



**HAL**  
open science

# Electrode 3D de PEDOT : PSS pour la détection de métabolites électrochimiquement actifs de *Pseudomonas aeruginosa*

Julie Oziat

► **To cite this version:**

Julie Oziat. Electrode 3D de PEDOT : PSS pour la détection de métabolites électrochimiquement actifs de *Pseudomonas aeruginosa*. Autre. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSEM026 . tel-01665207

**HAL Id: tel-01665207**

**<https://theses.hal.science/tel-01665207>**

Submitted on 15 Dec 2017

**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.



N° d'ordre NNT : 2016LYSEM026

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**l'Ecole des Mines de Saint-Etienne**

**Ecole Doctorale N° 488**  
**Sciences, Ingénierie, Santé**

**Spécialité de doctorat** : Microélectronique

Soutenue publiquement le 14/11/2016, par :  
**Julie Oziat**

---

**Electrode 3D de PEDOT:PSS pour la  
détection de métabolites  
électrochimiquement actifs de  
*Pseudomonas aeruginosa***

---

Devant le jury composé de :

DELABOUGLISE, Didier  
KUHN, Alexander  
ELSEN, Sylvie  
OWENS, Roisin  
MALLIARAS, George  
MAILLEY, Pascal  
JOSSO, Quentin

Professeur, Univ. Grenoble-Alpes  
Professeur, Bordeaux-INP  
Chercheur, UMR1036  
Professeur, ENSMSE  
Professeur, ENSMSE  
Directeur de recherche, CEA  
Chercheur, bioMérieux

Président et Rapporteur  
Rapporteur  
Examinatrice  
Examinatrice  
Directeur de thèse  
Co-directeur de thèse  
Invité

| Spécialités doctorales   | Responsables :  | Spécialités doctorales   | Responsables   |
|--|---|--|--|
| SCIENCES ET GENIE DES MATERIAUX<br>MECANIQUE ET INGENIERIE<br>GENIE DES PROCEDES<br>SCIENCES DE LA TERRE<br>SCIENCES ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT | K. Wolski Directeur de recherche<br>S. Drapier, professeur<br>F. Gruy, Maître de recherche<br>B. Guy, Directeur de recherche<br>D. Graillet, Directeur de recherche | MATHEMATIQUES APPLIQUEES<br>INFORMATIQUE<br>IMAGE, VISION, SIGNAL<br>GENIE INDUSTRIEL<br>MICROELECTRONIQUE | O. Roustant, Maître-assistant<br>O. Boissier, Professeur<br>J.C. Pinoli, Professeur<br>A. Dolgui, Professeur<br>S. Dauzere Peres, Professeur |

