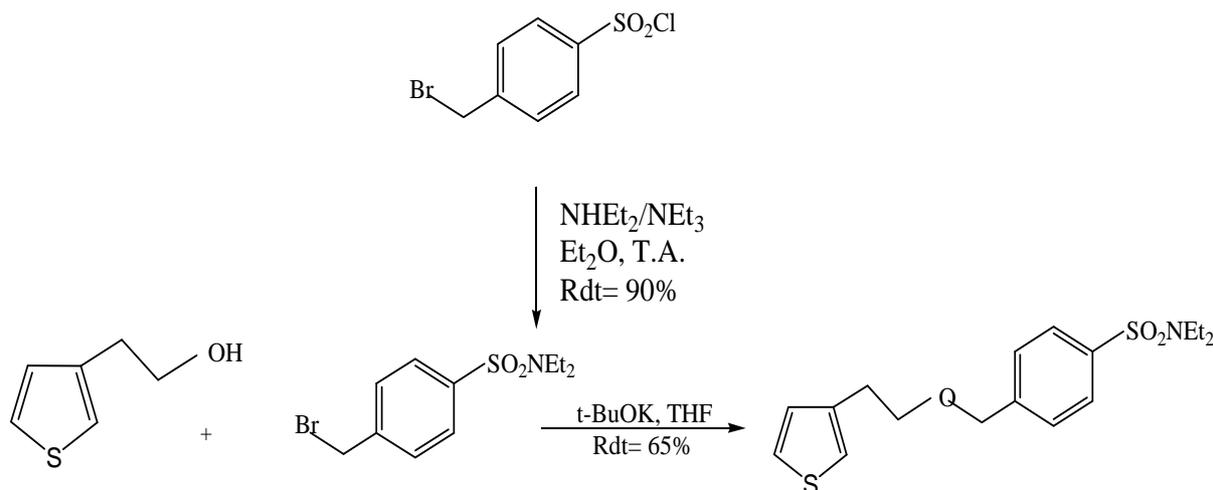


Schéma 1 : Mécanisme de synthèse du monomère

II-1-3- Purification du monomère

Cette expérience s'est faite par chromatographie sur colonne sur gel de silice au système éluant cyclohexane/ acétate d'éthyle (60/40). Deux produits ont été obtenus et analysés par RMN ^1H et ^{13}C . L'élucidation des structures des composés a permis d'identifier le monomère nécessaire à la formation du film de polythiophène. Les spectres RMN ^1H et ^{13}C sont représentés respectivement par les figures 30 et 31 confirmant bien l'obtention du monomère pur.

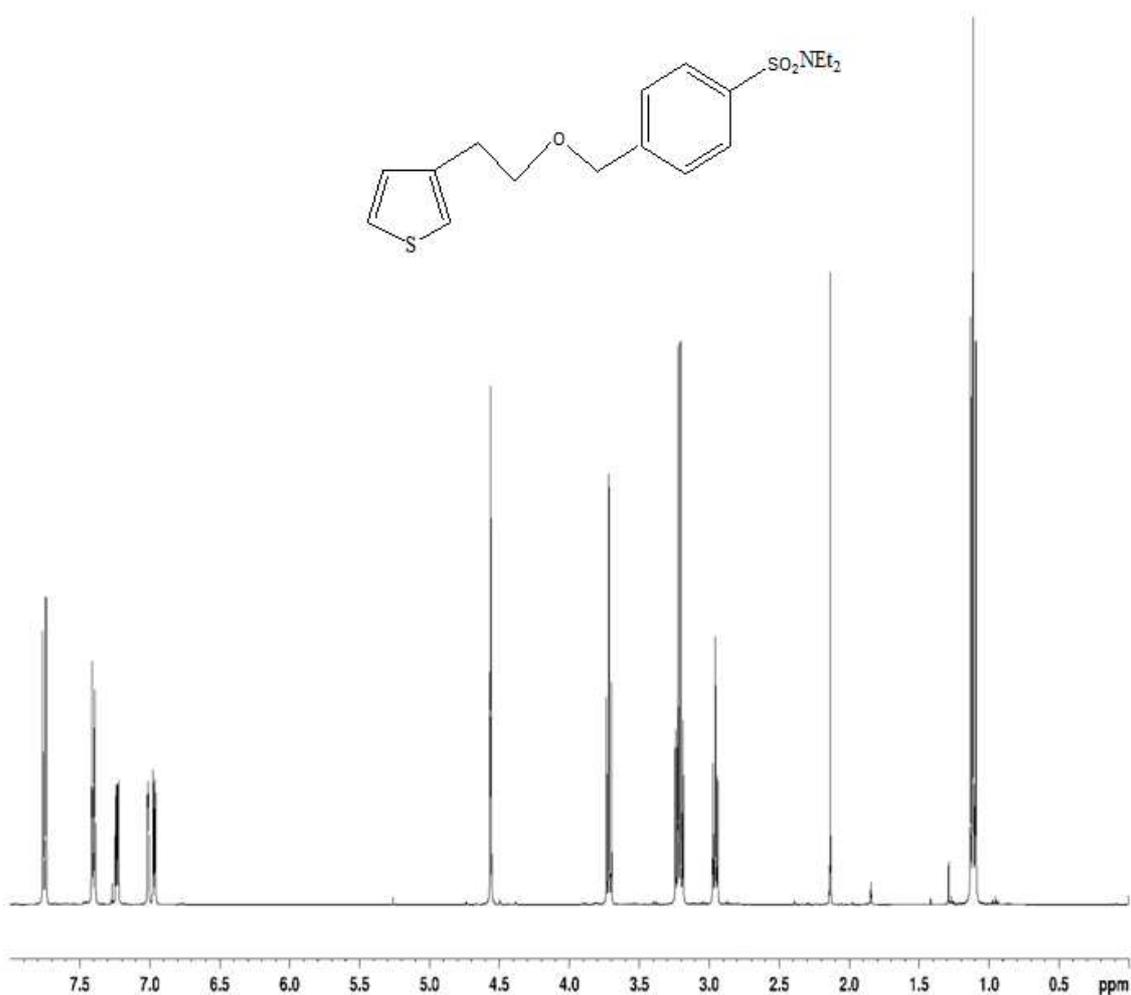


Figure 30: Spectre RMN ^1H du N, N-diéthyl-(2-thiophén-3yl-éthoxyméthyl)benzènesulfonamide

Sur le spectre RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ en ppm/TMS), on observe les signaux suivants : 7,71 - 7,79 (2H, système AA', $\text{H}_{\text{aromatique}}$) ; 7,32 - 7,40 (2H, système BB', $\text{H}_{\text{aromatique}}$) ; 7,25 (1H, dd, $\text{H}_{\text{thiophène}}$) ; 7,03 (1H, dd, $\text{H}_{\text{thiophène}}$), 6,98 (1H, dd, $\text{H}_{\text{thiophène}}$) ; 4,58 (2H, s, O- CH_2 -Ph) ; 3,73 (2H, t, CH_2 -O) ; 3,23 (4H, q, CH_2 -N) ; 2,97 (2H, t, CH_2 -thiophène) ; 1,14 (6H, t, CH_3).

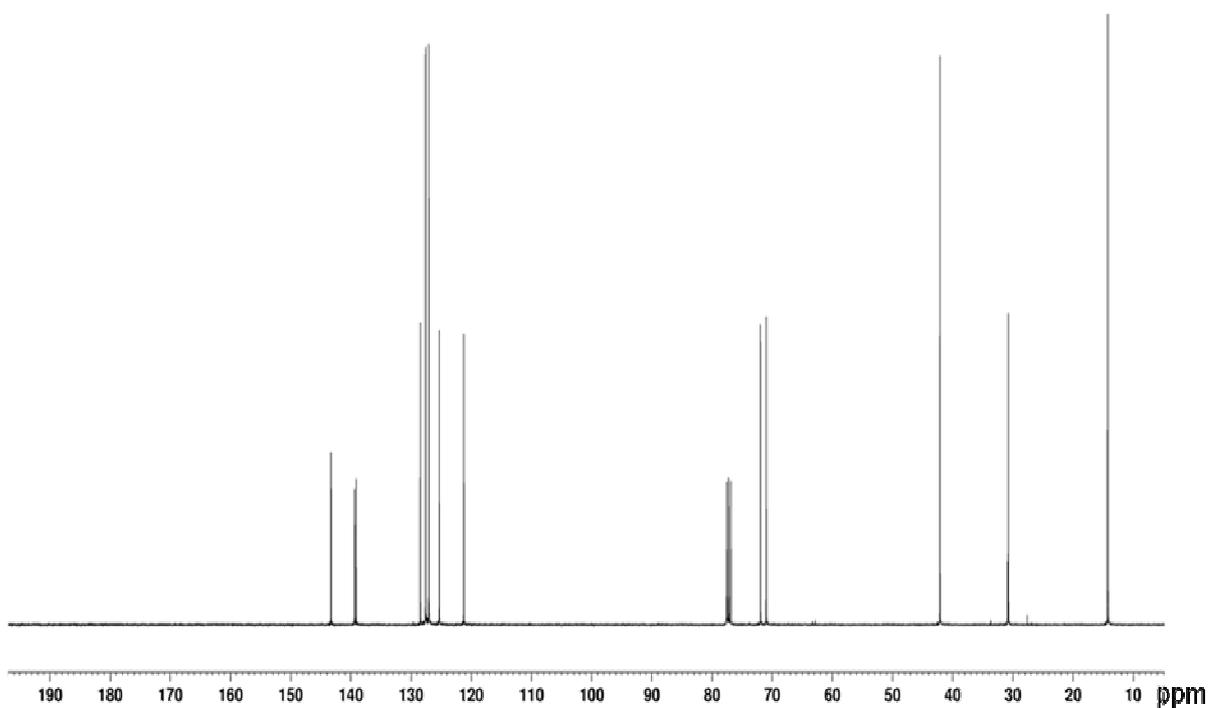
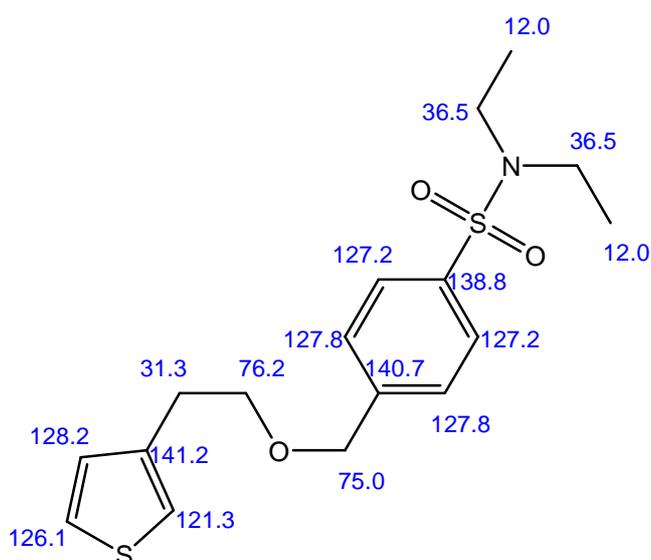


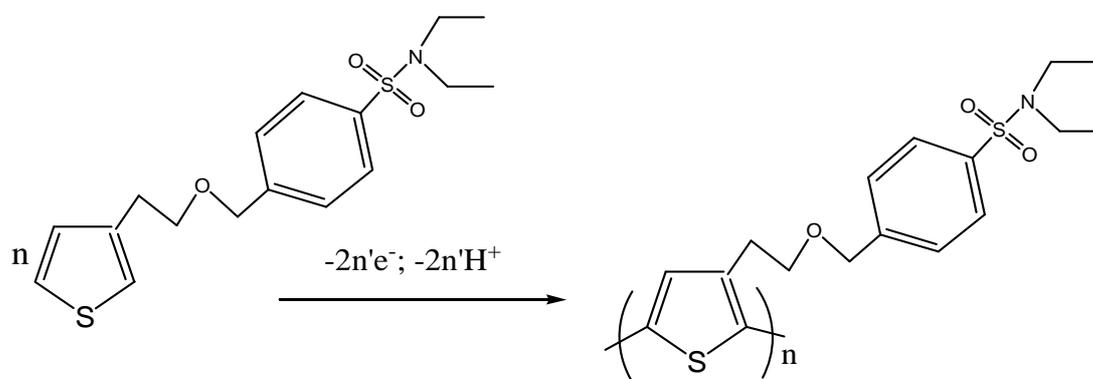
Figure 31: Spectre RMN ^{13}C du N, N-diéthyl-(2-thiophén-3yl-éthoxyméthyl)benzènesulfonamide

Sur le spectre RMN ^{13}C ci-dessus, on observe les déplacements chimiques que l'on peut attribuer de la manière suivante :



II-1-4- Formation du poly (N,N-diéthyl-(2-thiophén-3yl-éthoxyméthyl) – benzènesulfonamide (PolyM)

Le film de Poly(M) est formé par oxydation du monomère (10 mM) dans une solution d'acétonitrile et 0,1M d'hexafluorophosphate de tétra-n-butylammonium(Bu₄NPF₆) employé comme électrolyte. La solution électrolytique est préalablement séchée sur alumine activée à 300°C pendant 3h puis désaérée par un courant d'argon. Les études électrochimiques ont été réalisées avec un montage à trois électrodes. L'électrode de travail est une feuille de platine. L'électrode de référence consiste en un fil d'argent plongeant dans une solution d'acétonitrile contenant un sel d'argent (AgNO₃). La contre électrode est un fil de platine. Le potentiel anodique est imposé entre l'électrode de travail et l'électrode de référence tandis que le courant circule entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire (contre électrode). De cette façon, le système de référence de potentiel n'est pas perturbé au cours de l'étude électrochimique et les courbes intensité - potentiel peuvent être enregistrées. Le schéma suivant représente l'équation d'électropolymérisation. La figure 18 (page 39) démontre la formation de la chaîne de polythiophène de proche en proche à travers les couplages radicalaires.



La figure 32 présente la superposition de plusieurs voltammogrammes enregistrés sur une plaque de platine de 1,20 cm² avec une vitesse de balayage de 100 mV/s.

Légende : Les symboles suivants seront utilisés dans les paragraphes suivants :

I = Intensité de courant

E = Potentiel à l'électrode

ΔF = Variation de fréquence

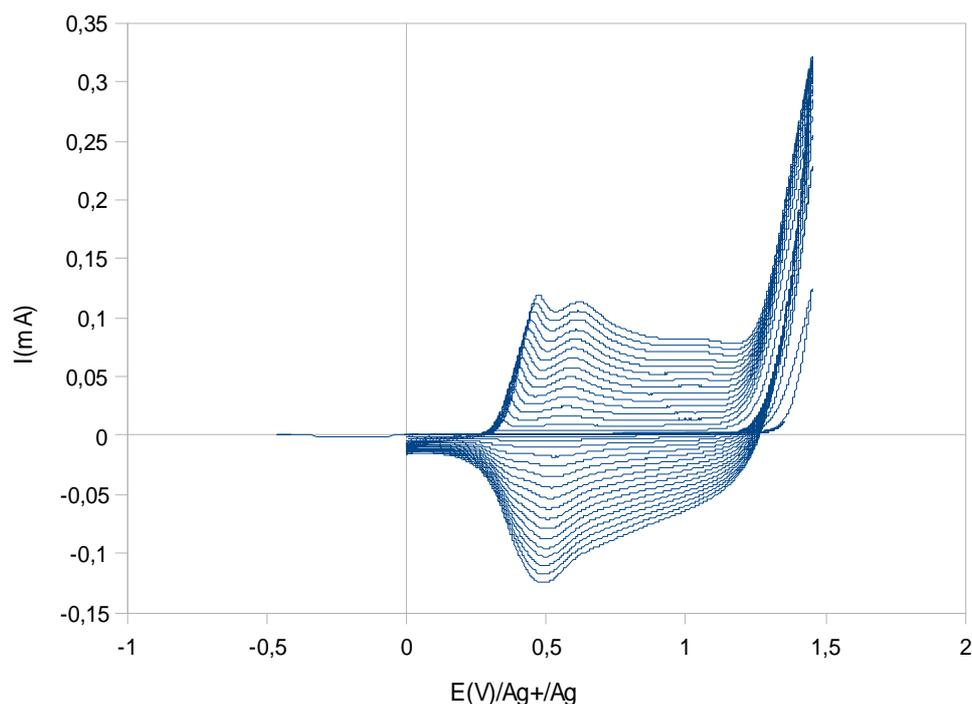


Figure 32: Voltammogrammes cycliques successifs enregistrés sur une plaque de platine plongée dans une solution contenant le monomère dans $\text{CH}_3\text{CN}/\text{Bu}_4\text{NPF}_6$, $V= 100 \text{ mV s}^{-1}$

L'expérience a été reprise sur un cristal de quartz platiné pour enregistrer les prises de masse. Les mêmes conditions expérimentales ont été adoptées : 10 mM du composé M_1 et 0,1M d'hexafluorophosphate de tétra-n-butylammonium (Bu_4NPF_6) employé comme électrolyte, une électrode de référence constituée d'un fil d'argent plongeant dans une solution d'acétonitrile contenant un sel d'argent (AgNO_3), une contre électrode constituée d'un fil de platine. La même vitesse de balayage de 100 mV.s^{-1} . Lorsque l'électrode de travail est un cristal de quartz platiné comme c'est le cas ici, l'analyseur de fréquence (microbalance à cristal de quartz) permet de suivre les variations de la fréquence de résonance du cristal de quartz. Comme démontré dans la partie bibliographique, ces variations de fréquence peuvent être traduites en variations de la masse de l'électrode de travail [220].

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

Cette relation permet de déduire que $\Delta m = -1,066 \Delta F$. La relation de Sauerbrey est vérifiée si la masse de polymère déposée sur l'électrode est inférieure à $15 \mu\text{g}$.

Les figures 33 et 34 illustrent les voltammogrammes observés et la prise de masse enregistrée pour 11 cycles.

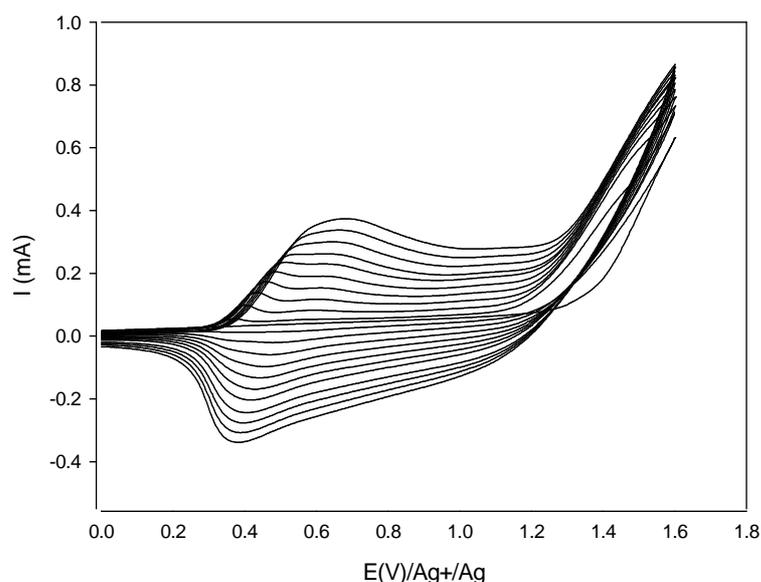


Figure 33: Voltammogrammes cycliques successifs enregistrés sur un cristal de quartz platiné pour 11 cycles, $V= 100 \text{ mV s}^{-1}$

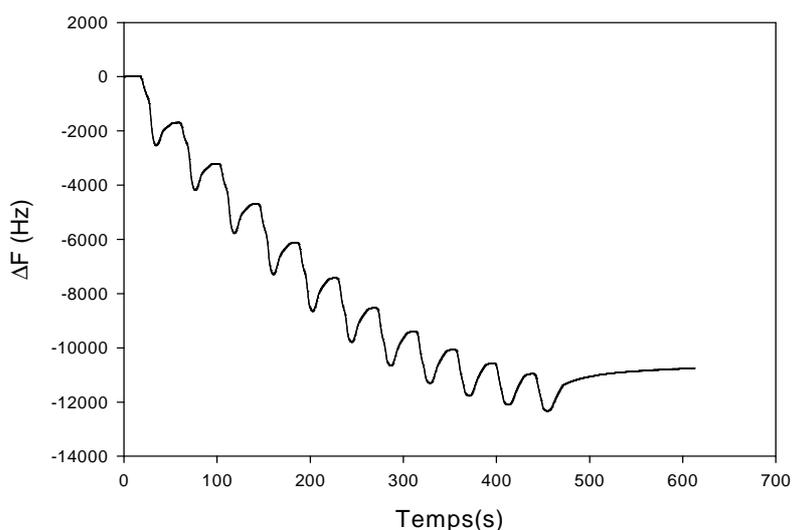


Figure 34: Courbe de suivi gravimétrique observée sur du cristal de quartz platiné pour 11 cycles de voltamétrie cyclique.

Il ressort de la figure 33 de voltamétrie cyclique qu'au premier balayage de potentiel, il y a une augmentation du courant d'oxydation à partir de 1,2 V. Ce courant correspond à l'oxydation du monomère en solution donnant lieu à la formation de radicaux cations. Dès le second balayage aller, un système réversible apparaît à un potentiel (0,6V) inférieur au potentiel d'oxydation du monomère. L'apparition de ce système correspond à l'oxydation du polymère formé à l'électrode. Les balayages supplémentaires montrent une augmentation de l'intensité de ce système attribuable à la formation d'un film électroactif qui croît à la surface

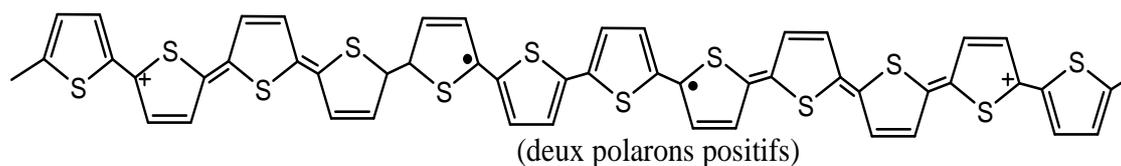
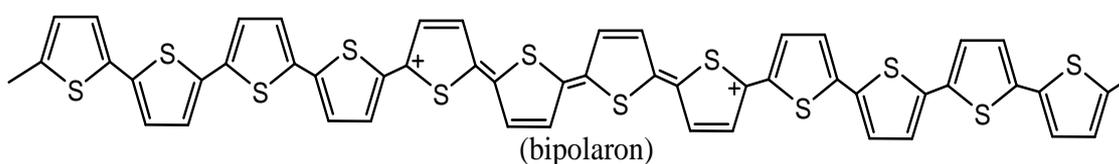
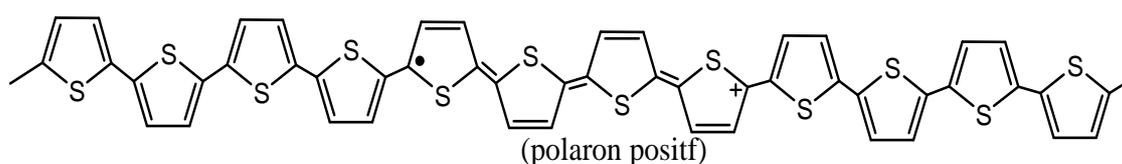
de l'électrode. La croissance du film de polymère est également confirmée par l'augmentation de la masse comme l'illustre la figure 34 de suivi gravimétrique. On observe sur cette figure une variation totale de fréquence de 12000 Hz correspondant à une prise de 12792 ng pour 11 cycles de voltamétrie cyclique. On remarque que cette valeur est proche de la condition limite de Sauerbrey (15 μ g). Ce qui permet de conclure dans notre cas que pour rester dans cette condition, le nombre de cycles lors de l'électropolymérisation doit être limité (moins de 15 cycles).

II-1-5- Etude électrochimique du film poly (N,N-diéthyl-(2-thiophén-3yl-éthoxyméthyl)benzènesulfonamide

Le film a ensuite été étudié dans la solution électrolytique d'acétonitrile dépourvue de monomère afin de rendre compte du comportement intrinsèque de polymère obtenu précédemment.

II-1-5- 1- Comportement anodique

En choisissant le domaine de potentiel entre -0.3V et +0.9 V, on obtient une courbe d'oxydation caractéristique du dopage p du poly(M). Le dopage p consiste en une perte d'électron. Ce qui entraîne la création d'une lacune électronique à l'origine du mouvement des électrons π le long de la chaîne. Des exemples de dopage p sont représentés ci-dessous où on observe un polaron (forme radical cation), un bipolaron (forme bicationique) et deux polarons dans la même molécule macromolécule.



Pour assurer l'électroneutralité du système, chaque charge positive est compensée par l'entrée dans le polymère poreux d'un anion PF_6^- provenant de la solution électrolytique. On obtient alors une conduction ionique et électronique avec un taux de dopage contrôlable en fonction de la quantité de charges introduites par unité monomérique dans le polymère à un potentiel donné.

Comme observé sur la figure 35, l'intensité du courant mesurée pendant le dopage p du poly(M) reste stable à partir du deuxième balayage de potentiel (superposition des voltammogrammes) ; ce qui indique une bonne stabilité du dopage p de ce polymère. Cette stabilité est corroborée par la courbe de suivi gravimétrique.

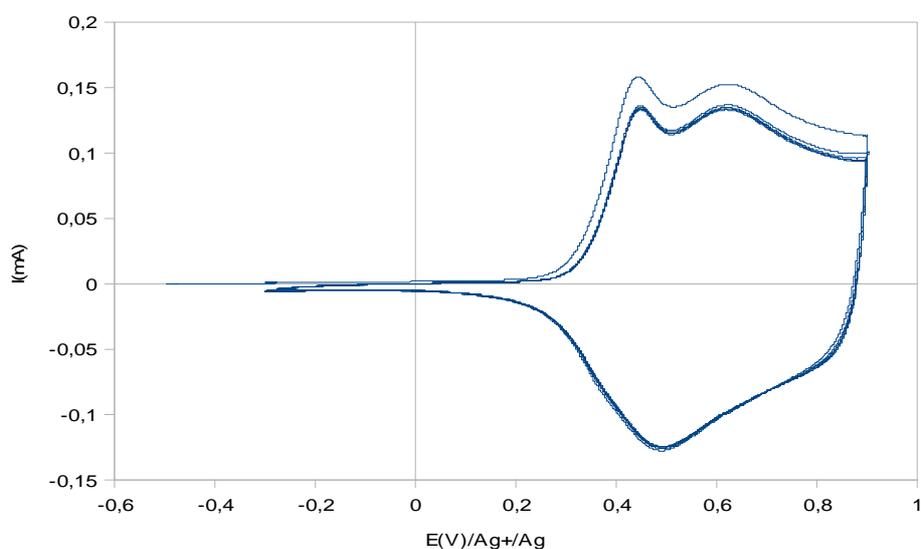


Figure 35: Voltammogrammes cycliques enregistrés sur plaque de platine recouvert du film de poly(M) obtenu précédemment. Ce film est plongé dans la solution de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{Bu}_4\text{NPF}_6$ (vitesse de balayage, 100 mV s^{-1})

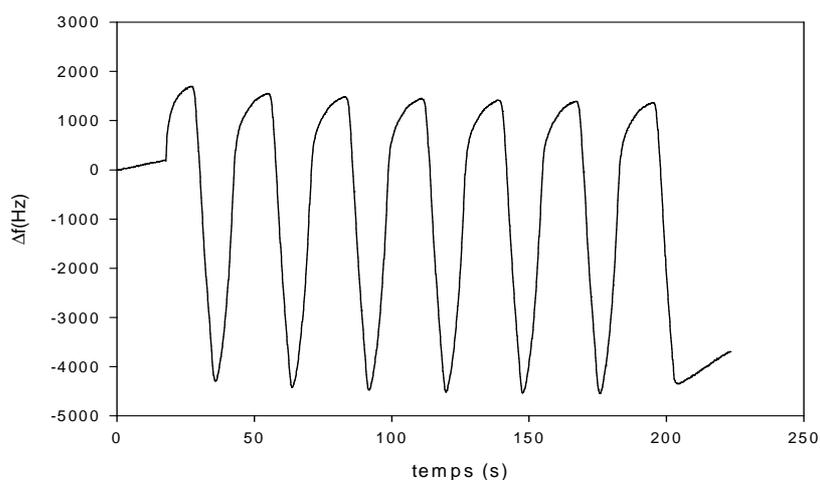


Figure 36: Courbe de suivi gravimétrique du dopage p du poly(M)

Cette courbe de suivi gravimétrique du dopage p (figure 36) montre une réversibilité du processus. En effet, nous observons une prise de masse constante au fil du temps ($\sim 6\mu\text{g}$) enregistrée aux différents balayages allers. Par la suite, une masse concomitante ($\sim 6\mu\text{g}$) de même nature (figure 36) est quant à elle observée pendant la neutralisation du film enregistrée aux balayages retours. Cette recherche d'électroneutralité au sein du polymère durant les différents cycles correspond à un processus de rentrée-sortie d'anions PF_6^- . La régularité de la courbe (figure 36) démontre une bonne stabilité électrochimique du dopage, et donc du polymère.

II-1-5-2- Comportement cathodique

Le comportement cathodique du poly(M) a été étudié sur le domaine de potentiel 0V à -2,5V dans une solution d'acétonitrile contenant Bu_4NPF_6 (0,1M) et préalablement séchée sur l'alumine activée, puis désaéré par un courant d'argon. Le voltammogramme (figure 37) montre un système réversible centré à -2,3V correspondant au processus de dopage n (création de charges négatives) dans la chaîne de poly(M). L'application d'un potentiel très cathodique peut conduire à la dégradation des chaînes polymères [228, 229]. Dans le cas du polythiophène qui nous occupe, l'application d'un potentiel cathodique limite de -2,5V permet la réduction des fonctions sulfonamides tout en conservant l'intégrité de la matrice (dopage p et n stables). Par ailleurs, comme indiqué précédemment nous observons un début de vague de réduction vers -2,5V traduisant la coupure cathodique de la liaison S-N de la fonction sulfonamide pour conduire aux ions sulfates SO_2^- . On note sur la figure 37 une intensité plus grande du pic de réduction au premier balayage. Ce phénomène est attribué à un courant de rémanence et correspond à la réduction d'une fraction de polymère non réduite entre +0,8V et -0,1V lors de la neutralisation du dopage p [228]. Ce phénomène de rémanence disparaît dès le second balayage et les voltammogrammes suivants se stabilisent en maintenant l'intensité du dopage n. Ainsi, le film est préservé à l'issue de plusieurs balayages du potentiel dans un intervalle compris entre 0V et -2,5V.

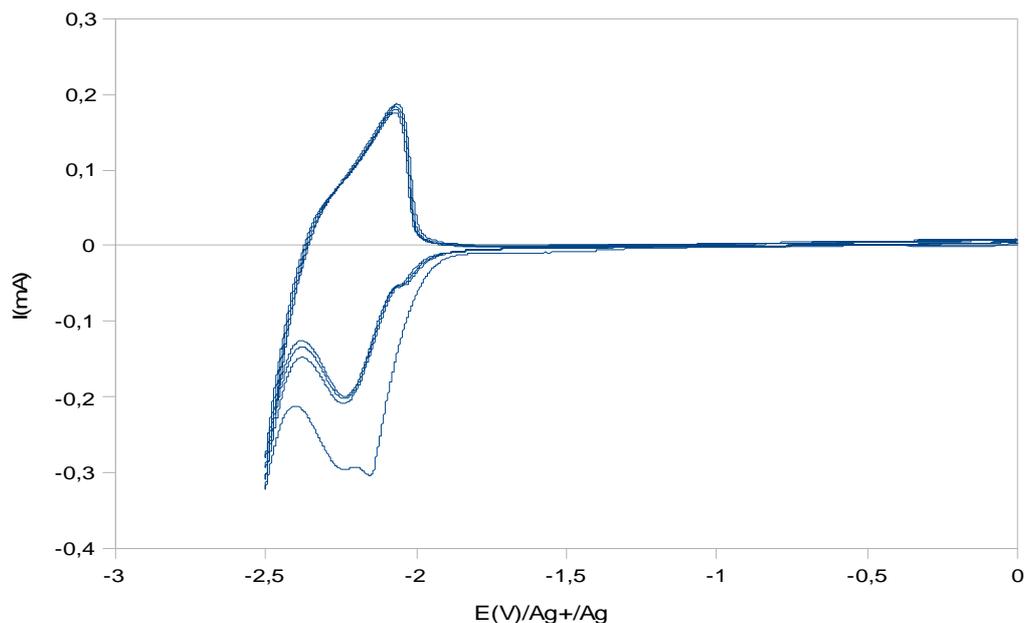


Figure 37: Voltammogrammes cycliques enregistrés à $100\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ de 0 V à -2,5V sur une plaque de platine recouverte d'un film de poly(M). Le film est plongé dans $\text{CH}_3\text{CN}/\text{Bu}_4\text{NPF}_6$

Par ailleurs, l'étude a été poursuivie en enregistrant la variation de masse à l'électrode de travail au cours du processus électrochimique. Les figures 38 et 39 illustrent le phénomène observé.

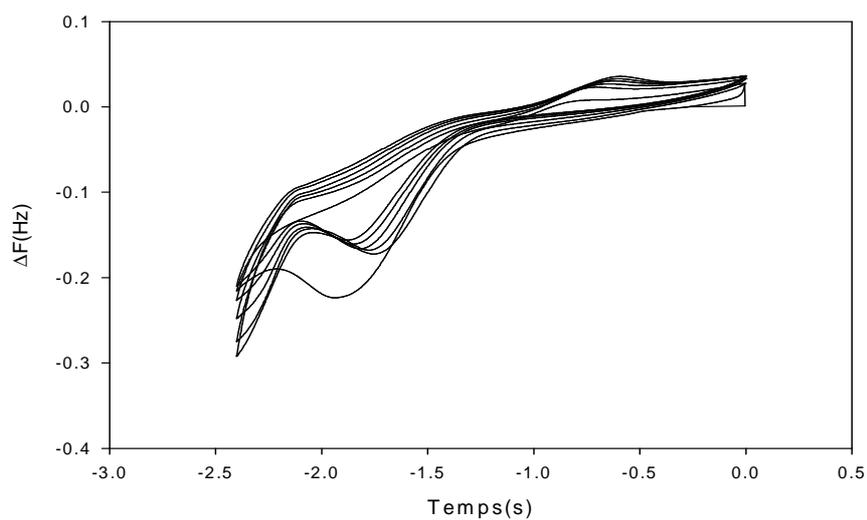


Figure 38: Voltammogrammes de coupure cathodique des liaisons S-N

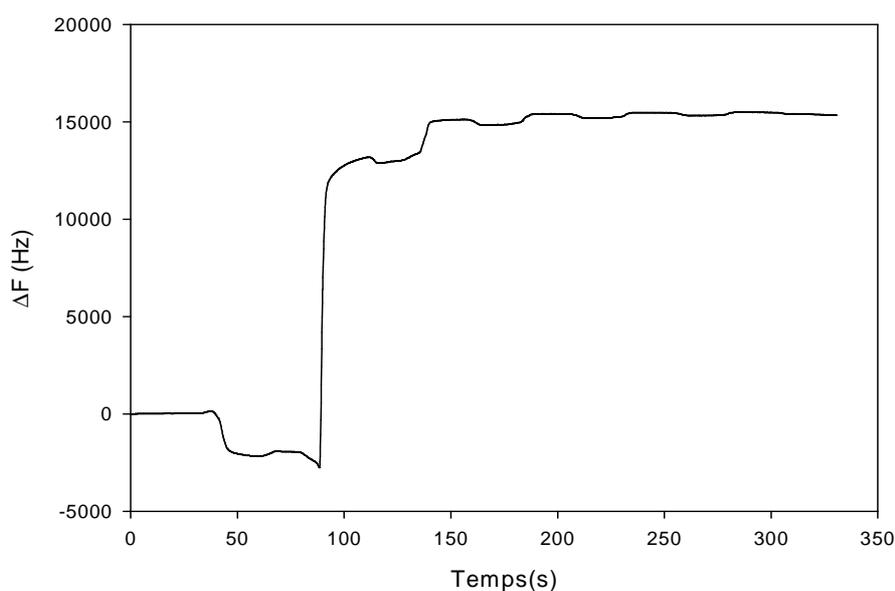
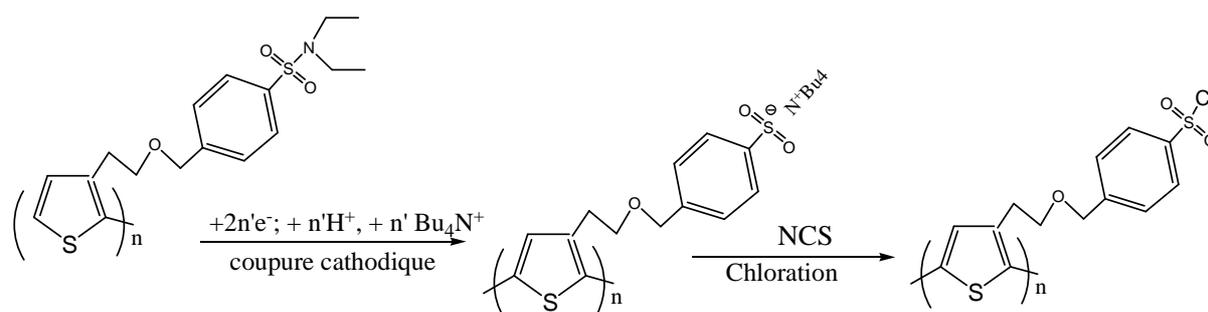


Figure 39: Courbe de suivi gravimétrique de la coupure cathodique des liaisons S-N

L'étude du comportement cathodique du poly(M) a permis de mettre en évidence la coupure des liaisons S-N des fonctions sulfonamides du polymère. Sur la figure 38 correspondant à l'étude cathodique du film de polymère sur cristal de quartz, on note deux pics de réduction autour de -1,7 V et de -2,45V. Celui à -1,7 V correspond au dopage n du film de polymère tandis que celui à -2,45 correspond à la coupure des liaisons S-N. Ceci est en accord les données de la littérature [230, 231]. Sur la courbe de gravimétrie (figure 39), on observe une perte brutale de masse à l'électrode au premier balayage et ensuite une stabilité du signal pendant les autres balayages. Cela indique que la coupure des liaisons S-N est quantitative lors du premier balayage de potentiel. Ceci corrobore avec les voltammogrammes correspondants (figure 38).

Le bon contrôle de la coupure de ces liaisons est important car cette étape est très déterminante pour la préparation de la fonction d'ancrage (SO_2Cl). En effet, les anions sulfinates (SO_2^-) créés lors de la coupure cathodique de la fonction SO_2NR_2 sont refunctionalisés en chlorure de sulfonyle par introduction du polymère dans une solution ($3,4 \cdot 10^{-2}\text{M}$) de N-chlorosuccinimide (NCS) dans l'acétonitrile pendant 15mn à température ambiante en accord avec les études préliminaires issues des littératures [230, 231].



Ces études montrent également que le groupement chlorure de sulfonyle réagit à température ambiante avec des nucléophiles faibles (alcools, amines primaires et secondaires) pour conduire à des esters sulfoniques ou sulfonamides. C'est ce qui a d'ailleurs motivé le choix d'un polymère possédant ce groupement fonctionnel dans notre projet pour accrocher de manière covalente les biomolécules cibles. Ces biomolécules, essentiellement constituées d'acides aminés contiennent en effet plusieurs groupements amines. Le polythiophène ainsi synthétisé est analysé par spectroscopie Raman pour confirmer sa nature mais aussi pour avoir un spectre de référence qui permettra de faire des comparaisons avec les surfaces possédant des biomolécules immobilisées. La littérature faite sur la synthèse des polythiophènes nous a permis d'interpréter les spectres et de comparer les valeurs expérimentales des bandes de vibrations obtenues à celles de la littérature [171-173, 232]. La figure 40 représente le spectre Raman (T64000 : Jobin-Yvon, CCD refroidi à l'azote liquide) du polymère fonctionnalisé synthétisé.

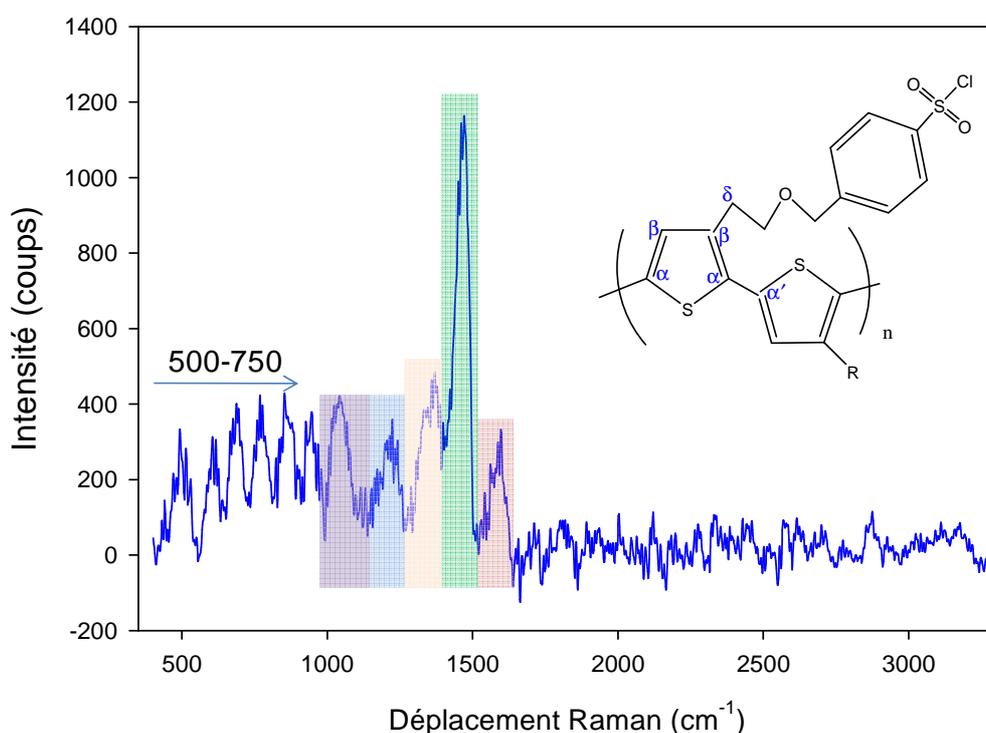


Figure 40: Spectre Raman du poly [chlorure 4-(2-thiophène-3-yl-éthoxyméthyle)benzènesulfonyle]

Plusieurs publications dans la littérature traitent des polythiophènes et bon nombres de techniques de caractérisation sont utilisées parmi lesquelles la spectroscopie Raman. Le tableau VII compare les déplacements Raman des bandes de vibrations des polythiophènes dans la littérature et ceux que nous avons obtenus expérimentalement.

Tableau VII: Interprétation du spectre Raman du poly[chlorure 4-(2-thiophén-3-yl-éthoxyméthyl)benzènesulfonyl]

| Fréquences (cm ⁻¹) issues de la littérature [170, 171] | Fréquences expérimentales (cm ⁻¹) | Attributions |
|--|---|---|
| 1550-1630 | 1597,9 | Dérivé du benzène |
| 1518 | 1521 | C α =C β vibration de valence antisymétrique |
| 1445 - 1455 | 1471,5 | C α =C β vibration de valence symétrique |
| 1378 | 1370.2 | C β -C β vibration de valence |
| 1325 -1425 | 1326,9 | SO ₂ - Cl |
| 1210 | 1224,4 | C α -C α' |
| 1186 | 1177,8 | C β - H |
| 1145 | 1151,6 | SO ₂ |
| 1125 | 1115,1 | SO ₂ - Cl |
| 1050 | 1042,3 | Noyau aromatique 1,4-substitué |
| 1021 | 1018 | C β' - C δ |
| 930 | 946,6 | C-O-C vibration de valence symétrique. |
| 720- 830 | 769- 853,3 | Benzène 1,4-disubstitué |
| 500 - 750 | 493 – 688,2 | C- S-C vibration de déformation des cycles thiophènes. |

D'après les résultats du spectre Raman, les bandes de vibrations du polythiophène que nous avons observées confirment les données issues de la littérature et par conséquent valident notre synthèse. Nous nous sommes intéressés aux polythiophènes en tant que matrice support potentielle pouvant être fonctionnalisée avant immobilisation d'éléments biologiques. Dans ce

cadre, les biomolécules sont essentiellement des protéines, il apparaît donc important de bien distinguer par diffusion Raman le signal provenant des polythiophènes de celui provenant des protéines, en particulier dans la zone 500 - 1700 cm^{-1} . La figure 41 représente le spectre comparatif de la protéine A et du polythiophène.