**EMSE : Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'État ou d'une HDR)**

|                      |               |                        |                                      |       |
|----------------------|---------------|------------------------|--------------------------------------|-------|
| ABSI                 | Nabil         | CR                     | Génie industriel                     | CMP   |
| AVRIL                | Stéphane      | PR2                    | Mécanique et ingénierie              | CIS   |
| BALBO                | Flavien       | PR2                    | Informatique                         | FAYOL |
| BASSEREAU            | Jean-François | PR                     | Sciences et génie des matériaux      | SMS   |
| BATTAIA-GUSCHINSKAYA | Olga          | CR                     | Génie industriel                     | FAYOL |
| BATTON-HUBERT        | Mireille      | PR2                    | Sciences et génie de l'environnement | FAYOL |
| BERGER DOUCE         | Sandrine      | PR2                    | Sciences de gestion                  | FAYOL |
| BIGOT                | Jean Pierre   | MR(DR2)                | Génie des Procédés                   | SPIN  |
| BILAL                | Essaid        | DR                     | Sciences de la Terre                 | SPIN  |
| BLAYAC               | Sylvain       | MA(MDC)                | Microélectronique                    | CMP   |
| BOISSIER             | Olivier       | PR1                    | Informatique                         | FAYOL |
| BONNEFOY             | Olivier       | MA(MDC)                | Génie des Procédés                   | SPIN  |
| BORBELY              | Andras        | MR(DR2)                | Sciences et génie des matériaux      | SMS   |
| BOUCHER              | Xavier        | PR2                    | Génie Industriel                     | FAYOL |
| BRODHAG              | Christian     | DR                     | Sciences et génie de l'environnement | FAYOL |
| BRUCHON              | Julien        | MA(MDC)                | Mécanique et ingénierie              | SMS   |
| BURLAT               | Patrick       | PR1                    | Génie Industriel                     | FAYOL |
| COURNIL              | Michel        | PR0                    | Génie des Procédés                   | DIR   |
| DAUZERE-PERES        | Stéphane      | PR1                    | Génie Industriel                     | CMP   |
| DEBAYLE              | Johan         | CR                     | Image Vision Signal                  | CIS   |
| DELAFOSSÉ            | David         | PR0                    | Sciences et génie des matériaux      | SMS   |
| DELORME              | Xavier        | MA(MDC)                | Génie industriel                     | FAYOL |
| DESRAYAUD            | Christophe    | PR1                    | Mécanique et ingénierie              | SMS   |
| DOLGUI               | Alexandre     | PR0                    | Génie Industriel                     | FAYOL |
| DRAPIER              | Sylvain       | PR1                    | Mécanique et ingénierie              | SMS   |
| FAVERGEON            | Loïc          | CR                     | Génie des Procédés                   | SPIN  |
| FEILLET              | Dominique     | PR1                    | Génie Industriel                     | CMP   |
| FRACZKIEWICZ         | Anna          | DR                     | Sciences et génie des matériaux      | SMS   |
| GARCIA               | Daniel        | MR(DR2)                | Génie des Procédés                   | SPIN  |
| GAVET                | Yann          | MA(MDC)                | Image Vision Signal                  | CIS   |
| GERINGER             | Jean          | MA(MDC)                | Sciences et génie des matériaux      | CIS   |
| GOEURIOT             | Dominique     | DR                     | Sciences et génie des matériaux      | SMS   |
| GONDRAN              | Natacha       | MA(MDC)                | Sciences et génie de l'environnement | FAYOL |
| GRAILLOT             | Didier        | DR                     | Sciences et génie de l'environnement | SPIN  |
| GROSSEAU             | Philippe      | DR                     | Génie des Procédés                   | SPIN  |
| GRUY                 | Frédéric      | PR1                    | Génie des Procédés                   | SPIN  |
| GUY                  | Bernard       | DR                     | Sciences de la Terre                 | SPIN  |
| HAN                  | Woo-Suck      | MR                     | Mécanique et ingénierie              | SMS   |
| HERRI                | Jean Michel   | PR1                    | Génie des Procédés                   | SPIN  |
| KERMOUCHE            | Guillaume     | PR2                    | Mécanique et Ingénierie              | SMS   |
| KLOCKER              | Helmut        | DR                     | Sciences et génie des matériaux      | SMS   |
| LAFOREST             | Valérie       | MR(DR2)                | Sciences et génie de l'environnement | FAYOL |
| LERICHE              | Rodolphe      | CR                     | Mécanique et ingénierie              | FAYOL |
| LI                   | Jean-Michel   |                        | Microélectronique                    | CMP   |
| MALLIARAS            | Georges       | PR1                    | Microélectronique                    | CMP   |
| MAURINE              | Philippe      | Ingénieur de recherche | Microélectronique                    | CMP   |
| MOLIMARD             | Jérôme        | PR2                    | Mécanique et ingénierie              | CIS   |
| MONTHELLET           | Frank         | DR                     | Sciences et génie des matériaux      | SMS   |
| MOUTTE               | Jacques       | CR                     | Génie des Procédés                   | SPIN  |
| NEUBERT              | Gilles        | PR                     | Génie industriel                     | FAYOL |
| NIKOLOVSKI           | Jean-Pierre   | Ingénieur de recherche |                                      | CMP   |
| NORTIER              | Patrice       | PR1                    |                                      | SPIN  |
| OWENS                | Rosin         | MA(MDC)                | Microélectronique                    | CMP   |
| PICARD               | Gauthier      | MA(MDC)                | Informatique                         | FAYOL |
| PIJOLAT              | Christophe    | PR0                    | Génie des Procédés                   | SPIN  |
| PIJOLAT              | Michèle       | PR1                    | Génie des Procédés                   | SPIN  |
| PINOLI               | Jean Charles  | PR0                    | Image Vision Signal                  | CIS   |
| POURCHEZ             | Jérémy        | MR                     | Génie des Procédés                   | CIS   |
| ROBISSON             | Bruno         | Ingénieur de recherche | Microélectronique                    | CMP   |
| ROUSSY               | Agnès         | MA(MDC)                | Génie industriel                     | CMP   |
| ROUSTANT             | Olivier       | MA(MDC)                | Mathématiques appliquées             | FAYOL |
| ROUX                 | Christian     | PR                     | Image Vision Signal                  | CIS   |
| STOLARZ              | Jacques       | CR                     | Sciences et génie des matériaux      | SMS   |
| TRIA                 | Assia         | Ingénieur de recherche | Microélectronique                    | CMP   |
| VALDIVIESO           | François      | PR2                    | Sciences et génie des matériaux      | SMS   |
| VIRICELLE            | Jean Paul     | DR                     | Génie des Procédés                   | SPIN  |
| WOLSKI               | Krzysztof     | DR                     | Sciences et génie des matériaux      | SMS   |
| XIE                  | Xiaolan       | PR1                    | Génie industriel                     | CIS   |
| YUGMA                | Gallian       | CR                     | Génie industriel                     | CMP   |