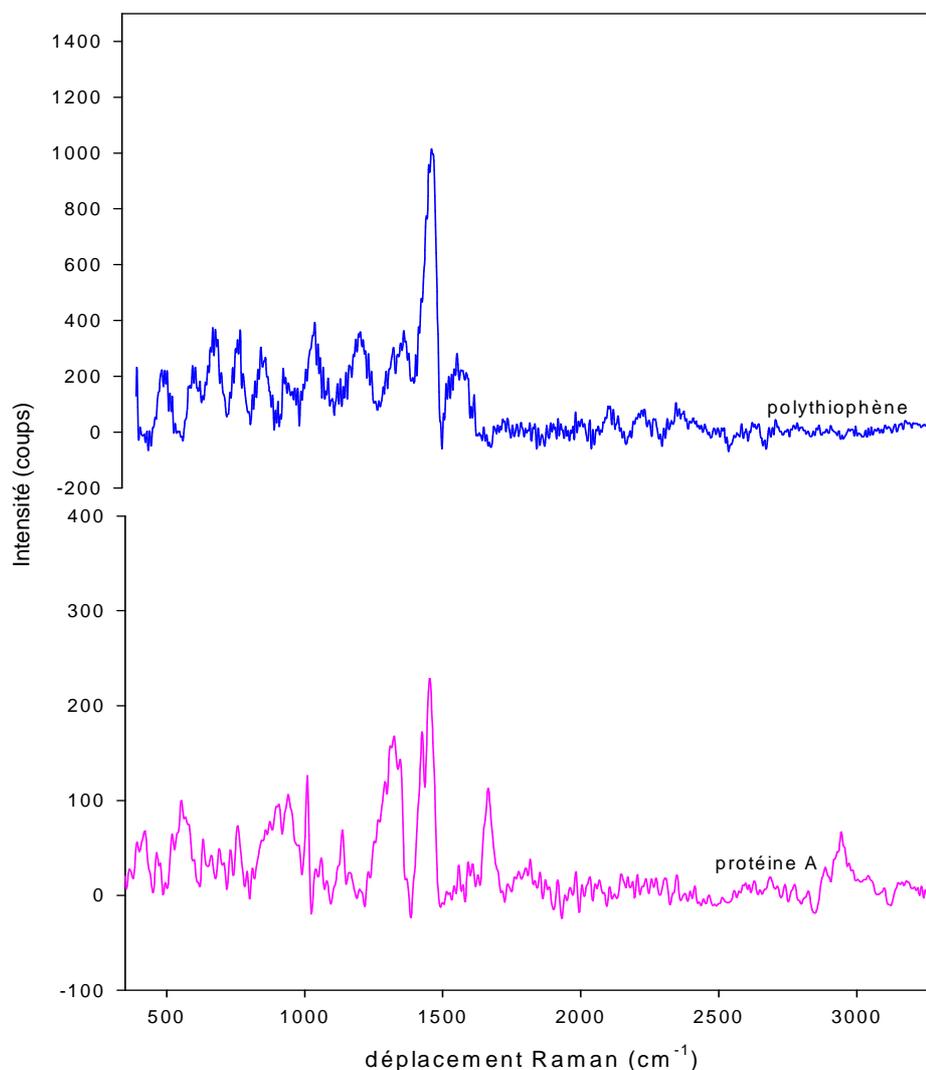


Figure 41: Comparaison entre le spectre Raman de la protéine A et le spectre du polythiophène

L'étude comparative de ces spectres est faite dans le tableau VIII ci-dessous.

Tableau VIII: Comparaison des bandes Raman de la protéine A et du poly[chlorure 4-(2-thiophén-3-yl-éthoxyméthyl)benzènesulfonyle]

| Protéine A | Polythiophène synthétisé |
|----------------------|--------------------------|
| 1665 | 1597,9 |
| 1518 | 1521 |
| 1490 1445 1425 | 1471,5 |
| 1372 | 1370.2 |
| 1229 | 1326,9 |
| 1101 | 1224,4 |
| 1132 | 1177,8 |
| 1125 | 1151,6 |
| 1050 | 1115,1 |
| 1003 | 1042,3 |
| 936 | 1018 |
| 901 | 946,6 |
| 855 | 769- 853,3 |
| 755 | 493 – 688,2 |

En comparant les bandes de vibrations de la première protéine que nous allons immobiliser à savoir la protéine A avec celles du polymère précédemment synthétisé, on note que les bandes de vibrations du polymère recouvrent toute la région comprise entre 500 cm^{-1} et 1700 cm^{-1} (zone caractéristique des acides nucléiques et des lipides : acides gras des protéines). Il apparaît ainsi très difficile à terme de reconnaître par spectroscopie Raman les signaux caractéristiques des biomolécules immobilisées sur un support polythiophène même si la procédure est validée. Le polythiophène, bien qu'il possède de nombreux avantages (ceux cités précédemment) n'est donc pas un support adéquat pour l'immobilisation des biomolécules choisies et leur identification par spectroscopie Raman dans ce projet. Ainsi, nous avons donc envisagé une autre technique de caractérisation des biomolécules immobilisées sur le support polymère à savoir la microscopie à fluorescence et la microbalance à cristal de quartz.

II-1-6- Immobilisation des biomolécules sur le support polymère

Comme présenté dans le paragraphe précédent, il est difficile de confirmer par spectroscopie Raman l'immobilisation des biomolécules sur le support polythiophène. Nous avons finalement opté dans cette partie pour un suivi par microbalance à cristal de quartz et par microscopie à fluorescence. Le film de polymère synthétisé précédemment est analysé par fluorescence pour avoir un spectre de référence. La figure 42 représente l'image de fluorescence du poly [chlorure 4-(2-thiophén-3-yl-éthoxyméthyl)-benzènesulfonyle].



Figure 42: Image de fluorescence du poly[chlorure 4-(2-thiophén-3-yl-éthoxyméthyl)-benzènesulfonyle]

On observe sur la figure 42 une tache de fluorescence confirmant bien la synthèse du polymère. Cette image sera comparée à celle sur laquelle sera immobilisée l'IgG fluorescent afin de valider le processus d'immobilisation.

Le but du projet étant de détecter une bactérie dans un échantillon donné, il est forcément nécessaire d'immobiliser au préalable un anticorps spécifique à cette bactérie. Pour optimiser et favoriser la reconnaissance spécifique anticorps-antigène, l'anticorps doit être bien immobilisé en préservant ses sites de reconnaissance de l'antigène. Pour cela, une protéine A ayant des interactions spécifiques avec l'anticorps est préalablement ancré sur notre support avant toute immobilisation de l'anticorps. Cette protéine A permet de bien orienter l'anticorps à la surface.

II-1-6-1- Immobilisation de la protéine A

La solution de protéine A est préparée dans le tampon phosphate (PBS) à une concentration de 50 mg/l. La surface polymère synthétisée et fonctionnalisée est montée dans une cellule à microbalance à cristal de quartz. 400 μ l de tampon sont introduites dans la cellule pour faire le point zéro et en même temps éviter la saturation de la microbalance. Une fois le signal

stabilisé 10 μl de solution de protéine A sont introduites dans le milieu. Après la nouvelle stabilisation, 10 μl sont encore introduites dans le milieu et ceci jusqu'à l'observation de l'invariance du signal en fonction de l'ajout de solution de protéine. La surface est ensuite lavée à l'eau ultrapure et séchée. La figure 43 présente les variations de fréquence observées pendant l'immobilisation.

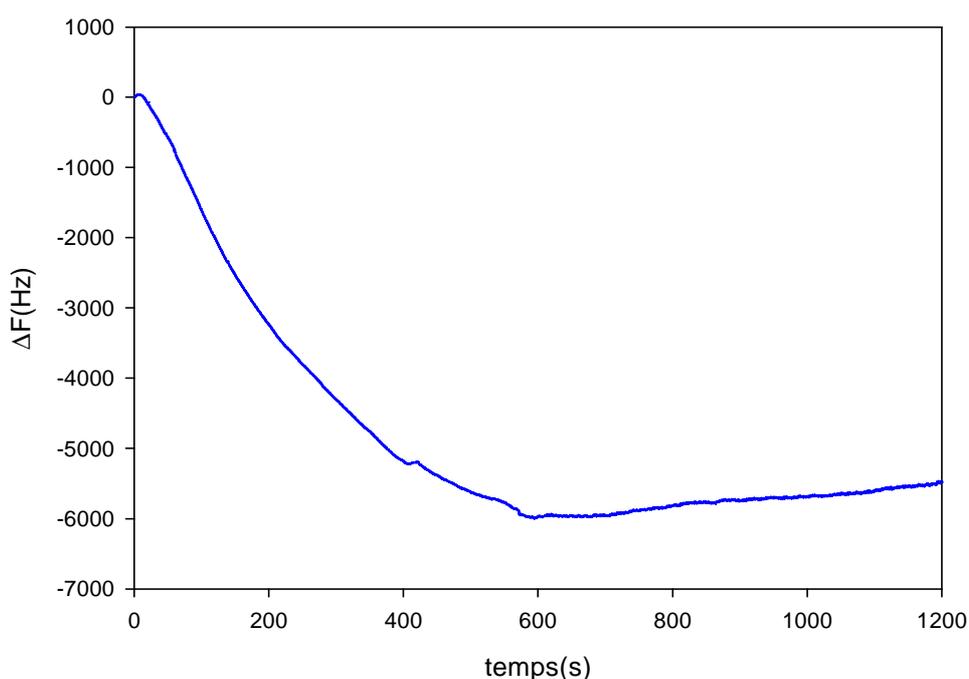


Figure 43: Courbe de suivi gravimétrique de l'immobilisation de la protéine A sur le poly(M) fonctionnalisé

Sur la courbe de suivi gravimétrique ci-dessus (figure 43), on observe une variation de fréquence de l'ordre de 5500 Hz correspondant à une variation de masse de 5863 ng. Nous notons que cette prise de masse importante n'est possible que pour une quantité de polymère déjà présente sur la surface inférieure à 10 μg . Ces résultats nous permettent bien de confirmer que la protéine A a été immobilisée.

II-1-6-2- Immobilisation de l'IgG spécifique à *Salmonella*

Une solution de 10 mg/l d'IgG est préparée dans le tampon PBS. L'échantillon précédent est remonté dans la cellule, une première injection de 100 μl de tampon est faite toujours pour la stabilisation du signal et constituer le point initial. Les additions de 10 μl de solution d'IgG ont été faites jusqu'à l'invariance du signal de la microbalance. La figure 44 représente les variations de fréquence observées.

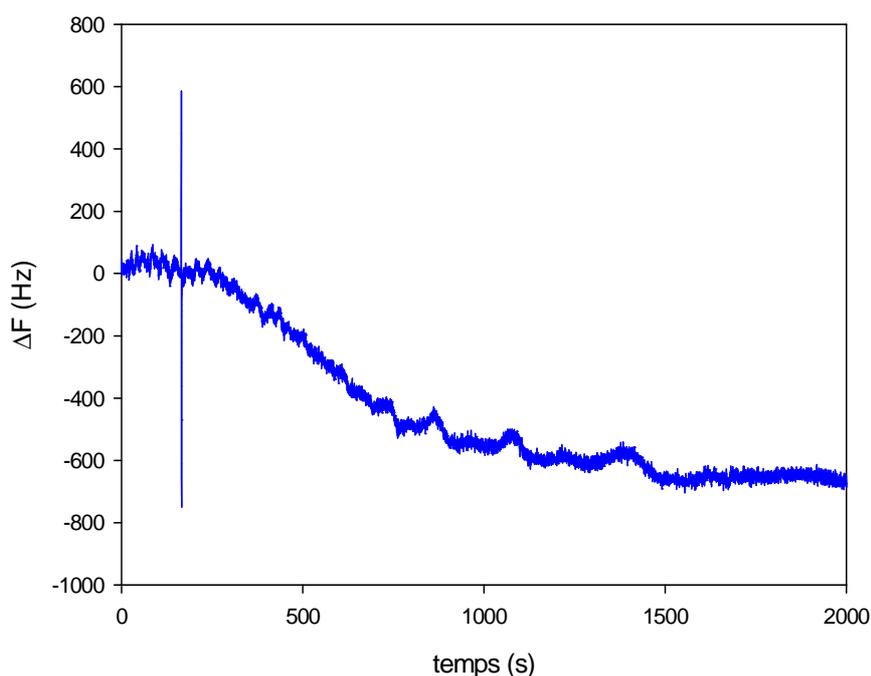


Figure 44: Courbe de suivi gravimétrique de l'immobilisation de l'IgG

La figure 44 montre une variation de fréquence de l'ordre de 700 Hz correspondant à une prise de masse calculée d'IgG immobilisé de 746,5 ng. En conclusion, l'IgG a été bien immobilisé même si les quantités restent légèrement faibles.

II-1-6-3- Immobilisation de l'IgG fluorescence

Pour obtenir des contrôles d'immobilisation supplémentaires, nous avons choisi à cette étape de confirmer l'immobilisation de l'IgG précédent par un autre IgG fluorescent qui lui est spécifique. Pour cela, une solution d'IgG fluorescent de concentration 140 mg/l a été préparée suivi des injections de 10 μ l dans la cellule sur laquelle est monté l'échantillon portant le premier IgG. Un contrôle positif d'immobilisation du premier IgG sera marqué par des prises de masse au niveau de la microbalance à cristal de quartz et une fluorescence abondante sur l'image de la microscopie à fluorescence. Les figures 45 et 46 présentent les résultats obtenus.

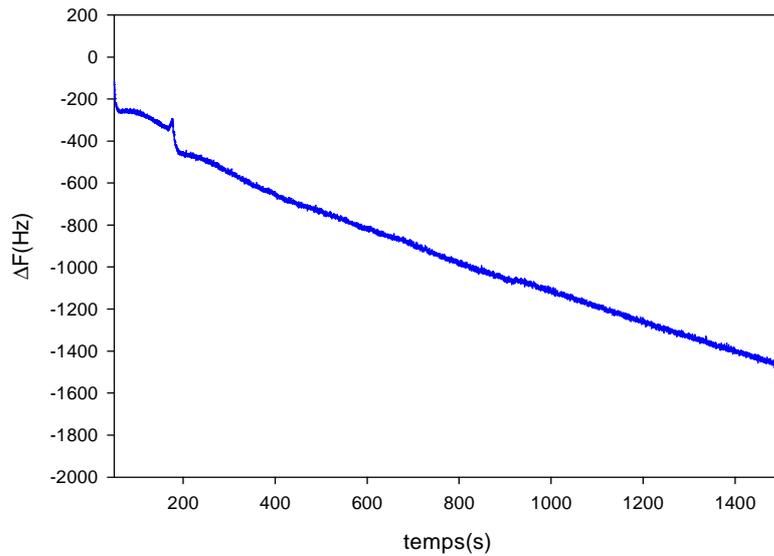


Figure 45: Courbe de suivi gravimétrique de l'immobilisation de l'IgG fluorescent

Cette figure indique une variation de fréquence de l'ordre de 1200 Hz ; donc une prise de masse calculée de 1279,2 ng. D'où, l'anti- IgG fluorescent est bien immobilisé. Ces résultats sont corroborés par l'image de fluorescence.

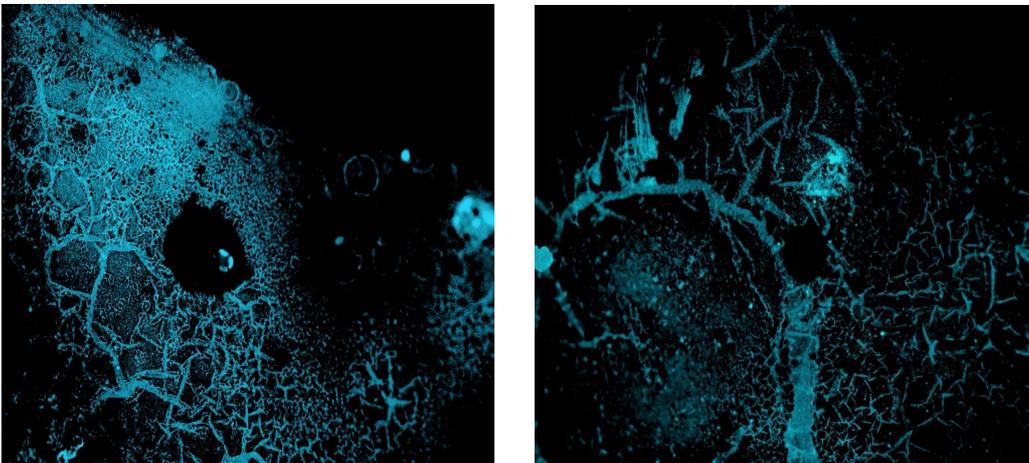


Figure 46: Image de fluorescence après immobilisation de l'anticorps fluorescent sur deux endroits différents de la surface

Les deux images de la figure 46 représentent la fluorescence de l'IgG fluorescent sur deux endroits différents de l'échantillon. On remarque que quelque soit la position où l'on se trouve sur l'échantillon, la fluorescence est plus marquée comparée à celle du polymère tout seul (figure 42). Ces résultats nous permettent de confirmer que la biomolécule fluorescente a été

immobilisée. Cette dernière étant spécifique à un premier IgG, on conclut par conséquent que le premier IgG a été au préalable bien immobilisé.

II-1-6-4- Immobilisation de la bactérie (salmonella)

L'applicabilité du polythiophène pour détecter une bactérie a été réalisée sur salmonella et la figure 47 présente les résultats obtenus.

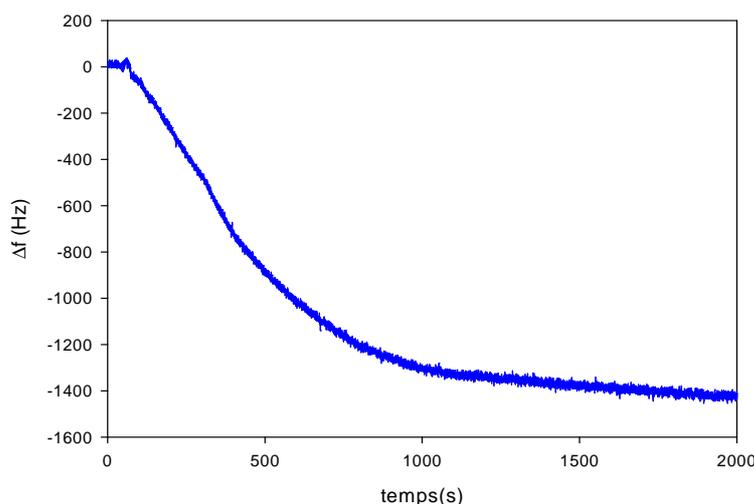


Figure 47: Suivi de l'immobilisation de salmonella

On observe sur la figure 47, une variation de fréquence de l'ordre de 1400 Hz correspondant à une variation de masse de 1492,4 ng confirmant très bien l'immobilisation de la bactérie. Nous avons ainsi pu valider la détection d'une bactérie par le polythiophène.

En conclusion

Cette partie nous a permis de synthétiser un polymère conducteur par électropolymérisation ; ce polymère a été caractérisé par spectroscopie Raman, microbalance à cristal de quartz et microscopie à fluorescence. Les essais d'immobilisation de la protéine A, l'anticorps spécifique à la salmonelle, un anticorps fluorescent spécifique à l'anticorps contre salmonelle et la salmonelle elle-même ont été entrepris. Un des objectifs de ce travail étant principalement les caractérisations du support et de matériels biologiques par **spectroscopie Raman**, il s'avère que le polythiophène n'est pas adapté à la caractérisation par spectroscopie Raman de ces biomolécules bien que le processus d'immobilisation soit positif. Nous avons donc envisagé une nouvelle voie avec un autre type de surface que nous présenterons dans la partie suivante.

II-2- Modification de la surface d'or par le chlorure de parabenzènesulfonyle

La partie précédente sur la synthèse du polythiophène a démontré que ce polymère n'était pas le meilleur candidat pour l'immobilisation des biomolécules en vue d'une détection Raman. Il est donc question dans cette partie d'élaborer une nouvelle surface spécifique permettant l'ancrage facilité des bioéléments et ne présentant pas un spectre Raman recouvrant le domaine fréquentiel des biomolécules. De plus, la technique principale de caractérisation étant la diffusion Raman, le choix du support à fonctionnaliser est de grande importance afin d'éventuellement coupler effet d'exaltation du signal attendu facilitant la détection des biomolécules. Plusieurs surfaces présentent cette propriété potentielle d'exaltation. Nous pouvons citer : l'or, l'argent, le platine. Nous avons choisi l'or en raison des études préliminaires sur les fonctionnalisations de surface pour l'immobilisation de biomolécules. Il ressort de la littérature que le soufre forme des liaisons covalentes avec la surface d'or. En revanche, la procédure de synthèse nécessite beaucoup de temps, d'étapes, de solvants et de réactifs mis en jeu. L'idée de notre projet est d'utiliser une molécule chimique qui va également former une liaison covalente avec de l'or comme dans le cas du soufre mais ceci en nécessitant moins d'étapes, de réactifs et de solvants. Nous avons choisi de fonctionnaliser la surface d'or avec le chlorure de benzènesulfonyle pour rester dans le but du projet à savoir une fonction d'ancrage en chlorure de sulfonyle et aussi parce qu'on est capable pour greffer facilement cette molécule de manière covalente sur la surface d'or.

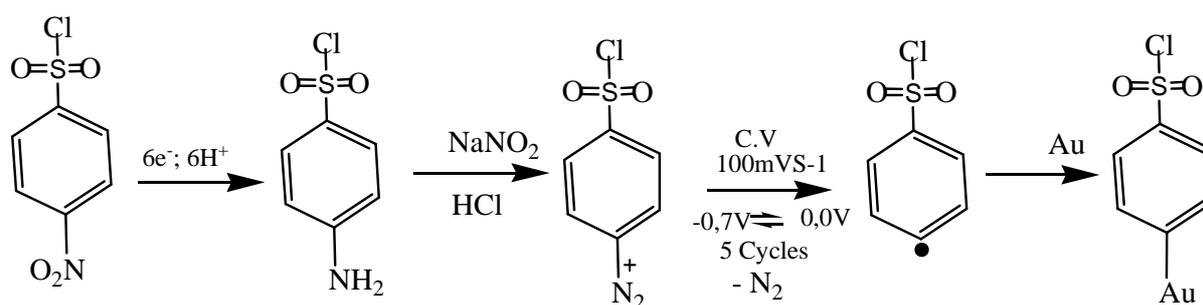
II-2-1- Synthèse électrochimique du chlorure de parabenzènesulfonyle

Nous avons utilisé deux méthodes pour la synthèse de ce composé donc nous allons développer tour à tour chacune en présentant ses avantages et ses inconvénients.

II-2-1-1- Synthèse à partir du chlorure de 4-nitrobenzène sulfonyle

Le solvant utilisé dans ce protocole est l'hexafluorophosphate de n-tétrabutylammonium dans l'acétonitrile : $\text{CH}_3\text{CN}/\text{Bu}_4\text{NPF}_6$ (0,1M). Le chlorure de 4-nitrobenzènesulfonyle (2,9 mg) est dissous avec 5,5 mg de nitrite de sodium (NaNO_2) dans 5 ml de solvant. Une faible portion d'acide chlorhydrique (200 μl) est associée au mélange pour permettre la conversion des

groupements nitro en groupements amines qui réagiront avec le nitrite de sodium NaNO_2 pour former le diazonium. La solution a été introduite dans une cellule électrochimique en téflon d'une capacité de 12 ml. Les études électrochimiques ont été réalisées avec un montage à trois électrodes. Une électrode de travail constituée d'une plaque d'or sur quartz ($\Phi = 5 \text{ mm}$), une électrode de référence constituée d'un fil d'argent plongeant dans une solution d'acétonitrile contenant un sel d'argent (AgNO_3 à 0,1M) et un fil de platine comme contre électrode. Le mécanisme de cette synthèse est résumé par l'équation ci-dessous.



De cette équation, il ressort qu'une fois les fonctions nitro réduites en amine, le nitrite de sodium dans le milieu réagit avec la fonction amine pour donner un sel de diazonium. Ce sel de diazonium est ensuite transformé en radical libre (avec dégagement de l'azote) qui à son tour formera des liaisons covalentes avec la surface de l'or. La surface d'or est ainsi modifiée par une monocouche organique avec un groupement chimique. Si la réaction n'est toutefois pas bien contrôlée, une réaction secondaire peut intervenir par la réaction des fonctions chlorure de sulfonyle avec des fonctions amines pour former des groupements sulfonamides. Dans ce cas, on n'aura pas seulement la formation d'une monocouche mais aussi, de petites chaînes de polymères à la surface de l'or entraînant une rugosité de surface plus importante. Ce phénomène est illustré par le mécanisme ci-dessous :

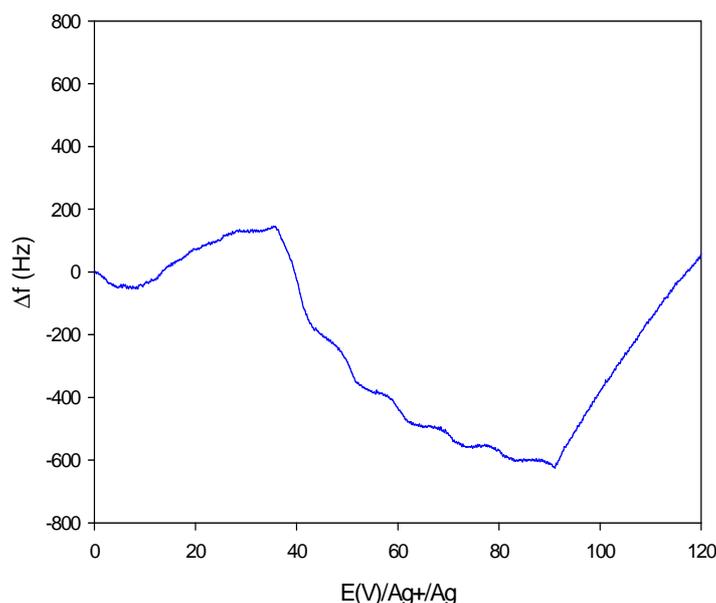


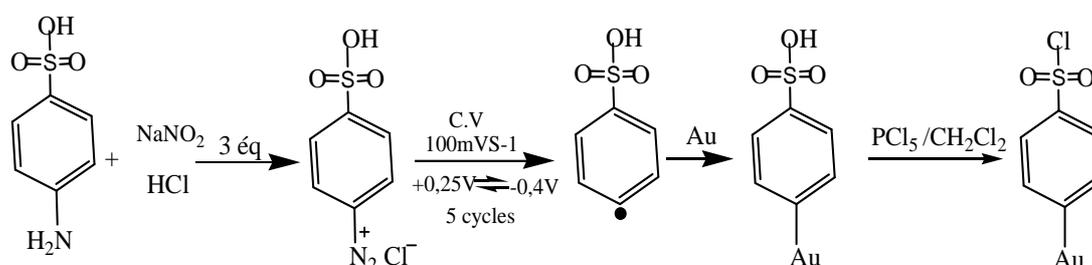
Figure 49: Suivi gravimétrique de la modification de la surface d'or à partir du chlorure de 4-nitrobenzènesulfonyle

Nous avons réalisé, comme observé sur la figure 48, cinq cycles de réduction de +0,5V à -0,5V correspondant au passage du sel diazonium au radical libre dans la solution d'acétonitrile. Au premier balayage de potentiel, l'intensité du courant de réduction est importante (-0,13mA). Cette intensité diminue progressivement jusqu'à un seuil intervenant au troisième balayage. Cela signifie au premier balayage, la modification de la surface d'or est plus importante et diminue graduellement jusqu'à un stade où la monocouche est réalisée (plus de surface d'or disponible). Ce phénomène est corroboré avec la courbe gravimétrique (figure 49). Sur celle-ci, on observe une prise de masse importante au premier balayage suivi d'une diminution progressive.

II-2-1-2- Synthèse à partir de l'acide sulfanilique (acide 4-amino benzènesulfonique)

Le solvant utilisé est l'acide chlorhydrique. L'acide paraaminobenzènesulfonique (4,3 mg) et le nitrite de sodium (5,2 mg) sont dissous dans 5 ml de HCl (1M). Cette solution a été ensuite introduite dans une cellule électrochimique à trois électrodes. Une électrode de travail constituée de la surface d'or sur quartz, une électrode de référence au calomel saturé (ECS) et une contre électrode constituée de platine. On réalise ensuite une voltamétrie cyclique sur un

domaine de potentiel compris entre 0,3V et - 0,4Vet simultanément un suivi gravimétrique par microbalance à cristal de quartz est effectué. Après cette étape, la surface d'or sur quartz modifiée est ensuite introduite dans une solution de $\text{PCl}_5/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ pour transformer les fonctions acides sulfoniques en chlorure de sulfonyle. Cette dernière constitue notre fonction d'ancrage, très réactive, spécifique et nécessaire à la capture des biomolécules. Le mécanisme de la réaction est présenté ci-dessous :



Nous avons réalisé cette synthèse à partir de trois équivalents de NaNO_2 . Dans ce deuxième protocole de synthèse, la fonction amine réagit toujours avant le nitrite de sodium pour former le sel de diazonium qui va se transformer en radical libre et former une liaison covalente avec la surface d'or. Ceci se fait électrochimiquement par voltamétrie cyclique à 100 mVs^{-1} dans un domaine de potentiel compris entre $0,25 \text{ V}$ et $-0,4 \text{ V}$. Les résultats suivants confirment bien la synthèse du composé attendu.

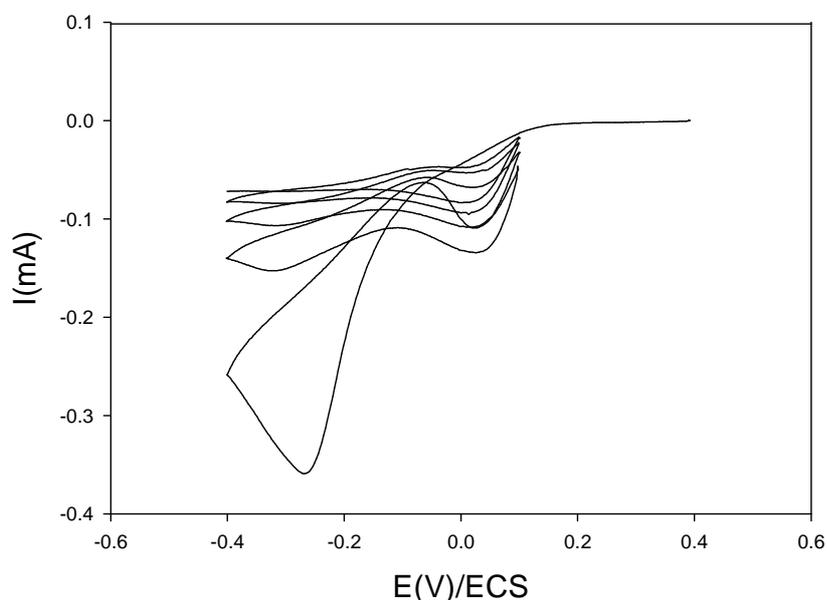


Figure 50: Voltamétrie cyclique de modification de la surface d'or sur quartz à partir de l'acide sulfanilique

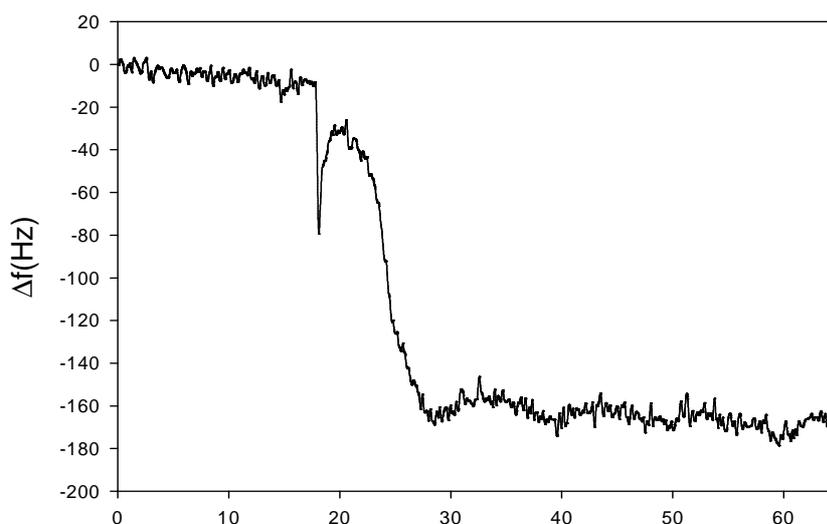


Figure 51: Suivi gravimétrique de la modification de la surface d'or

Sur les voltammogrammes enregistrés (figure 50), l'intensité du courant au premier balayage de potentiel est très importante et diminue de façon très significative à partir du deuxième balayage et varie ensuite peu. Ce phénomène indique une passivation de l'électrode. C'est-à-dire une modification presque totale de la surface au premier balayage. Cette passivation caractérise la formation d'une monocouche de chlorure de benzènesulfonyle à la surface de l'or. Le processus de sulfonylamidation marqué dans le précédent protocole n'a pas lieu dans celui-ci. En effet, les groupements hydroxyles des fonctions acides sulfoniques ne constituent pas de bons groupements partants et ne peuvent réagir avec les fonctions amines. Par ailleurs, sur la figure 50 de voltamétrie cyclique, on observe une vague irréversible à 0,1V marquant la réduction du sel de diazonium en radical libre. Ce dernier va ensuite assurer une liaison covalente avec la surface d'or. Le phénomène de passivation est corroboré par la prise de masse sur la microbalance à cristal de quartz. Sur la figure 51, on observe une grande prise de masse au premier balayage et ensuite une stabilité pour les autres balayages de potentiel. Ce qui signifie que la surface d'or est totalement modifiée dès le premier balayage. La variation globale de fréquence observée pendant la fonctionnalisation de la surface d'or est de l'ordre de 160 Hz et correspond à une variation de masse de l'ordre de 170 ng. Le nombre d'unité de fonctionnalisation présent sur la surface d'or peut être calculé à partir de la variation de masse obtenue sur la microbalance. Ce nombre d'unités est de 9.6866110^{-10} mole. La diffusion Raman a été réalisée sur cette surface pour avoir un spectre de référence du substrat avant immobilisation des biomolécules. La figure 52 représente le spectre Raman de la surface d'or modifiée au chlorure de parabenzenesulfonyle.

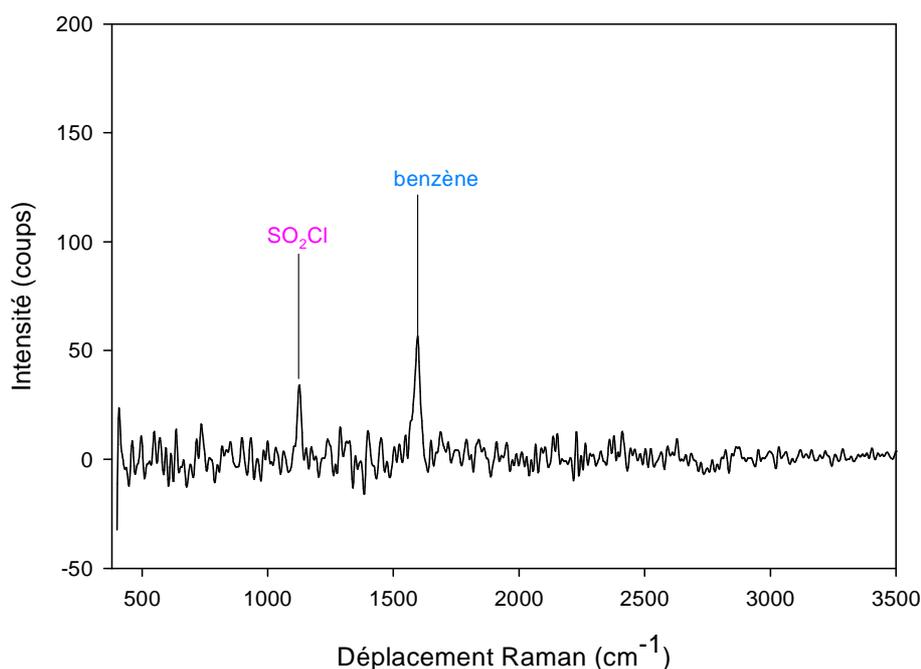


Figure 52: Spectre Raman de la surface d'or modifié au chlorure de parabenzènesulfonyle

Sur ce spectre, on observe deux bandes de vibration caractéristiques de la monocouche synthétisée. Une bande à 1595 cm^{-1} attribuable au cycle benzène et une bande à 1127 cm^{-1} attribuable à la fonction SO_2Cl (liaison S-Cl). Ces informations sont bien compatibles avec la structure de la molécule. Les groupements SO_2Cl réagiront ensuite de manière covalente avec la protéine A. Et comme nous l'avons déjà mentionné la caractérisation de la protéine accrochée se fera principalement par diffusion Raman d'où la nécessité d'avoir au préalable un spectre du substrat bien dégagé pour pouvoir identifier les vibrations propres à la biomolécule. La figure 53 représente la juxtaposition du spectre de la monocouche et celui de la protéine A.

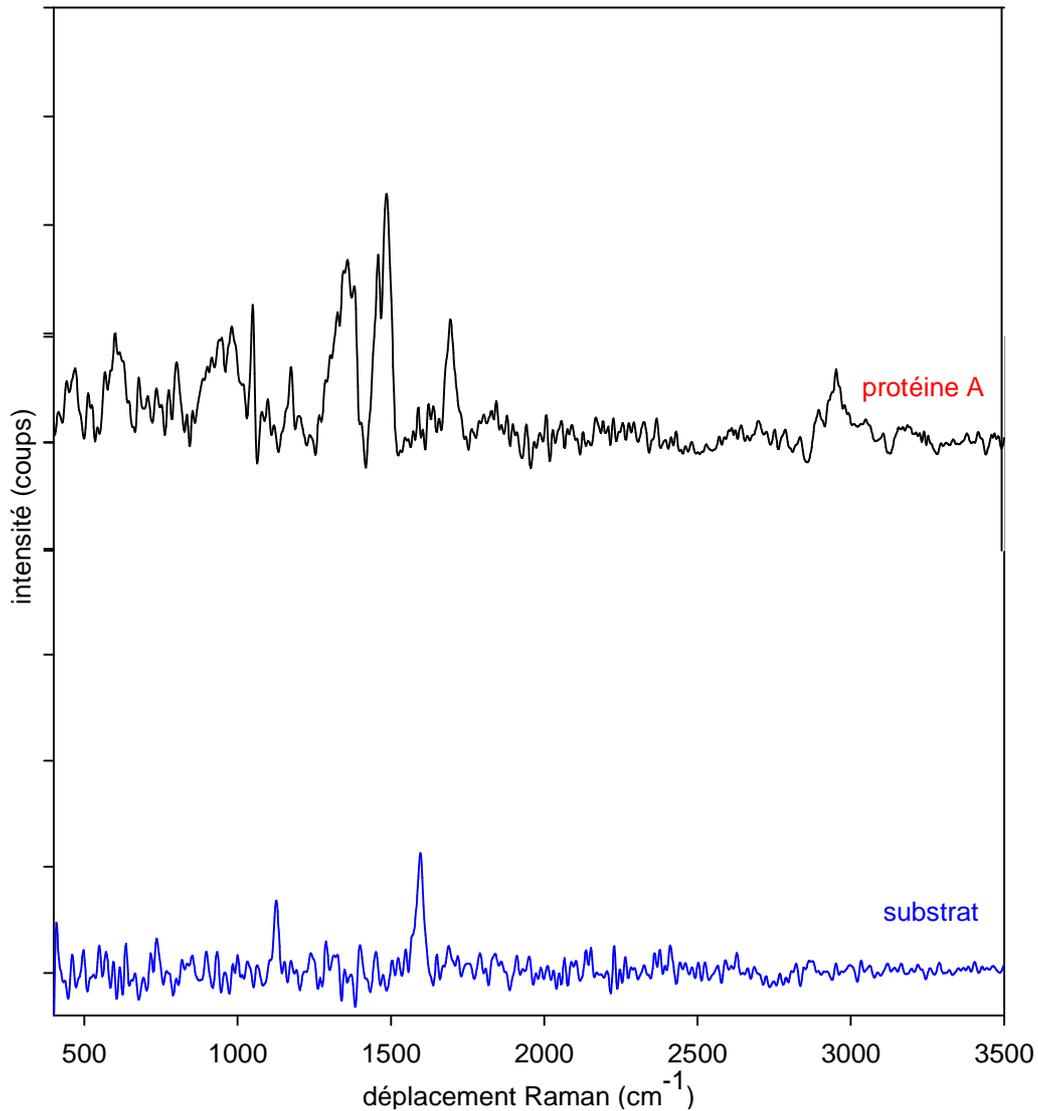


Figure 53: Spectre comparatif du substrat et de la protéine A

En comparant ce spectre de la monocouche avec celui de la protéine A, on remarque que la surface d'or fonctionnalisée présente peu de pics, de surcroît dans un domaine différent de celui de la protéine A. Donc, les signaux caractéristiques des biomolécules immobilisées sur ce type de substrat devraient être plus aisément identifiables. La surface d'or modifiée est ainsi prête pour l'ancrage des biomolécules.

II-2-2- Contrôle de la fonctionnalisation de la surface d'or par AFM

Cette expérience a été réalisée à partir d'une surface d'or de faible rugosité (0,9 nm). Le **microscope à force atomique** (ou **AFM** pour **atomic force microscope**) est un type de microscope à sonde locale qui sert à visualiser la topographie de la surface d'un échantillon.

Doté d'une pointe à extrémité métallique de 10 nm de rayon placée sur un levier flexible, ce microscope enregistre les interactions entre les atomes de la pointe et ceux de la surface à analyser. Il se produit soit une attraction, appelée force de Van der Waals, soit une répulsion (à très faible distance). Ces forces provoquent des déplacements de la pointe, entraînant des déviations du levier qui sont enregistrées et traitées par ordinateur pour reproduire le relief.

Pour l'expérience AFM, une surface de dimension 5x5 μm de l'échantillon d'or pur est dans un premier temps analysée seule pour avoir une idée de la topographie. Cette surface est ensuite fonctionnalisée par le chlorure de benzènesulfonyle selon le second protocole présenté précédemment : c'est-à-dire à partir de l'acide sulfanilique. Les résultats de ces expériences sont représentés sur les figures 54 et 55.

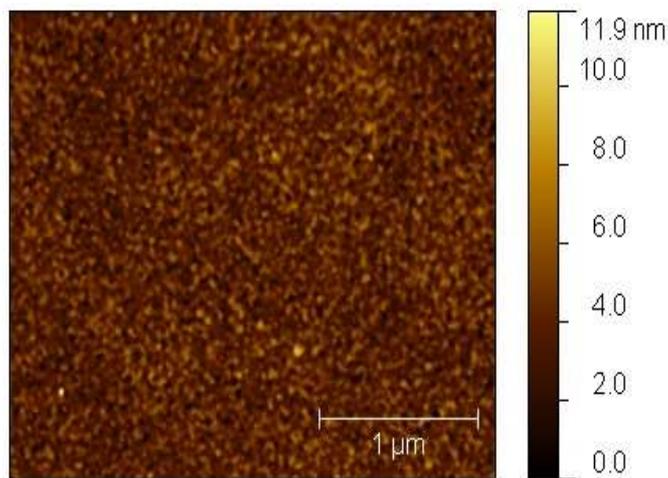


Figure 54: Image AFM de la surface d'or non fonctionnalisée

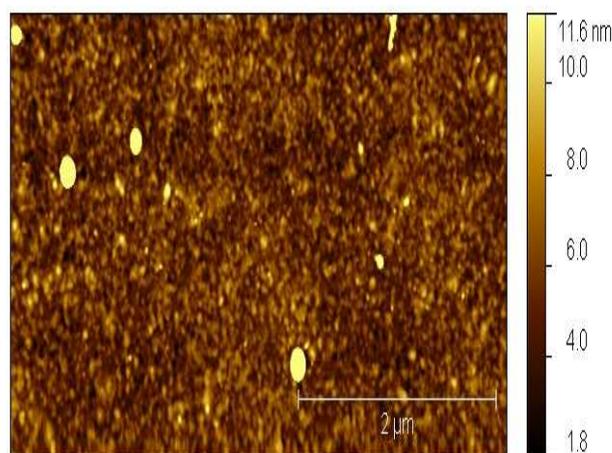


Figure 55: Image AFM de la surface d'or fonctionnalisée

Les résultats AFM ont montré que la surface d'or pure possède une rugosité de 0,9 nm. Après fonctionnalisation avec du chlorure de parabenzènesulfonyle, on a observé une augmentation de la rugosité (1,3 nm) signifiant qu'un dépôt de matière a été effectivement réalisé. On note de plus sur les images, une homogénéité de la surface d'or à l'état pur et fonctionnalisé. Sur les images de la surface d'or fonctionnalisée, des objets ovales de couleur jaunâtre et de dimension de l'ordre de quelques nanomètres ont été repérés. La présence de ces nano objets est probablement due à la contamination de la surface. Ce détail sensibilise sur la précaution à prendre lors de la fonctionnalisation de surface à savoir, bien rincer la surface après fonctionnalisation pour éliminer les résidus de matières non réagies et ensuite bien protéger correctement avant une expérience d'AFM pour éviter la présence de polluants extérieurs.

II-2-3- Immobilisation des biomolécules

L'immobilisation de protéines et des anticorps, les interactions spécifiques et non spécifiques et des modifications structurelles sont les mécanismes importants largement examinés dans le développement d'immuno-essais et des biocapteurs. Leur immobilisation sur support solide permet généralement d'augmenter leur stabilité au cours du temps. Comme déjà décrit dans la partie bibliographique, on distingue plusieurs techniques d'immobilisation des bioéléments sur le transducteur :

Adsorption physique : La fixation des biomolécules sur le support peut se faire soit par des forces de dispersion²⁹ (Van der Waals), soit par des forces polaires résultant de la présence de champs électriques dans les micropores, soit par des liaisons hydrogènes dues aux groupements hydroxyles ou amines. Ce procédé est réversible et la désorption peut survenir au cours de la mesure. De plus, par cette méthode, on ne fixe qu'une faible quantité de bioélément sur le substrat ce qui diminue la limite de détection.

Confinement : Il s'agit de conserver l'élément sensible près de la surface du capteur sans toutefois le lier physiquement à cette même surface. Dans ce cas, le biorécepteur, qui va rester libre en solution à l'intérieur d'un compartiment fermé par une membrane sélective et semi-perméable, conserve une activité maximale. Cette technique, bien qu'offrant en théorie d'excellents résultats est très peu utilisée du fait de la complexité de sa mise en œuvre.

Liaisons covalente : Le couplage covalent se fait généralement avec un support fonctionnalisé insoluble dans l'eau. Il modifie la structure moléculaire du soluté et rend en général le processus irréversible. Lorsque cette technique est utilisée avec un élément

²⁹ Force de dispersion : La force d'attraction qui existe entre les molécules qui n'ont aucun dipôle permanent

biologique, la réaction doit impliquer les sites qui ne sont pas essentiels à l'activité biologique de la molécule. Ce type d'immobilisation évite le phénomène de désorption et permet de mieux contrôler les quantités de matières fixées. C'est celle que nous avons choisi pour immobiliser nos biomolécules au regard des différents avantages qu'elle présente.

II-2-3- 1- Immobilisation de la protéine A

La protéine A est un récepteur superficiel cellulaire fortement stable produit par plusieurs lignées de *Staphylococcus aureus*. Elle est constituée d'une simple chaîne polypeptidique de poids moléculaire 42 kDa, contenant quatre domaines répétitifs riches en acide aspartique et en acide glutamique, mais exempt de cystéine. Elle contient peu ou pas de carbohydate, 4 résidus tyrosine. La protéine A est capable de se lier à la partie Fc (fragment cristallisable) d'immunoglobines, particulièrement l'anticorps IgG, d'un grand nombre d'espèces. Elle joue ainsi un rôle très important dans les biocapteurs pour la détection de microorganismes. En se liant aux immunoglobulines par leur fragment cristallisable, elle permet une reconnaissance aisée d'un microorganisme spécifique via le fragment Fab (fragment antigen binding) de l'IgG. Les travaux préliminaires démontrent qu'elle est constituée de cinq domaines de récepteurs disponibles pour interagir avec les IgG [233].

Le contrôle d'immobilisation de toutes les biomolécules a été réalisé conjointement par diffusion Raman et par microbalance à cristal de quartz.

II-2-3- 1- 1- Protocole d'immobilisation de la protéine A

Une solution de 50 mg/l de protéine A a été préparée à l'aide du tampon phosphate (pH 7,4). La poudre de protéine A est d'origine commerciale (référence P6031- Sigma). La surface d'or modifiée avec du chlorure de benzène sulfonyle est immergée dans la solution de protéine A pendant 2h. La surface a été ensuite lavée au tampon phosphate et à l'eau ultrapure plusieurs fois et séchée à température ambiante. La diffusion Raman a ensuite été réalisée sur cette surface à l'aide du spectromètre Xplora de Horiba Jobin Yvon en utilisant la longueur d'onde $\lambda = 785$ nm. Pour le suivi par microbalance, la surface d'or fonctionnalisée est montée dans une cellule électrochimique et connectée à la microbalance. 500 μ L de solution de tampon phosphate sont introduites initialement dans la cellule pour la stabilisation du signal de la microbalance, des injections de 10 μ l de solution de protéine A se sont poursuivies successivement. La surface est enfin démontée de la cellule électrochimique puis lavée et séchée à température ambiante pour poursuivre l'immobilisation des autres biomolécules.

II-2-3- 1- 2- Identification de la protéine A

Comme nous l'avons précédemment introduit, les recherches actuelles en terme de détection de bioélément et en particulier de pathogènes, s'orientent vers des méthodes rapides, sélectives et sensibles. A ce titre, la spectroscopie Raman est une des techniques les plus prometteuses pour la détection directe et l'identification rapide [203, 206, 234, 235]. L'efficacité démontrée de la spectroscopie Raman pour l'identification de la conformation, l'orientation, la configuration de chaînes, des résidus d'acides aminés et des interactions est extrêmement utile dans l'identification des biomolécules tout en maintenant l'intégrité fonctionnelle de la molécule [236-238]. Cette technique nous permet sans ambiguïté d'identifier les biomolécules immobilisées et présente l'avantage de ressortir les bandes de vibrations des résidus d'acides aminés détails que la spectroscopie Infrarouge ne révèle pas. La figure 56 ci-dessous représente le spectre Raman de la poudre de protéine A réalisée dans la gamme spectrale 400 cm^{-1} - 3500 cm^{-1} avec un temps d'acquisition de 300 s, longueur d'onde de 785 nm et un objectif de microscope x100. Le spectre de la protéine A immobilisée sur la surface fonctionnalisée sera ensuite comparé à celui de la poudre de protéine A afin de confirmer l'immobilisation.

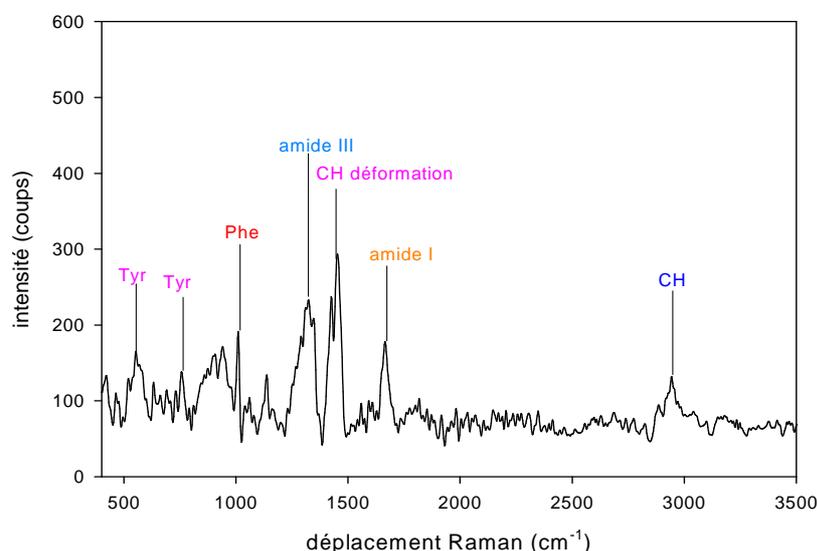


Figure 56: Spectre Raman de la poudre de protéine A

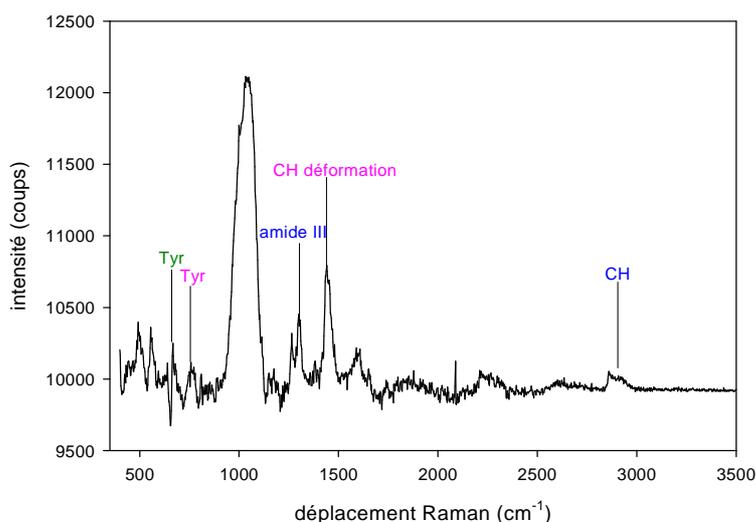


Figure 57: Spectre Raman de la protéine A immobilisée sur la surface d'or fonctionnalisée

Le spectre de la figure 56 est pris comme référence pour le contrôle d'immobilisation de la protéine A par spectroscopie Raman. Ce spectre présente les vibrations liées aux C-H de valence entre 2860 cm^{-1} et 2940 cm^{-1} , une bande amide I autour de 1657 cm^{-1} , les bandes de vibration liées à la phénylalanine apparaissent autour de 1610 cm^{-1} et 1002 cm^{-1} , le tryptophane apparaît autour de 1553 cm^{-1} et 1421 cm^{-1} , les vibrations de déformation des CH_2 apparaissent autour de 1445 cm^{-1} , les bandes observées à 1395 cm^{-1} sont attribuables aux vibrations de déformations CH_3 , une bande amide III à 1327 cm^{-1} , les vibrations de valence des liaisons C-C sont observées autour de 1123 cm^{-1} et 1031 cm^{-1} , une bande à 937 cm^{-1} attribuable à la vibration de balancement des liaisons CH_3 des structures terminales en hélice α . Les bandes à 895 cm^{-1} et 880 cm^{-1} sont attribuables aux vibrations de balancement des liaisons CH_2 , les bandes de vibrations caractéristiques de la tyrosine sont observées à 853 cm^{-1} , 830 cm^{-1} , 760 cm^{-1} et 644 cm^{-1} . Les bandes de vibration que nous observons sont bien en accord avec la littérature. Sur la figure 57 qui représente le spectre de la protéine A immobilisée sur la surface, on observe bien une bande entre 2860 cm^{-1} et 2940 cm^{-1} attribuable à la vibration de valence C-H; la bande à 1654 cm^{-1} attribuable à la fonction amide I; la bande à 1443 cm^{-1} attribuable à la vibration de déformation CH_2 ; la bande entre 1304 cm^{-1} - 1258 cm^{-1} attribuable à la fonction amide III en hélice α ; les bandes de vibration de balancement de CH_2 autour de 875 cm^{-1} . Les bandes de vibration correspondantes aux résidus d'amino acides tels que la phénylalanine entre 1001 cm^{-1} et 1601 cm^{-1} ; le tryptophane à 1542 cm^{-1} ; la tyrosine entre 829 cm^{-1} et 756 cm^{-1} et enfin les vibrations de valence des

liaisons C-C autour de 1078 cm^{-1} . La présence de ces différentes bandes de vibrations sur le spectre de la protéine A immobilisée permet bien de confirmer sa fixation sur la surface. Les études préliminaires montrent que les surfaces d'or exaltent le signal Raman. Ce qui nous permet à partir de la spectroscopie Raman conventionnelle d'obtenir des données de meilleure qualité. Ces résultats sont corroborés avec ceux observés sur la courbe de suivi gravimétrique (figure 58).

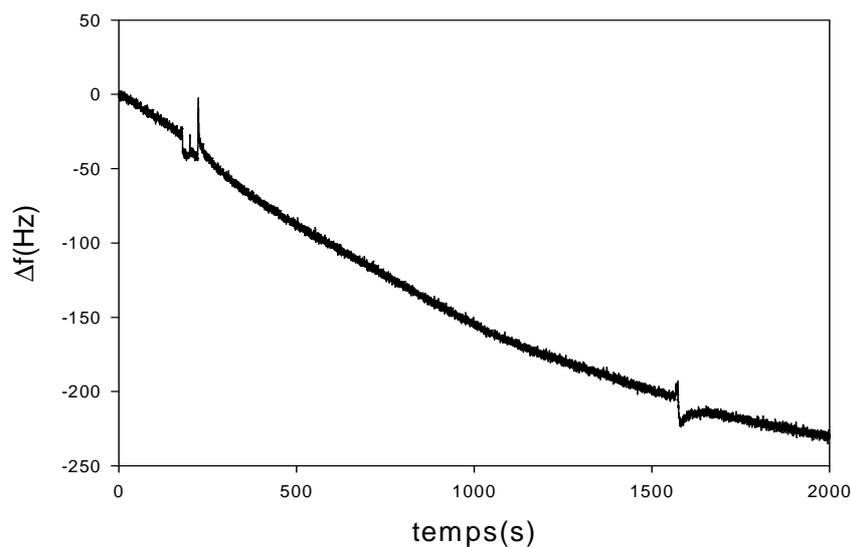


Figure 58: Suivi gravimétrique de l'immobilisation de la protéine A

La courbe de suivi gravimétrique qui présente une variation de la fréquence de résonance du cristal de quartz en fonction du temps montre une variation de fréquence de l'ordre de 225 Hz. D'après la relation de Sauerbrey, cette variation de fréquence correspond à une variation de masse de l'ordre de 240 ng. Le nombre de moles de protéine A déposée sur la surface est de 5.7142910^{-12} mole. Cette donnée permet d'obtenir le nombre de fonctionnalisation par protéine A greffée à la surface. On observe sur cette courbe, un dépôt graduel de masse sur la surface. Ce qui laisse penser à une réaction thermodynamiquement stable de la protéine avec la surface fonctionnalisée. Pour s'assurer du couplage covalent entre la protéine A et le substrat, les tests d'adsorption ont été réalisés. Pour cela, les injections de $10\ \mu\text{l}$ de la solution de protéine utilisée pour l'immobilisation ont été menées sur une surface d'or non modifiée et suivies par microbalance à cristal de quartz. La figure 59 présente les résultats obtenus.

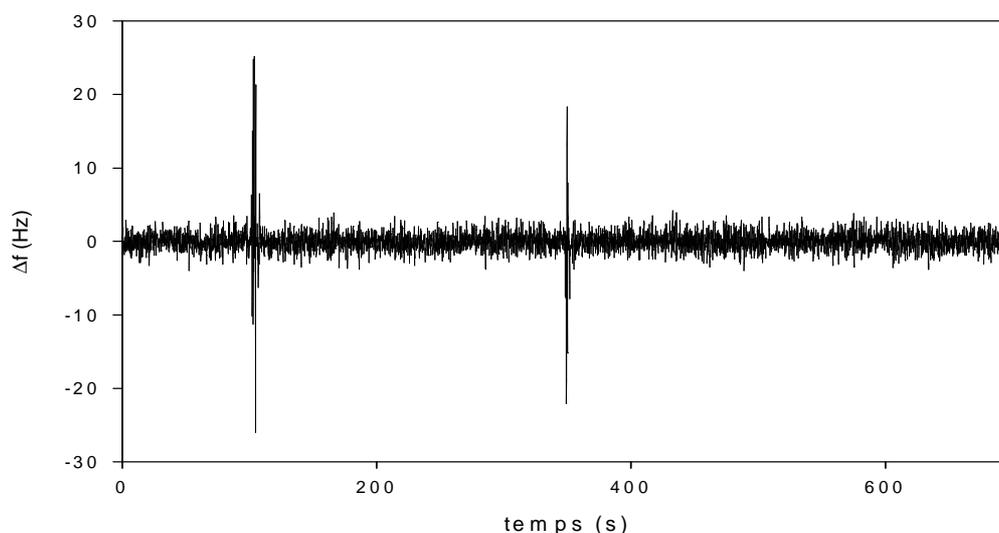
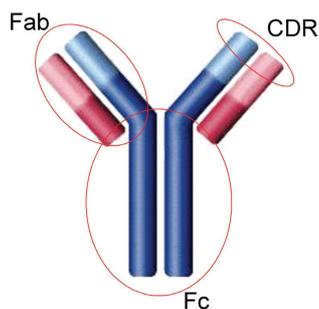


Figure 59: Contrôle d'adsorption de la protéine A

Sur cette figure 59, on remarque que l'injection de la solution de protéine A n'entraîne pas de variation de la fréquence de résonance du cristal de quartz. Après plusieurs injections, il n'est pas observé de variation de fréquence. On peut donc conclure à l'absence de prise de masse : la protéine A ne s'adsorbe pas sur la surface d'or. Nous confirmons ainsi que les prises de masses observées dans la procédure d'immobilisation de la protéine sur la surface d'or fonctionnalisée sont bien spécifiques. L'interaction entre la protéine A et la surface fonctionnalisée résulte de la substitution nucléophile du chlore de la surface fonctionnalisée par des groupements amines de la protéine A formant ainsi des liaisons sulfonamides très stables.

II-2-3-2- Immobilisation de l'immunoglobuline : IgG humain

Les anticorps, aussi appelés " immunoglobulines", sont une des deux molécules de protéine importantes du système immunitaire qui interviennent dans la reconnaissance de pathogènes. Ils sont constitués de quatre chaînes polypeptidiques reliées par des ponts disulfures et possèdent un poids moléculaire de 150 kDa. Ils possèdent une structure en Y et comportent deux extrémités remarquables. Le fait d'avoir préalablement immobilisé une protéine A sur la surface permet à l'anticorps de se greffer spécifiquement via son fragment Fc sur la protéine afin de laisser disponible les sites de reconnaissance de l'antigène à travers les fragments Fab (fragment antigen binding) region. Le fragment CDR (Complementarity Determining Regions) détermine la spécificité de la molécule et établit le contact avec un antigène.



II-2-3-2- 1- Protocole d'immobilisation de l'immunoglobuline : IgG humain

Une solution d'IgG de concentration 1g/l a été préparée pour l'immobilisation à partir du tampon phosphate. La surface d'or modifiée et portant la protéine A est introduite dans la solution d'IgG pendant 2h puis lavée au tampon et à l'eau stérile et séchée à température ambiante et soumise au contrôle Raman. Pour les études gravimétriques, 500 μ l de la solution tampon ont été introduits dans la cellule à microbalance à cristal de quartz et suivis jusqu'à la stabilisation du signal. Des injections de 10 μ l de solution d'IgG sont ensuite réalisées successivement dans la cellule de microbalance. A la fin de l'immobilisation, la surface est lavée plusieurs fois au tampon et à l'eau stérile puis séchée à température ambiante et remontée dans la cellule à microbalance pour l'immobilisation de l'antigène.

II-2-3-2- 2- Identification de l'immunoglobuline: IgG humain

La figure 60 représente le spectre Raman de la poudre d'IgG. L'interprétation du spectre de référence de la poudre d'IgG a été faite sur la base des données de la littérature [236]. La prédominance de la structure de l'IgG en hélice β est marquée par la bande amide I autour de 1671 cm^{-1} et la bande la plus intense de l'amide III à 1242 cm^{-1} . Dans la protéine, où l'hélice α prédomine, la bande amide III à 1327 cm^{-1} est plus intense que celle à 1242 cm^{-1} . Les autres bandes liées à la vibration de valence des liaisons C-H, vibration de déformation des liaisons C-H, vibration de balancement des groupes CH_2 , vibrations liées aux résidus d'acides aminés : phénylalanine, tyrosine, tryptophane apparaissent aux mêmes fréquences que celles de la poudre de protéine A.

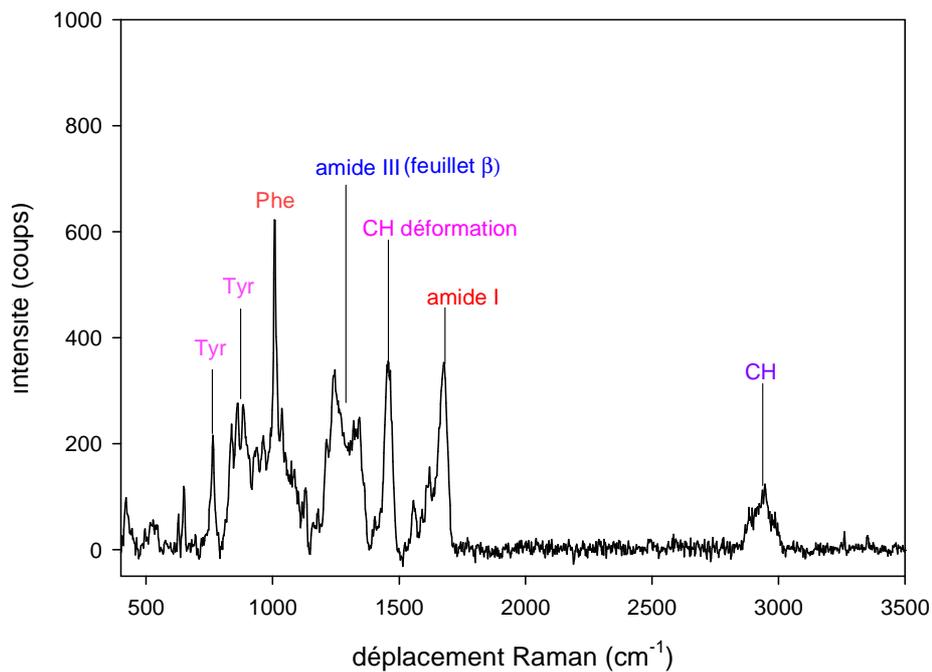


Figure 60: Spectre Raman de la poudre d'IgG

Il ressort d'ici que la spectroscopie Raman permet de distinguer directement et rapidement la protéine A et l'IgG à partir des bandes de vibration de la fonction amide III où l'on aura une structure d'hélice α pour la protéine A et une structure en feuillet β pour l'IgG.

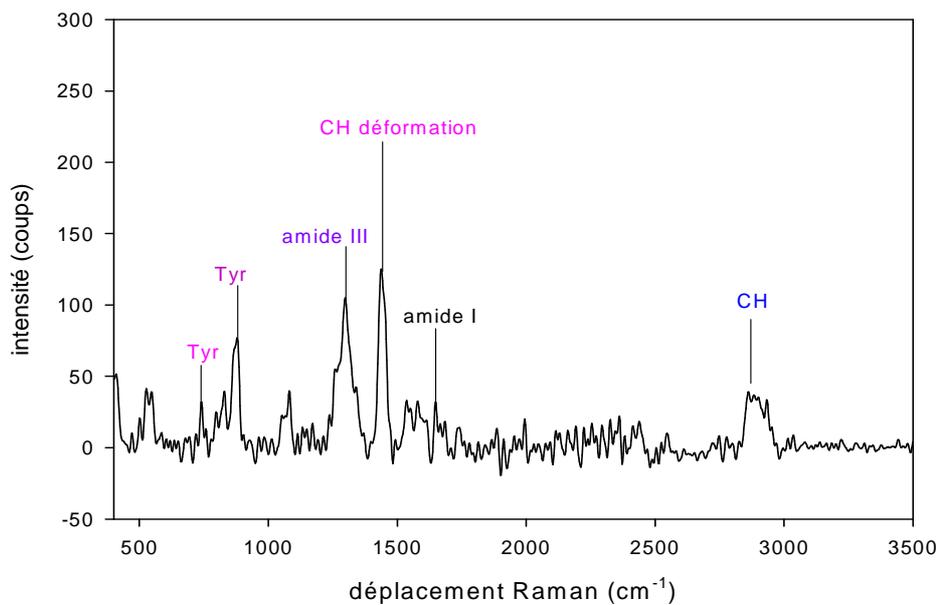


Figure 61: Spectre Raman de l'IgG immobilisé sur le substrat fonctionnalisé et la protéine A

Sur la figure 61, on observe des bandes entre 2860 cm⁻¹ et 2940 cm⁻¹ attribuable à la vibration de valence des liaisons C-H, une faible bande autour de 1661 cm⁻¹ attribuable à la fonction amide I, une bande à 1443 cm⁻¹ lié à la vibration de déformation des groupes CH₂, une bande entre 1258 cm⁻¹ et 1304 cm⁻¹ lié à la fonction amide III, une bande autour de 1078 cm⁻¹ liée à la vibration de valence des liaisons C-C, une bande à 756 cm⁻¹ et 829 cm⁻¹ attribuable à la tyrosine. Ces différentes bandes présentes dans le spectre de l'IgG immobilisé permettent de conclure qu'après immobilisation, les biomolécules conservent leur structure. De ce fait, les bandes de vibrations caractéristiques des biomolécules ne sont pas modifiées. Les faibles shifts observés pour certaines fréquences de vibration par comparaison au spectre de référence peuvent être dus à l'environnement chimique des différents groupes fonctionnels. En effet, en considérant un modèle très simple, on peut admettre que la fréquence (f) de vibration est liée à la constante de force de la liaison (k) et à la masse des atomes (m) ou molécules par une relation « grossière » du type :

$$w = \sqrt{\frac{k}{m}} \quad \text{où } w \text{ est la pulsation } = 2\pi f$$

La calibration du spectromètre est menée systématiquement à partir du silicium qui possède une seule raie à 520 cm⁻¹ et de manière à éviter les raies Rayleigh très intense pouvant masquer le signal Raman. Les conditions expérimentales (temps d'acquisition spectrale, le nombre de d'acquisition, diamètre du diaphragme confocal) sont aussi choisies de manière à éviter au mieux le phénomène de fluorescence pouvant masquer partiellement ou même totalement le spectre Raman.

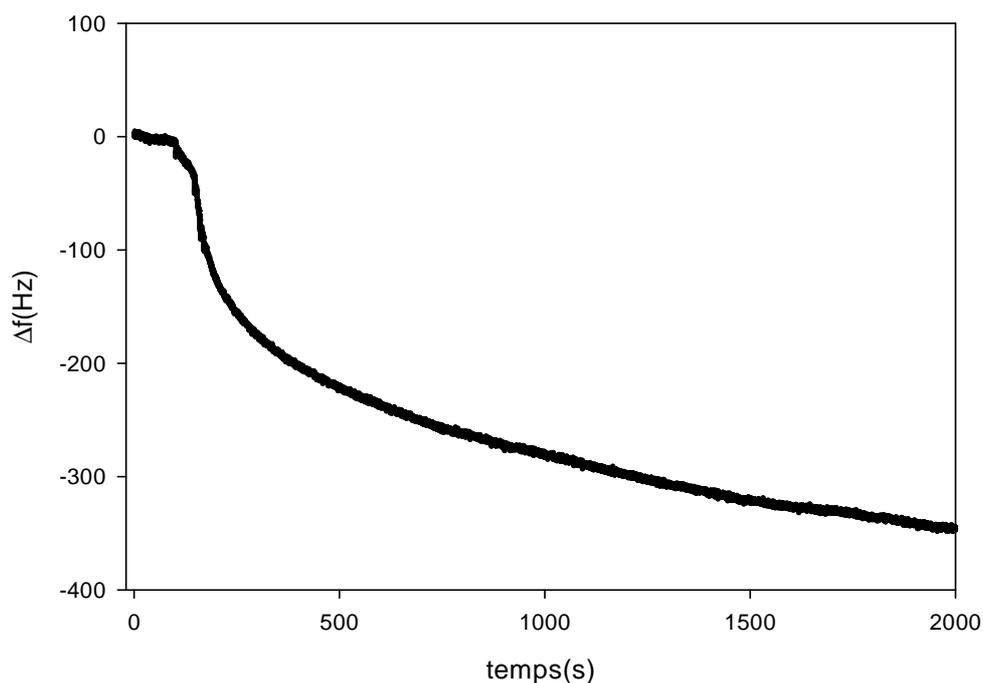


Figure 62: Suivi gravimétrique de l'immobilisation de l'IgG

Les expériences de suivi gravimétrique ont été répétées pour le cas d'immobilisation de l'IgG et la figure 62 nous montre une variation de fréquence de l'ordre de 350 Hz correspondante à une variation de masse d'IgG déposée sur la surface de 373 ng. On remarque que l'immobilisation de l'IgG se fait de manière plus rapide que la protéine A. A $t = 250$ s, on observe une variation brusque de la fréquence. Ce qui pourrait s'expliquer par les interactions spécifiques très fortes entre la protéine A déjà présente sur la surface et l'IgG.

II-2-3-3- Reconnaissance anticorps-antigène

Les travaux réalisés jusqu'ici ont permis de vérifier la validité de notre protocole de fonctionnalisation. Il est à noter que, tous les produits biologiques utilisés étaient sans danger pour l'expérimentateur, de même nous avons choisi un antigène spécifique à l'anticorps précédent, sans que ce soit forcément une bactérie. L'anti IgG humain a été utilisé ici et présente une grande spécificité avec l'IgG. Les interactions anticorps-antigène se font à travers le fragment Fab (fragment antigen binding) de l'anticorps. La reconnaissance entre l'anticorps et l'antigène se fait via les liaisons hydrogènes. D'autres interactions faibles de type Van der Waals, interactions hydrophobiques et forces électrostatiques peuvent aussi

entrer en jeu dans le processus de reconnaissance. La figure 63 illustre le phénomène d'interaction anticorps-antigène.

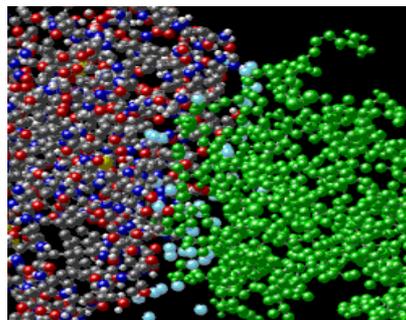


Figure 63: Illustration des interactions anticorps - antigène

Les molécules d'eau en bleu clair comblent les espaces entre l'anticorps et l'antigène. Les molécules en vert correspondent à l'antigène et celles multicolores correspondent à l'anticorps. Les molécules d'eau contribuent de façon significative à l'énergie de liaison par création des liaisons hydrogènes supplémentaires entre l'anticorps et l'antigène. Les interactions entre un anticorps et l'antigène n'étant pas covalentes, la réaction est réversible. Le tableau IX illustre les diverses interactions [239].

Tableau IX: Types et origine des interactions

| Forces non covalentes | Origines | illustrations |
|-------------------------|---|--|
| Forces électrostatiques | Attraction entre charges opposées | $-\text{NH}_3^{\oplus} \text{OOC}^{\ominus}$ |
| Liaison hydrogène | Hydrogène partagé entre atomes électronégatifs (N,O) | $\begin{array}{c} \diagdown \text{N} - \text{H} \cdots \text{O} = \text{C} \diagup \\ \delta^- \quad \delta^+ \quad \delta^- \quad \delta^+ \end{array}$ |
| Forces de Van der Waals | La fluctuation dans les nuages électroniques autour des molécules polarise de manière opposée les atomes voisins | |
| Forces hydrophobes | Le groupe hydrophobe n'interagit pas avec l'eau et a tendance à s'amasser pour exclure des molécules d'eau. L'attraction implique aussi des forces de Van der Waals | |

II-2-3-3-1- Protocole d'immobilisation de l'antigène

Une solution de 1,07g/l de l'anti IgG a été préparée à partir du tampon phosphate. La surface d'or utilisée dans l'immobilisation des précédentes étapes a été introduite dans cette dernière solution pendant 2h, lavée au tampon plusieurs fois et séchée à température ambiante et soumise aux études Raman. Le suivi par microbalance a été opéré de la même manière que les étapes précédentes.

II-2-3-3-2- Identification de l'antigène

Le spectre Raman a été réalisé dans les mêmes conditions expérimentales que les étapes précédentes. Rappelons ici que les antigènes possèdent des sites de reconnaissance bien précis pour l'anticorps. Ce qui fait qu'un antigène ne réagira qu'avec un anticorps spécifique particulier. Par exemple, une bactérie type *Escherichia coli* ne réagira pas avec un anticorps spécifique à salmonella. La figure 64 représente les résultats obtenus à l'issue de l'immobilisation de l'anti IgG.

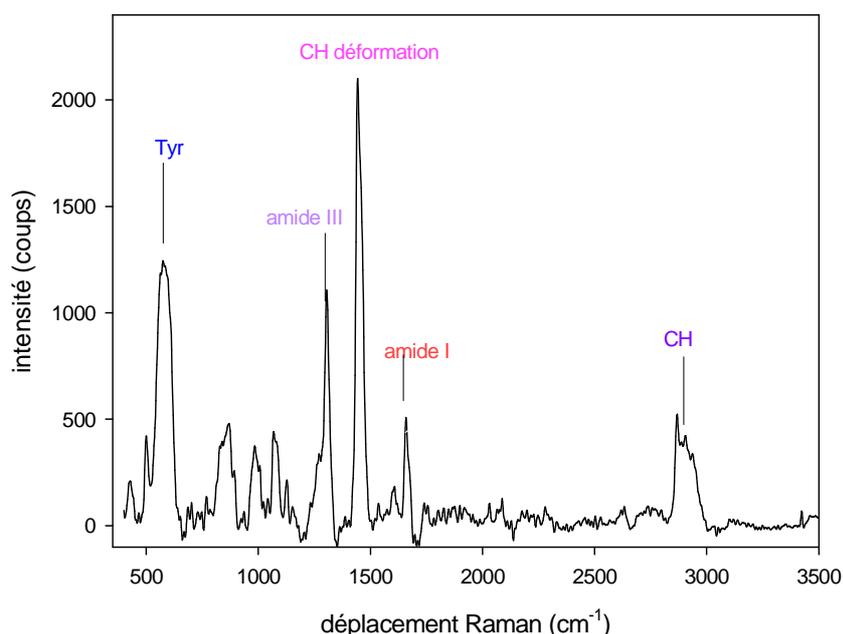


Figure 64: Spectre Raman de l'anti IgG immobilisé

Par comparaison des spectres Raman avec les étapes précédentes d'immobilisation de la protéine A et de l'IgG, on observe des pics supplémentaires et bien résolus confirmant l'immobilisation de l'anti IgG. On note par exemple le pic à 1661 cm⁻¹ correspondant à la bande amide I qui est intense et très résolu. Ce pic était très faible dans les autres étapes et son

accroissement d'intensité ne peut provenir que de cette biomolécule antiIgG d'un point de vue global. Ces résultats sont corroborés par la courbe de suivi gravimétrique (figure 65).

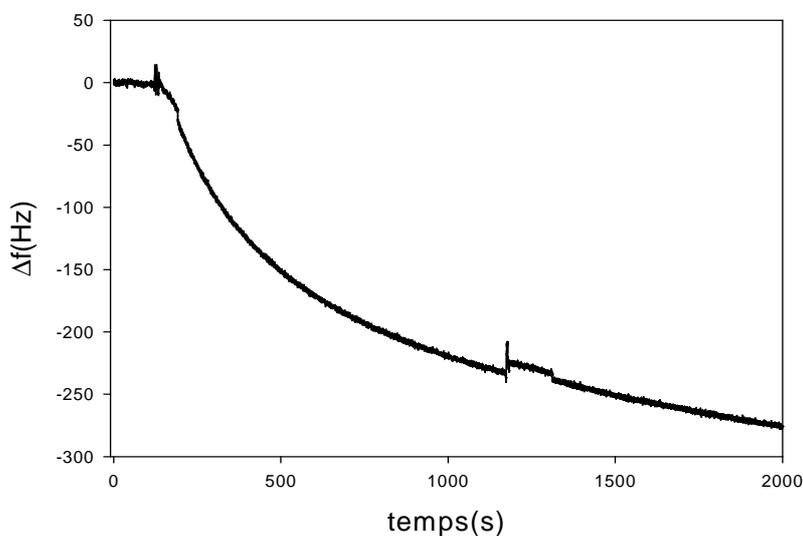


Figure 65: Suivi gravimétrique de l'immobilisation de l'anti IgG

Le suivi gravimétrique de l'immobilisation de l'anti IgG montre une variation de fréquence de 275 Hz (figure 65) correspondante à la variation de masse calculée de 293 ng. On note aussi une prise de masse rapide autour de 300s. Cette observation peut être liée aux interactions spécifiques entre l'IgG et l'anti-IgG. Cette réaction est donc très rapide du fait des interactions très fortes entre les deux entités.

II-2-4-Contrôle d'immobilisation des biomolécules par AFM

II-2-4-1- Contrôle d'immobilisation de la protéine A

La surface d'or utilisée pour cette expérience est une plaque d'or de très faible rugosité (0,9 nm) fabriquée au laboratoire de Physique de l'Etat Condensé de l'Université du Maine. Les surfaces précédemment employées pour le Raman et la microbalance à cristal de quartz n'ont pas été utilisées du fait de leur forte rugosité. En effet, pour un faible dépôt de matière sur une surface fortement rugueuse, le dispositif AFM pourrait ne pas détecter la matière. C'est la raison pour laquelle de nouvelles surfaces d'or plus lisses ont été dédiées aux études AFM. Une solution de protéine A de concentration 50 mg/l est préparée à partir du tampon PBS. La surface d'or fonctionnalisée est immergée dans cette solution pendant 2h, lavée au tampon phosphate, séchée à température ambiante et visualisée au microscope AFM. L'image obtenue est représentée par la figure 66.

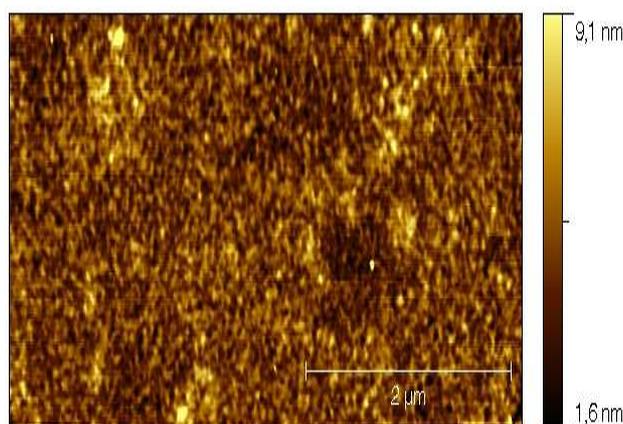


Figure 66: Visualisation AFM de la protéine A immobilisée sur la surface d'or fonctionnalisée

L'expérience est réalisée sur une portion de la surface de dimension 5x5 nm. Il ressort de l'image obtenue une rugosité de 1,1nm. Cette donnée est incompatible avec les résultats obtenus pour la fonctionnalisation de la surface. Cette étape donnait une rugosité de 1,3nm. Théoriquement, nous attendions une rugosité plus importante que celle de la première étape parce qu'une nouvelle quantité de matière est ajoutée à la surface. Le résultat obtenu insatisfaisant pourrait s'expliquer par plusieurs raisons : soit par une très faible quantité de protéine présente à la surface et très faiblement détectable par l'instrumentation, soit une répartition non uniforme des entités greffées sur la surface. Ce résultat non satisfaisant permettrait en revanche de conclure quant à la non adsorption de la protéine sur la surface d'or utilisée. Car une adsorption forte de la protéine serait détectée sur toute région de la surface.

II-2-4-2- Contrôle d'immobilisation de l'IgG

Etant donné qu'une protéine réagit spécifiquement avec les immunoglobulines, la présence d'une protéine A sur la surface sera détectée par l'IgG. Une solution d'IgG anti *Escherichia coli* de concentration 0,35g/l a été préparée. L'échantillon fonctionnalisé comportant la protéine A est immergé dans cette nouvelle solution pendant 2h puis lavée au tampon et séchée à température ambiante. La visualisation AFM de cette nouvelle surface donne les résultats suivants :

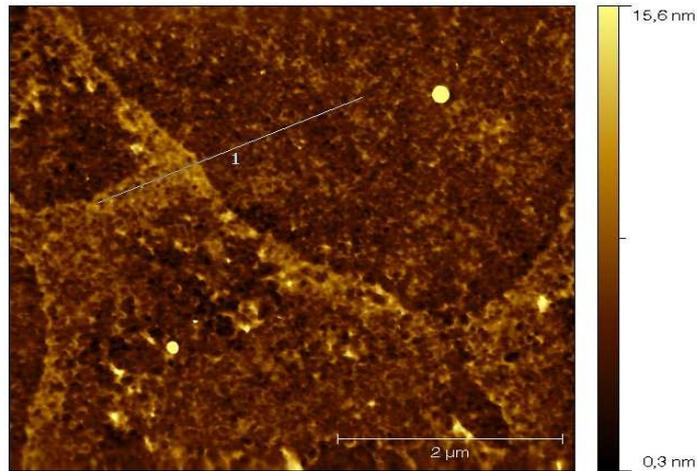


Figure 67: Visualisation AFM de l'IgG immobilisée sur la surface fonctionnalisée

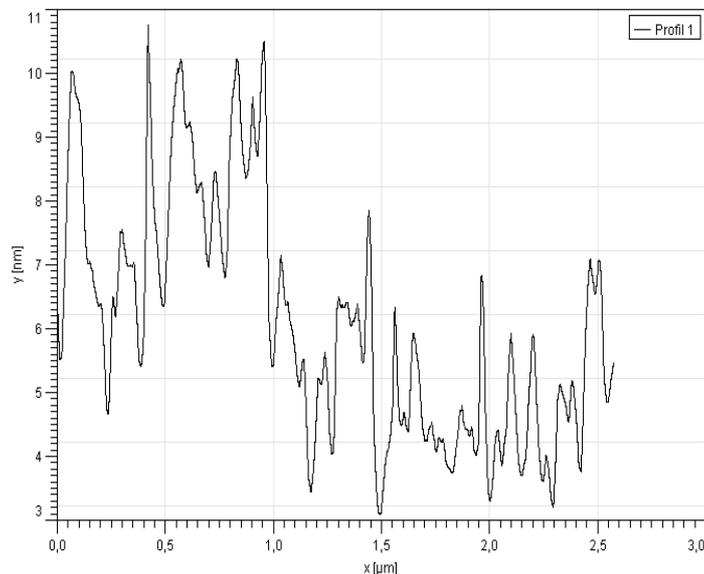


Figure 68: Profil de hauteur de l'IgG immobilisé

Sur la figure 67, on observe une membrane qui recouvre partiellement la surface de l'échantillon. Le profil de hauteur de cette membrane est représenté à la figure 68. Nous notons qu'elle possède une épaisseur de 3,5nm. Cette information est conforme à une présence d'IgG. La présence de l'IgG à cette étape nous permet alors de répondre à une question posée lors de l'étape précédente. Est-ce que la protéine A a effectivement été greffée sur des fonctionnalisations ? En supposant que la membrane obtenue est issue des interactions spécifiques, on peut affirmer que la protéine A était immobilisée, même si faiblement. La présence d'une membrane bien visible après l'immobilisation de l'IgG pourrait aussi bien s'expliquer par le fait les IgG sont des macromolécules de poids moléculaires importantes 150 kDa contre 42 kDa pour la protéine A.

II-2-4-3- Contrôle d'immobilisation de l'IgG Fluorescent

L'IgG fluorescent utilisé dans cette expérience est marqué à l'isothiocyanate fluorescéine (FITC). FITC est une petite molécule organique qui se conjugue aux protéines par l'intermédiaire des amines primaires. Dans le cadre de notre expérience le FITC se couple de façon covalente à des amines primaires (lysines) de l'immunoglobuline (IgG) déjà présente sur la surface. L'utilisation de cet IgG fluorescent pour détecter la présence d'un anticorps préalablement immobilisé sur la surface offre l'avantage d'un test complémentaire à savoir la microscopie à fluorescence.