**ENISE : Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'État ou d'une HDR)**

|           |             |                        |                                 |       |
|-----------|-------------|------------------------|---------------------------------|-------|
| BERGHEAU  | Jean-Michel | PU                     | Mécanique et Ingénierie         | ENISE |
| BERTRAND  | Philippe    | MCF                    | Génie des procédés              | ENISE |
| DUBUJET   | Philippe    | PU                     | Mécanique et Ingénierie         | ENISE |
| FEULVARCH | Eric        | MCF                    | Mécanique et Ingénierie         | ENISE |
| FORTUNIER | Roland      | PR                     | Sciences et Génie des matériaux | ENISE |
| GUSSAROV  | Andrey      | Enseignant contractuel | Génie des procédés              | ENISE |
| HAMDI     | Hédi        | MCF                    | Mécanique et Ingénierie         | ENISE |
| LYONNET   | Patrick     | PU                     | Mécanique et Ingénierie         | ENISE |
| RECH      | Joël        | PU                     | Mécanique et Ingénierie         | ENISE |
| SMUROV    | Igor        | PU                     | Mécanique et Ingénierie         | ENISE |
| TOSCANO   | Rosario     | PU                     | Mécanique et Ingénierie         | ENISE |
| ZAHOUANI  | Hassan      | PU                     | Mécanique et Ingénierie         | ENISE |

**Rome ne s'est pas faite en un jour**

Proverbe français



# Remerciements

Avant de laisser le lecteur découvrir le contenu scientifique de cette thèse, j'aimerais remercier toutes les personnes qui ont rendu ce travail possible ainsi que tous ceux qui ont contribué à le rendre meilleur ou plus agréable.

Mes remerciements vont tout d'abord à M. GEORGE MALLIARAS, chef du département d'accueil de l'EMSE et directeur de cette thèse, et M. DANIEL VELLOU, chef du département d'accueil du CEA, qui ont permis, par leur volonté de collaborer, que cette thèse existe. De plus, je voudrais adresser mes remerciements à GEORGE pour m'avoir inclus dans la vie de son laboratoire à Gardanne, malgré le fait que j'étais basée à Grenoble.