La préparation de l'échantillon a été réalisée par immersion d'une surface d'or fonctionnalisée avec la protéine A et l'IgG préalablement immobilisés, dans une solution d'IgG fluorescent de concentration 1g/l. Au bout de 2h, l'échantillon a été lavé au tampon, puis à l'eau ultrapure et séchée à température ambiante avant d'être analysé par AFM. La microscopie à force atomique réalisée à cette étape de l'expérience présente les résultats des figures 70 et 71.

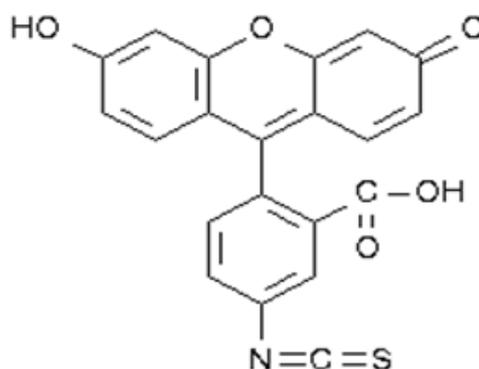


Figure 69: Structure de la molécule FITC

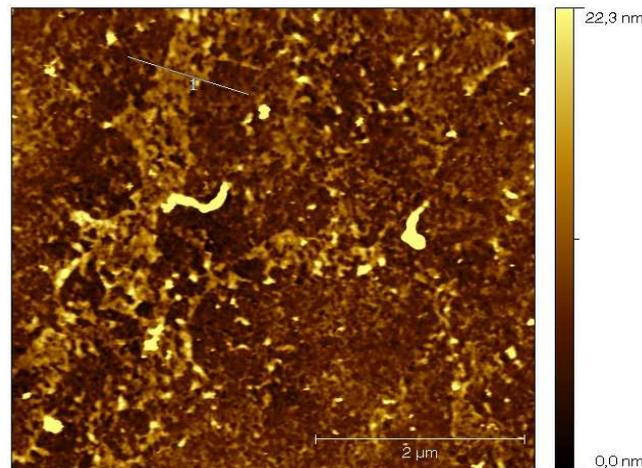


Figure 70: Visualisation AFM de l'IgG fluorescent

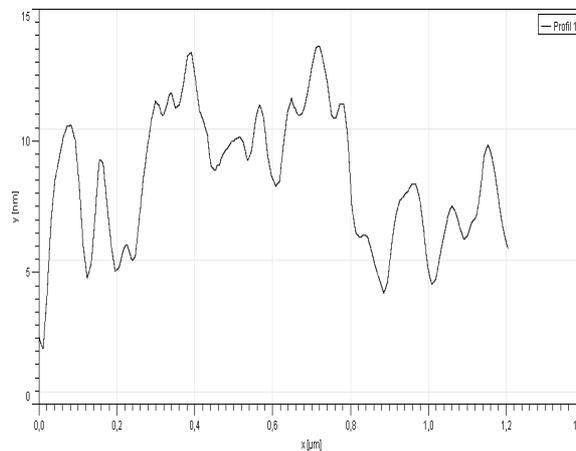


Figure 71: Profil de hauteur de l'IgG fluorescent immobilisé

Sur la figure 70 de microscopie AFM, on note de nouveau la présence d'une membrane d'épaisseur plus importante que celle de l'étape précédente laissant croire qu'il y a un nouveau dépôt de matière sur la surface. Le profil de hauteur de cette membrane représenté par la figure 71 permet d'estimer une épaisseur de 5nm qui pourrait s'expliquer par la présence de l'IgG fluorescent immobilisé. La dimension de la membrane de 5nm nous laisse croire qu'en plus de la membrane de 3,5 nm attribuable au premier anticorps immobilisé (l'IgG), nous avons une seconde membrane de dimension 1,5nm. L'ensemble de ces informations nous permet à travers l'AFM de conclure que les différentes biomolécules ont été immobilisées.

II-2-4-4- Contrôle d'immobilisation de l'IgG fluorescent par microscopie à fluorescence

Les échantillons initialement non fluorescents, l'immobilisation de l'IgG fluorescent spécifique au premier IgG montre les résultats de la figure 72 confirmant bien l'immobilisation.

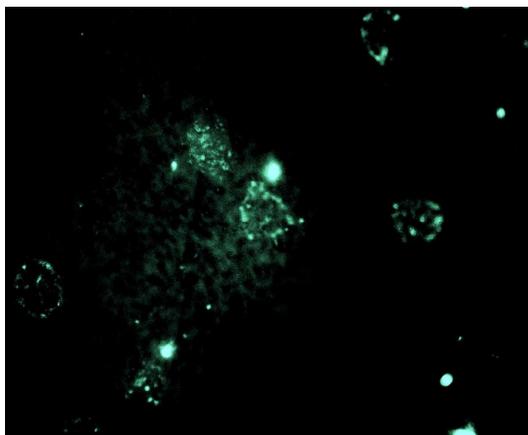


Figure 72: Image de microscopie à fluorescence de l'IgG fluorescent

Conclusion

Nous avons élaboré un nouveau protocole de fonctionnalisation des surfaces d'or très rapide, très réactif et spécifique. La validation de l'ensemble du processus a été vérifiée par l'immobilisation successive sur la surface d'or de la protéine A, l'IgG et l'anti IgG. Nous avons aussi démontré qu'il est possible à partir de la spectroscopie Raman conventionnelle (c'est-à-dire dispersive et sans amplification spécifique) de détecter les signaux des biomolécules immobilisées sur le support et de visualiser une monocouche bien que les signaux caractéristiques soient très faibles. Les techniques supplémentaires de contrôle, comme la microbalance à cristal de quartz, la microscopie AFM et la microscopie à fluorescence ont permis de confirmer la fonctionnalisation de la surface d'or et de vérifier son potentiel d'application à la fixation de biomolécules. Cette fonctionnalisation peut être étendue à tout type de biomolécules et présente des perspectives très intéressantes dans la réalisation de biocapteurs pour le contrôle de qualité, en industries agroalimentaires notamment.

I-3- Etude des interactions entre biomolécules

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à un aspect plus fondamental à savoir, les interactions mises en jeu dans les procédés biologiques. Les interactions de type protéine - protéine et les interactions protéine- surfaces jouent un rôle clé dans beaucoup de processus biologiques comme la transduction de signal, le contrôle d'expression de gène, l'inhibition d'enzyme, la reconnaissance antigène-anticorps [240]. Ces différents phénomènes trouvent leurs applications dans les bio-implants, les bio-fouling, les immuno-essais et les biocapteurs [241]. Il demeure cependant encore difficile de justifier pleinement les raisons qui expliquent l'établissement d'une interaction entre une séquence particulière de la biomolécule et sa surface cible. Les caractéristiques moléculaires des chaînes latérales des acides aminés de chaque séquence spécifique, leur position relative et la formation spontanée de conformations préférentielles du polypeptide interviennent dans un processus de reconnaissance. La compréhension des mécanismes à l'origine des interactions initiales et des assemblages protéiques offre la possibilité de contrôler et d'orienter le processus de formation ainsi que la nature et les propriétés fonctionnelles des structures supramoléculaires résultantes. Ce travail, en avant de l'objectif initial de type biocapteur a consisté à :

- expliquer les interactions d'une part entre la protéine A et l'anticorps et d'autre part entre la protéine A et les surfaces fonctionnalisées par spectroscopie Raman.
- établir l'efficacité de l'ordre de réactivité entre les différentes entités : c'est-à-dire vérifier si les interactions entre deux protéines successivement ancrées sur un substrat sont les mêmes que les interactions entre ces deux protéines ancrées simultanément.
- vérifier par diffusion Raman l'adsorption de la protéine sur une surface d'or.

II-3-1- Origine des interactions entre protéines

Les protéines sont des hétéropolymères, linéaires, ayant une séquence bien définie. Les monomères étant des acides aminés, une protéine donnée aura toujours le même nombre de monomères enchaînés dans un ordre particulier [242]. Les relations complexes qui relient la séquence à la fonction découlent de la propriété qu'a la chaîne linéaire de se replier dans une conformation tridimensionnelle donnée. C'est cette structure tridimensionnelle qui détermine la fonction de la protéine. La position relative des différents atomes qui composent une protéine est décrite sur la figure 73.

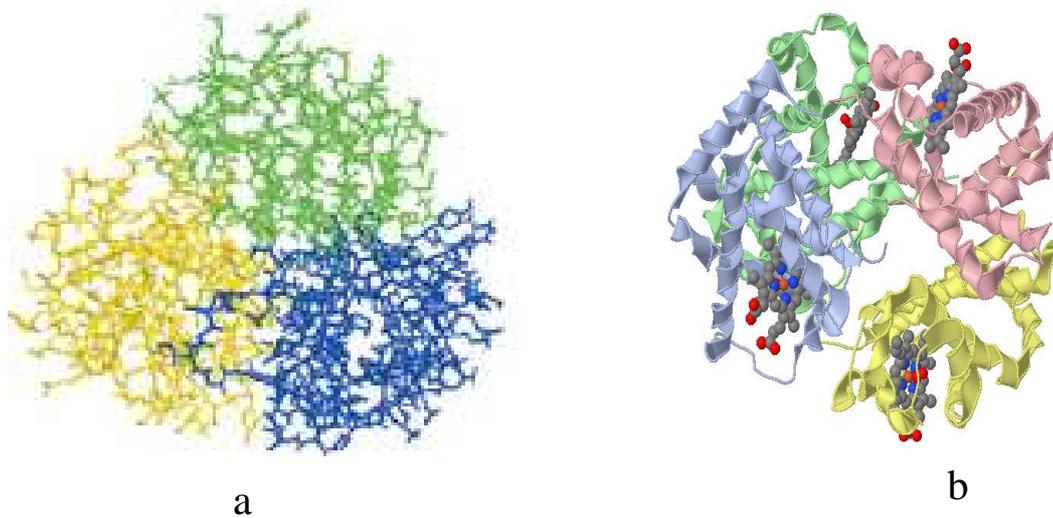


Figure 73: a) Structure tridimensionnelle d'une protéine[242] ; b) Représentation schématique de la structure tridimensionnelle

Cette structure qui détermine la composition en acides aminés et la conformation en trois dimensions de la protéine est très complexe si bien que la représentation classique de la molécule comme le montre la figure 73(a) est inutilisable. Les changements de structure et d'orientation des protéines résultent des interactions qui dépendent-elles mêmes des facteurs tels que les réactions spécifiques ou non spécifiques, l'hydratation ou la déshydratation, l'encombrement stérique, la désorption et les conditions expérimentales [243, 244]. Une représentation schématique d'une molécule de protéine peut être comprise, en visualisant les boucles et les structures secondaires comme les hélices. L'hélice alpha est caractérisée par l'enroulement des liaisons peptidiques autour d'un axe. Cet enroulement se fait vers la droite (hélice droite). Dans le feuillet plissé bêta, les 2 chaînes sont disposées parallèlement l'une à l'autre et orientées en sens inverse. Cette disposition est dite antiparallèle (voire figure 75).

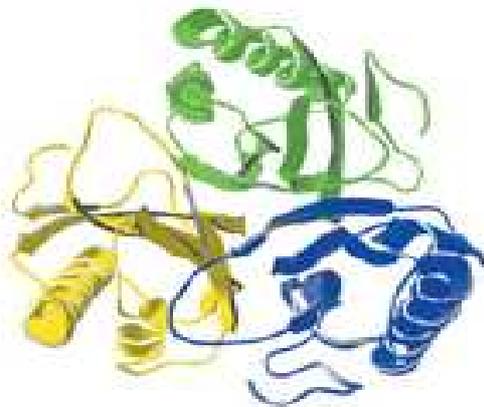


Figure 74: Structure secondaire d'une protéine [242]

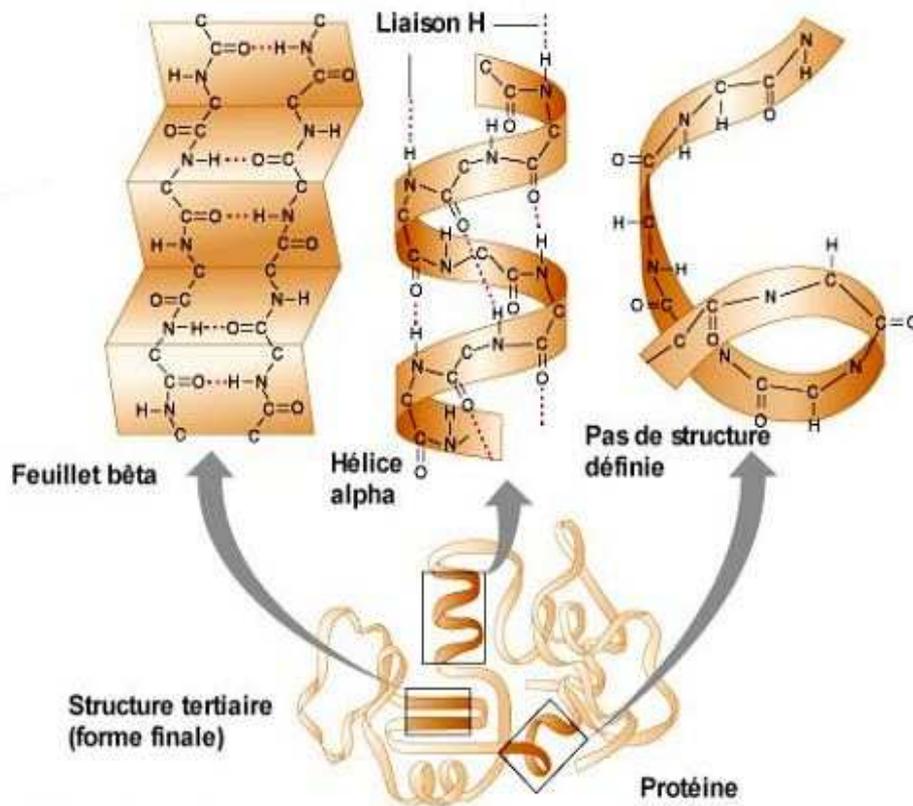


Figure 75: Illustration des structures α et β des protéines [245]

II-3-2- Nature des interactions

Les interactions rencontrées dans les assemblages protéiques peuvent être différentes de par leur nature, leur énergie (force) et leur spécificité selon la nature de l'assemblage protéique et les conditions physico-chimiques du milieu. De plus, plusieurs types d'interaction sont susceptibles d'être impliqués entre les protéines à la fois dans la formation de l'assemblage protéique et dans sa stabilité. Il apparaît donc nécessaire de rappeler brièvement les principales caractéristiques des interactions moléculaires rencontrées lors des assemblages protéiques.

II-3-2-1- Les liaisons covalentes

Les liaisons covalentes sont spécifiques et résultent de la mise en commun d'électrons entre deux atomes. Elles peuvent aussi bien se former au sein d'une même protéine qu'entre plusieurs protéines. Ces liaisons sont très énergétiques (200 à 800 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Elles peuvent

s'établir entre les groupements carboxyliques et les groupements amines des acides aminés des protéines pour former des liaisons de type peptidique. La formation de ce type de liaison nécessite fréquemment un catalyseur qui peut être physique (température, pression), biologique (certaines enzymes comme la transglutaminase) ou encore chimique (glutaraldéhyde). Des liaisons covalentes peuvent également s'établir par l'intermédiaire des groupements thiols des résidus cystéine pour former des ponts disulfures intra et/ou intermoléculaires. La formation de ces liaisons est également favorisée par des températures élevées. Les liaisons covalentes jouent un rôle primordial dans la conformation des protéines et leur stabilité. A titre d'exemple, les ponts disulfures intramoléculaires confèrent une grande stabilité aux protéines.

II-3-2-2- Les interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques s'établissent entre des protéines portant des charges électriques opposées. L'énergie de ces interactions est fortement dépendante (i) des charges portées par les protéines (q_1 et q_2), (ii) de la distance entre les protéines (r) et (iii) de la constante diélectrique (ϵ) du milieu dans lequel ces protéines interagissent. La force des interactions électrostatiques est décrite classiquement par la loi de Coulomb et s'exprime selon l'équation suivante :

$$F = \frac{q_1 q_2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r^2}$$

ϵ_0 correspond à la constante diélectrique du vide et ϵ_r correspond à la constante diélectrique du milieu. Les interactions électrostatiques entre protéines sont influencées par les charges des protéines et les conditions physico-chimiques du milieu dans lesquelles les complexes protéiques sont formés (pH, force ionique, nature des ions et température). L'énergie associée à ce type d'interaction est de l'ordre de 25 à 50 kJ.mol⁻¹.

II-3-2-3- Les liaisons hydrogènes

Les liaisons hydrogènes sont de type dipôle-dipôle. Elles s'établissent entre un atome d'hydrogène (accepteur d'électrons) lié à un atome électronégatif (N, O) et un autre atome électronégatif (donneur d'électrons). L'établissement des liaisons hydrogènes est favorisé à basse température. L'énergie de ces liaisons est dépendante de l'électronégativité des atomes et de leur orientation dans la liaison : l'énergie la plus élevée est obtenue lors de l'alignement

des deux atomes électronégatifs et de l'atome d'hydrogène impliqués dans la liaison. L'énergie d'une liaison hydrogène s'échelonne entre 10 et 30 kJ.mol⁻¹.

II-3-2-4- Les liaisons de Van der Waals

Les liaisons de Van der Waals sont des liaisons non-spécifiques de type dipôle permanent - dipôle permanent, dipôle permanent - dipôle induit et dipôle induit - dipôle induit. Ces liaisons s'établissent à courte distance entre les domaines d'une même protéine ou entre plusieurs protéines. Elles résultent de la distribution asymétrique des charges électroniques d'un atome qui induit un moment dipolaire sur ce même atome. Ce moment dipolaire altère la distribution électronique des atomes voisins ce qui entraîne la mise en place de liaisons de Van der Waals entre ces atomes.

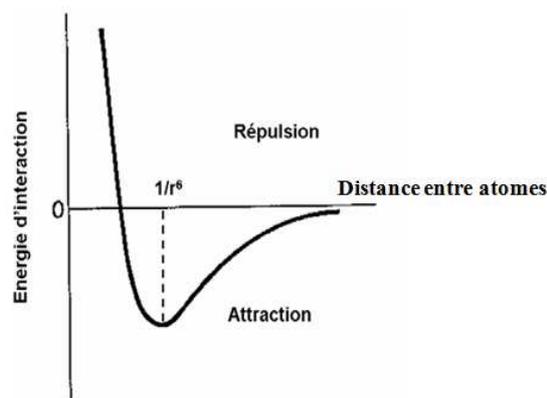


Figure 76: Illustration des interactions type Van der Waals

Les liaisons de Van der Waals sont attractives ou répulsives selon la distance entre les partenaires de l'interaction. En fonction des distances entre entités, elles sont d'abord attractives, ce qui provoque le rapprochement des atomes et deviennent répulsives lors du rapprochement trop important de ceux-ci du à la répulsion des nuages électroniques et à l'impénétrabilité des atomes (Figure 76). L'énergie des liaisons de Van der Waals est proportionnelle à $1/r^6$ (r étant la distance entre deux atomes). Elle est de l'ordre de 1 à 20 kJ.mol⁻¹ et est globalement inférieure à celle des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogènes.

II-3-2-5- Les associations hydrophobes

Les protéines peuvent également interagir et s'assembler pour former des complexes via des associations hydrophobes. Elles s'établissent entre des molécules apolaires ou présentant des

domaines apolaires dans des solvants aqueux. Ces associations hydrophobes sont de nature entropique et sont fortement dépendantes de la température. Elles sont favorisées pour des températures élevées. L'énergie de ces associations hydrophobes est de l'ordre de 2 à 10 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Les protéines globulaires contiennent des acides aminés apolaires. Des associations hydrophobes s'établissent entre ces acides aminés ; ce qui contribue au repliement des protéines globulaires et à leur stabilité. L'organisation et le repliement des protéines sont tels que la majeure partie de ces acides aminés se retrouvent enfouis au cœur des protéines, là où l'accessibilité au solvant est restreinte (excepté pour les protéines membranaires dont les acides aminés apolaires sont exposés à la surface des protéines). Par conséquent, l'établissement d'associations hydrophobes entre protéines nécessite fréquemment une modification conformationnelle et structurale de ces dernières afin d'exposer les acides aminés apolaires à leur surface.

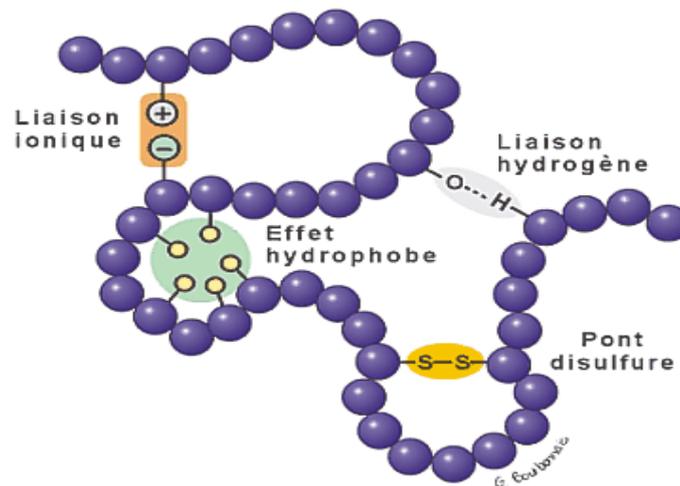


Figure 77: Illustration des interactions protéiques [245]

II-3-3- Outils de détections des interactions

Plusieurs outils d'analyse permettent de caractériser les interactions et les comportements physico-chimiques des protéines [246-249]. Parmi ces outils, les techniques spectroscopiques vibrationnelles telle que la spectroscopie Raman, sont utilisées pour déterminer les conformations secondaires et la structure des interactions [238, 250]. La conformation ou la configuration des éléments présents dans la protéine tels que les groupements amide III, la chaîne latérale, les résidus d'acides aminés et le mécanisme d'interactions impliquent des changements de polarisabilité dans la molécule. La diffusion Raman est particulièrement adaptée à la détection et l'analyse des changements de polarisabilité des biomolécules [236,

238, 250]. Cette technique optique non destructive, non invasive permet une mesure rapide, sensible et reproductible de tous les échantillons biologiques. La bande amide III généralement bien résolue dans le spectre Raman des protéines a été utilisée pour déterminer précisément leur conformation secondaire [236]. Les changements spectraux associés aux acides aminés aromatiques comme la tyrosine, la phénylalanine et des résidus tryptophane ont été utilisés pour suivre les interactions impliquant des modifications structurales [251]. Dans le cas d'une interaction entre un substrat et une protéine, la modification du site actif rend la protéine inactive. La figure 78 présente le site actif d'une protéine.

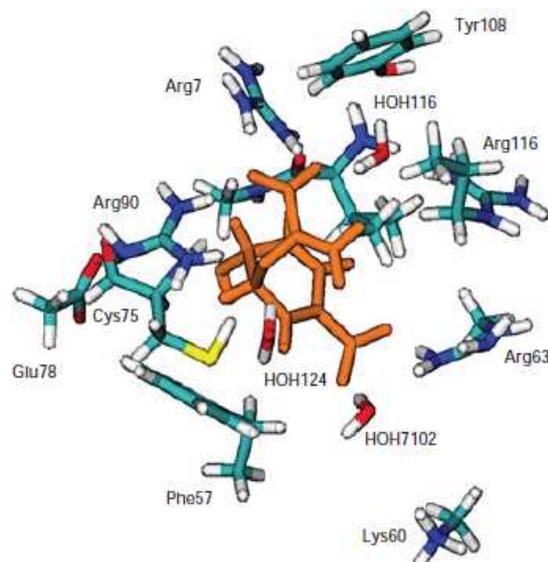


Figure 78: Représentation du site actif d'une protéine

Une représentation du site actif permet de mettre en évidence les interactions clés entre la protéine et le substrat. Cette figure met en évidence la sensibilité de la reconnaissance structurale entre le substrat et la protéine : la simple modification d'un oxygène en NH (mutation Glu/Gln) conduit à une protéine quasiment inactive.

II-3-4- Identification des interactions

II-3-4-1- Fonctionnalisation du substrat

Le substrat choisi pour étudier les interactions est une plaque d'or de rugosité 15 nm. Cette surface est fonctionnalisée avec du glutaraldéhyde. Pour se faire, la plaque d'or est lavée successivement à l'eau et à l'éthanol pendant 20 min et est ensuite immergée dans 250 mM de solution de thio-urée dans l'eau stérile pendant 24h. Cette surface est alors activée avec une solution de glutaraldéhyde (5% en volume) dans du tampon phosphate pendant 20 mn,

rincée avec du tampon pour éliminer le reste de matière non réagie, séchée à température ambiante et utilisée pour l'immobilisation des protéines.

II-3-4-2- Immobilisation des protéines A et IgG

Pour étudier les interactions entre les deux protéines et le substrat d'or fonctionnalisé au glutaraldéhyde, deux expériences d'immobilisations des protéines ont été réalisées :

- L'immobilisation successive des deux protéines : la surface d'or fonctionnalisée est immergée dans la solution de 0,1 mg/ml de protéine A pendant 2h, lavée successivement au tampon et à l'eau et séchée à température ambiante. Les interactions issues de la protéine A et du substrat ont été ensuite décelées par diffusion Raman. Cette même surface a été utilisée pour suivre les interactions entre la protéine A et l'IgG. De ce fait, l'échantillon de surface d'or fonctionnalisée portant la protéine A a été immergé dans une solution de 0,1 mg/ml d'IgG pendant 2h, lavé au tampon et séchée à température ambiante et enfin analysé par diffusion Raman.
- L'immobilisation simultanée des deux protéines : ceci en préparant préalablement une solution de la protéine A et d'IgG de même concentration et enfin de mélanger les deux solutions pour laisser interagir les deux entités pendant 1h avant de procéder à leur immobilisation sur le substrat. Les deux solutions de protéine ont été préparées à la concentration de 0,1 mg/ml chacune.

II-3-4-3- Identification des interactions

Toutes les études d'interactions sont menées en utilisant la diffusion Raman. Les spectres de référence de la protéine A et de l'IgG ont été réalisés sur les poudres lyophilisées de chaque entité. Le mélange de solution de Protéine A et d'IgG a aussi été analysé par la même technique afin de distinguer les interactions qui proviennent de la réaction entre les deux protéines et celles issues de la réaction avec la surface fonctionnalisée. L'adsorption des protéines sur la surface d'or a aussi été contrôlée. Les spectres ci-dessous (figure 79) présentent les résultats obtenus des différentes expériences.

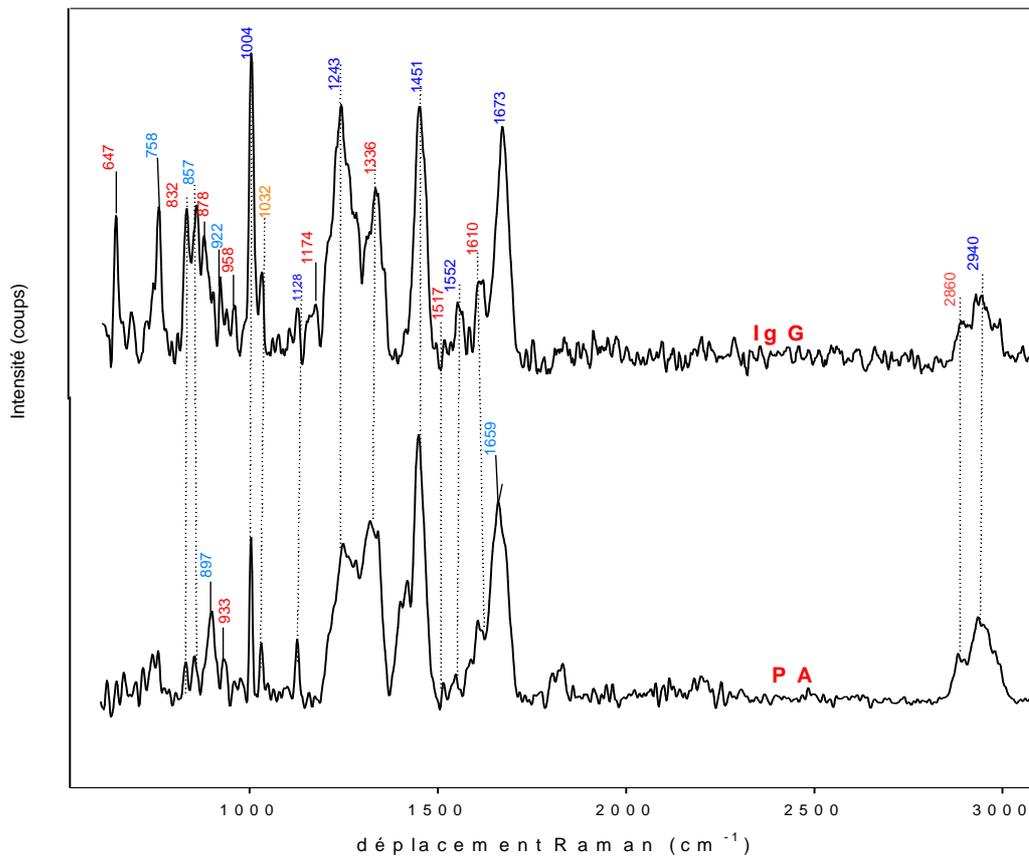


Figure 79: Spectre de référence de la protéine A et de l'IgG (poudre)

La protéine A et l'IgG sont des protéines globulaires de poids moléculaires 42 kDa et 150 kDa respectivement. La conformation secondaire de la protéine A montre qu'elle est constituée d'environ 54% d'hélice α et d'environ 10 à 20% d'hélice β . Les molécules d'IgG sont constituées majoritairement d'hélice β (environ 47%) et 7% d'hélice α . Une représentation schématique des deux hélices est représentée sur la figure 80.

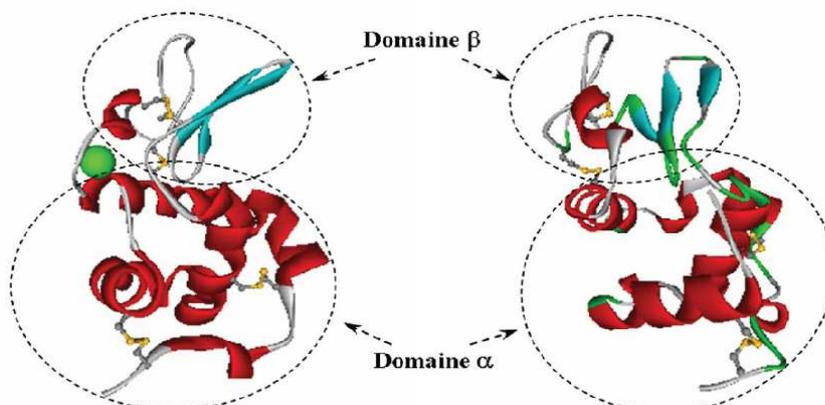


Figure 80: Représentation des hélices α et β

Sur le spectre Raman ces hélices α et β sont marquées par les bandes de vibration entre 1240 cm^{-1} et 1350 cm^{-1} correspondante à la fonction amide III. Pour l'hélice α , l'intensité de la bande à 1336 cm^{-1} est plus importante que celle de la bande à 1243 cm^{-1} et c'est l'inverse pour l'hélice β . Une autre caractéristique de l'hélice β est déterminée par la bande amide I à 1673 cm^{-1} dans le spectre de l'IgG. Rappelons que les spectres Raman de référence de la protéine A et de l'IgG sont décrits dans la partie précédente.

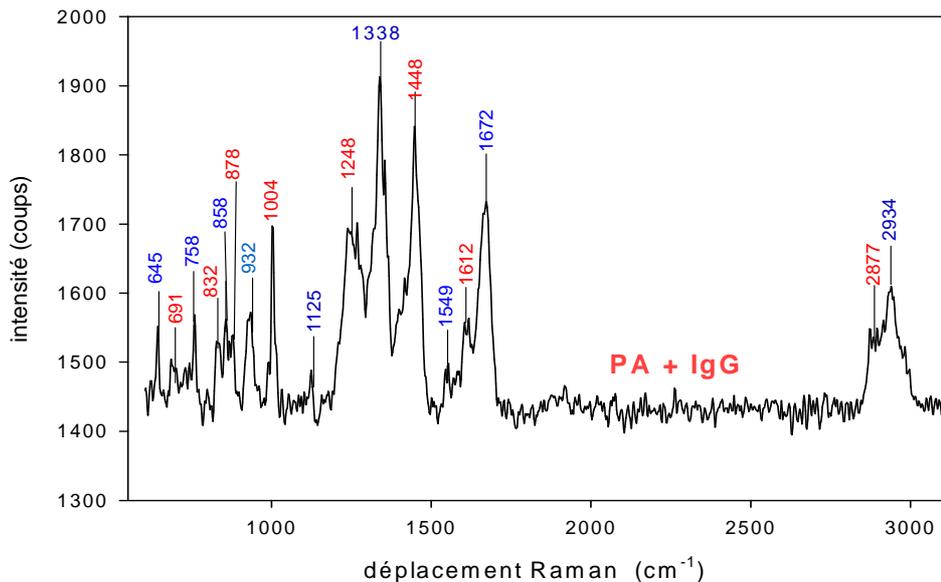


Figure 81: Spectre Raman du mélange de la solution de PA + IgG

Le spectre de la figure 81 représente les données Raman obtenues à partir du mélange de la solution de protéine A et l'IgG de même concentration. On note des caractéristiques spectrales spécifiques résultant de l'interaction entre les deux protéines. La bande amide I apparaît à 1672 cm^{-1} et est liée à la prédominance de l'hélice β de l'IgG. L'amide III est présent en hélice α , la bande à 932 cm^{-1} correspondante à l'hélice α des groupements CH_3 de la protéine A est plus intense que celle observée dans le spectre de référence de la protéine A. Ces observations nous permettent de conclure que le mélange de solution de protéine A et de la solution d'IgG présente principalement les caractéristiques de la protéine A. Les autres bandes de vibrations dans le spectre du mélange en l'occurrence celles à 2934 cm^{-1} , 1612 cm^{-1} , 1549 cm^{-1} , 1125 cm^{-1} , 858 cm^{-1} , 832 cm^{-1} , 645 cm^{-1} , 448 cm^{-1} sont les mêmes que celle du spectre de référence de la protéine A et de l'IgG. On note à l'issue de l'interaction entre la protéine A et l'IgG la disparition de la bande de vibration à 1032 cm^{-1} attribuable à la chaîne carbonée de conformation cis de la protéine A et de l'IgG. On pourrait penser que

l'interaction entre ces deux entités implique cette chaîne carbonée (se fait à partir de cette chaîne).

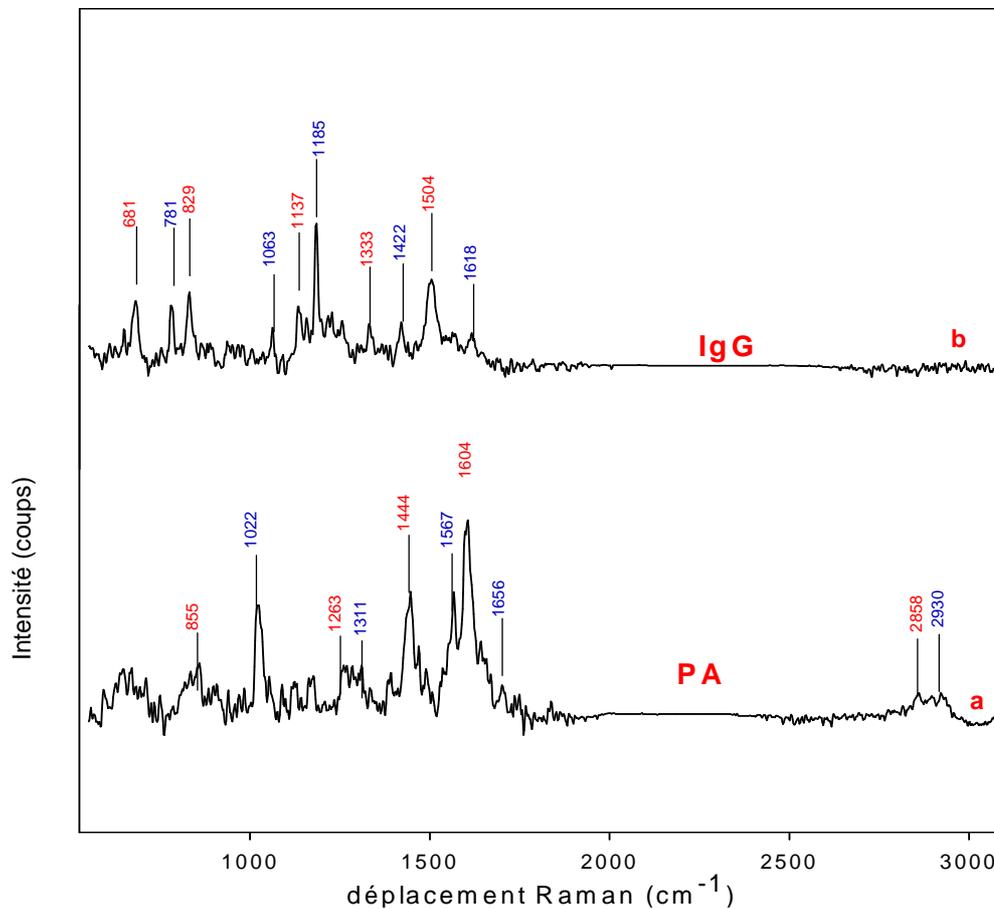


Figure 82: Spectre Raman des biomolécules immobilisées successivement; a) Immobilisation de la protéine A ; b) Immobilisation de l'IgG

La protéine A est immobilisée sur la surface d'or fonctionnalisée via glutaraldéhyde. Les analyses Raman ont permis d'obtenir les résultats de la figure 82 a. Sur ce spectre, on note les bandes caractéristiques de la protéine A avec un décalage en fréquence pour certaines bandes notamment celles à 1311 cm^{-1} , 1263 cm^{-1} . Ce « shift » comme nous l'avons déjà explicité dans la partie précédente est lié à l'environnement chimique du groupement fonctionnel impliqué. L'environnement chimique peut être constitué non seulement des atomes voisins de cette fonction amide de la protéine étudiée, mais aussi de la présence des atomes provenant de la surface fonctionnalisée. Sur la figure 82b, on note également des bandes de vibrations caractéristiques de l'IgG et aussi un « shift » associé à ces bandes de vibrations. On note la présence des pics bien résolus et plus intenses, caractéristiques de la tyrosine et du tryptophane à l'issue des interactions. En conclusion, nous pouvons affirmer que la structure

de la chaîne latérale et amide des protéines immobilisées sur la surface est modifiée par comparaison à leur structure initiale et que les résidus d'acide d'acides aminés tels que la tyrosine et le tryptophane sont bien mis en évidence.

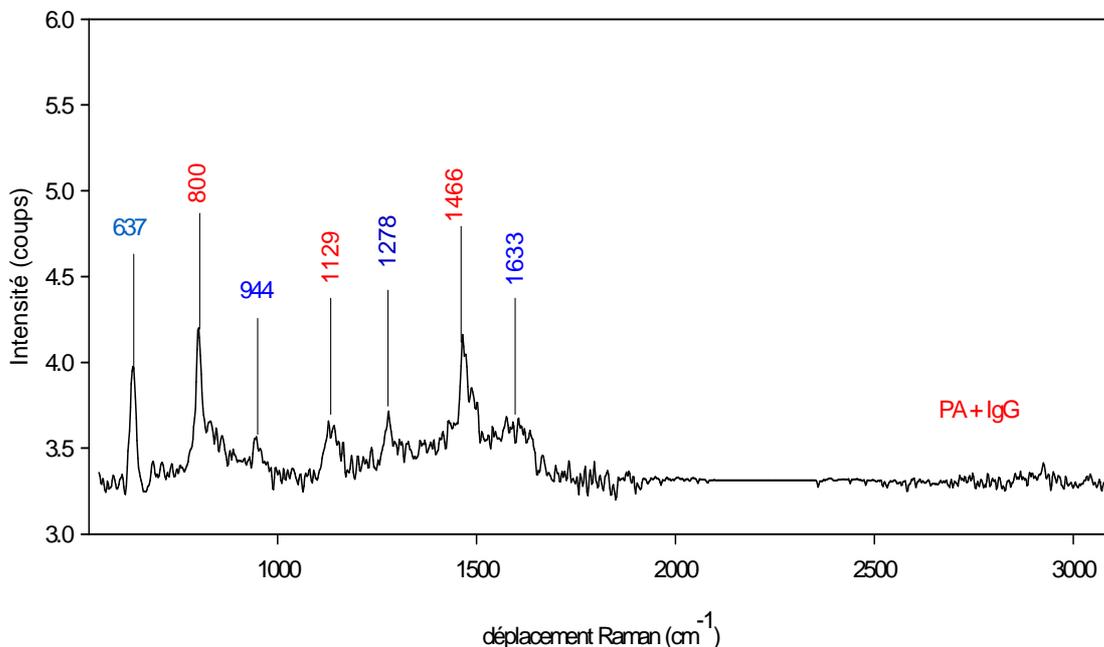


Figure 83: Spectre Raman de la protéine A et de l'IgG immobilisés simultanément

L'immobilisation successive de la protéine A et de l'IgG nous a permis à travers la spectroscopie vibrationnelle Raman d'identifier chaque entité. La question que nous nous posons est de savoir ce qui se passerait si les deux biomolécules étaient préalablement mélangées avant immobilisation. Autrement dit, est-ce que l'immobilisation simultanée des biomolécules produit le même résultat ou aurait la même efficacité que leur immobilisation successive sur une surface ?

Le spectre de la figure 83 répond partiellement à cette question. Par comparaison à la figure 82 qui représente les spectres Raman issus de l'immobilisation successive des deux protéines, on note des bandes de vibrations communes autour de : 1656 cm^{-1} et 1633 cm^{-1} correspondant à l'amide I, 1444 cm^{-1} et 1466 cm^{-1} lié au C-H de déformation, 1263 cm^{-1} et 1278 cm^{-1} liés à la fonction amide III, 1137 cm^{-1} et 1129 cm^{-1} liés à la vibration de valence des liaisons C-C, 829 cm^{-1} et 800 cm^{-1} , 681 cm^{-1} et 637 cm^{-1} correspondant à la tyrosine. On note également dans le cas de l'immobilisation successive des décalages de fréquences par rapport aux valeurs de référence. Cette expérience d'immobilisation simultanée a permis de fixer les deux protéines et on remarque dans le spectre résultant à la fois les caractéristiques de la protéine A

et de l'IgG. Les bandes de vibrations de la tyrosine sont plus marquées et peuvent résulter des interactions fortes entre la protéine A et l'IgG. Ces bandes sont d'autant plus intenses que dans le spectre de référence de l'IgG. Leur exaltation dans l'étape d'immobilisation simultanée laisse penser que, dans le cas de l'immobilisation successive des deux biomolécules, la réaction préalable de la protéine A avec la surface fonctionnalisée influence ces bandes tyrosine. Les résidus tyrosine sont connus comme résultant de l'interaction entre la protéine A et l'IgG [252]. On note de plus dans le spectre d'immobilisation simultanée une modification dans la structure d'hélice α de la protéine A. Ces détails permettent de conclure que les interactions entre la protéine A et l'IgG se font à travers la tyrosine présente dans la structure α hélice de la protéine. Ce qui pourrait être l'une des raisons pour lesquelles la protéine A est utilisée comme récepteur d'IgG dans certains biocapteurs.

On remarque finalement que la procédure d'immobilisation simultanée est assez efficace et peut aussi être utilisée pour immobiliser d'autres biomolécules. De plus, ce protocole expérimental est plus rapide que le précédent car un gain de temps de 1h a été réalisé.

II-3-4-4- Interactions Protéines- Surface

Les interactions protéine et surface ont été étudiées à travers les tests d'adsorption de la protéine A et de l'IgG sur la surface d'or pur. Comme les étapes d'immobilisation des différentes biomolécules dans notre travail ont été réalisées par incubation durant 2h, le contrôle d'adsorption a été vérifié par une incubation à 2h et au-delà de 2h. Pour cela, la surface d'or pur est immergée dans une solution de protéine A de concentration 50 mg/l pendant 2h, lavée au tampon, séchée à température ambiante et analysée par spectroscopie Raman. La même expérience a été réalisée pour l'IgG d'une concentration de 1g/l. Les autres échantillons de surface d'or pur ont été immergés dans la solution de protéine A, et d'IgG de même concentration que la précédente pendant 16h. Après lavage au tampon et séchage, ils ont été analysés aussi par diffusion Raman. Les résultats de ces expériences sont représentés sur les figures 84 et 85.

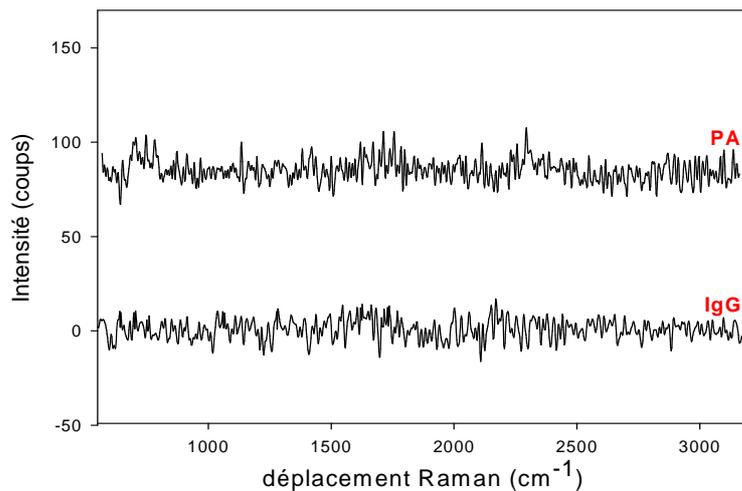


Figure 84: Contrôle d'adsorption, 2h d'incubation

Sur la figure 84 du contrôle d'adsorption ci-dessus, on n'observe pas de bandes de vibration caractéristiques de la protéine A et de l'IgG. Ce qui permet de conclure qu'il n'y a vraisemblablement pas d'adsorption de protéine au bout de 2h sur les surfaces d'or et que les interactions observées dans les étapes d'immobilisation via une fonctionnalisation de surface sont réellement spécifiques.

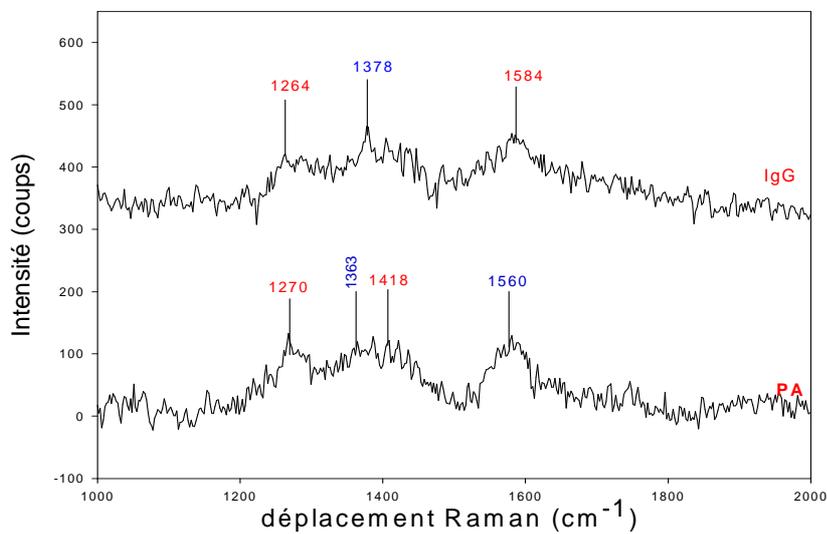


Figure 85: Test d'adsorption des protéines: 16 h d'incubation

Après 16 h d'incubation, on observe des signaux de faibles intensités sur les spectres de la protéine A et de l'IgG comme le montre la figure 85. Sur le spectre de la protéine A, on note des bandes à 1560 cm^{-1} , 1418 cm^{-1} , 1368 cm^{-1} et 1270 cm^{-1} attribuables respectivement au tryptophane pour les deux premières bandes et l'amide III pour les deux dernières. Le spectre

de l'IgG montre les bandes de vibrations à 1584 cm^{-1} , 1378 cm^{-1} et 1264 cm^{-1} attribuables également au tryptophane pour la première et à l'amide I pour les deux dernières. Bien que l'on observe l'adsorption des protéines au bout d'une très longue période d'incubation (16h), ce phénomène est très faible et ne perturbera pas les interactions covalentes et spécifiques entre les protéines et surfaces fonctionnalisées.

Les interactions entre biomolécules peuvent dépendre de certains facteurs comme la conformation de la biomolécule et des paramètres physico-chimiques du milieu réactionnel. Pour optimiser le protocole expérimental, nous devons intégrer tous ces critères.

II-3-5- Paramètres physicochimiques

Parmi les différents paramètres physico-chimiques, le pH, la force ionique et la température sont ceux les plus fréquemment étudiés et modulés lors de la formation et de l'orientation des assemblages protéiques. Le pH est un facteur agissant sur le degré d'ionisation des groupements portés par les chaînes latérales des acides aminés constituant les protéines. Par conséquent, le pH influe directement sur la charge des protéines ce qui peut moduler et orienter la morphologie des assemblages protéiques.

La force ionique est un paramètre physico-chimique pour lequel la formation des assemblages protéiques peut être modulée en écrantant les charges de surface des protéines. Dans une solution aqueuse, la distribution des ions à la surface des protéines est régit par le potentiel électrostatique de surface des protéines : les contre-ions s'accumulent à l'interface des protéines pour compenser les charges de surface ; inversement les co-ions sont refoulés de la surface des protéines, leur distance à l'interface dépendant de l'intensité du potentiel de surface des protéines. Les interactions entre protéines peuvent aussi être influencées par la température du milieu. Ce facteur module tout d'abord la balance des interactions établies entre les protéines impliquées dans l'assemblage. A faible température, la mise en oeuvre d'interactions de nature électrostatique entre les protéines est favorisée, alors que l'augmentation de la température permet la formation d'assemblages protéiques via des interactions de nature hydrophobe. De plus, au-delà de la modulation des interactions impliquées dans l'assemblage, la température influe également sur la conformation des protéines : selon leur stabilité thermodynamique, l'augmentation de la température peut induire des modifications conformationnelles des protéines qui peuvent être à l'origine de la formation d'assemblages protéiques.

En conclusion, pour optimiser notre protocole expérimental d'immobilisation de protéines, nous devons intégrer ces paramètres physicochimiques pour limiter les phénomènes de dénaturation.

II-4- Synthèse d'une nouvelle surface spécifique par photopolymérisation

Cette partie présente un autre type de fonctionnalisation de surface se faisant par photopolymérisation. Le monomère est synthétisé par voie chimique et devra subir une polymérisation sous rayonnement UV. Le but de cette nouvelle partie est de proposer une autre technique de fonctionnalisation de surface plus facile à mettre en œuvre qui permettra à terme aux industriels de réaliser un contrôle en continu de la qualité de leurs produits. Cette dernière fonctionnalisation présente l'avantage majeur de se réaliser sur tout type de surface. Deux caractéristiques sont principalement responsables de l'essor industriel des systèmes photopolymérisables [253] :

- la rapidité du processus qui transforme, en une fraction de seconde, la molécule en un matériau polymère ;
- production à des vitesses pouvant atteindre 400 m/min. Elles sont appliquées sur des supports variés, tels que des métaux, des matières plastiques, du papier et du carton.

Les propriétés de surface d'un matériau peuvent être nettement améliorées à l'aide de revêtements protecteurs très résistants, tels ceux obtenus par photoréticulation. Divers types de matériaux sont actuellement protégés à l'aide de vernis UV, notamment le bois, les plastiques, les fibres optiques, le papier, le cuir, les textiles, les métaux, etc. Les films de 20 à 100 μm d'épaisseur augmentent la durabilité de ces matériaux en ralentissant les phénomènes de dégradation, oxydation, corrosion, vieillissement et usure lors de leurs utilisations. L'introduction de photostabilisants dans la formulation de la résine confère au revêtement un rôle de filtre anti-UV et permet ainsi de décupler la résistance au photovieillissement de matériaux polymères.

Bien que la photopolymérisation soit principalement utilisée pour insolubiliser des films photosensibles de faible épaisseur, typiquement entre 1 et 100 μm , cette technologie permet de réticuler des échantillons beaucoup plus épais. Pour cela, il convient d'opérer à de faibles concentrations en photoamorceurs, en choisissant un composé qui subit une photolyse rapide, sans créer de photoproduits absorbants dans le proche UV. Le rayonnement lumineux peut ainsi pénétrer progressivement à l'intérieur de l'échantillon et amorcer la polymérisation des couches profondes. Divers types de résines acrylates et époxydes ont été réticulées par cette photopolymérisation frontale sur des épaisseurs pouvant atteindre plusieurs centimètres. L'utilisation du rayonnement solaire permet de réaliser ce changement de phase liquide-solide

en quelques minutes à température ambiante et de traiter des panneaux de grande dimension à un coût énergétique nul. D'autres applications même si elles ne représentent pas à l'heure actuelle une part de marché importante, n'en présentent pas moins un grand intérêt en raison de leurs performances et des nouvelles perspectives qu'elles ouvrent pour le proche avenir [253] telles que :

- la création d'objets tridimensionnels et de prototypes par polymérisation de couches successives à l'aide d'un faisceau laser ;
- le photodurcissement de ciments dentaires ;
- la fabrication de membranes composites et de plastiques renforcés ;
- l'enregistrement d'hologrammes à l'aide de photopolymères autodéveloppants ;
- la fabrication de composants optiques et de guides d'onde par faisceau laser.

Nous ajoutons dans cette catégorie la synthèse de surfaces spécifiques pour l'ancrage de biomolécules qui constitue la troisième voie envisagée dans le cadre de cette thèse.

II-4-1- Généralités sur la photopolymérisation

Le traitement par irradiation sous UV est devenu une technologie très répandue qui a trouvé plusieurs applications industrielles grâce à ses nombreux avantages [254-258]. Pour être polymérisable sous UV, une formulation est essentiellement constituée des deux composés chimiques de base suivants :

- une résine macromoléculaire portant une ou plusieurs fonctions réactives qui, en polymérisant, donne naissance à un réseau polymère tridimensionnel ;
- un photoamorceur qui, sous l'action du rayonnement UV, génère des centres actifs vis-à-vis du groupement fonctionnel de la résine.

En plus de ces deux constituants principaux, des additifs (stabilisants, agents mouillants, charges, pigments ...) peuvent être ajoutés pour améliorer notamment les propriétés finales du matériau [253].

II- 4-1-1- Principe de base de la photopolymérisation

La photopolymérisation est un processus de polymérisation sous rayonnement UV. La formulation fluide au départ, se transforme en un solide après irradiation. Si le monomère

possède une fonctionnalité supérieure à 2, on obtient un réseau tridimensionnel réticulé. Il nécessite la plupart du temps l'emploi de petites molécules appelées photoamorceurs. En l'absence d'irradiation, ces molécules (photoamorceurs) se trouvent à l'état fondamental. Lors de l'absorption d'un photon possédant une énergie suffisante, les molécules passent à un état excité se traduisant par un transfert d'électron d'HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) à LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital). La nature des espèces chimiques formées après excitation permet de caractériser le type de photopolymérisation. Lorsqu'un radical libre est formé, on parle de photopolymérisation radicalaire et cationique lorsque l'espèce chimique formée est un cation. Le schéma général de la photopolymérisation est représenté ci- dessous [259] :



Schéma 3: Etapes de la photopolymérisation

Les excitations conduisent, soit par coupure homolytique, soit par arrachement d'hydrogène d'un composé donneur de protons, à la formation de radicaux ou d'ions. En présence de monomères, ces espèces actives sont susceptibles d'amorcer la polymérisation. La figure 86 illustre le comportement du photoamorceur sous irradiation [253].

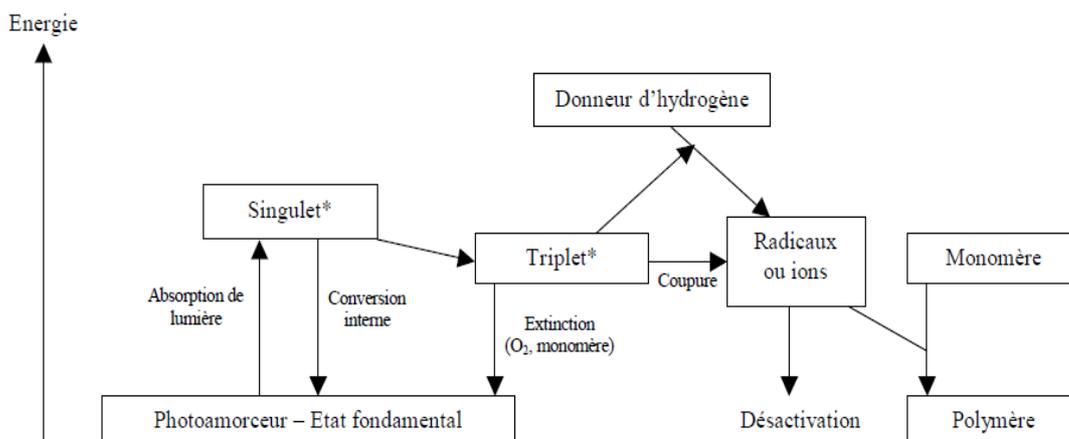


Figure 86: Diverses voies de désactivation d'une molécule de photoamorceur excitée

Pour être efficace, un photoamorceur doit satisfaire un certain nombre de critères :

- il doit présenter une forte absorption dans le domaine d'émission de la source lumineuse utilisée, en général une lampe à vapeur de mercure;
- les états excités singulet et triplet doivent avoir une courte durée de vie (quelques nanosecondes) pour éviter leur désactivation (quenching) par l'oxygène moléculaire ou le monomère;
- les ions ou radicaux issus des états excités doivent être produits avec un rendement quantique aussi élevé que possible et être réactifs envers le groupement monomère ;
- il doit présenter une solubilité suffisante dans le mélange ;
- sa stabilité au stockage doit être élevée.

La vitesse d'amorçage est donnée par la relation ci-dessous [253] :

$$V_a = \Phi_a I_0 [1 - \exp(-2,3A)]$$

V_a = vitesse d'amorçage

I_0 = intensité de la lumière incidente

Φ_a = rendement quantique

$A = \log\left(\frac{I_0}{I_t}\right)$ = absorbance de l'échantillon

I_t = Intensité de la lumière transmise

l'absorbance dépend de la concentration en photoamorceur [PA]

$A = \varepsilon \ell [PA]$

ε = coefficient d'extinction molaire du photoamorceur

Il existe deux principaux types de photoamorceur, selon que leur photolyse libère des espèces radicalaires ou ioniques [253].

II-4-1-2- Photopolymérisation radicalaire

Cette réaction consiste à l'association des différents radicaux formés après l'étape d'amorçage. Comme la plupart des monomères ne produisent pas de radicaux amorceurs en quantité suffisante lorsqu'ils sont exposés au rayonnement UV, il est nécessaire d'ajouter un composé photosensible qui absorbe efficacement la lumière incidente et produise des espèces radicalaires ou ioniques avec un rendement quantique élevé³⁰. Une fois amorcée, la réaction

³⁰ **rendement quantique** : rapport du nombre de molécules transformées au nombre de photons absorbés.

en chaîne se développe comme dans une polymérisation classique. Ce type de polymérisation concerne les monomères comportant des insaturations vinyliques tels que les acrylates, les méthacrylates et les polyesters insaturés (en présence de styrène). Les acrylates sont parmi les monomères les plus réactifs. Ensuite, viennent les monomères possédant des groupements méthacrylates, allyliques et enfin vinyliques [259].

L'ensemble du processus peut être représenté schématiquement comme suit [260]:

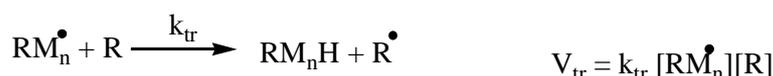
● **Amorçage:**



● **Propagation:**



● **Transfert:**



● **Terminaison:**

- monomoléculaire:



- bimoléculaire:



Dans le cas de monomères monofonctionnels, en faisant l'hypothèse de l'état quasi-stationnaire (EQS) et d'une terminaison bimoléculaire,

$$V_t = 2k_t [RM_n^\bullet]^2 = V_a \quad \text{d'où } [RM_n^\bullet] = \frac{V_a}{\sqrt{2k_t}}, \text{ la vitesse de polymérisation s'écrit :}$$

$$V_p = \frac{k_p}{k_t^{0,5}} (2,3 \Phi_a \varepsilon I_0 \ell)^{0,5} [M][A]^{0,5}$$

k_p = constante de la vitesse de propagation

k_t = constante de la vitesse de terminaison

Φ_a = rendement quantique d'amorçage

ϵ = coefficient d'extinction molaire

I_0 = Intensité du rayonnement incident

[A]: concentration en photoamorceur

[M]: concentration en monomère

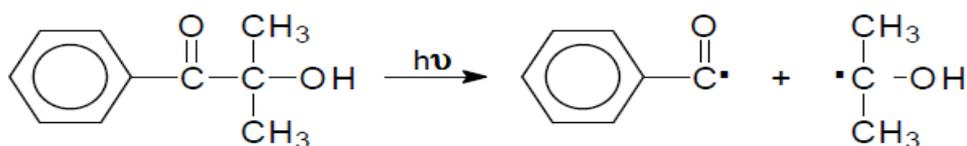
Les divers photoamorceurs radicalaires principalement utilisés aujourd'hui peuvent être classés en 2 grandes catégories en fonction de la nature du mécanisme impliqué dans la photolyse.

- Ceux donnant des radicaux par coupure homolytique, dits photoamorceurs de type Norrish I [256, 261],

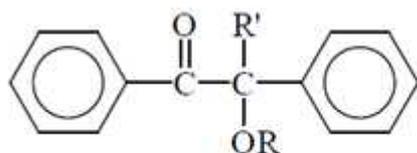
- ceux donnant des radicaux par arrachement d'hydrogène d'un composé donneur de protons, dits photoamorceurs de type Norrish II [262]

II-4-1-2-1- Photoamorceurs de type I

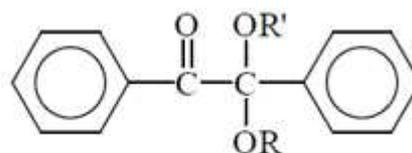
Sous irradiation UV, ces photoamorceurs subissent une coupure homolytique conduisant à la formation de 2 radicaux susceptibles d'amorcer plus ou moins efficacement la polymérisation des composés vinyliques et acryliques.



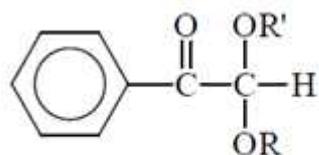
Les photoamorceurs appartenant à cette classe sont :



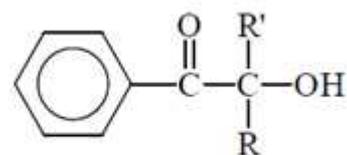
éther de benzoïne



cétals benzyliques



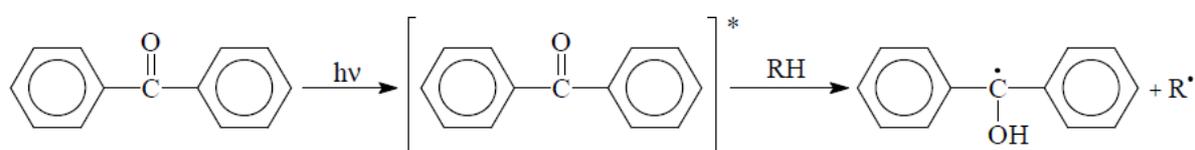
dérivés de l'acétophénone



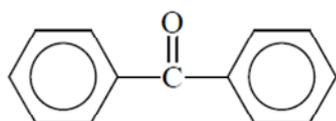
hydroxyalkylphénones

I-4-1-2-2- Photoamorceurs de type II

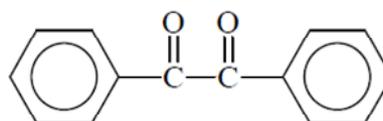
Sous l'effet du rayonnement UV, ces photoamorceurs arrachent un proton à une molécule ayant un hydrogène labile conduisant ainsi à la formation de deux radicaux.



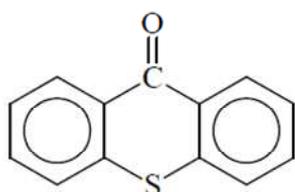
Dans cette catégorie, on trouve une très large gamme de composés portant des groupements carbonyles. Parmi les composés les plus représentatifs de cette forme d'amorçage, on peut citer la benzophénone, le benzyle, la thioxanthone, l'antraquinone et les céto-coumarines.



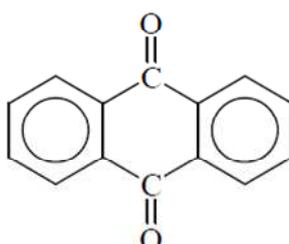
benzophénone



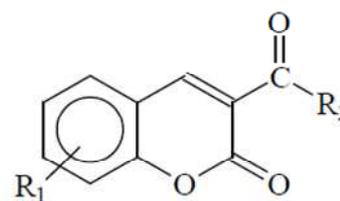
benzyle



thioxanthone



antraquinone



céto-coumarines

II-4-1-3- Photopolymérisation cationique

La photopolymérisation cationique présente l'avantage de ne pas être sensible à l'oxygène de l'air. De plus, lors de l'arrêt de l'irradiation, la polymérisation peut continuer en l'absence de

réactions de terminaison. Par ailleurs, ce type de polymérisation permet d'obtenir une meilleure adhésion sur le support recouvert par la résine.

Le processus de photopolymérisation par voie cationique fait généralement intervenir deux classes de photoamorceurs :

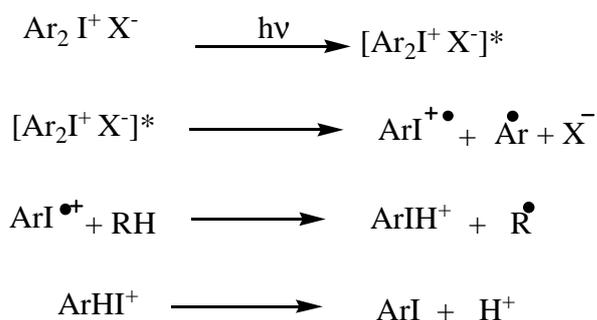
- ceux qui génèrent des acides de Bronsted (les plus couramment employés),
- ceux qui génèrent des acides de Lewis

Ce processus est utilisé pour polymériser en particulier des monomères de type éther vinylique et des monomères hétérocycliques (époxydes, lactones, éthers cycliques...).

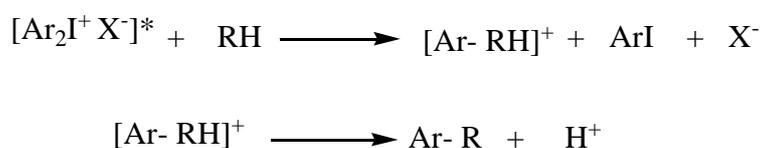
II-4-1-3-1- Photoamorceurs cationiques

Les amorceurs générant des acides de Bronsted [256, 263, 264] sont généralement des sels de diaryliodonium ou triarylsulfonium. Sous irradiation UV et en présence d'un composé donneur d'hydrogène, la photolyse de ces sels génère ainsi des acides forts. La littérature [265] propose le mécanisme de décomposition suivant :

- Réaction majoritaire



- Réaction minoritaire

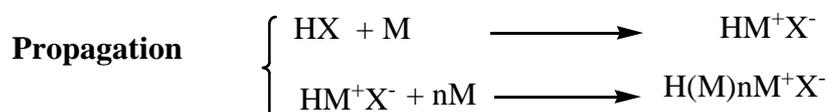
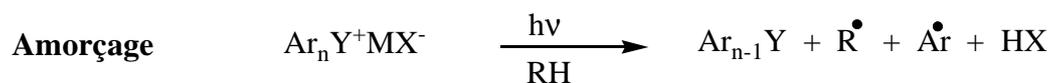


Ainsi, plus le caractère nucléophile du contre-ion (X^-) est faible et plus la réaction de photolyse est rapide. On peut donc classer les différents contre-ions selon leur réactivité [265].



La seconde classe de photoamorceur cationique correspond aux sels d'arène [265]. Ils libèrent un acide de Lewis de type : $\text{C}_5\text{H}_6\text{-Fe}^+\text{X}^-$

II-4-1-3-2- Mécanisme de photopolymérisation cationique

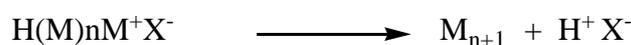


Terminaison

- Transfert de monomère



- Transfert spontané



- Transfert à un composé à hydrogène libre



Y = S, I,

MX = PF₆⁻, BF₄⁻, SbF₆⁻,

AH = solvant ou monomère

II-4-1-4- Avantages du procédé photochimique

La polymérisation photoamorcée présente plusieurs caractéristiques qui la différencient des polymérisations amorcées par voie thermique [253, 259]

Rapidité

La polymérisation est quasi instantanée, le passage de la molécule au matériau polymère s'effectuant en quelques dixièmes de seconde; elle ne nécessite, de ce fait, qu'une faible dépense énergétique.

Réduction ou absence des COV

Les polymérisations photoamorcées sont habituellement réalisées à température ambiante, avec des résines ne contenant pas de solvant, ce qui réduit l'émission de vapeurs polluantes.

Le contrôle spatial

La réticulation intervient uniquement dans des zones spatialement bien définies, celles qui sont exposées au rayonnement lumineux, ce qui permet de réaliser des images en relief à haute résolution.

Le contrôle temporel

La réaction peut être déclenchée à un instant précis et être arrêtée à tout moment, grâce à un contrôle temporel de l'irradiation.

L'intensité de la source lumineuse est modulable dans une très large gamme, ce qui permet de contrôler la vitesse d'amorçage.

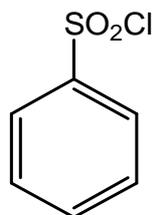
Une polymérisation frontale contrôlée à température ambiante

En agissant sur la longueur d'onde du rayonnement lumineux et/ou sur la concentration en photoamorceur, on peut régler la profondeur de pénétration de la lumière et, donc, l'épaisseur de la couche polymère formée, qui peut varier de quelques micromètres à plusieurs millimètres.

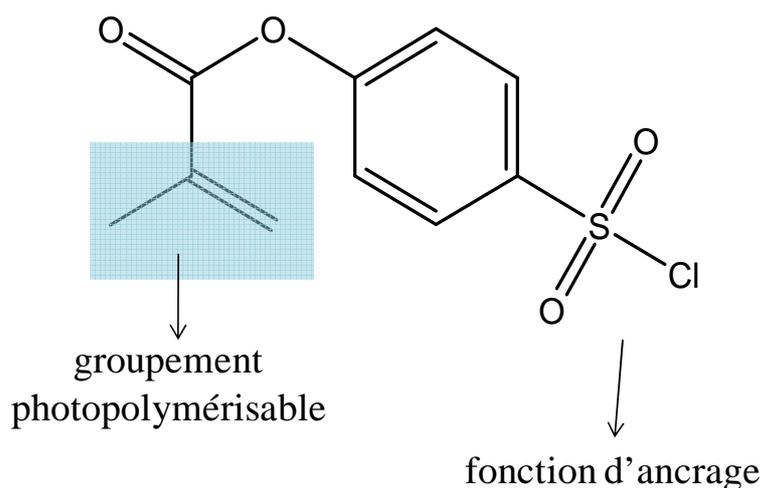
Les formulations sont monocomposantes avec une très grande durée de vie en absence de toute exposition directe à la lumière.

II-4-2- Synthèse du monomère

Comme toute polymérisation, la photopolymérisation se fait à partir d'un monomère. Le monomère ici est choisi en fonction des résultats obtenus précédemment. A savoir posséder une molécule organique qui dispose d'un spectre Raman ne recouvrant pas les bandes des bioéléments. Nous focaliserons donc notre étude sur les groupements benzènes substitués du chlorure de sulfonyle.



Le but étant à la suite de la synthèse du monomère de procéder à une photopolymérisation, le monomère est choisi également en fonction de la facilité de la molécule à former les espèces réactives sous l'effet de l'irradiation, notamment les molécules insaturées. Le choix s'est finalement orienté vers le chlorure de 4-méthacryloyloxybenzènesulfonyle dans lequel le groupement photopolymérisable est la fonction méthacryloyle et la fonction d'ancrage des biomolécules étant le groupement chlorure de sulfonyle.



II-4-2-1- Schéma du principe de synthèse

Des études réalisées sur différentes résines polymérisables par voie radicalaire ont montré que la famille des méthacrylates est parmi les monomères les plus réactifs [253]. Par conséquent, la molécule du chlorure de méthacryloyle a été choisie comme réactif dans la synthèse de notre monomère. La réaction de cette dernière avec l'acide 4-hydroxybenzènesulfonique permet d'obtenir une formulation huileuse (ester) qui sera facilement photopolymérisable.

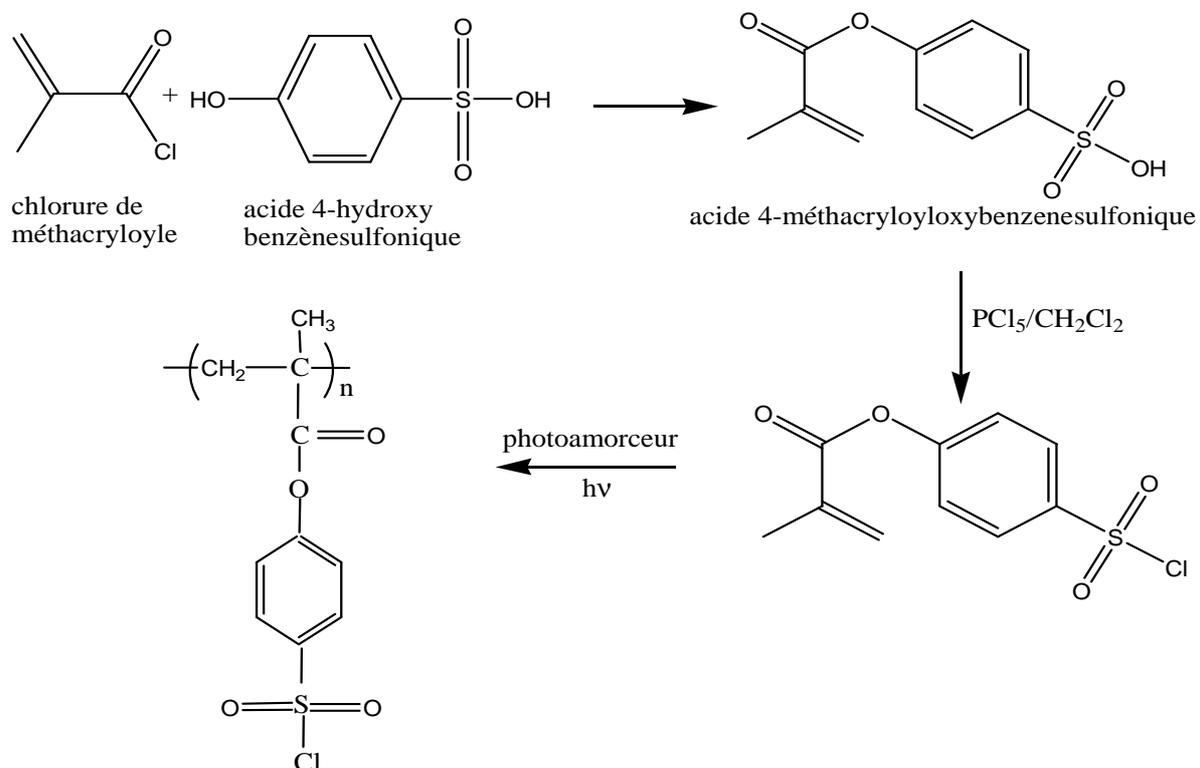


Schéma 5: Schéma du principe de synthèse

II-4-2-2- Protocole de synthèse du monomère

La réaction consiste en une estérification du chlorure de méthacryloyle par l'acide 4-hydroxybenzènesulfonique en présence d'une base forte. Trois équivalents de base sont nécessaires pour l'effectivité de cette réaction. Deux équivalents sont nécessaires pour capter les deux protons de l'acide 4-hydroxybenzènesulfonique (afin de le rendre très nucléophile et de réagir efficacement avec le chlorure d'acide) et un autre pour neutraliser l'acide chlorhydrique formé pendant la réaction. Un alcoolate très nucléophile va ainsi se former et réagir avec le chlorure de méthacryloyle pour conduire à la fonction ester. La difficulté de cette réaction est de retrouver les meilleures conditions expérimentales permettant d'optimiser le protocole de synthèse. Le mécanisme proposé pour cette synthèse de monomère est illustré sur le schéma 4 ci-dessous.

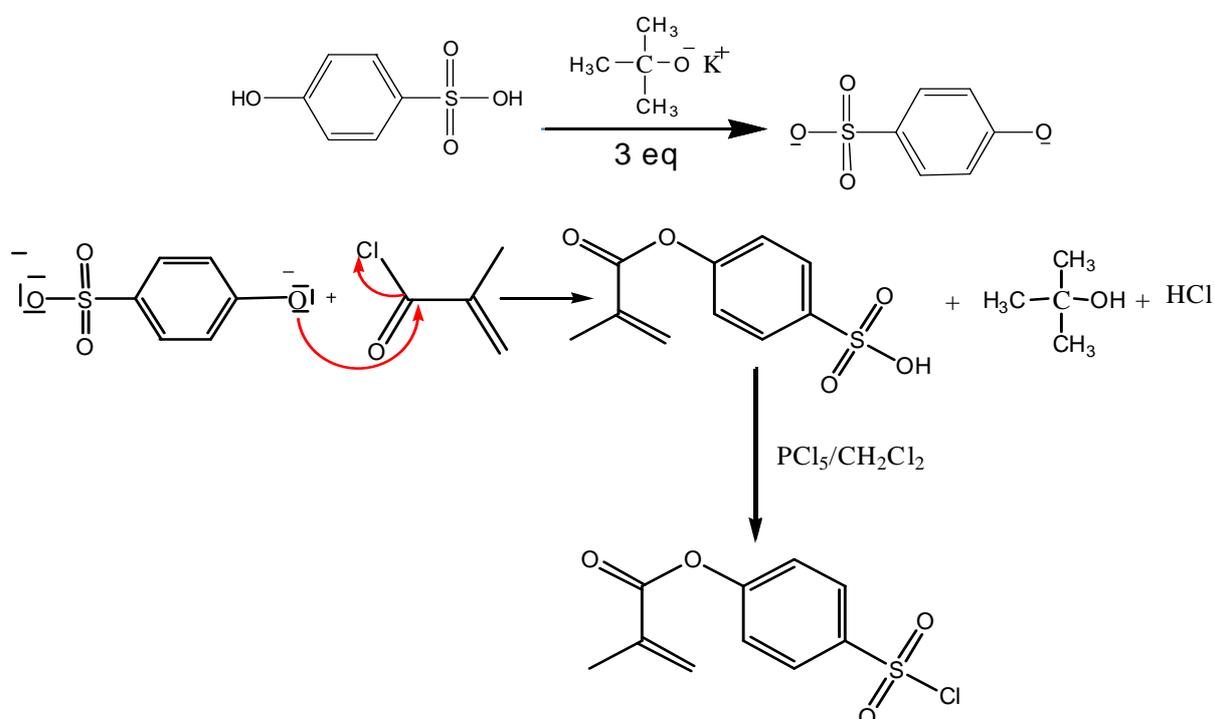


Schéma 6: Mécanisme de formation du monomère

Le dispositif expérimental utilisé est représenté sur la figure 87 ci dessous. La réaction étant réalisée pour la première fois, les conditions douces ont été adoptées : synthèse préalable à basse température, en milieu inerte. L'alcool acheté sous forme hydratée, l'utilisation d'un tamis moléculaire est nécessaire pour retenir les molécules d'eaux qui pourront éventuellement entraver l'estérification. L'utilisation d'un solvant anhydre est requise.

Étapes de la synthèse :

Cette synthèse n'a pas encore fait l'objet d'étude dans la littérature. Pour cela, il n'existe pas de protocole standard de mise en oeuvre. Nous procédons donc par essais successifs pour rechercher les meilleures conditions expérimentales, notamment quant au choix de la température du milieu réactionnel. Nous avons ainsi essayé plusieurs protocoles de synthèse de ce composé.

II-4-2-2-1- Refroidissement du milieu réactionnel

N'ayant pas d'information sur les risques que peut engendrer la réaction, un premier essai a été réalisé en refroidissant le milieu réactionnel par un bain de glace. Les étapes suivantes relatent le processus :

le dispositif expérimental a été installé sous un courant d'azote. Le tamis moléculaire a été introduit dans le tricol avec du THF pour retenir les molécules d'eaux présentes dans l'alcool. Sous agitation magnétique, l'alcool hydraté (5 g) a été introduit dans le milieu. La base (10 g) dissout dans du THF est introduite dans le milieu réactionnel à travers l'ampoule à addition. La réaction entre la base et l'alcool étant supposée être exothermique, un bain de glace a été installé sous le dispositif pour refroidir le milieu. Un thermomètre associé au milieu indiquait à chaque instant la température du milieu réactionnel. A une température de 0°C, le chlorure d'acide (3,6 g) a été additionné goutte à goutte au milieu réactionnel et enfin la réaction a été poursuivie pendant 3h.

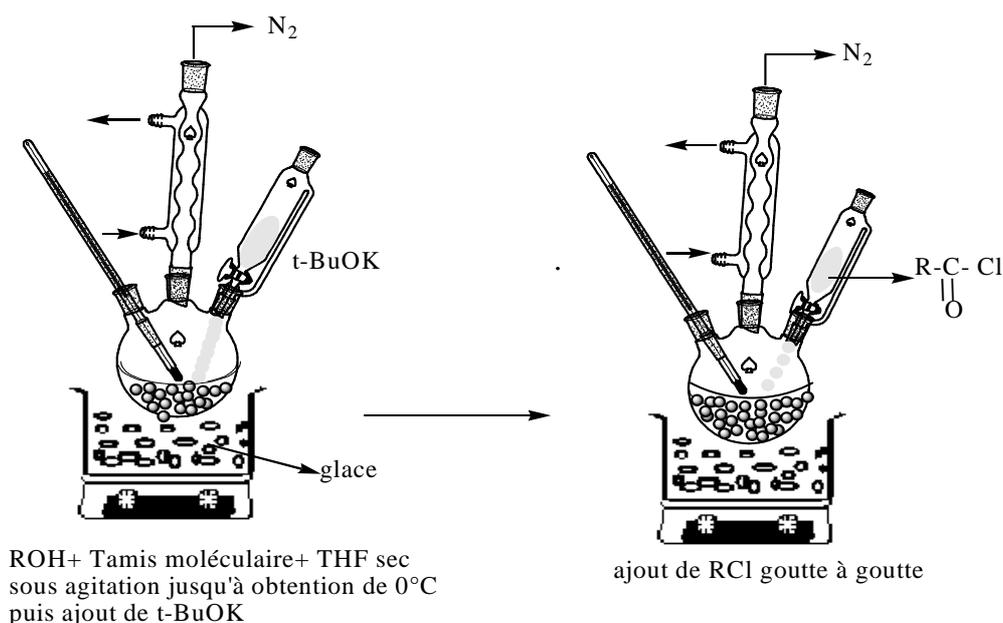


Figure 87: Dispositif expérimental pour la synthèse du monomère

A l'issue de ce processus, nous avons obtenu un produit brut d'une masse de 3,3 g correspondant à un rendement de 47%. Ce produit brut a été analysé par RMN ^{13}C et ^1H . Les résultats des analyses sont présentés sur les figures 88 et 89.

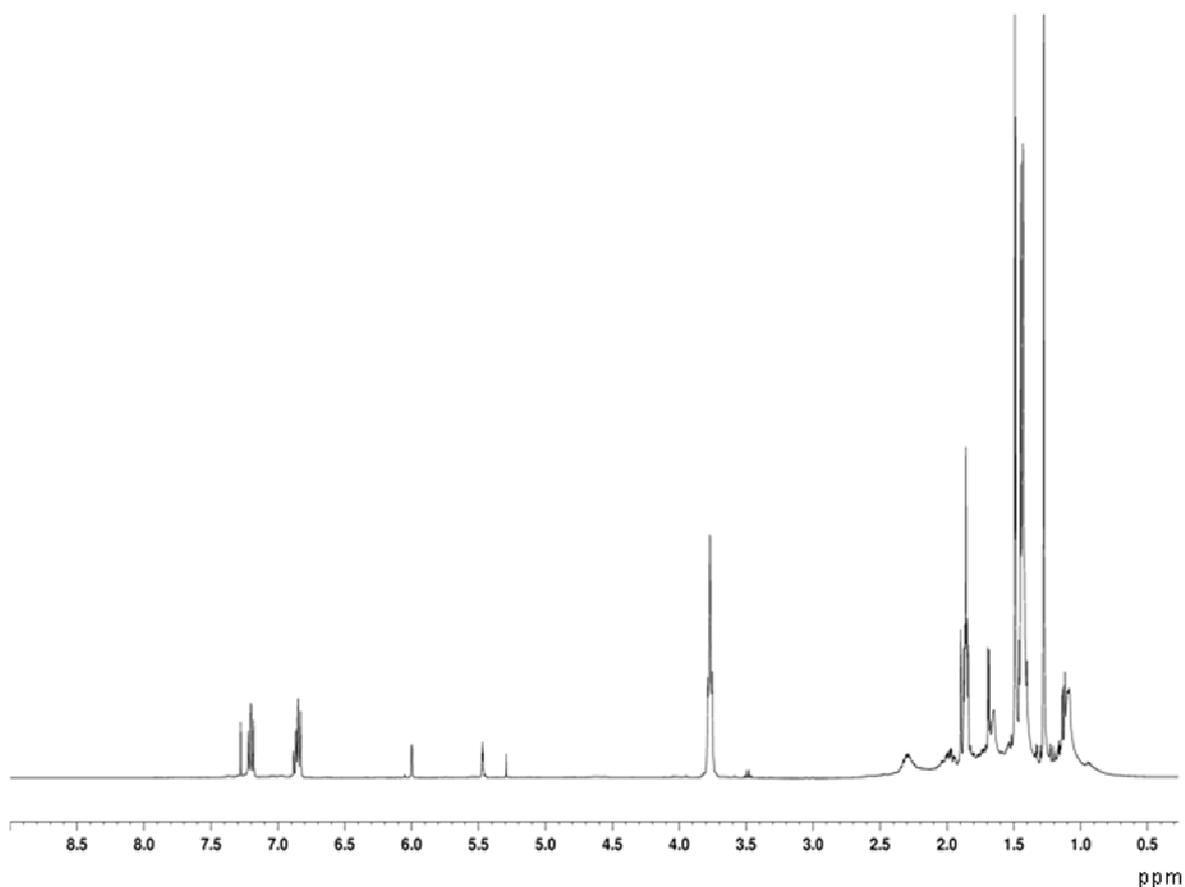


Figure 88: Spectre RMN ^1H du composé brut

Sur le spectre RMN ^1H , on observe un système de proton aromatique (doublet de doublet) entre 6,8 ppm et 7,3 ppm ; les protons vinyliques (singulet) 5,5 ppm et 6 ppm. Le proton méthylénique (singulet) autour de 1,93 ppm et le proton de OH du groupement acide sulfonique autour de 2 ppm. Les autres protons dans les champs forts sont d'origine inconnue et peuvent être attribués aux impuretés. La présence des signaux suscités ne suffit pas pour conclure de la synthèse effective du composé car ces mêmes signaux sont aussi caractéristiques des réactifs utilisés pour la synthèse.

Sur le spectre ^{13}C de la figure 89, nous proposons l'attribution résumée dans le tableau X.