Mes remerciements vont ensuite à M. GILLES MARCHAND, qui a imaginé mon sujet de thèse, et m'a encadrée pendant mes premiers mois. De plus, je le remercie d'avoir pris le temps de relire et commenter certains des chapitres de mon manuscrit.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à M. PASCAL MAILLEY, co-directeur et encadrant principal de cette thèse. J'aimerais le remercier pour l'intérêt qu'il a toujours porté à ce travail, sa bonne humeur en toutes circonstances ainsi que pour les nombreuses discussions enrichissantes qui m'ont permises de progresser et de faire de ce travail ce qu'il est. J'aimerai également lui dire à quel point j'ai apprécié le temps qu'il a pris, dans des moments difficiles pour lui, pour continuer à soutenir cette thèse.

Je tiens ensuite à remercier M. DIDIER DELABOUGLISE et M. ALEXANDER KUHN pour avoir accepté le rôle de rapporteurs de cette thèse. De plus, je les remercie pour les échanges que nous avons eus autour de ce travail qui ont été enrichissants.

Merci à MME SYLVIE ELSSEN qui, en tant que microbiologiste et spécialiste de *P. aeruginosa*, a beaucoup apporté à ce travail, que ce soit par le biais de nos discussions ou par celui des expériences que nous avons réalisées en collaboration. De plus, j'aimerais lui dire que j'ai grandement apprécié sa rigueur dans le travail ainsi que sa réactivité. Pour finir, j'aimerais la remercier pour le temps qu'elle m'a consacré tout au long de ma thèse.

Merci à MME ROISIN OWENS et M. QUENTIN JOSSO pour avoir accepté de faire partie de mon jury. Merci pour les remarques, questions et discussions que nous avons eu lors de la soutenance. De plus, je voudrais remercier ROISIN, en tant que membre du laboratoire d'accueil à l'EMSE, pour sa bienveillance vis-à-vis de ce travail et de moi-même.

Merci à M. PIERRE MARCOUX qui m'a guidé et accompagné dans toutes les expériences de combinant microbiologie et électrodes de PEDOT. Merci à lui pour son temps, son imagination et sa pédagogie qui m'ont permis d'enrichir ma thèse et mon savoir.

Je tiens aussi à remercier GILLES MARCHAND et PASCAL MAILLEY de nouveau, puis SEVERINE VIGNOUD, en tant que chefs de laboratoire successifs au CEA, et CLAUDE VAUCHIER, chef de service au CEA, qui ont contribué à la réalisation de ce travail dans un environnement serein.

J'aimerais remercier mes collègues de l'ElectroChoc' Team : GAËTAN SCHEIBLIN, MAXIME GOUGIS, MELANIE ALIAS et GAËTAN GRENOT, sans oublier CEDRIC GOYER qui était là à mes débuts. Leur présence a réellement contribué à la réussite de cette thèse que ce soit au

niveau du travail grâce à leurs conseils ou au niveau de mon épanouissement personnel avec toutes nos discussions et la très bonne ambiance au sein de notre groupe. Merci à GAËTAN S. d'avoir été mon binôme de thèse, affronter les difficultés à deux a rendu les choses beaucoup plus faciles. Merci à MELANIE pour sa bonne humeur, son enthousiasme et son énergie qui donne envie d'avancer. Merci à MAXIME pour tous ses conseils ainsi que ses qualités humaines qui ont permises de souder un peu plus l'équipe. Merci à GAËTAN G. pour son enthousiasme et sa bonne humeur.

J'aimerais aussi exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui m'ont aidée/formée/conseillée sur l'un des points de ma thèse. Travailler avec eux fut très enrichissant sur le plan professionnel mais aussi très agréable sur le plan humain. Merci à MICHEL MERMOUX qui m'a aidée à réaliser et interpréter les spectres Raman. Merci à JEAN-CHARLES ARNAULT pour le temps passé sur les analyses XPS. Merci à SEVERINE VIGNOUD et EMILIE PERRET pour les analyses BET. Merci à LISA RACINE pour les tests mécaniques. Merci à GUILLAUME COSTA pour les multiples aides qu'il m'a donné, notamment pour le MEB et les traitements de surface. Merci à VENCESLASS RAT pour les conseils et l'aide concernant les connecteurs et les câbles. Merci à MANUEL ALESIO, FRANÇOIS BOIZOT et NICOLAS VERPLANCK pour les conseils et l'aide concernant la conception et réalisation des puces.