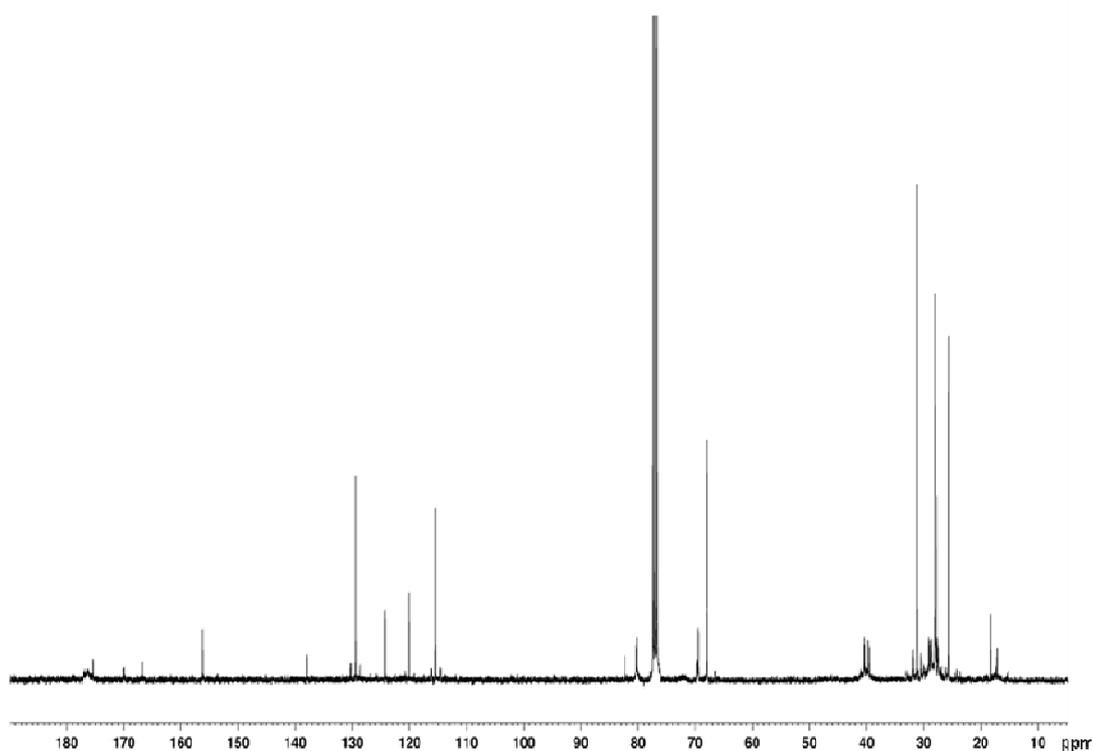


Figure 89: Spectre RMN ^{13}C composé brut

Tableau X: Interprétation du spectre RMN ^{13}C du produit brut

| Déplacement chimique δ (ppm) | Attributions |
|--|---------------------------|
| 18 | CH_3 |
| 120 | C du noyau aromatique |
| 124 | C du noyau aromatique |
| 129 | C éthylénique |
| 135 | C éthylénique |
| 137 | C - SO_3H |
| 156 | = C - O |
| 166 | C (RCOOR) |
| 169 | C(RCOCl) |

Les autres signaux présents dans ce spectre témoignent d'impuretés (produit non réagi). Il peut y donc avoir des traces de réactifs de départ. Même si elle se retrouve en très faibles quantités, la présence du groupement caractéristique de la fonction ester à 166 ppm nous indique que le composé recherché est présent dans le milieu réactionnel.

Le composé précédemment décrit a été purifié par chromatographie sous colonne dans le mélange de solvant cyclohexane/ acétate d'éthyle. 66 mg de produits purs ont été obtenus et analysés encore par RMN ^1H , ^{13}C et DEPT³¹. Les figures 90, 91 et 92 représentent les différents résultats obtenus.

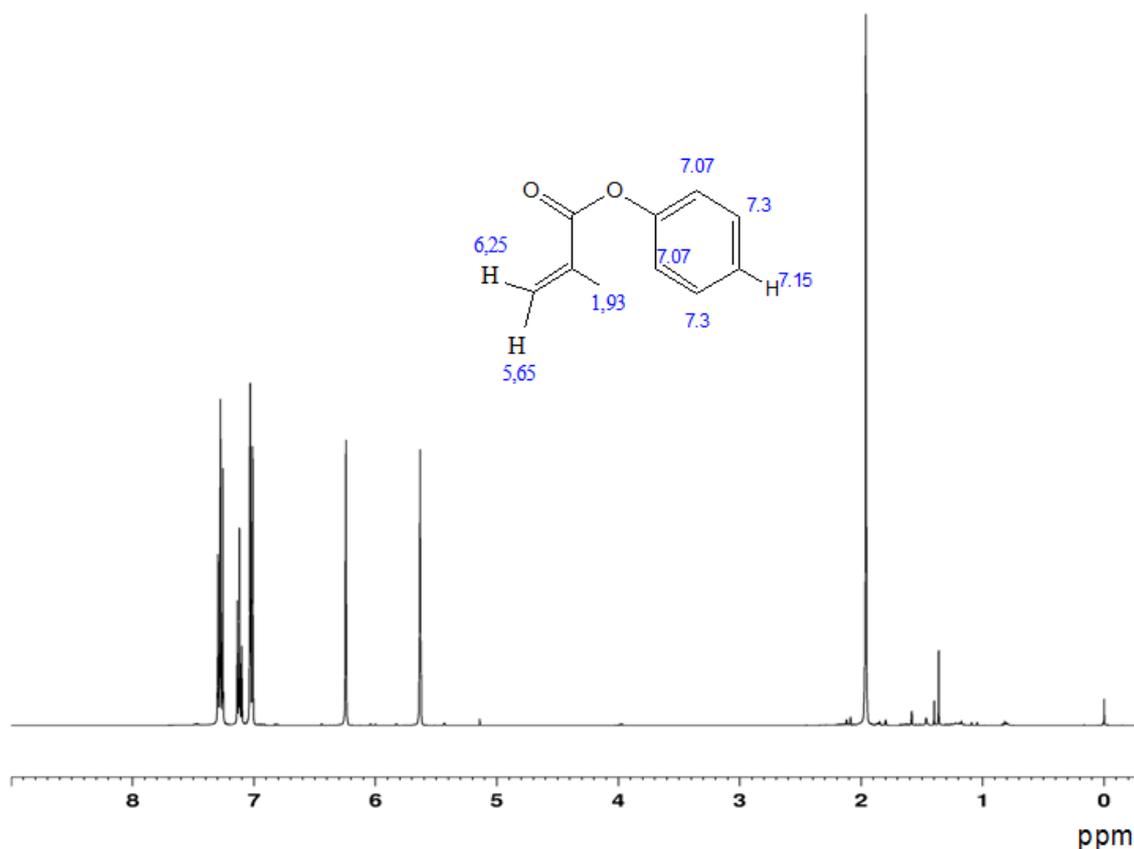
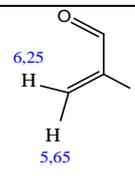
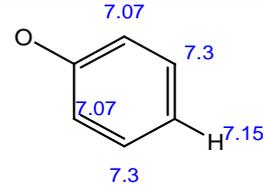


Figure 90: Spectre RMN ^1H du produit pur isolé

³¹ DEPT: Distortionless enhancement by polarization transfer

Le spectre RMN ^1H révèle la présence des pics suivants dans le tableau XI ci dessous :

Tableau XI : Interprétations du spectre RMN ^1H du produit pur isolé

| δ (ppm) | Sous -structure |
|---------------------|--|
| 1,93 | CH_3 |
| 5,65 6,25 |  |
| 7,07 7,15 7,3 |  |

On remarque l'apparition du proton à 7,15 ppm. Cette position de la molécule est supposée être occupée par le groupement SO_3H . En revanche, on n'observe pas le H du groupement OH. Ce qui permet de conclure que le produit attendu n'est pas finalement celui obtenu à la fin de la synthèse. Cette information est corroborée par le spectre ^{13}C et DEPTQ 135

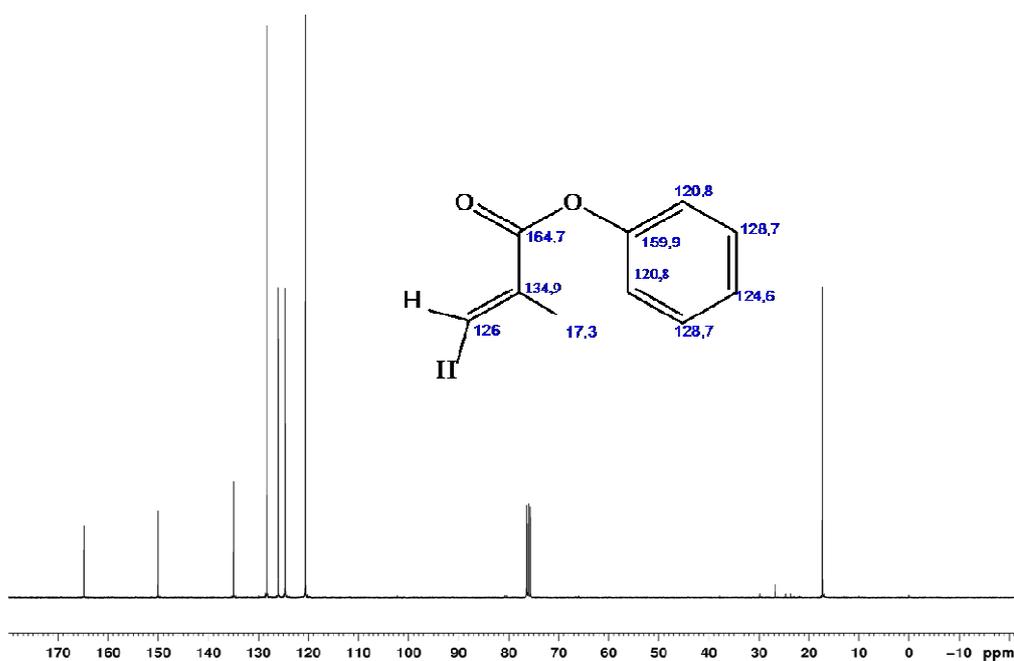
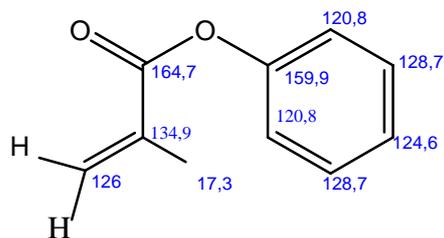


Figure 91: Spectre RMN ^{13}C du produit pur isolé

Sur le spectre ^{13}C , on observe les résultats suivants :



On a la présence d'un carbone tertiaire supplémentaire à 124,6 ppm. Ce qui est bien confirmé sur le DEPT 135 par l'apparition dans la zone positive réservée au CH et CH_3 d'un signal supplémentaire.

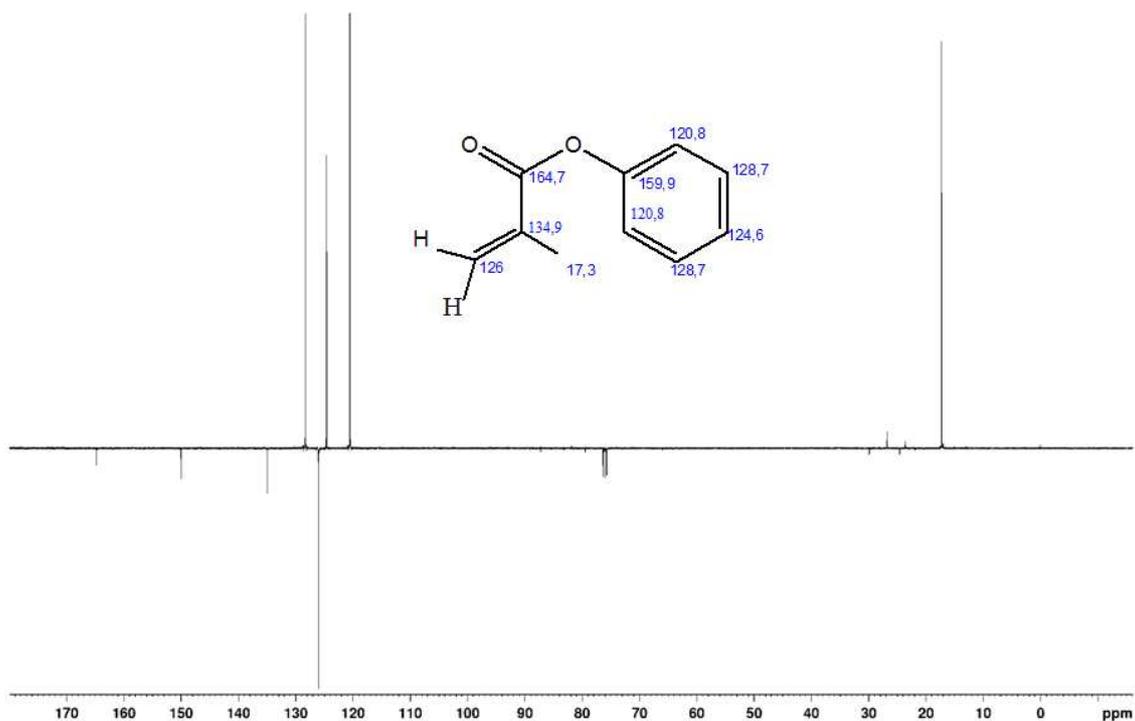
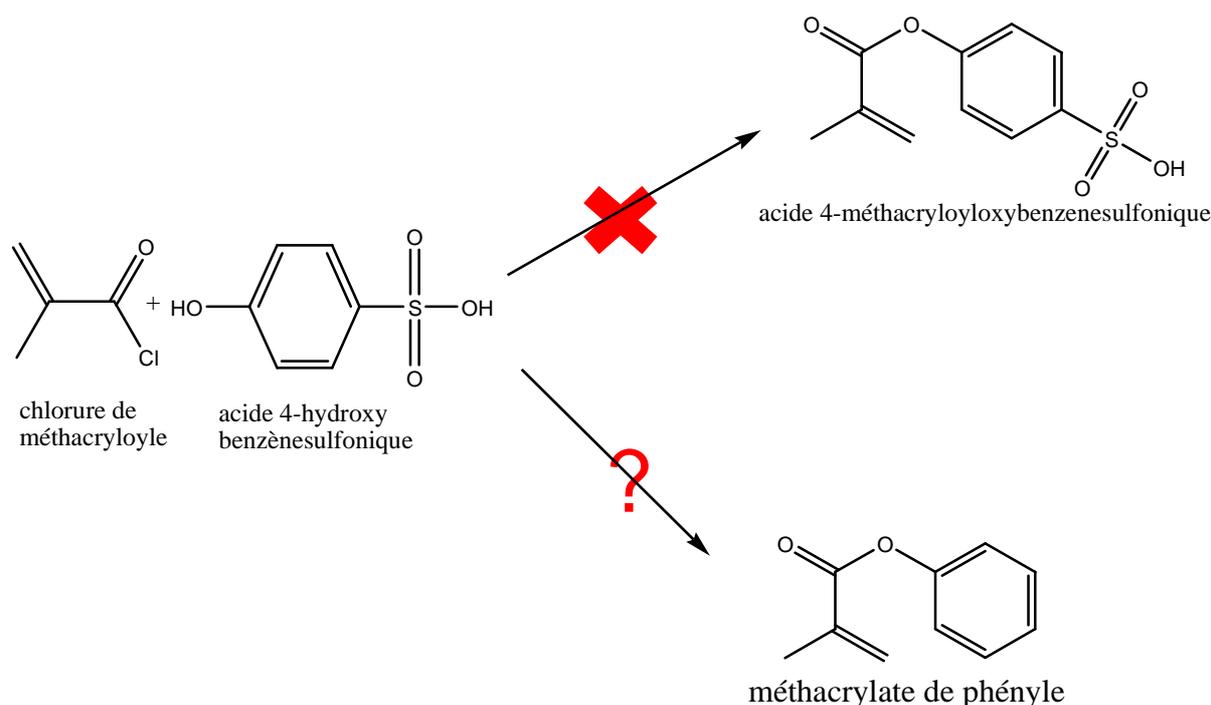


Figure 92: Spectre RMN DEPTQ 135 du produit pur isolé

En conclusion, le produit attendu n'a pas été synthétisé de manière effective. Des investigations ont été menées pour comprendre pourquoi et comment le méthacrylate de phényle a été formé.



Pour répondre à cette question, nous avons analysé tous les réactifs utilisés pour la synthèse par RMN ^1H et ^{13}C (le chlorure de méthacryloyle, l'acide 4-hydroxybenzènesulfonique). Il s'est avéré que l'acide 4-hydroxybenzènesulfonique contenait une proportion de phénol. Par conséquent, ce phénol a réagit prioritairement avec le chlorure de méthacryloyle d'où la formation du méthacrylate de phényle et non de l'acide 4-méthacryloyloxybenzènesulfonique.

II-4-2-2-2- Synthèse du monomère à haute température

Le même protocole expérimental a été repris mais à haute température. Un réfrigérant a été associé au dispositif expérimental pour un chauffage à reflux. Dans du THF anhydre, le tamis moléculaire est additionné sous agitation magnétique avec 5 g d'acide 4-hydroxybenzènesulfonique sont ajouté au milieu. Toujours sous agitation, 10 g de tertibutoxyde de potassium sont ajoutés dans le milieu. L'ensemble est chauffé à une température de 50°C suivi d'une addition de la solution de chlorure d'acide goutte à goutte dans le milieu. La réaction s'est ensuite poursuivie pendant 3h. L'extraction de la phase organique s'est faite avec du dichlorométhane ; elle a été ensuite séchée au sulfate de magnésium et évaporée à l'évaporateur rotatif. Un solide blanc sous forme de paillette insoluble dans le chloroforme, méthanol, acétone mais soluble dans le diméthylsulfoxyde a été obtenu. L'analyse de ce composé brut obtenu a été faite par RMN ^1H et ^{13}C .

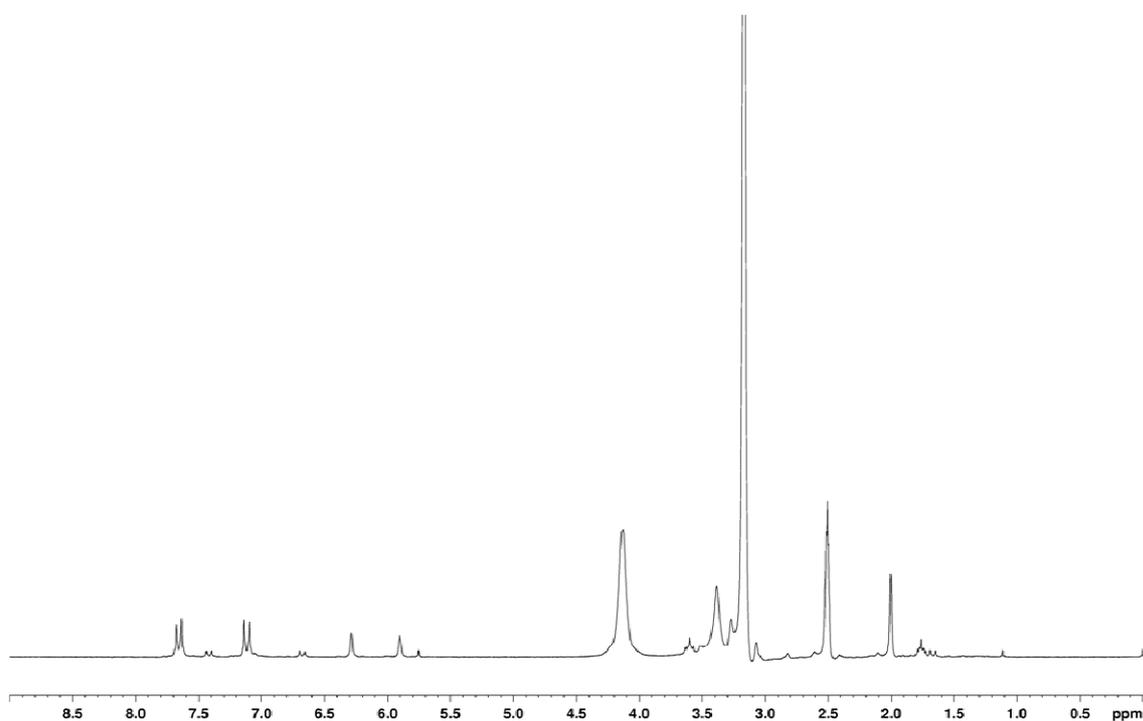


Figure 93: Spectre RMN ^1H du solide brut obtenu

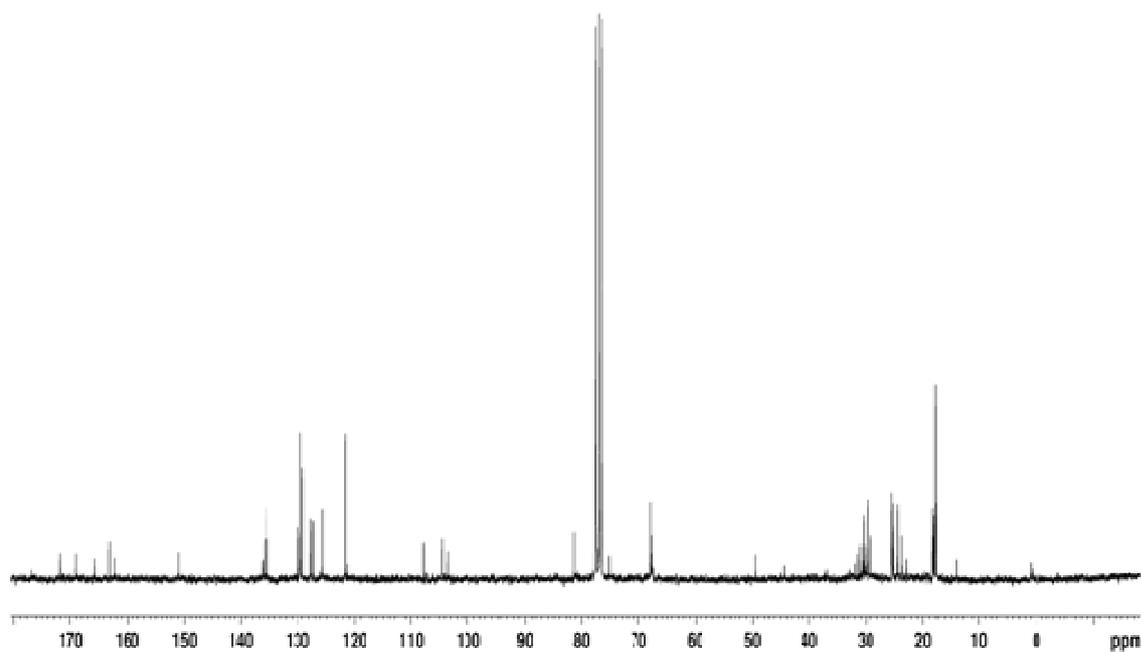


Figure 94: Spectre RMN ^{13}C du composé brut obtenu

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C des figures 93 et 94 ci-dessus ont montré que nous avons un mélange de plusieurs composés. Les quantités de produits bruts obtenus étant très faibles et les problèmes de solubilité se posant, nous avons jugé inutile de continuer des investigations dessus.

Des études supplémentaires sont en cours pour l'amélioration du protocole de synthèse, voire l'élaboration d'un nouveau monomère photopolymérisable.

La synthèse n'ayant pas abouti, la photopolymérisation n'a évidemment pu être menée. Des travaux futurs sont prévus pour la mise au point d'un nouveau monomère et la mise en œuvre de la troisième voie par photopolymérisation.

Conclusion générale

Comme nous l'avons introduit dans ce manuscrit, l'objectif principal de ce travail est de mettre en œuvre une technique alternative de détection de microorganismes en couplant surfaces fonctionnalisées spécifiquement et diffusion Raman. En effet, l'exploration de nouvelles stratégies d'immobilisation des microorganismes en vue de les identifier plus rapidement, constitue un impératif pour l'amélioration de la performance des outils de détection existants. Dans ce contexte, nous avons donc proposé dans notre travail de thèse, de nouvelles surfaces fonctionnalisées appliquées à l'immobilisation des biomolécules. Deux techniques de caractérisations ont été utilisées : la spectroscopie conventionnelle dispersive Raman qui offre en quelques secondes des spectres de bonne qualité, qui est applicable en milieu aqueux, qui est non destructive et non invasive et qui permet d'analyser de très petits volumes d'échantillon. La microbalance à cristal de quartz, très sensible qui permet d'analyser les masses de l'ordre du nanogramme à la surface d'une électrode de quartz.

Dans une première partie, le polythiophène a été synthétisé par voie électrochimique, dopé, puis fonctionnalisé. Les mesures gravimétriques ont été opérées par une cellule à microbalance à cristal de quartz permettant de quantifier la masse du thiophène déposée à l'électrode. La tentative d'immobilisation a été réalisée avec une protéine A, un anticorps spécifique à salmonella, un anticorps fluorescent spécifique au précédent et enfin sur salmonella. Il ressort de cette partie que la présence des traces d'eau dans le milieu est un handicap pour la formation du polymère, la coupure cathodique de la liaison S-N s'accompagne d'une légère dégradation du polymère formé. L'immobilisation des biomolécules sur cette surface a été menée avec succès. Le spectre Raman de ce polymère est de plus très riche en signaux caractéristiques recouvrant complètement la zone représentative des biomolécules immobilisées, rendant par la même la détection de microorganismes par cette voie peu probable.

La deuxième partie expose la modification de la surface d'or par ancrage du chlorure de parabenzènesulfonyle. Cette réaction contrairement au polythiophène est très rapide. Une passivation de l'électrode et une réduction du sel de diazonium en radical libre formant une liaison covalente avec la surface de l'or est observée. . La validité de l'utilisation de cette surface a été contrôlée par la protéine A, un anticorps humain et un anticorps fluorescent spécifique au précédent. De plus, un anticorps spécifique à salmonella et enfin la bactérie

salmonella. La spectroscopie Raman et la microbalance à cristal de quartz ont permis de suivre avec succès toutes les étapes du protocole expérimental.

La troisième partie décrit de manière plus fondamentale les interactions entre protéines : deux solutions de protéines A et d'anticorps spécifique à *E.coli* ont été utilisées pour l'étude par diffusion Raman. L'immobilisation successive des deux entités a été poursuivie sur une surface d'or fonctionnalisée au glutaraldéhyde, puis simultanément après une heure de réaction préalable entre les deux solutions. La spectroscopie Raman a permis d'identifier les différentes interactions entre les deux processus. Il ressort de cette partie que l'immobilisation simultanée des deux entités est tout aussi efficace et peut désormais être privilégiée comme procédé d'immobilisation car il permet de gagner en temps.

La quatrième partie présente une troisième voie de surface d'accrochage de bioéléments. Il s'agit de la synthèse chimique d'un monomère photopolymérisable. A ce jour, plusieurs difficultés ont été rencontrées dans cette partie notamment la maîtrise du protocole expérimental et les conditions réactionnelles. Cette synthèse n'ayant pas fait l'objet d'étude dans la littérature, nous avons tenté deux conditions en vain et finalement avons obtenu un produit non prévu qui a été caractérisé. Des études complémentaires sont en cours pour l'élaboration du monomère et parvenir à la photopolymérisation de ce dernier.

Les différentes surfaces synthétisées dans ce travail peuvent être appliquées à l'immobilisation de toutes sortes de biomolécules ouvrant ainsi des perspectives très intéressantes pour la réalisation des biocapteurs.

Elles peuvent être employées dans les systèmes fluidiques type Lab-on- chip pour détecter les bactéries telles : *Escherichia coli* (responsables des infections suivantes : diarrhées, infections urinaires, infections nosocomiales: septicémies, méningite du nouveau-né) , *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* (abcès, panaris, ostéomyélite (infection osseuse grave), furoncle, septicémie, rhinite) *Pseudomonas aeruginosa* (qui est à l'origine de : infections des yeux, des plaies et de la gastro-entérite aiguë), *Vibrio cholerae* responsable du choléra, *Shigella dysenteriae* responsable de la dysentérie.

Elles peuvent également être employées dans le développement des biocapteurs utilisables en industries agroalimentaires pour un contrôle de la qualité des aliments et le suivi en chaîne des étapes de la production.

**CHAPITRE III :
MATERIELS ET METHODES**

III-1- Caractérisation des molécules organiques

III-1-1- Solvants et réactifs

III-1-1-1- Solvants

L'acétonitrile : CH_3CN (Eb à 760 mmHg = 82°C)

Le dichlorométhane : CH_2Cl_2 (Eb à 760 mmHg = 40°C)

Le chloroforme deutéré utilisé pour les analyses en Résonance Magnétique Nucléaire.

Le tétrahydrofurane : $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ ((Eb à 760 mmHg = 66°C)

III-1-1-2- Réactifs

Le tableau XII illustre les caractéristiques des produits chimiques utilisés.

Tableau XII : Caractéristiques des produits chimiques utilisés

| Réactifs et produits chimiques utilisés | Formule | Origine | Pureté(%) |
|--|--|-------------------------|-----------|
| Acide chlorhydrique | HCl | Aldrich | 98% |
| Acide sulfanilique | $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_3\text{NS}$ | Sigma Aldrich | / |
| Alumine | Al_2O_3 | Merck | / |
| Chlorure de potassium | KCl | Radiometer analytical | / |
| Hexafluorophosphate de tétra n-butylammonium | Bu_4NPF_6 | Fluka Analytic | > 99% |
| N-Chlorosuccinimide | $\text{C}_8\text{H}_4\text{O}_2\text{NCl}$ | Aldrich | 98% |
| N,N-diéthyl-(2-thiophén-3yl-éthoxyméthyl)-benzènesulfonamide | $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{S}_2$ | / | / |
| Nitrite de sodium | NaNO_2 | Merck | / |
| Pentachlorure de phosphate | PCl_5 | Aldrich | 95% |
| Acide p- phénolsulfonique hydrate | $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ | Tokyo Chemical Industry | > 90% |
| Chlorure de méthacryloyl | $\text{C}_4\text{H}_5\text{ClO}$ | Aldrich | 97% |
| Terbutoxyde de potassium | $\text{C}_4\text{H}_9\text{OK}$ | Acros Organics | 98% |

III-1-2- Techniques de caractérisation

III-1-2-1- Résonance magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres RMN du proton des échantillons en solution dans le chloroforme deutéré ont été enregistrés sur des spectromètres à transformée de Fourier BRUKER AC 400 et DPX 200. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en parties par millions (ppm) par rapport au singulet du tétraméthylsilane (TMS ; $\delta = 0$) pris comme référence.

La multiplicité des signaux est abrégée comme suit :

s : singulet ; d : doublet, t : triplet ; q : quadruplet ; quint : quintuplet ; m : multiplet ; dd : doublet de doublet.

III-1-2-2- Chromatographies

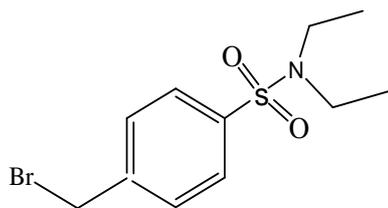
Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de silice Merck 60F₂₅₄. Les révélateurs employés sont L'UV, la vanilline et le permanganate de potassium. Les chromatographies sur colonne ont été effectuées de gel de silice (60-200 mesh- Acros).

III-1-3- Modes opératoires des synthèses organiques

III-1-3-1- Synthèse du monomère N,N-diéthyl-(2-thiophén-3yl-éthoxyméthyl)-benzènesulfonamide

III-1-3-1-1- Synthèse du 4- bromométhyl-N,N-diéthylbenzène-sulfonamide

Une solution étherée (6 ml) de triéthylamine (4,1 mmol) et de diéthylamine (4,1 mmol) a été additionnée à la solution de chlorure de 4-(bromométhyl) benzènesulfonyl (3,7 mmol) dans 6 ml d'éther. Après deux heures d'agitation à température ambiante sous atmosphère d'azote, le mélange est hydrolysé puis extrait trois fois à l'éther. Les phases organiques sont ensuite séchées sur sulfate de magnésium anhydre, filtrées et évaporées sous pression réduite pour collecter le produit recherché qui sera ensuite utilisé sans purification pour l'étape suivante de la synthèse.

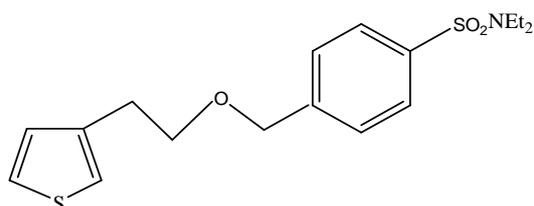


$C_{11}H_{16}NO_2SBr$
 $M = 306, 22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 Solide blanc
 Rendement: 90%

RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm/TMS): 7,79 - 7,81 (2H, système AB, $^3J_{HH} = 8,46 \text{ Hz}$, $H_{\text{aromatique}}$); 7,75- 7,77 (2H, système AB, $^3J_{HH} = 8,52$, $H_{\text{aromatique}}$); 4,50 (2H, s, CH_2Br); 3,25 (4H, q, $^3J_{HH} = 7,14 \text{ Hz}$, N- CH_2); 1,14 (6H, t, $^3J_{HH} = 7,14\text{Hz}$, CH_3).

III-1-3-1-2- Synthèse du N,N-diéthyl-(2-thiophén-3yl-éthoxy méthyl) benzènesulfonamide

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



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

RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm/TMS) : 7,71- 7,79 (2H, système AB, $^3J_{HH} = 8,3\text{Hz}$, $H_{\text{aromatique}}$); 7,32 - 7,40 (2H, système AB, $^3J_{HH} = 8,3\text{Hz}$, $H_{\text{aromatique}}$); 7,25 (1H,dd, $^4J_{HH} = 2,29 \text{ Hz}$, $^3J_{HH} = 4,9\text{Hz}$, $H_{\text{thiophène}}$); 7,03 (1H, dd, $^4J_{HH} = 2,9,\text{Hz}$; $^4J_{HH} = 1,1 \text{ Hz}$, $H_{\text{thiophène}}$), 6,98 (1H,dd, $^4J_{HH} = 1,1\text{Hz}$, $^3J_{HH} = 4,9 \text{ Hz}$, $H_{\text{thiophène}}$); 4,58 (2H, s, O- CH_2 -Ph); 3,73 (2H, t, $^3J_{HH} = 6,8 \text{ Hz}$, CH_2 -O); 3,23 (4H, q, $^3J_{HH} = 7,1 \text{ Hz}$, CH_2 -N); 2,97 (2H,t, $^3J_{HH} = 6,8 \text{ Hz}$, CH_2 -thiophène); 1,14 (6H, t, $^3J_{HH} = 7,1 \text{ Hz}$, CH_3).

III-1-3-1-3- Synthèse de l'acide 4-méthacryloyloxybenzène sulfonique.

Dans du THF anhydre, on additionne le tamis moléculaire. Après agitation, on ajoute 5 g de l'acide hydroxybenzènesulfonique acheté sous forme hydraté. 10 g de terbutoxyde de potassium sont additionnés dans le milieu réactionnel, soit directement en poudre, ou bien dissout dans le THF à travers l'ampoule d'addition. Le bain de glace est installé sous le dispositif. La température du milieu est contrôlée. Lorsqu'elle atteint 0°C, il faut ajouter 3,6 g de chlorure d'acide goutte à goutte dans le milieu réactionnel. Il faut laisser poursuivre la réaction pendant 2H.

Enfin le milieu réactionnel est hydrolysé avec une solution saturée de chlorure de sodium. La phase organique est extraite au dichlorométhane et séchée avec du sulfate de magnésium. La solution est filtrée et évaporée à l'évaporateur rotatif. Une huile jaunâtre est formée et constitue le produit brut. Après analyse par chromatographie sous couche mince de ce composé, il est soumis aux analyses RMN ^1H et ^{13}C .

Finalement, le composé est purifié par chromatographie sur colonne (gel de silice, éluant ; éther de pétrole- acétate d'éthyle).

III-2- Instrumentation et procédure électrochimique

III-2-1- Cellules électrochimiques

La cellule électrochimique est connectée à un potentiostat/ galvanostat EG&PAR modèle VMP2/Z-40 piloté par le logiciel EC-Lab V9.24.

Lorsque la cellule électrochimique n'est pas couplée à une mesure gravimétrique, les investigations électrochimiques sont réalisées dans une cellule trois doigts d'une capacité de 10 ml équipée de trois électrodes :

- une électrode de travail constituée d'une plaque de platine de surface $1,2 \text{ cm}^2$;
- une électrode auxiliaire constituée d'un fil de platine ;
- un système de référence différent selon le milieu d'étude : organique ou aqueux.

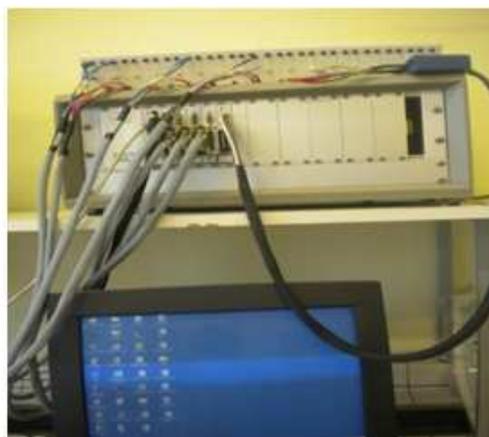
Dans le milieu organique, l'électrode de référence est constituée d'un fil d'argent plongé dans un compartiment isolé contenant une solution de nitrate d'argent 0,1M et un compartiment inférieur comportant l'acétonitrile.

Dans le milieu aqueux, l'électrode de référence est celle au calomel saturé (ECS).

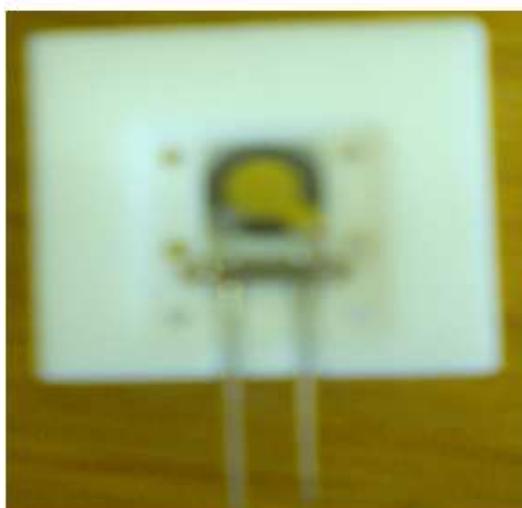
Lorsque la cellule électrochimique est couplée à une mesure gravimétrique, les investigations électrochimiques sont réalisées dans une cellule en Téflon, de forme cubique et possède une capacité de 12 ml. Les systèmes de référence et auxiliaire sont les mêmes que ceux utilisés dans la cellule à trois doigts et l'électrode de travail est un cristal de quartz AT-Cut 9 MHz recouvert d'or. Ce cristal est fixé au fond de la cellule et connecté à la microbalance à cristal de quartz (modèle QCM922 de Princeton Applied Research) piloté par le logiciel WinEchim by Seiko EG&G.



Microbalance à cristal de Quartz



Potentiostat



Cellule pour QCM



Cellule trois doigts

Figure 95: Photos du potentiostat, de la microbalance à cristal de quartz et les cellules utilisées pour la synthèse électrochimique

III-2-2- Mesures électrochimiques

III-2-2-1- Potentiostat/galvanostat

Les études sur le potentiostat sont réalisées en connectant à cet appareil une cellule électrochimique contenant la solution électrolytique et le système d'électrodes. Une expérience de voltamétrie cyclique est réalisée à une vitesse de balayage de 100 mVs^{-1} dans une gamme de potentiel bien précise. On en tire ainsi une variation de courant en fonction du potentiel que l'on appelle voltamogramme. Les voltamogrammes obtenus permettent de suivre l'état du film formé.

III-2-2-2- Microbalance à Cristal de quartz

Les études par microbalance à cristal de quartz ont été effectuées sur des cristaux de quartz AT- Cut 9 MHz recouverts d'or de surface apparente $0,2 \text{ cm}^2$ connectés à la microbalance à cristal de quartz PAR modèle QCM922 pilotée par le logiciel WinEchem Seiko EG&G.

Les mesures des variations de la fréquence de vibration quartz sont traduites en variations de masse Δm calculées à partir de la relation de Sauerbrey qui relie la fréquence de résonance à la variation de masse du quartz. Cette relation est établie en supposant que la variation de fréquence du cristal de quartz (Δf en Hz) est entièrement due à la variation de masse (Δm en g) du matériau inséré.

III-2-3- Synthèse et refonctionnalisation du poly(N,N-diéthyl-4-(2-thiophén-3yl-éthoxyméthyl)-benzènesulfonamide

III-2-3-1- Polymérisation anodique du monomère

La polymérisation électrochimique du monomère a été réalisée dans une cellule trois doigts après avoir dégazé le milieu réactionnel contenant Bu_4NPF_6 (0,1M) dans l'acétonitrile et le monomère (28 mM) par un courant d'argon. Après polymérisation, le film a été rincé avec le solvant pour éliminer d'éventuelles traces de monomères qui n'auraient pas réagi. Le film a été ensuite dopé dans une cellule ne contenant que le milieu électrolytique pour le rendre conducteur.

III-2-3-2- Refonctionnalisation du poly (N, N-diéthyl-4-(2-thiophén-3yl-éthoxyméthyl)benzènesulfonamide en chlorure de poly(N,N-diéthyl-4-(2-thiophén-3yl-éthoxyméthyl)-benzènesulfonyle

La formation du chlorure de sulfonyle est amorcée par la rupture cathodique de la liaison S-N de la fonction sulfonamide par voltamétrie cyclique. Le film possédant la fonction sulfinate a été enfin trempé dans une solution de N-Chlorosuccinimide de concentration $3,4 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ dans l'acétonitrile. Le film ainsi fonctionnalisé au chlorure de sulfonyle a été enfin rincé à l'acétonitrile. Il est ainsi prêt à subir les études spectroscopiques et à recevoir du matériel biologique.

III-2-3-3- Modification de la surface d'or par le chlorure de parabenzènesulfonyle

Les études ont été faites en couplant le potentiostat à la microbalance à cristal de quartz. Ainsi, la cellule en Téflon est utilisée. L'électrode de travail était constituée d'un cristal de quartz AT- Cut 9 MHz recouverts d'or de surface apparente 0,2 cm² connecté à la microbalance à cristal de modèle décrit précédemment. L'électrode de référence est au calomel saturé et l'électrode auxiliaire un fil de platine. Le processus consistait en la réaction de l'acide sulfanilique et du nitrite de sodium en présence de l'acide chlorhydrique pour former un sel de diazonium. Le diazonium est ensuite réduit en radical libre par voltamétrie cyclique. Les radicaux libres formés se greffent sur l'or de manière covalente. Les groupements SO₃H de l'acide sulfanilique ont été transformés en chlorure de sulfonyle par le pentachlorure de phosphate dans le dichlorométhane et rincée au dichlorométhane. La surface ainsi préparée est prête à ancrer les biomolécules.

III-2-4- Synthèse du chlorure de 4-méthacryloyloxybenzènesulfonyle

III-2-4-1- Matériels nécessaires

Ballon tricol, ampoule d'addition, thermomètre, agitateur magnétique, réfrigérant, ampoule à décanter.

III-2-4-2- Méthodes de synthèse

Le tamis moléculaire est mélangé au solvant et agité sous agitateur magnétique, l'alcool est ensuite introduit dans le milieu et sous agitation pendant 5 mn. L'alcool supposé déjà anhydre sera transformé en alcoolate en présence de la base. La base est ensuite additionnée au milieu réactionnel après l'arrêt de l'agitateur magnétique. La réaction entre l'alcool et la base devant être exothermique, le thermomètre est utilisé pour contrôler la température du milieu. Un bain de glace est installé sous le montage pour refroidir le milieu. Lorsque la température atteint 0°C, l'addition du chlorure d'acide se fait goutte à goutte sous agitation magnétique. Après addition de ce dernier réactif, la durée d'estérification a été de 3h. Le traitement du milieu a été opéré à l'aide de l'eau saturée au chlorure de sodium pour récupérer le THF et les produits solubles dans l'eau. Le dichlorométhane est ensuite utilisé pour récupérer le produit attendu. Pour réaliser ce traitement, le milieu réactionnel précédent est transvasé dans une ampoule à décanter. Les deux solvants nécessaires pour la séparation de phase sont introduits dans

l'ampoule à décanter pour avoir la séparation des produits : monomère attendu et résidus réactionnels. La partie organique (monomère attendu soluble dans le dichlorométhane) est évaporée pour avoir le produit brut. Ce produit a été ensuite analysé en RMN ^1H et ^{13}C , pour déterminer la pureté par comparaison avec les spectres standard du produit attendu, et aussi pour déterminer la structure.

III-3- Instruments et procédures biologiques

III-3-1- Appareillage

III-3-1-1- Autoclave

Un autoclave est un récipient à parois épaisses et à fermeture hermétique conçu pour réaliser sous pression (de quelques bars) soit une réaction industrielle, soit la cuisson ou la stérilisation à la vapeur. Cet appareil est utilisé au cours de nos travaux pour stériliser les solutions et les déchets biologiques.



Figure 96: Autoclave utilisé pour la stérilisation des solutions biologiques

III-3-1-2- Poste de sécurité microbiologique

Le Poste de sécurité microbiologique (PSM) permet la protection du produit, du manipulateur et de l'environnement contre les dangers liés aux aérosols dans la manipulation de substances biologiquement actives, infectées ou dangereuses. Il est constitué d'un système de filtration comportant un ou deux ventilateurs à régulation automatique et de 2 filtres HEPA³² (un pour le soufflage dans le volume de travail, l'autre pour l'évacuation vers l'extérieur).

³² HEPA : High Efficiency Particulate Air Filter



Figure 97: Poste de sécurité microbiologique

III-3-2- Matériels biologiques

III-3-2-1- La protéine A

Elle est formée d'une simple chaîne polypeptidique de poids moléculaire 42kDa constituée de quatre domaines répétitive riche en acide aspartique, glutamique et dépourvu de cystéine. Elle possède une très faible proportion voire absence de carbohydrate, quatre tyrosines.

III-3-2-2- L'anticorps : IgG

Les anticorps sont des complexes polypeptidiques de hauts poids moléculaire (150kDa). Chaque anticorps est composé de quatre chaînes polypeptidiques comprenant deux chaînes légères (L) et deux chaînes lourdes (H) identiques. Chaque chaîne est divisée en régions variables (V) et constante (C). Deux anticorps ont été utilisés dans ce travail. Le premier est l'IgG du sérum humain) commandé chez Sigma de numéro référence I 4506. Il est aussi présente sous forme de poudre lyophilisée de pureté $\geq 95\%$ (SDS-PAGE)³³ avec une teneur en protéine de plus de 90%. Les anticorps sont généralement utilisés pour détecter et neutraliser les antigènes. Cet anticorps a été utilisé dans ce travail pour démontrer la validité de la fonctionnalisation mise au point. Le fait d'avoir préalablement immobilisé une protéine A sur la surface permet à l'anticorps de se greffer spécifiquement via son fragment Fc (fragment cristallisable) sur la protéine afin de laisser disponible les sites de reconnaissance de

³³ SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

C'est une technique couramment utilisé en biochimie ou en biologie moléculaire pour séparer les protéines en fonction de leur mobilité électrophorétique.

l'antigène (ici l'anti IgG) à travers les fragments Fab (fragment antigen binding) region. Le fragment CDR (Complementarity Determining Regions) détermine la spécificité de la molécule et établit le contact avec un antigène.

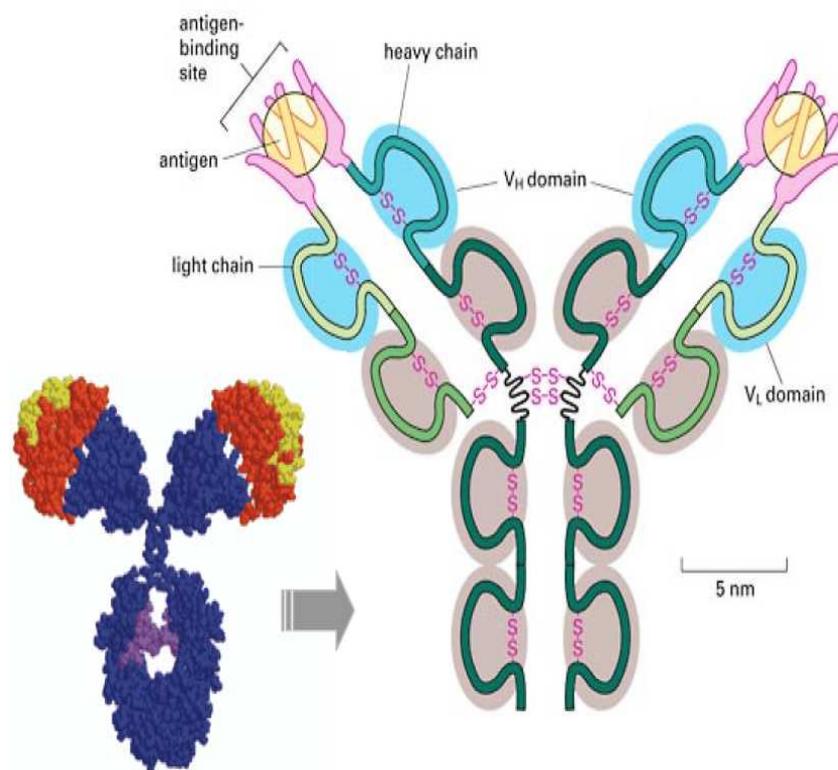


Figure 98: Structure d'un anticorps

III-3-2-3- L'antigène

Dans la vérification de l'applicabilité de notre fonctionnalisation, l'anti IgG spécifique de l'anticorps IgG humain ci-dessus a été utilisé. Ceci pour un test préalable moins coûteux avant l'utilisation d'un anticorps propre à une bactérie (plus coûteux). Dans un second temps, les bactéries *Escherichia coli* K12 et *Salmonella* sont utilisées. La reconnaissance entre l'anticorps et l'antigène se fait à travers les liaisons hydrogènes. D'autres interactions faibles de type Van der Waals, interactions hydrophobiques et forces électrostatiques peuvent entrer en jeu dans le processus de reconnaissance.

Les molécules d'eau contribuent de façon significative à l'énergie de liaison par création des liaisons hydrogènes supplémentaires entre l'anticorps et l'antigène.

III-3-3- Préparation des échantillons

III-3-3-1- Tampon phosphate (phosphate buffer solution : PBS)

Le PBS est utilisée comme tampon dans toutes les expériences d'immobilisation en biologie. Il est préparé de manière à obtenir une concentration de 10 mM et un pH de 7,4. La composition est la suivante :

Tableau XIII : Composition du tampon phosphate

| Sel | Concentration (mM) | Masse molaire (g/mol) | Pureté (%) |
|----------------------------------|--------------------|-----------------------|------------|
| NaCl | 140 | 58,44 | 99 |
| KCl | 2,7 | 74,56 | 99,5 |
| KH ₂ PO ₄ | 1,5 | 136,09 | 99,5 |
| Na ₂ HPO ₄ | 10 | 141,96 | - |

Pour une solution de PBS à 10 mM et pH = 7,4 et un volume de 1 litre, les quantités de sel suivantes ont été pesées et dissoutes dans 1L d'eau ultrapure :

[NaCl] = 140 mM

$[NaCl] = n_{NaCl}/V_{Tampon}$ et $n_{NaCl} = m_{NaCl}/M_{NaCl}$ d'où $m_{NaCl} = C_{NaCl} \times M_{NaCl} \times V_{Tampon}$

m_{NaCl} à peser = $140 \cdot 10^{-3} \times 58,44 \times 1 = 8,18$ g = 0,99 x m_{NaCl} à peser corrigée

D'où $m_{NaCl\ pc} = 8,18/0,99 = 8,2642$ g

$$m_{NaCl\ pc} = 8,264 \text{ g}$$

[KCl] = 2,7 mM

$m_{KCl} = C_{KCl} \times M_{KCl} \times V_{Tampon}$ d'où m_{KCl} à peser = $2,7 \cdot 10^{-3} \times 74,56 \times 1 = 0,201$ g = 0,995 $m_{KCl\ pc}$

D'où $m_{KCl\ pc} = 0,201/0,995 = 0,202324$ g

$$m_{KCl\ pc} = 0,202 \text{ g}$$

[KH₂PO₄] = 1,5 mM

$m_{KH_2PO_4} = C_{KH_2PO_4} \times M_{KH_2PO_4} \times V_{Tampon}$ d'où $m_{KH_2PO_4}$ à peser = $1,5 \cdot 10^{-3} \times 136,09 \times 1 = 0,204$ g

= 0,995 $m_{KH_2PO_4\ pc}$ D'où $m_{KH_2PO_4\ pc} = 0,204/0,995 = 0,205161$ g

$$m_{KH_2PO_4\ pc} = 0,205 \text{ g}$$

[Na₂HPO₄] = 10 mM

$m_{Na_2HPO_4} = C_{Na_2HPO_4} \times M_{Na_2HPO_4} \times V_{Tampon}$

d'où $m_{Na_2HPO_4}$ à peser = $10 \cdot 10^{-3} \times 141,96 \times 1 = 1,4196$ g

$$m_{Na_2HPO_4\ p} = 1,420 \text{ g}$$

La solution de tampon PBS est enfin stérilisée dans un autoclave.

III-3-3-2- Préparation de la solution de protéine A

1 ml de solution de PBS a été introduit dans le tube contenant 1mg de protéine A pour la dissoudre. La solution de protéine A de 1 mg/ml ainsi préparée a été ensuite prélevée et introduite dans 19 ml de tampon. La solution de protéine A finale est de 50 mg/l. Cette solution a été utilisée pour l'immobilisation de la protéine sur la surface fonctionnalisée pendant 2h. L'échantillon est ensuite lavé plusieurs fois au tampon pour éliminer la partie de protéine adsorbée. La protéine se greffe sur la surface fonctionnalisée de manière covalente.

III-3-3-3- Préparation de la solution d'IgG : (IgG anti E. coli et anti Salmonella)

Une solution de 0,350 mg/ml a été préparée à température ambiante pour l'immobilisation de d'IgG anti E. coli de référence. Des gouttes de cette solution ont été prélevées et déposées sur la surface d'or sur quartz préalablement fonctionnalisée et contenant la protéine A. La protéine A est reconnue pour former des liaisons spécifiques avec les anticorps IgG via leur fragment Fc contenant les fonctions acides carboxyliques. Dans la littérature, on démontre également que les deux espèces possèdent cinq sites de liaisons.

III-3-3-4- Préparation de la bactérie E. coli et Salmonella

La bactérie est mise en culture dans le milieu peptoné pendant une nuit à 37°C. Elles sont ensuite diluées avec le milieu eau peptonée au dixième pour obtenir une densité optique à 620nm de 0,1. On centrifuge à 3000 rpm 1 ml de suspension bactérienne de densité optique 0,1 dans le but d'enlever le milieu de culture et on rince au moins deux fois au PBS. Après centrifugation dans les mêmes conditions, le culot de bactéries est ensuite dilué au PBS. Pour se faire, à 35µl d'homogénat bactérien (dans ce milieu, on quantifie la concentration à l'ordre de 10⁶ bactéries /ml) et on ajoute 965 µL de PBS. La solution de bactérie est ainsi prête pour l'immobilisation. Les gouttes de solutions sont déposées sur les surfaces d'or fonctionnalisées et portant la protéine A et l'anticorps. L'incubation à température ambiante à cette étape était de 30 mn suivi de plusieurs lavages au PBS. Les différentes étapes d'immobilisation ont été faites sous poste de sécurité microbiologique.

III-4- Spectroscopie Raman

Le spectromètre Raman utilisé est celui de Horiba Jobin Yvon modèle Xplora. Il est constitué d'un système compact comprenant :

- une source laser qui fournit une radiation monochromatique de fréquence stable ;
- un microscope confocal qui focalise le spot laser incident (soit $\lambda = 638$ nm, soit $\lambda = 785$ nm) sur la surface de l'échantillon, via l'objectif approprié puis dirige les photons diffusés vers le spectromètre. Les objectifs utilisés sont $\times 10$, $\times 50$ LF, $\times 100$ pour la mise au point ;
- un filtre de réjection qui permet de séparer le signal Rayleigh qui est beaucoup plus intense que le signal Raman à détecter ;
- un monochromateur : Les photons diffusés entrent dans le monochromateur par le trou confocal permettant de localiser spatialement la lumière. Un miroir prismatique dirige ensuite les photons sur un réseau holographique de 600 ou 1800 traits/mm, dispersant les photons selon leur longueur d'onde (le choix du nombre de traits est fonction de la résolution cherchée et du rapport signal/bruit). Chaque radiation est ensuite focalisée par une lentille sur le détecteur ;
- un détecteur type CCD (Charge Coupled Device) refroidi à l'air qui permet de recueillir simultanément les informations spatiales et spectrales concernant l'échantillon.

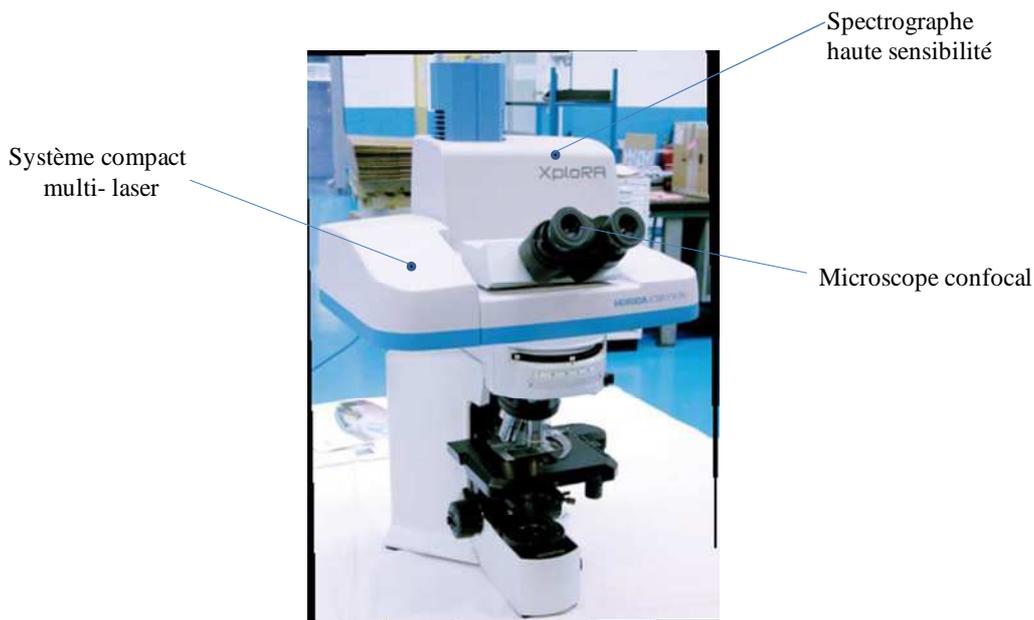


Figure 99: Spectromètre Raman Xplora de Horiba Jobin Yvon

Les spectres Raman de tous les échantillons sont réalisés à la longueur d'onde de 785 nm. La correction spectrale est réalisée à partir du logiciel Labspec 5. On procède successivement par une soustraction de la ligne de base type « ligne » et un lissage de « degré 9 ».

III-5- Microscopie à force atomique

Le microscope à force atomique (ou AFM pour atomic force microscope) est un type de microscope à sonde locale qui sert à visualiser la topographie de la surface d'un échantillon. Il permet ainsi d'observer les atomes à la surface d'échantillons sous vide ou dans l'air. Il peut aussi fonctionner en milieu liquide, propriété qui a très rapidement permis le transfert de cette technologie à la biologie.

Le principe de l'AFM consiste à amener, soit au contact de la surface à étudier, soit à une distance de quelques \AA une pointe dont l'extrémité a un rayon de quelques nanomètres, et à lui faire balayer ligne par ligne la topographie de cette surface en évitant de la déformer. Cette pointe se situe à l'extrémité d'un évier flexible, le *cantilever*. Un faisceau laser dirigé sur l'extrémité du *cantilever* est réfléchi vers une photodiode à deux ou quatre cadrans. Les déplacements du faisceau sur la photodiode permettent de détecter les mouvements du *cantilever* dans les trois plans de l'espace (x, y, z) avec une précision voisine de la taille de l'atome. Un ordinateur enregistre cette hauteur et peut ainsi reconstituer une image de la surface. Initialement, la technique a été utilisée pour caractériser les surfaces solides puis son champ d'application s'est étendu à la biologie. En effet, la mesure de la force d'interaction entre la pointe et l'échantillon sur laquelle repose l'imagerie par microscopie à force atomique a servi également à déterminer les forces de liaisons entre deux molécules.

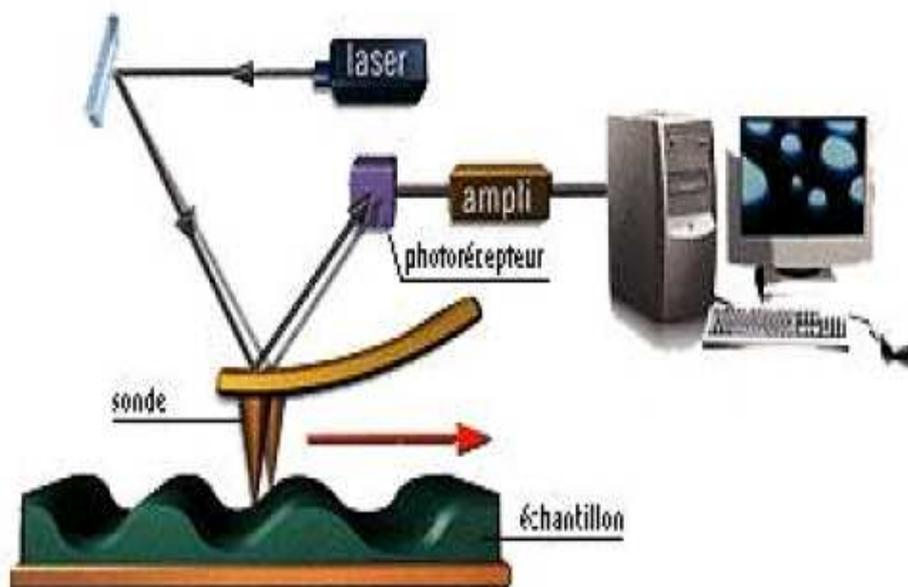


Figure 100: Principe de la microscopie à force atomique

III-6- Microscopie à fluorescence

La fluorescence est la propriété que possèdent certains corps d'émettre de la lumière après avoir absorbé des photons de plus forte énergie (plus courte longueur d'onde). La microscopie à fluorescence fait désormais partie des méthodes de recherche utilisées de manière routinière. Son principe est basé sur le marquage des molécules cibles par des traceurs fluorescents ou par l'intermédiaire d'une molécule révélatrice (méthode sandwich). Les traceurs sont des molécules qui absorbent de l'énergie lumineuse dans une gamme de longueur d'onde donnée (excitation) et la restituent en partie sous forme de lumière fluorescente (émission). Ces molécules sont donc caractérisées par la longueur de la lumière d'excitation et d'émission. Des capteurs (photomultiplicateur ou caméra CCD) permettent de collecter la lumière émise par fluorescence et de reconstituer une image de la surface avec une résolution latérale de l'ordre de 10 μm . L'inconvénient majeur de la technique de détection directe est lié à la nécessité de marquer les molécules cibles, ce qui peut influencer leur interaction avec les molécules sondes. De même, une mesure indirecte par sandwich favorise les interactions non spécifiques et induit un rapport signal sur bruit de fond élevé. De plus, le marquage des molécules cibles nécessite des étapes supplémentaires sur les protocoles de préparation. En outre, les marqueurs fluorescents les plus couramment utilisés ont certaines limites : le phénomène de *quenching* qui résulte de l'adsorption d'une partie d'énergie par les autres molécules présentes dans le milieu et le phénomène de photoblanchissement (photobleaching) qui caractérise la perte des propriétés fluorescentes des molécules sous l'effet d'une excitation prolongée ou par une forte intensité lumineuse.

Le microscope à fluorescence utilisé est équipé d'un jeu de filtres correspondant aux caractéristiques du fluorochrome :

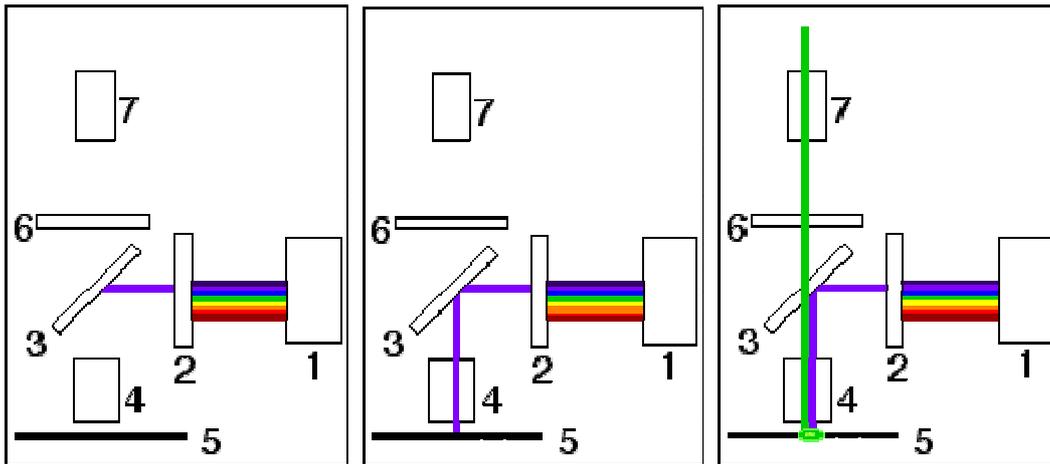
- un filtre d'excitation permettant la sélection des radiations absorbées par le fluorochrome (autour de 490 nm),
- un miroir dichroïque réfléchissant les radiations absorbables vers l'échantillon et ne laissant passer par transmission que les radiations vertes et au dessus (>500 nm),
- un filtre d'émission ne laissant passer par transmission que les radiations vertes et au dessus (>500 nm).

La figure 101 représente la photo du microscope à fluorescence utilisé dans le cadre de ce travail. Il est de marque ZEISS piloté par le logiciel axiovision.



Figure 101: Microscope à fluorescence (ZEISS)

Le trajet des radiations lumineuses dans un microscope à fluorescence est le suivant :



a) Le filtre 'excitation sélectionne les radiations spécifiques du fluorochrome

b) Ces radiations sont réfléchies par le miroir et éclairent l'échantillon

c) celui-ci émet les radiations de fluorescence qui seules atteignent l'oculaire.

- 1- lampe à arc
- 2- filtre d'excitation
- 3- miroir dichroïque
- 4- objectif

- 5- Préparation
- 6- filtre d'émission
- 7- oculaire

Références bibliographiques

- 1 **Bizet, K., Gabrielli, C., Perrot, H. and Thérasse, J.**, La microbalance à quartz électrochimique : perspectives d'application en biologie médicale. *Immunoanal Biol Spéc* 1995. **10**: 205- 211.
- 2 **Alocilja, E. C. and Radke, S. M.**, Market analysis of biosensors for food safety. *Biosensors and Bioelectronics* 2003. **18**: 841- 846.
- 3 **Nayak, M., Kotian, A., Marathe, S. and Chakravortty, D.**, Detection of microorganisms using biosensors—A smarter way towards detection techniques. *Biosensors and Bioelectronics* 2009. **25**: 661–667.
- 4 **Dufaitre-Patouraux, L., Vague, P. and Lassmann-Vague, V.**, Technologie et fiabilité de l'autosurveillance glycémique : historique et état actuel. *Diabetes Metab* 2003. **29**: 2S7-2S14.
- 5 **Dzyadevych, S. V., Soldatkin, A. P., Arkhypova, V. N., El'skaya, A. V., Chovelon, J.-M., Georgiou, C. A., Martelet, C. and Jaffrezic-Renault, N.**, Early-warning electrochemical biosensor system for environmental monitoring based on enzyme inhibition. *Sensors and Actuators B* 2005. **105**: 81–87.
- 6 **Noguer, T., Leca, B., Jeanty, G. and Marty, J.-L.**, Biosensors Based on Enzyme Inhibition: Detection of Organophosphorus and Carbamate Insecticides and Dithiocarbamate Fungicides. *Field analytical chemistry and technology* 1999. **3**: 171–178.
- 7 **Chovelon, J. M. and Dzyadevytch, S.**, Suivi, par un biocapteur enzymatique, de la dégradation photochimique du parathionmethyl Corrélation entre la toxicité des photoproduits, leur nature et leur concentration. Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon 2003, pp 284- 291.
- 8 **Paddle, B. M.**, Biosensors for chemical and biological agents of defence interest. *Biosensors & Bioelectronics* 1996. **II**: 1079- 1113.
- 9 **Michel, C., Ouerd, A., Battaglia-Brunet, F., Guigues, N., Grasa, J.-P., Bruschi, M. and Ignatiadis, I.**, Cr(VI) quantification using an amperometric enzyme-based sensor: Interference and physical and chemical factors controlling the biosensor response in ground waters. *Biosensors and Bioelectronics* 2006. **22**: 285–290.
- 10 **Mello, L. D. and Kubota, L. T.**, Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry* 2002. **77**: 237–256.

-
- 11 **Amine, A., Mohammadi, H., Bourais, I. and Palleschi, G.,** Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors and Bioelectronics* 2006: 1405–1423.
 - 12 **Binder, P.,** Immunocapteurs et biocapteurs non enzymatiques: principes et applications possibles en analyse. *ImmunoanaL BioL Spdc.* 1990. **19:** 23-33.
 - 13 **Venugopal, V.,** Biosensors in fish production and quality control. *Biosensors & Bioelectronics* 2002. **17:** 147–157.
 - 14 **Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K. and C. Adley, C.,** An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances* 2010. **28:** 232–254.
 - 15 **Castillo, J., Gaspar, S., Leth, S., Niculescu, M., Mortari, A., Bontidean, I., Soukharev, V., Dorneanu, S. A., Ryabov, A. D. and Csoregi, E.,** Biosensors for life quality Design, development and applications. *Sensors and Actuators B* 2004. **102:** – 194.
 - 16 **Boujtita, M., Boitard, M. and El Murr, N.,** Development of renewable surface biosensors to meet industrial needs for measurement of glucose in fruit juices. *Biosensors & Bioelectronics* 1999. **14:** 545–553.
 - 17 **Ciucu, A. A., Negulescu, C. and Baldwin, R. P.,** Detection of pesticides using an amperometric biosensor based on ferophthalocyanine chemically modified carbon paste electrode and immobilized bienzymatic system. *Biosensors and Bioelectronics* 2003. **18:** 303 - 310.
 - 18 **Girard-Egrot, A. P., Chauvet, J. P., Boullanger, P. and Coulet, P. R.,** IgG1-glycolipidic LB films obtained by vertical deposition of an interfacial film formed through proteo-liposome spreading at the air/water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 23 (2002) 319–325 2002. **23:** 319–325.
 - 19 **Farré, M., Martinez, E. and Barcelo, D.,** *techniques de détermination de composés organiques dans l'environnement.* Techniques de l'ingénieur, Paris, FRANCE: 2008.
 - 20 **Gerard, M., Chaubey, A. and Malhotra, B. D.,** Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* 2002. **17:** 345–359.
 - 21 **Dupont, D.,** Applications des biocapteurs dans l'industrie agroalimentaire. Techniques de l'ingénieur, Paris, FRANCE, Paris France 2005, pp 4010.4011-4010.4018.
 - 22 **Zhang, S., Zhao, H. and John, R.,** Development of a quantitative relationship between inhibition percentage and both incubation time and inhibitor concentration
-

-
- for inhibition biosensors—theoretical and practical considerations. *Biosensors & Bioelectronics* 2001. **16**: 1119–1126.
- 23 **Ivnitski, D., Abdel-Hamid, I., Atanasov, P. and Wilkins, E.,** Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosensors for detection of pathogenic bacteria* 1999. **14**: 599–624.
- 24 **Schoning, M. J., Krause, R., Block, K., Musahmeh, M., Mulchandani, A. and Wang, J.,** A dual amperometric/potentiometric FIA-based biosensor for the distinctive detection of organophosphorus pesticides. *Sensors and Actuators B* 2003. **95**: 291–296.
- 25 **Mulchandani, P., Mulchandani, A., Kaneva, I. and Chen, W.,** Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents. 1. Potentiometric enzyme electrode. *Biosensors & Bioelectronics* 1999. **14**: 77–85.
- 26 **Mosiello, L., Laconi, C., Del Gallo, M., Ercole, C. and Lepidi, A.,** Development of a monoclonal antibody based potentiometric biosensor for terbuthylazine detection. *Sensors and Actuators B* 2003. **95**: 315–320.
- 27 **Seki, A., Kawakubo, K., Iga, M. and Nomurac, S.,** Microbial assay for tryptophan using silicon-based transducer. *Sensors and Actuators B* 2003. **94**: 253–256.
- 28 **Lee, H.-S., Kim, Y. A., Choo, Y. A. and Lee, Y. T.,** Oxidation of organophosphorus pesticides for the sensitive detection by a cholinesterase - based sensor. *Chemosphere* 2002. **46**: 571- 576.
- 29 **Ghindilis, A. L., Morzunova, T. G., Barmin, A. V. and Kurochkin, I. N.,** Potentiometric biosensors for cholinesterase inhibitor analysis based on mediatorless bioelectrocatalysis. *Biosensors & Bioelectronics* 1996. **11**: 873--880.
- 30 **MAI, A. T.,** Developpement des biocapteurs électrochimiques à base de tyrosinase pour la détection des polluants organiques en phase aqueuse *Chimie. l'Université Claude Bernard- Lyon 1, Lyon 1* 2004, pp 153.
- 31 **Luong, J. H. T., Bouvrette, P. and Male, K. B.,** Developments and applications of biosensors in food analysis. *TIBTECH* 1997. **15**: 369- 377.
- 32 **Pourcel- Gouzy, M. L.,** Développement d'interfaces adaptées aux analyses biochimiques et biologiques - Application aux capteurs chimiques CHEMFETs *Conception des Circuits Microélectroniques et Microsystèmes. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, Toulouse* 2004, pp 143.
-

-
- 33 **Bonnet, C., Andreescu, S. and Marty, J.-L.,** Adsorption: an easy and efficient immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. *Analytica Chimica Acta* 2003. **481**: 209–211.
- 34 **Vikholm-Lundin, I. and Albers, W. M.,** Site-directed immobilisation of antibody fragments for detection of C-reactive protein. *Biosensors and Bioelectronics* 2006. **21**: 1141–1148.
- 35 **Rella, R., Siciliano, P., Quaranta, F., Primo, T., Valli, L. and Schenetti, L.,** Poly[3-(butylthio)thiophene] Langmuir–Blodgett films as selective solid state chemiresistors for nitrogen dioxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2002. **198–200**: 829–833.
- 36 **Xie, D., Jiang, Y., Pan, W. and Li, Y.,** A novel microsensor fabricated with charge-flow transistor and a Langmuir–Blodgett organic semiconductor film. *Thin Solid Films* 2003. **424**: 247–252.
- 37 **Hou, Y., Jaffrezic-Renault, N., Zhang, A., Wang, J., Errachid, A. and Chovelon, J.-M.,** Study of pure urease Langmuir–Blodgett and application for biosensor development. *Sensors and Actuators* 2002. **86**: 143–149.
- 38 **Mlika, R., Ouada, H. B., Kalfat, R., Gamoudi, G., Mhenni, F. and Jaffrezic-Renault, N.,** Thin sensitive organic membranes on selective iron-ion sensors. *Synthetic Metals* 1997. **90**: 239–243.
- 39 **Narducci, D., Bernardinello, P. and Oldani, M.,** Investigation of gas–surface interactions at self-assembled silicon surfaces acting as gas sensors. *Applied Surface Science* 2003. **212–213**: 491–496.
- 40 **Lobert, P. E., Bourgeois, D., Pampin, R., Akheyar, A., Hagelsieb, L. M., Flandre, D. and Remacle, J.,** Immobilization of DNA on CMOS compatible materials. *Sensors and Actuators B* 2003. **92**: 90–97.
- 41 **Li, C. M., Sun, C. Q., Song, S., Choong, V. E., Maracas, G. and Zhang, X. J.,** Impedance labelless detection-based polypyrrole DNA biosensor. *Frontiers in Bioscience* 2005. **10**.
- 42 **Cloarec, J. P., Chevolut, Y., Laurenceau, E., Phaner-Goutorbe, M. and Souteyrand, E.,** A multidisciplinary approach for molecular diagnostics based on biosensors and microarrays. *ITBM-RBM* 2008. **29**: 105–127.
- 43 **Macanovic, A., Marquette, C., Polychronakos, C. and Lawrence, M. F.,** Impedance-based detection of DNA sequences using a silicon transducer with PNA as the probe layer. *Nucleic Acids Research* 2004. **32**.
-

-
- 44 **Guiducci, C. and Nardini, C.**, High Parallelism, Portability, and Broad Accessibility: Technologies for Genomics. *ACM Journal on Emerging Technologies in Computing Systems* 2008. **4**.
- 45 **Souteyrand, E., Cloarec, J. P., Martin, J. R., Wilson, C., Lawrence, I., Mikkelsen, S. and Lawrence, M. F.**, Direct Detection of the Hybridization of Synthetic Homooligomer DNA Sequences by Field Effect. *J. Phys. Chem. B* 1997. **101**: 2980-2985.
- 46 **Ma, K.-S., Zhou, H., Zoval, J. and Madou, M.**, DNA hybridization detection by label free versus impedance amplifying label with impedance spectroscopy. *Sensors and Actuators B* 2006. **114**: 58–64.
- 47 **Ma, K.-S., Zhou, H., Fischetti, A., Zoval, J. and Madou, M.**, Detection of DNA hybridization with impedance amplifying labels. *NSTI-Nanotech* 2004. **1**: 31- 34.
- 48 **Cai, W., Peck, J. R., van der Weide, D. W. and Hamers, R. J.**, Direct electrical detection of hybridization at DNA-modified silicon surfaces. *Biosensors and Bioelectronics* 2003.
- 49 **Sakata, T. and Miyahara, Y.**, Detection of DNA recognition events using multi-well field effect devices. *Biosensors and Bioelectronics* 2005. **21**: 827–832.
- 50 **Wrobel, N., Deininger, W., Hegemann, P. and Mirsky, V. M.**, Covalent immobilization of oligonucleotides on electrodes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2003. **32**: 157-162.
- 51 **Zhi, Z.-L., Drazan, V., Wolfbeis, O. S. and Mirsky, V. M.**, Electrocatalytic activity of DNA on electrodes as an indication of hybridisation. *Bioelectrochemistry* 2006. **68**: 1- 6.
- 52 **Tamarin, O., Comeau, S., Déjous, C., Moynet, D., Rebière, D., Bezian, J. and Pistre, J.**, Real time device for biosensing: design of a bacteriophage model using love acoustic waves. *Biosensors and Bioelectronics* 2003. **18**: 755-763.
- 53 **Tamarin, O., Déjous, C., Rebière, D., Pistré, J., Comeau, S., Moynet, D. and Bezian, J.**, Study of acoustic Love wave devices for real time bacteriophage detection. *Sensors and Actuators B* 2003. **91**: 275–284.
- 54 **Betty, C. A., Lal, R., Sharma, D. K., Yakhmi, J. V. and Mittal, J. P.**, Macroporous silicon based capacitive affinity sensor—fabrication and electrochemical studies. *Sensors and Actuators B* 2004. **97**: 334–343.
- 55 **Rodriguez, A., Molinero, D., Valera, E., Trifonov, T., Marsal, L. F., Pallarès, J. and Alcubilla, R.**, Fabrication of silicon oxide microneedles from macroporous silicon. *Sensors and Actuators B* 2005. **109**: 135–140.
-

-
- 56 **Saha, H.**, Porous Silicon Sensors- Elusive and Erudite. *International journal on smart sensing and intelligent systems* 2008. **1**: 34- 56.
- 57 **Mirsky, V. M., Riepl, M. and Wolfbeis, O. S.**, Capacitive monitoring of protein immobilization and antigen–antibody reactions on monomolecular alkylthiol films on gold electrodes. *Biosensors & Bioelectronics* 1997. **12**: 977–989.
- 58 **Riepl, M., Mirsky, V. M., Novotny, I., Tvarozek, V., Rehacek, V. and Wolfbeis, O. S.**, Optimization of capacitive affinity sensors: drift suppression and signal amplification. *Analytica Chimica Acta* 1999. **392**: 77-84.
- 59 **Vaughan, R. D., O’Sullivan, C. K. and Guilbault, G. G.**, Development of a quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Enzyme and Microbial Technology* 2001. **29**: 635–638.
- 60 **Senillou, A., Jaffrezic-Renault, N. and Cosnier, C. M. S.**, A miniaturized urea sensor based on the integration of both ammonium based urea enzyme field effect transistor and a reference field effect transistor in a single chip. *Talanta* 1999. **50**: 219–226.
- 61 **Sant, W., Pourciel, M. L., Launay, J., Do Conto, T., Martinez, A. and Temple-Boyer, P.**, Development of chemical field effect transistors for the detection of urea. *Sensors and Actuators B* 2003. **95**: 309–314.
- 62 **De Quan, Kim, Y. and , S., W.**, Characterization of an amperometric laccase electrode covalently immobilized on platinum surface. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 561 (2004) 181–189 2004.
- 63 **Flounders, A. W., Singh, A. K., Volponi, J. V., Carichner, S. C., Wally, K., Simonian, A. S., Wild, J. R. and Schoeniger, J. S.**, Development of sensors for direct detection of organophosphates. Part II: sol–gel modified field effect transistor with immobilized organophosphate hydrolase. *Biosensors & Bioelectronics* 1999. **14**: 715–722.
- 64 **Singh, A. K., Flounders, A. W., Volponi, J. V., Ashley, C. S., Wally, K. and Schoeniger, J. S.**, Development of sensors for direct detection of organophosphates. Part I: immobilization, characterization and stabilization of acetylcholinesterase and organophosphate hydrolase on silica supports. *Biosensors & Bioelectronics* 1999. **14**: 703–713.
- 65 **Lei, C., Valenta, M. M., Saripalli, K. P. and Ackerman, E. J.**, Biosensing Paraoxon in Simulated Environmental Samples by Immobilized Organophosphorus Hydrolase in Functionalized Mesoporous Silica. *J. Environ. Qual.* 2007. **36**: 233- 238.
-

-
- 66 **Schöning, M. J., Arzdorf, M., Mulchandani, P., Chen, W. and Mulchandani, A.,** A capacitive field-effect sensor for the direct determination of organophosphorus pesticides. *Sensors and Actuators B* 2003. **91**: 92–97.
- 67 **Patel, D., Davies, E. R. and Hannah, I.,** The use of convolution operators for detecting contaminants in food images. *Pattern Recognition* 1996. **29**: 1019 -1029.
- 68 **Montesinos, T., Pérez-Munguia , S., Valdez, F. and Marty, J.-L.,** Disposable cholinesterase biosensor for the detection of pesticides in water-miscible organic solvents. *Analytica Chimica Acta* 2001. **431**: 231–237.
- 69 **Jaffrezic-Renault, N., Wan, K., Senillou, A., Chovelon, J. M. and Martelet, C.,** Development of new polymeric membranes for ENFETs for biomedical and environmental applications. *Biosensors* 1999. **27**: 578- 586.
- 70 **Zahran, M. M., Abdel-Aziz, K. B., Abdel-Raof, A. and Nahas, E. M.,** The Effect of Subacute Doses of Organophosphorus Pesticide, Nuvacron, on the Biochemical and Cytogenetic Parameters of Mice and Their Embryos. *Res. J. Agric. & Biol. Sci.* 2005. **1**: 277-283.
- 71 **Jarquín, R., Hanning, I., Ahn, S. and Ricke, S. C.,** Development of Rapid Detection and Genetic Characterization of Salmonella in Poultry Breeder Feeds. *Sensors* 2009. **9**: 5308-5323.
- 72 **Lenigk, R., Lam, E., Lai, A., Wang, H., Han, Y., Carlier, P. and Renneberg, R.,** Enzyme biosensor for studying therapeutics of Alzheimer's disease. *Biosensors & Bioelectronics* 2000. **15**: 541–547.
- 73 **Abdullah, J., Ahmad, M., Yook Heng, L. Y., Karuppiah, N. and Sidek, H.,** An Optical Biosensor based on Immobilization of Laccase and MBTH in Stacked Films for the Detection of Catechol. *Sensors* 2007. **7**: 2238-2250.
- 74 **Klis, M., Rogalski, J. and Bilewicz, R.,** Voltammetric determination of Catalytic reaction Parameters of Laccase based on Electrooxidation of hydroquinone and Abts. *Bioelectrochemistry* 2006. doi: [10.1016/j.bioelechem.2006.09.008](https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2006.09.008).
- 75 **McArdle, F. A. and Persaud, K. C.,** Development of an enzyme-based biosensor for atrazine detection. *Analyst* 1993. **118**: 419-423.
- 76 **Chung, T. S., Loh, K.-C. and Goh, S. K.,** Development of Cellulose Acetate Membranes for Bacteria Immobilization to Remove Phenol. *Journal of Applied Polymer Science* 1998. **68**: 1677–1688.
- 77 **Drtina, G. J., Haddad, L. C., Rasmussen, J. K., Gaddam, B. N., Williams, M. G., Moeller, S., Fitzsimons, R. T., Fansler, D. D., Buhl, T. L., Yang, Y. N., Weller, V.**
-

-
- A., Lee, J. M., Beauchamp, T. J. and Heilmann, S. M.,** Azlactone-reactive polymer supports for immobilizing synthetically useful enzymes. II. Important preliminary hydrogen bonding effects in the covalent coupling of Penicillin G Acylase. *Reactive & Functional Polymers* 2005. **64**: 13–24.
- 78 **Hermanson, G. T., Mattson, G. R. and Krohn, R. I.,** Preparation and use of immunoglobulin-binding affinity supports on Emphaze beads. *Journal of Chromatography A* 1995. **691**: 113-122.
- 79 **Fontaine, L., Lemele, T., Brosse, J.-C., Sennyey, G., Senet, J.-P. and Wattiez, D.,** Grafting of 2-Vinyl-4,4-dimethylazlactone onto Electron-Beam Activated Poly(propylene) Films and Fabrics. Application to the Immobilization of Sericin. *Macromol. Chem. Phys.* 2002. **203**: 1377- 1384.
- 80 **Kausaite-Minkstimiene, A., A. Ramanaviciene, A., Kirlyte, J. and Ramanavicius, A.,** Comparative Study of Random and Oriented Antibody Immobilization Techniques on the Binding Capacity of Immunosensor. *Anal. Chem.* 2010. **82**: 6401–6408.
- 81 **Briand, E., Salmain, M., Compère, C. and Pradier, C.-M.,** Immobilization of Protein A on SAMs for the elaboration of immunosensors. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2006. **53**: 215–224.
- 82 **Briand, E., Gu, C., Boujday, S., Salmain, M., Herry, J. M. and Pradier, C. M.,** Functionalisation of gold surfaces with thiolate SAMs: Topography/bioactivity relationship – A combined FT-RAIRS, AFM and QCM investigation. *Surface Science* 2007. **601**: 3850–3855.
- 83 **Briand, E., Salmain, M., Herry, J.-M., Perrot, H., Compère, C. and Pradier, C.-M.,** Building of an immunosensor: How can the composition and structure of the thiol attachment layer affect the immunosensor efficiency. *Biosensors and Bioelectronics* 2006. **22**: 440–448.
- 84 **Briand, E., Salmain, M., Compère, C. and Pradier, C.-M.,** Anti-rabbit immunoglobulin G detection in complex medium by PM-RAIRS and QCM Influence of the antibody immobilisation method. *Biosensors and Bioelectronics* 2007. **22**: 2884–2890.
- 85 **Sira, L., Sim, S.-J., Park, C., Gu, M. B., Hwang, U. Y., Yi, J., Oh, B. K. and Lee, J.,** Development of Surface Plasmon Resonance Immunosensor through Metal Ion Affinity and Mixed Self-Assembled Monolayer. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2008. **18**: 1695–1700.
-

-
- 86 **Vega, R. A., Maspoch, D., Salaita, K. and Mirkin, C. A.,** Nanoarrays of single virus particles. *Angew. Chem. Int.* 2005. **44**: 6013-6015.
- 87 **Vega, R. A., Maspoch, D., Shen, C. D., Kakkassery, J. J., Chen, B. J., Lamb, R. A. and .., C. A. M.,** Functional antibody arrays through metal ion-affinity templates. *Chembiochem* 2006. **7**: 1653-1657.
- 88 **Ayres, N., Holt, D. J., Jones, C. F., Corum, L. E. and Grainger, D. W.,** Polymer Brushes Containing Sulfonated Sugar Repeat Units: Synthesis, Characterization and In Vitro Testing of Blood Coagulation Activation. *J Polym Sci A Polym Chem.* 2008. **46**: 7713–7724.
- 89 **Iwata, R., Satoh, R., Iwasaki, Y. and Akiyoshi, K.,** Covalent immobilization of antibody fragments on well-defined polymer brushes via site-directed method. *Colloids Surf. B* 2008. **62**: 288–298.
- 90 **Cullen, S. P., Liu , X., Mandel, I. C., Himpfel, F. J. and Gopalan, P.,** Polymeric brushes as functional templates for immobilizing ribonuclease A: study of binding kinetics and activity. *Langmuir* 2008. **24**: 913 - 920.
- 91 **Torrance, L., Ziegler, A., Pittman, H., Paterson, M., Toth, R. and Eggleston, I.,** Oriented immobilisation of engineered single-chain antibodies to develop biosensors for virus detection. *Journal of Virological Methods* 2006. **134**: 164–170.
- 92 **Sun, Y., Bai, Y., Song, D., Li, X. L., Wang, L. and Zhang, H.,** Design and performances of immunoassay based on SPR biosensor with magnetic microbeads. *Biosensors and Bioelectronics* 2007. **23**: 473–478.
- 93 **Li, J., Wei, X. and Yuan, Y.,** Synthesis of magnetic nanoparticles composed by Prussian blue and glucose oxidase for preparing highly sensitive and selective glucose biosensor. *Sensors and Actuators B* 2009. **139**: 400–406.
- 94 **Jun, B.-H., Noh, M. S., Kim, G., Kang, H., Kim, J.-H., Chung, W.-J., Kim, M.-S., Kim, Y.-K., Cho, M.-H., Jeong, D. H. and Lee, Y.-S.,** Protein separation and identification using magnetic beads encoded with surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytical Biochemistry* 2009. **391**: 24–30.
- 95 **Lee, W., Oh, B.-K., Lee, W. H. and Choi, J.-W.,** Immobilization of antibody fragment for immunosensor application based on surface plasmon resonance. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2005. **40**: 143–148.
- 96 **Sugimura, Y., Ueda, H., Makia, M. and Hitomi, K.,** Novel site-specific immobilization of a functional protein using a preferred substrate sequence for transglutaminase 2. *Journal of Biotechnology* 2007. **131**: 121–127.
-

-
- 97 **Mahsa, G.**, Immobilisation de la trypsine sur un support de polyéthylène fonctionnalisé par voie plasma *Genie des Procédés et Haute Technologie*. Université Pierre et Marie Curie (Paris VI): École Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Paris 2007, pp 180.
- 98 **Yang, J., Cui, F.-Z., Lee, I. S. and Wang, X.**, Plasma surface modification of magnesium alloy for biomedical application. *Surf. Coat. Technol.* (2010), doi:10.1016/j.surfcoat.2010.07.045 2010.
- 99 **Chen, W. and Xue, G.**, Low potential electrochemical syntheses of heteroaromatic conducting polymers in a novel solvent system based on fluoborate–ethyl ether. *Prog. Polym. Sci.* 2005. **30**: 783–811.
- 100 **Peyrard, M. and Dauxois, T.**, *Physique des solitons*, Paris: 2004.
- 101 **Zhao, H., Chen, F., Lewis, T. W., Price, W. E. and Wallace, G.**, Studies of electropolymerisation of sodium 2-(3-thienyl)ethyl sulfonate. *Reactive & Functional Polymers* 1997. **34**: 27-36.
- 102 **Lim, E., Jung, B.-J., Shim, H.-K., Taguchi, T., Noda, B., Kambayashi, T., Mori, T., Ishikawa, K., Takezoe, H. and Do, L.-M.**, Nanoscale thin-film morphologies and field-effect transistor behavior of oligothiophene derivatives. *Organic Electronics* 2006. **7**: 121–131.
- 103 **Yakuphanoglu, F.**, Electrical conductivity and electrical modulus properties of α , ω -dihexylsexithiophene organic semiconductor. *Physica B 393* 2007. **393**: 139–142.
- 104 **Kim, S. K., Lee, J.-H. and Hwang, D.-H.**, El properties of an alternating copolymer composed of phenothazine and thiophene heterocycles. *Synthetic Metals* 2005. **152**: 201–204.
- 105 **Andersson, M. R., Berggren, M., Gustafsson, G., Hjertberg, T., Inganäs, O. and Wennerstrom, O.**, Synthesis of poly(alkylthiophenes) for light-emitting diodes. *Synthetic Metals* 1995. **71**: 2183-2184.
- 106 **Lee, J. Y., Kwon, Y. J., Woo, J.-W. and Moon, D. K.**, Synthesis and characterization of fluorine–thiophene-based p-conjugated polymers using coupling reaction. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2008. **14**: 810–817.
- 107 **Miyabe, K., Tada, K. and Onoda, M.**, Transient photocurrent in poly(3-octadecylthiophene) near the solid–liquid phase transition. *Thin Solid Films* 2003. **438–439**: 248–252.
-

-
- 108 **Ohmori, Y., Morishima, C., Uchida, M. and Yoshino, K.,** Dynamic characteristics of electroluminescent diodes utilizing conducting polymers. *Synthetic Metals* 1993. **55- 57:** 4180-4185.
- 109 **Pang, I., Kim, H., Kim, S., Jeong, K., Jung, H. S., Yu, C.-J., Soh, H. and Lee, J.,** Aminosilane monolayer-assisted patterning of conductive poly(3,4-ethylenedioxythiophene) source/drain electrodes for bottom contact pentacene thin film transistors. *Organic Electronics* 2010. **11:** 338–343.
- 110 **Parneix, J. P. and El Kadiri, M.,** A.C. complex conductivity of lightlydoped A.C.poly-3-methylthiophene. *Synthetic Metals* 1988. **25:** 299 - 310.
- 111 **Promarak, V., Punkvuang, A., Jungsuttiwong, S., Saengsuwan, S., Sudyoasuk, T. and Keawin, T.,** Synthesis, optical, electrochemical, and thermal properties of α,α -bis(9,9-bis-n-hexylfluorenyl)-substituted oligothiophenes. *Tetrahedron Letters* 2007. **48:** 3661–3665.
- 112 **Kreja, L., Czerwifiski, W., Kurzawa, J. and Kurzawa, M.,** Structure and electrical properties of chemically modified poly(3-alkylthiophenes). *Synthetic Metals* 1995. **72:** 153-158.
- 113 **Diagne, A. A., Fall, M., Guène, M., Dieng, M. M., Deflorian, F., Rossi, S., Bonora, P. and Volpe, C. D.,** Electrochemical impedance spectroscopy of polybithiophene films in an aqueous LiClO₄ solution. *C. R. Chimie* 2007. **10:** 558-563.
- 114 **Fall, M., Diagne, A. A., Dieng, M. M., Deflorian, F., Rossi, S., Bonora, P. L., Della Volpe, C. and Aaron, J.-J.,** Electrochemical impedance spectroscopy of poly(3-methoxythiophene) thin films in aqueous LiClO₄ solutions. *Synthetic Metals* 2005. **155:** 569–575.
- 115 **Leclère, P., Surin, M., Brocorens, P., Cavallini, M., Biscarini, F. and Lazzaron, R.,** Supramolecular assembly of conjugated polymers: From molecular engineering to solid-state properties. *Materials Science and Engineering R* 2006. **55:** 1–56.
- 116 **Xia, Q., Burkhardt, M. and Halik, M.,** Oligothiophenes in organic thin film transistors – Morphology, stability and temperature operation. *Organic Electronics* 2008. **9:** 1061–1068.
- 117 **Virkar, A., Ling, M.-M., Locklin, J. and Bao, Z.,** Oligothiophene based organic semiconductors with cross-linkable benzophenone moieties. *Synthetic Metals* 2008. **158:** 958–963.
-

-
- 118 **Zhao, J., Huang, L., Cheng, K. and Zhang, Y.**, Palladium-catalyzed alkenation of thiophenes and furans by regioselective C–H bond functionalization. *Tetrahedron Letters* 2009. **50**: 2758–2761.
- 119 **Zhao, C., Chen, X., Gao, C., Ng., M.-K., Ding, H., Park, K. and Gao, Y.**, New organic semiconductors for thin-film transistors: Synthesis, characterization, and performance of 4H-indeno[1,2-b]thiophene derivatives. *Synthetic Metals* 2009. **159**: 995–1001.
- 120 **Iosip, M. D., Destri, S., Pasini, M., Porzio, W., Pernstich, K. P. and Batlogg, B.**, New dithieno[3,2-b:2',3'-d]thiophene oligomers as promising materials for organic field-effect transistor applications. *Synthetic Metals* 2004. **146**: 251–257.
- 121 **Liu, X., Knupfer, M. and Huisman, B., -H.**, Electronic properties of the interface between α,ω -dihexyl-quaterthiophene and gold. *Surface Science* 595 (2005) 165–171 2005. **595**: 165–171.
- 122 **Hassan, J., Schulz, E., Gozzi, C. and Lemaire, M.**, Palladium-catalyzed synthesis of oligo(alkylthiophenes). *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 2003. **195**: 125–131.
- 123 **Nguyen, P. T., Rammelt, U., Plieth, W., Richter, S., Plötner, M., Fischer, W.-J., Kiriya, N., Kamloth, K. P. and Adler, H.-J.**, Experiments with organic field effect transistors based on polythiophene and thiophene oligomers. *Electrochimica Acta* 2005. **50**: 1757–1763.
- 124 **Knupfer, M. and Liu, X.**, Interface electronic properties of oligothiophenes: the effect of chain length and chemical substituents. *Surface Science* 2006. **600**: 3978–3981.
- 125 **Delgado, M. C. R., Hernandez, V., Casado, J., Lopez Navarrete, J. T., Raimundo, J.-M., Blanchard, P. and Roncali, J.**, Quantum chemical DFT and spectroscopic study of a push–pull chromophore for second-order nonlinear optics containing bithiophene as the electron relay. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* 2004. **709**: 187–193.
- 126 **Trabattoni, S., Borghesi, A., Laera, A., Moret, M. and Papagni, A.**, The role of impurities in quaterthiophene film photoluminescence. *Synthetic Metals* 2004. **145**: 7–10.
- 127 **Donat, B. P., Panozzo, S., Vial, J.-C., Beigné, C. and Rieutord, F.**, Increased field effect mobility from linear to branched thiophene-based polymers. *Synthetic Metals* 2004. **146**: 225–231.
-

-
- 128 **Peyron, C., Navarre, J.-M., Craynest, N. V. and Benhida, R.**, First example of base-promoted tandem alkylation–bromination of 2-bromothiophene via halogen dance process: a remarkable temperature effect. *Tetrahedron Letters* 2005. **46**: 3315–3318.
- 129 **Vamvounis, G., Yu, J. and Holdcroft, S.**, Photo-physical and electro-optical properties of polythiophenes bearing tetrahydropyran side groups. *European Polymer Journal* 2004. **40**: 2659–2664.
- 130 **Wolfer, P., Müller, C., Smith, P., Baklar, M. A. and Stingelin-Stutzmann, N.**, α -Quaterthiophene–polyethylene blends: Phase behaviour and electronic properties. *Synthetic Metals* 2007. **157**: 827–833.
- 131 **Fenoll, M.**, Optimisation des paramètres d'impression pour l'électronique imprimée sur supports souples *Génie des Procédés*. institut National Polytechnique de Grenoble, Grenoble 2007, pp 210.
- 132 **Jaczewska, J., Raptis, I., Budkowski, A., Goustouridis, D., Raczkowska, J., Sanopoulou, M., Pamula, E., Bernasik, A. and Rysz, J.**, Swelling of poly(3-alkylthiophene) films exposed to solvent vapors and humidity: Evaluation of solubility parameters. *Synthetic Metals* 2007. **157**: 726–732.
- 133 **Odaci, D., Kayahan, S. K., Timur, S. and Toppare, L.**, Use of a thiophene-based conducting polymer in microbial biosensing. *Electrochimica Acta* 53 (2008) 4104–4108 2008. **53**: 4104–4108.
- 134 **Urien, M.**, Cellules photovoltaïques organiques à base copolymères à blocs de type rigide-flexible. Bordeaux I, Bordeaux 2008, pp 234.
- 135 **Park, J.-W., Lee, D. H., Chen, J., Bae, M.-H., Kang, M.-S., Kim, Y., -H., Pyo, S., Yi, M. H. and Kwon, S.-K.**, Organic thin-film transistor based on dibenzothiophene. *Current Applied Physics* 2010. **XXX**: 1-5.
- 136 **McConnell, H. M., Rice, P., Wada, G. H., Owicki, J. C. and Parce, J. W.**, The microphysiometer biosensor. *Current Opinion in Structural Biology* 1991. **1**: 647-652.
- 137 **Nicho, M. E., Hu, H., Lopez-Mata, C. and Escalante, J.**, Synthesis of derivatives of polythiophene and their application in an electrochromic device. *Solar Energy Materials & Solar Cells* 2004. **82**: 105- 118.
- 138 **Choi, J. H., Cho, D., Park, H. J., Jin, S.-H., Jung, S., Yi, M., Kun Song, C. K. and Chan Yoon, U. C.**, Synthesis and characterization of a series of bis(dimethyl-n-octylsilyl)oligothiophenes for organic thin film transistor applications. *Synthetic Metals* 2009. **159**: 1589–1596.
-

-
- 139 **Moulton, J. and Smith, P.**, Electrical and mechanical properties of oriented poly(3-alkylthiophenes) I. Doping-enhanced stiffness of poly(3-octylthiophene). *Synthetic Metals* 1991. **40**: 13- 22.
- 140 **Hotta, S., Soga, M. and Sonoda, N.**, Novel organosynthetic routes to polythiophene and its derivatives. *Synthetic Metals* 1988. **26**: 267- 279.
- 141 **Zagorska, M. and Krische, B.**, Chemical synthesis and characterization of soluble poly(4,4'-dialkyl-2,2'-bithiophenes). *Polymer* 1990. **31**: 1379.
- 142 **Pron, A. and Rannou, P.**, Processible conjugated polymers: from organic semiconductors to organic metals and supraconductors. *Prog. Polym. Sci.* 2002. **27**: 135- 190.
- 143 **Andreani, F., Angiolini, L., Greci, V. and Salatelli, E.**, Optically active polyalkylthiophenes: synthesis and polymerization of chiral, symmetrically substituted, quinquethiophene monomer. *Synthetic Metals* 2004. **145**: 221–227.
- 144 **Gao, Z., Zhou, L. and Huang, H.**, Exceptional anisotropy in conductivity and mechanical properties of poly-3-octylthiophene films. *Thin Solid Films* 1999. **347**: 146- 150.
- 145 **Kreja, L., Kurzawa, M. and Kurzawa, J.**, The influence of modification by nitric acid or chlorine on the regiospecific structure of poly(3-alkylthiophenes) (P3ATs). *Synthetic Metals* 1995. **74**: 235-239.
- 146 **Lopez-Mata, C., Nicho, M. E., Hu, H., Cadenas-Pliego, G. and Garcia-Hernandez, E.**, Optical and morphological properties of chemically synthesized poly3-octylthiophene thin films. *Thin Solid Films* 2005. **490**: 189 – 195.
- 147 **Morita, S., Shakuda, S., Sugimoto, R. and Yoshino, K.**, Kinetics of poly(3-alkylthiophene) gel in volume instability. *Synthetic Metals* 1993. **55-57**: 1182-1187.
- 148 **Nicho, M. E., Hernandez, F., Hu, H., Medrano, G., Güizado, M. and Guerrero, J. A.**, Physicochemical and morphological properties of spin-coated poly(3-alkylthiophene) thin films. *Solar Energy Materials&Solar Cells* 2009. **93**: 37- 40.
- 149 **Chen, S. and Ni, J.**, Structure/Properties of Conjugated Conductive Polymers. 1. Neutral Poly(3-alkyl thiophene)s. *Macromolecules* 1992. **25**: Number 23 November 29,1992.
- 150 **Mangeny, C., Lacroix, J.-C., Chane-Ching, K. I., Aeiayach, S., Jouini, M., Adenier, A. and Lacaze, P.-C.**, Macroscopic modulation of the p-electron density of pendant groups grafted on conductive polymers. *Synthetic Metals* 2000. **108**: 237–243.
-

-
- 151 **Vallat, P.**, Synthèse et étude des structures électronique et macromoléculaire d'un polyélectrolyte conjugué : le poly(thiophène 3-acide acétique) *Physique*. Université Louis Pasteur de Strasbourg, Strasbourg 2006, pp 222.
- 152 **Laakso, J., Osterholm, J.-E. and Nyholm, P.**, Synthesis and characterization of conducting polymer blends of poly(3-alkylthiophenes). *Synthetic Metals* 1990. **37**: 145- 150.
- 153 **Furukawa, Y.**, Electronic Absorption and Vibrational Spectroscopies of Conjugated Conducting Polymers. *J. Phys. Chem.* 1996. **100**: 15644-15653.
- 154 **Hanawa, T., Kuwabata, S., Hashimoto, H. and Yoneyama, H.**, Gas sensitivities of electropolymerised polythiophene films. *Synthetic Metals* 1989. **30**: 173 - 181.
- 155 **Roncali, J.**, Conjugated Poly(thiophenes): Synthesis, Functionalization, and Applications. *Chem. Rev* 1992. **92**: 711- 738.
- 156 **Ng, S. C., Ma, Y. F., Chan, H. S. O. and Dou, Z. L.**, Syntheses and characterisation of electrically conductive and fluorescent poly[3-(ω -bromoalkyl)thiophenes]. *Synthetic Metals* 1999. **100**: 269- 277.
- 157 **Singh, R., Kaur, A., Yadav, K. L. and Bhattacharya, D.**, Mechanism of dc conduction in ferric chloride doped poly(3-methyl thiophene). *Current Applied Physics* 2003. **3**: 235–238.
- 158 **He, J., Zhou, H., Wan, F., Lu, Y. and Xue, G.**, SERS study of the high quality conducting polythiophene film. *Vibrational Spectroscopy* 2003. **31**: 265–269.
- 159 **Xu, J. M., Chan, H. S. O., Ng, S. C. and Chung, T. S.**, Polymers synthesized from (3-alkylthio)thiophenes by the FeCl₃ oxidation method. *Synthetic Metals* 2002. **132**: 63- 69.
- 160 **Pomerantz, M., Tseng, J. J., Zhu, H., Spoull, S. J., Reynolds, J. R., Uttz, R. and Arnott, H. J.**, processable polymers and copolymers of 3-alkylthiophenes and their friends. *Synthetic Metals* 1991. **41- 43**: 825- 830.
- 161 **Yamamoto, T., Honda, Y., Sata, T. and Kokubo, H.**, Electrochemical behavior of poly(3-hexylthiophene). Controlling factors of electric current in electrochemical oxidation of poly(3-hexylthiophene)s in a solution. *Polymer* 2004. **45**: 1735–1738.
- 162 **Chan, H. S. O. and Siu Choon, S.**, Synthesis, Characterization and application of thiophene -based functional polymers. *Prog. Polym. Sci.* 1998. **23**: 1167–1231.
- 163 **Niemi, V. M., Knuutila, P., Osterholm, J.-E. and Korvola, J.**, Polymerization of 3-alkylthiophenes with FeCl₃. *Polymer* 1991. **Volume 33, Number 7**: 1559.
-

-
- 164 **Gallazzi, M. C., Castellani, L. and Zerbi, G.,** Regiospecificity and structural properties of polyalkylthiophenes. *Synthetic Metals* 1991. **41- 43:** 495-498.
- 165 **Langeveld-Voss, B. M. W., Janssen, R. A. J. and Meijer, E. W.,** On the origin of optical activity in polythiophenes. *Journal of Molecular Structure* 2000. **521:** 285–301.
- 166 **Sévignon, M., Papillon, J., Schulz, E. and Lemaire, M.,** New synthetic method for the polymerization of alkylthiophenes. *Tetrahedron Letters* 1999. **40:** 5873-5876.
- 167 **Yamamoto, T. and Take-aki Koizumi, T.-a.,** Synthesis of p-conjugated polymers bearing electronic and optical functionalities by organometallic polycondensations and their chemical properties. *Polymer* 2007. **48:** 5449-5472.
- 168 **Iraqi, A., Barker, G., W. and Pickup, D. F.,** Synthesis and characterisation of functionalised thiophene copolymers with electron donor and acceptor substituents. *Reactive & Functional Polymers* 2006. **66:** 195–200.
- 169 **Hu, X. and Xu, L.,** Structure and properties of 3-alkoxy substituted polythiophene synthesized at low temperature. *Polymer* 2000. **41:** 9147–9154.
- 170 **Louarn, G., Trznadel, M., Buisson, J. P., Laska, J., Pron, A., Lapkowski, M. and Lefrant, S.,** Raman Spectroscopic Studies of Regioregular Poly(3-alkylthiophenes). *J. Phys. Chem.* 1996, *100*, 12532-12539 1996. **100:** 12532-12539.
- 171 **Louarn, G., Buisson, J. P. and Lefrant, S.,** Vibrational Studies of a Series of a Oligothiophenes as Model Systems of Polythiophene. *J. Phys. Chem.* 1995. **99:** 11399-11404.
- 172 **Shi, G., Xu, J. and Fu, M.,** Raman Spectroscopic and Electrochemical Studies on the Doping Level Changes of Polythiophene Films during Their Electrochemical Growth Processes. *J. Phys. Chem. B* 2002. **106:** 288-292.
- 173 **Holze, R.,** In situ surface resonance Raman spectroscopy of electrochemically generated polythiophene films. *Synthetic Metals* 1991. **40:** 379-385.
- 174 **Dalibart, M. and Servant, L.,** Tarité Spectroscopie dans l'infrarouge. *Technique de l'ingenieur:* p 2845.
- 175 **Barbillat, J., Bourgeard, D., Buntinx, G., Delhayé, M., Dhamelin-court, P. and Fillaux, F.,** Technique de l'ingenieur: analyse et caractérisation : spectroscopie Raman 1999, pp 1- 31.
- 176 **Cardona, M.,** Raman scattering in high Tc superconductors: phonons, electrons, and electron–phonon interaction. *Physica* 1999. **C 317–318:** 30–54.
-

-
- 177 **White, S. N.**, Laser Raman spectroscopy as a technique for identification of seafloor hydrothermal and cold seep minerals. *Chemical Geology* 2009. **259**: 240–252.
- 178 **Voronov, O. A. and Street Jr., K. W.**, Raman scattering in a new carbon material. *Diamond & Related Materials* 2010. **19**: 31–39.
- 179 **Raman, C. V.**, A new type of secondary radiations. *Nature* 1928. **121**: 501- 502.
- 180 **Lambert, P. J., G Whitman, A. G., Dyson, O. F. and Akula, S. M.**, Raman spectroscopy: the gateway into tomorrow's virology. *Virology Journal* 2006. **3**: 51.
- 181 **Rusciano, G., Pesce, G., Salemme, M., Selvaggi, L., Vaccaro, C., Sasso, A. and Carotenuto, R.**, Raman spectroscopy of *Xenopus laevis* oocytes. *Methods* 2010. **51**: 27–36.
- 182 **Singh, R. and Riess, F.**, The 1930 nobel prize for physics: a close decision? *Notes Rec. R. Soc. Lond.* 2001. **55**: 267–283.
- 183 **Dickinson, R. G. and Dillon, R. T.**, Raman spectra of solutions of some ionized substances. Gates Chemical Laboratory, California Institute of Technology 1929, pp 334- 337.
- 184 **Browne, W. R. and McGarvey, J. J.**, The Raman effect and its application to electronic spectroscopies in metal-centered species: Techniques and investigations in ground and excited states. *Coordination Chemistry Reviews* 2007. **251**: 454–473.
- 185 **Merad, L.**, Etude par Spectroscopie Raman et modelisation d'une resine composite RTM *Physique*. l'Université Paul Verlaine - Metz, Metz 2010, pp 136.
- 186 **Osterheld, A. L., Young, B. K. F., Dunn, J., Stewart, R. E., Skobelev, I. Y., Faenov, A. Y. and Magunov, A. I.**, Influence of laser satellite transitions on spectroscopy of high-intensity laser produced plasma. *J. Quant. Spectrosc. Radial. Transfer* 1997. **Vol. 58**: 827-833.
- 187 **Djaker, N., Lenne, P. F., Marguet, D., Colonna, A., Hadjur, C. and Rigneault, H.**, Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy (CARS): Instrumentation and applications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 2007. **571**: 177–181.
- 188 **Delhaye, M. and Dhamelinourt, P.**, Dossier 2865. Laboratoire de spectrochimie infrarouge et Raman du CNRS 1999, pp 2865.
- 189 **Makiabadi, T.**, Etude de surfaces nanostructurées : applications à la spectroscopie Raman exaltée de surface et à la résonance de plasmons localisés *Physique*. Université de Nantes, Ecole polytechniques de l'Université de Nantes, Nantes 2010, pp 173.
-

-
- 190 **Adu, K. W., Gutierrez, H. R. and Eklund, P. C.,** Raman-active phonon line profiles in semiconducting nanowires. *Vibrational Spectroscopy* 2006. **42**: 165- 175.
- 191 **Marteau, P., Zanier-Szydowski, N., Aoufi, A., Hotier, G. and Cansell, F.,** Remote Raman spectroscopy for process control. *Vibrational Spectroscopy* 1995. **9**: 101-109.
- 192 **Laserna, J. J.,** *Modern techniques in Raman Spectroscopy.* John Wiley & Sons Ltd: 1996.
- 193 **Gardinier, D. J. and Graves, P. R.,** *Practicals Raman spectroscopy,* Springer Verlag Edn: 1989.
- 194 **Plantier, D.,** Etude Par spectroscopie des excitations de faibles énergies dans les semiconducteurs soumis à des champs magnétiques intenses *Physique.* Université Joseph Fourier - Grenoble I, Grenoble 2003, pp 179.
- 195 **Siesler, H. W. and Holland- Moritz, K.,** *Infrared and Raman spectroscopy of polymers:* 1980.
- 196 **Brands, P. J. M., Van de Poll, S. W. E., Quaedackers, J. A., Mutsaers, P. H. A., Puppels, G. J., Van der Laarse, A. and de Voigt, M. J. A.,** combined micro.PIXE and NIR Raman spectroscopic plaque characterisation in a human atherosclerotic aorta sample. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 2001. **181**: 454- 459.
- 197 **Beattie, J. R., Barrett, L. J., Malone, J. F., McGarvey, J. J., Nieuwenhuyzen, M. and Kett, V. L.,** Investigation into the subambient behavior of aqueous mannitol solutions using temperature-controlled Raman microscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 67 2007. **67**: 569–578.
- 198 **Chalus, P., Roggo, Y. and Ulmschneider, M.,** La spectroscopie Raman: un outil pour répondre à l’initiative « Process Analytical Technology » (PAT) dans l’industrie pharmaceutique. *Spectraanalyse* 2006. **252**: 1-6.
- 199 **Dippel, B., Tatsch, E. and Schrader, B.,** development of an inverted NIR-FT-Raman microscope for biomedical applications. *Journal of Molecular Structure* 1997. **408-409**: 247-251.
- 200 **Boere, I. A., Schut, T. C. B., Boogert, J. V. D., De Bruin, R. W. F. and Puppel, G. J.,** Use of fibre optic probes for detection of Barrett’s epithelium in the rat oesophagus by Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 2003. **32**: 47–55.
- 201 **Buschman, H. P., Deinum, G., Motz, J. T., Fitzmaurice, M., Kramer, J. R., Van der Laarse, A., Brusckke, A. V. and Feld, M. S.,** raman spectroscopy of human coronary atherosclerosis: Biochemical assessment of cellular and extracellular morphologic structures in situ. *Cardiovascular pathology* 2001. **10**: 69- 82.
-

-
- 202 **de Siqueira, R. S., Dodd, C. E. R. and Rees, C. E. D.**, Phage amplification assay as rapid method for salmonella detection. *Brazilian Journal of Microbiology* 2003. **34**: 118-120.
- 203 **Hutsebaut, D., Vandroemme, J., Heyrman, J., Dawyndt, P., Vandenabeele, P., Moens, L. and de vos, P.**, Raman microspectroscopy as an identification tool within the phylogenetically homogeneous 'Bacillus subtilis'-group. *Systematic and Applied Microbiology* 2006. **29**: 650–660.
- 204 **de Jong, B. W. D., Bakker Schut, T. C., Coppens, J., Wolffenbuttel, K. P., Kok, D. J. and Puppels, G. J.**, Raman spectroscopic detection of changes in molecular composition of bladder muscle tissue caused by outlet obstruction. *Vibrational Spectroscopy* 2003. **32**: 57–65.
- 205 **Liu, T. T., Lin, Y. H., Hung, C. S., Liu, T. J., Yu Chen, Y., Huang, Y. C., Tsai, T. H., Wang, H. H., Wang, D. W., Wang, J. K., Wang, Y. L. and Lin, C. H.**, A High Speed Detection Platform Based on Surface-Enhanced Raman Scattering for Monitoring Antibiotic-Induced Chemical Changes in Bacteria Cell Wall.
- 206 **Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L. P., Ngo-Thi, N. A., Vreeswijk, T. V., Stämmler, M., Endtz, H. P., Bruining, H. A., Naumann, D. and Puppels, G. J.**, Prospective Study of the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bacterial and Fungal Pathogens Recovered from Blood Cultures. *Journal of clinical Microbiology* 2003. **41**: 324–329.
- 207 **Puppels, G. J., Bakker Schut, T. C., Sijtsema, N. M., Grond, M., Maraboeuf, F., de Grauw, C. G., Figdor, C. G. and Greve, J.**, Development and Application of Raman microspectroscopic and Raman imaging techniques for cell biological studies. *Journal of Molecular Structure* 347 1995. **347**: 477-484.
- 208 **Schrader, B., Dippel, B., Fendel, S., Keller, S., Liichte, T., M. Riedl, R. Schulte and Tatsch, E.**, NIR FT Raman spectroscopy-a new tool in medical diagnostics. *Journal of Molecular Structure* 1997. **408/409**: 23-31.
- 209 **Schrader, B., Dippel, B., Erb, I., Keller, S., Löchte, T., Schulz, H., Tatsch, E. and Wessel, S.**, NIR Raman spectroscopy in medicine and biology: results and aspects. *Journal of Molecular Structure* 1999. **480–481**: 21–32.
- 210 **Yu, C., Gestl, E., Eckert, K., Allara, D. and Irudayaraj, J.**, Characterization of human breast epithelial cells by confocal Raman microspectroscopy. *Cancer Detection and Prevention* 2006. **30**: 515–522.
-

-
- 211 **Ali, E. M. A., Edwards, H. G. M., Hargreaves, M. D. and Ian J. Scowen, I. J.**, In-situ detection of drugs-of-abuse on clothing using confocal Raman microscopy. *analytica chimica acta* 2008. **615**: 63–72.
- 212 www.emse.fr/spip/IMG/pdf/raman.pdf, Techniques spectrométriques, Ecole des Mines de Saint Etienne Edn.
- 213 **Jarvis, R. M. and Goodacre, R.**, Discrimination of Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* 2004. **76**: 40-47.
- 214 **Krishna, C. M., Kegelaer, G., Adt, I., Rubin, S., Kartha, V. B., Manfait, M. and Sockalingum, G. D.**, Characterisation of uterine sarcoma cell lines exhibiting MDR phenotype by vibrational spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005. **1726**: 160 – 167.
- 215 **Krishna, C. M., Sockalingum, G. D., Kegelaer, G., Rubin, S., Kartha, V. B. and Manfait, M.**, Micro-Raman spectroscopy of mixed cancer cell populations. *Vibrational Spectroscopy* 2005. **38**: 95–100.
- 216 **Brown, K. L., Palyvoda, O. Y., Thakur, J. S., Nehlsen-Cannarella, S. L., Fagoaga, O. R., Gruber, S. A. and Auner, G. W.**, Raman spectroscopic differentiation of activated versus non-activated T lymphocytes: An in vitro study of an acute allograft rejection model. *Journal of Immunological Methods* 2009. **340**: 48–54.
- 217 **Baena, J. R. and Lendl, B.**, Raman spectroscopy in chemical bioanalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* 2004. **8**: 534–539.
- 218 **Schwartz, T., Jungfer, C., Heißler, S., Friedrich, F., Faubel, W. and Obst, U.**, Combined use of molecular biology taxonomy, Raman spectrometry, and ESEM imaging to study natural biofilms grown on filter materials at waterworks. *Chemosphere* 2007. **77**: 249–257.
- 219 **Pauporté, T. and Lincot, D.**, Techniques de l'ingenieur: Microbalance à cristal de quartz: 1-16.
- 220 **Bandey, H. L., Gonsalves, M., Hillman, A. R., Glidle, A. and Bruckenstein, S.**, Dynamic quartz crystal impedance measurements of polyvinylferrocene film deposition. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1996. **410**: 219-227.
- 221 **Cho, Y.-K., Kim, S., Kim, Y. A., Lim, H. K., Lee, K., Yoon, D., Lim, G., Pak, Y. E., Ha, T. H. and Kim, K.**, Characterization of DNA immobilization and subsequent hybridization using in situ quartz crystal microbalance, fluorescence spectroscopy, and surface plasmon resonance. *Journal of Colloid and Interface Science* 2004. **278**: 44–52.
-

-
- 222 **Chen, K.-S., Chen, S.-C., Lin, H.-R., Yan, T.-R. and Tseng, C.-C.**, A novel technique to immobilize DNA on surface of a quartz crystal microbalance by plasma treatment and graft polymerization. *Materials Science and Engineering* 2007. **C 27**: 716–724.
- 223 **Berney, H., West, J., Haeefe, E., Alderman, J., Lane, W. and Collins, J. K.**, A DNA diagnostic biosensor: development, characterisation and performance. *Sensors and Actuators* 2000. **B 68**: 100–108.
- 224 **Wang, H., Wu, J., Li, J., Ding, Y., G., S. and R., Y.**, Nanogold particle-enhanced oriented adsorption of antibody fragments for immunosensing platforms. *Biosensors and Bioelectronics* 2005. **20**: 2210–2217.
- 225 **Ghouchian, H. O. and Kamo, N.**, Latex piezoelectric immunoassay: effect of interfacial properties. *Analytica Chimica Acta* 1995. **300**: 99-105.
- 226 **Geddes, N. J., Paschinger, E. M., Furlong, D. N., Caruso, F., Hoffmann, C. L. and Rabolt, J. F.**, Surface chemical activation of quartz crystal microbalance gold electrodes - analysis by frequency changes, contact angle measurements and grazing angle FTIR. *Thin Solid Films* 1995. **260**: 192-199.
- 227 **Gautier, C.**, Développement de supports polythiophène conducteurs pour l'immobilisation d'ADN, la détection électronique de l'hybridation et la libération locale de gènes *Chimie et physico-chimie des polymères*. Université du Maine, Le Mans 2006, pp 157.
- 228 **Rault-Berthelot, J. and Rozé, C.**, Anodic oxidation of the Spiro [4,9'-fluorenyl] - 2,6-diphenylthiopyran: towards polyphenylene substituted by thiopyrylium or thiopyranyl functions. *Synthetic Metals* 1996. **83**: 153-157.
- 229 **Rault-Berthelot, J., Roze', C., Granger, M. M. and Raoult, E.**, Anodic oxidation of various arylene-cyanovinyls made of alternating fluorenyl, thienyl and/or phenyl units. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1999. **466**: 144–154.
- 230 **Pilard, J. F., Marchand, G. and Simonet, J.**, Chemical Synthesis at Solid Interfaces. On the Use of Conducting Polythiophenes Equipped of Adequate Linkers Allowing a Facile and Highly Selective Cathodic S-N Bond Scission with a Fully Regenerating Resin Process. *Tetrahedron* 1998. **54**: 9401-9414.
- 231 **Dubey, S., Fabre, B., Marchand, G., Pilard, J. F. and Simonet, J.**, Voltammetric investigation of new polythiophene derivatives possessing electrochemically cleavable arylsulfonamide groups as precursors for solid phase electrosynthesis. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1999. **477**: 121–129.
-

-
- 232 **Bazzaoui, E. A., Levi, G., Aeiyaeh, S., Aubard, J., Marsault, J. P. and Lacaze, P. C.,** SERS Spectra of Polythiophene in Doped and Undoped States. *J. Phys. Chem.* 1995, **99**, 6628-6634 1995. **99**: 6628-6634.
- 233 **Sjoholm, I.,** Protein A from *Staphylococcus aureus* Spectropolarimetric and Spectrophotometric Studies. *Eur. J. Biochem.* 1975. **51**: 55-61.
- 234 **Ibelings, M. S., Maquelin, K., Endtz, H. P., Bruining, H. A. and Puppels, G. J.,** Rapid identification of *Candida* spp. in peritonitis patients by Raman spectroscopy. *Clin Microbiol Infect* 2005. **11**: 353–358.
- 235 **Yang, H. and Irudayaraj, J.,** Rapid detection of foodborne microorganisms on food surface using Fourier transform Raman spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* 2003. **646**: 35–43.
- 236 **Cai, S. and Singh, B. R.,** A Distinct Utility of the Amide III Infrared Band for Secondary Structure Estimation of Aqueous Protein Solutions Using Partial Least Squares Methods. *Biochemistry* 2004. **43**: 2541-2549.
- 237 **Jenkins, A. L., Larsen, R. A. and Williams, T. B.,** Characterization of amino acids using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A* 2005. **61**: 1585–1594.
- 238 **Tuma, R.,** Raman spectroscopy of proteins: from peptides to large assemblies. *J. Raman Spectrosc.* 2005. **36**: 307–319.
- 239 **Gorochoy, G. and Papo, T.,** *Immunologie*. Paris : Doin, 2000, Paris (France): 2000.
- 240 **Fernandez-Recio, J., Totrov, M. and Abagyan, R.,** Identification of Protein–Protein Interaction Sites from Docking Energy Landscapes. *J. Mol. Biol.* 2004. **335**: 843–865.
- 241 **Dancil, K.-P., Greiner, D. P. and Sailor, M. J.,** A Porous Silicon Optical Biosensor: Detection of Reversible Binding of IgG to a Protein A-Modified Surface. *J. Am. Chem. Soc.* 1999. **121**: 7925-7930.
- 242 **Minard, P. and Desmadril, M.,** Création par évolution dirigée de biomolécules reconnaissant des nano-objets. *Traité techniques de l'ingénieur NM 4 2000* 2007: 1-11.
- 243 **Jeyachandran, Y. L., Mielczarski, J. A., Mielczarski, E. and Rai, B.,** Efficiency of blocking of non-specific interaction of different proteins by BSA adsorbed on hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 2010. **341**: 136–142.
- 244 **Lu, S., He, J. and Liu, Z.,** Tuning interfacial non-covalent interactions through biomimetic functionalization of inorganic surface: The case of lysozyme and mesocellular silica foam hybrids. *Chemical Engineering Journal* 2009. **146**: 503–514.
-

-
- 245 http://sti-bio.scola.ac-paris.fr/pedago/proteines/html/structure_prot.html.
- 246 **Pande, J., Pande, C., Gilg, D., Vasak, M., Callender, R. and Kagi, J. H. R.,** Raman, Infrared, and Circular Dichroism Spectroscopic Studies on Metallothionein: A Predominantly "Turn"-Containing Protein. *Biochemistry* 1986. **25**: 5526-5532.
- 247 **Wen, Z. Q., Hecht, L. and Barron, L. D.,** P-Sheet and associated turn signatures in vibrational Raman optical activity spectra of proteins. *Protein Science* 1994. **3**: 435-439.
- 248 **Chen, X., Wang, J., Kristalyn, C. B. and Chen, Z.,** Real-Time Structural Investigation of a Lipid Bilayer during Its Interaction with Melittin Using Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy. *Biophysical Journal* 2007. **93**: 866–875.
- 249 **Galli, C., coen, M. C., Hauert, R., Katanaev, V. L., Wymann, M. P., Gröning, P. and Schlapbach,** protein adsorption on topographically nanostructured titanium. *surface science* 2001. **474**: 180- 184.
- 250 **Thomas, G. J. J.,** New Structural Insights from Raman Spectroscopy of Proteins and Their Assemblies. *Biopolymers (Biospectrosc.)* 2002. **67**: 214-225.
- 251 **El-Mashtoly, S. F., Gu, Y., Yoshimura, H., Yoshioka, S., Aono, S. and Kitagawa, T.,** Protein Conformation Changes of HemAT-Bs upon Ligand Binding Probed by Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy. *Journal of biological chemistry* 2008. **282**: 6942- 6949.
- 252 **Stone, G. C., Sjobring, U., Bjorck, L., Sjoquist, J., Barber, C. V. and Nardella, F. A. J. Immunol.** 1989. **143**: 565-570.
- 253 **Decker, C.,** Polymerisation sous rayonnement UV, Techniques de l'ingénieur, Traitéplastiques et composites. *AM 3044* 2000: 1-15.
- 254 **Cho, J.-D., Kim, H.-K., Kim, Y.-S. and Hong, J.-W.,** Dual curing of cationic UV-curable clear and pigmented coating systems photosensitized by thioxanthone and anthracene. *Polymer Testing* 2003. **22**: 633–645.
- 255 **Cho, J.-D. and Hong, J.-W.,** Photo-curing kinetics for the UV-initiated cationic polymerization of a cycloaliphatic diepoxide system photosensitized by thioxanthone. *European Polymer Journal* 2005. **41**: 367–374.
- 256 **Segurola, J., Allen, N., Edge, M., Parrondo, A. and Roberts, I.,** Photochemistry and photoinduced chemical crosslinking activity of several type II commercial photoinitiators in acrylated prepolymers. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 1999. **122**: 115-125.
-

-
- 257 **Podsiadly, R.**, Photoreaction and photopolymerization studies on fluo flavin dye–pyridinium salt systems. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2008. **198**: 60–68.
- 258 **Costela, A., Garcia- Moreno, I., Garcia, O. and Sastre, R.**, N-acetyl-4-nitro-1-naphthylamine as sensitizer of N,N-dimethylaniline for photoinitiated radical polymerization. *Polymer* 2000. **41**: 8017- 8026.
- 259 **Decker, C.**, Photoinitiated Crosslinking polymerisation. *Frog. Polym Sci.* 1996. **21**: 593-650.
- 260 **Decker, C. and Decker, D.**, Photoinitiated radical polymerization of vinyl ether-maleate systems. *Polymer* 1997. **38**: 2229-2237.
- 261 **Rutsch, W., Dietliker, K., Leppard, D., Kiihler, M., Misev, L., Kolczak, U. and Rist, G.**, Recent developments in photoinitiators. *Progress in Organic Coatings* 1996. **27**: 227-239.
- 262 **Encinas, M. V., Rufs, A. M., Corrales, T., Catalina, F., Peinado, C., Schmith, K., Neumann, M. G. and Allen, N. S.**, The influence of the photophysics of 2-substituted thioxanthenes on their activity as photoinitiators. *Polymer* 2002. **43**: 3909- 3913.
- 263 **Crivello, J. V.** *J. Polym. Sci Part A: Chem.* 1999. **37**: 4241-4254.
- 264 **Fouassier, J.-P. and Burr, D.**, Interactions entre thioxanthenes et morpholino cetonas, effets de synergie dans les réactions de photopolymérisations. *Eur. Polym. J.* 1991. **27**: 657-663.
- 265 **Crivello, J. V.**, Advanced curing technologies using photo-and electron beam induced cationic polymerization. *Radiation Physics and Chemistry* 2002. **63**: 21–27.
- 266 **Crivello, J. V.**, UV and electron beam-induced cationic polymerization. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 1999. **151**: 8- 21.