J'aimerais ensuite remercier toute les personnes qui m'ont accompagnée tout au long de cette thèse : à midi, pendant les pauses, pendant les sorties, au détour des couloirs... Ces 3 ans n'auraient pas été pareil sans eux tous. Merci au groupe des midis : MORGANE ma bonne copine malheureusement trop loin trop longtemps, GUILLAUME C. dynamique, volontaire et toujours gentil, EMILIE P. constamment gentille, ETZAEEL et son enthousiasme, ROXANE et son rire, CHA-LORE, PETRA, CORALIE, CLEMENTINE... Merci à ANNE-CLAUDE, ma voisine, pour les nombreuses discussions que nous avons partagées tout au long de ma thèse. Merci aux autres doctorants avec qui j'ai partagé cette expérience de la thèse : LISA avec qui on s'est soutenu depuis le début, HADRIEN et son humour, GIACOMO et nos expériences un peu folles, CELINE, MARJORIE, CLAIRE, ELOÏSE, JUDY, VERONICA, SOPHIE, FRANÇOIS B., JULIEN... Ainsi qu'aux collègues de département : GUILLAUME N., NATHALIE, MATHIEU, MATHILDE, FABRICE, MARIE, DOMINIQUE, VERO-NIQUE, FLORENCE, ISABELLE, CAROLINE, ANTOINE, FREDERIC L., SIMON, EMILIE B., THOMAS C., MELANIE G., DAVID, FANNY, OLIVIER, REGIS, FREDERIC B., VINCENT, FRANÇOIS B., FREDERIC R., CHARLY, CATHERINE, SANDRINE, YVON, SADOK, THOMAS B., VALENTIN...

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes avec qui j'ai collaboré et interagi au sein du laboratoire de bioélectronique : SAHIKA, ELOÏSE, THOMAS, ILKE, ADEL, ANNA-MARIA, MA-GALI, JOLIEN, ESMA, VINCENZO, PIERRE, BABIS, DONOTA...

Merci aux amis, en dehors des laboratoires, avec qui j'ai passé de nombreuses soirées au cours de ces 3 ans : FLORIAN, LUDO, ETIENNE, ROMAIN, CELIA, FANETTE, JULIETTE, SOLENE, SOPHIE, QUENTIN, JEAN, TRISTAN, ESTELE ...

Et pour finir un énorme merci à JULIEN, à MA FAMILLE ainsi qu'à CELLE DE JULIEN qui m'ont soutenue tout au long de ma thèse !

# SOMMAIRE

# Sommaire

|  |     |
|--|-----|
| <i>Remerciements</i> .....   | 3   |
| <i>Sommaire</i> .....  | 6   |
| <i>Introduction générale</i> .....   | 10  |
| <b>Chapitre 1</b> <i>Etat de l'art sur les méthodes d'identification des bactéries et contexte de la thèse</i> .....                               | 14  |
| <b>1.1. Identification de bactéries en microbiologie clinique</b> .....  | 15  |
| 1.1.1. Avant-propos.....   | 15  |
| 1.1.2. Méthodes d'identification de bactéries.....   | 18  |
| 1.1.3. Conclusions sur l'identification bactérienne.....   | 24  |
| <b>1.2. L'approche de la thèse : l'analyse de surnageants bactériens</b> .....   | 24  |
| 1.2.1. Composition du surnageant d'une culture bactérienne.....  | 24  |
| 1.2.2. Sécrétôme.....  | 26  |
| 1.2.3. Quorum sensing.....   | 26  |
| 1.2.4. Utilisation de l'électrochimie pour l'analyse des surnageants bactériens.....   | 28  |
| <b>1.3. La bactérie d'intérêt de la thèse : <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....  | 28  |
| 1.3.1. Généralités sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....   | 28  |
| 1.3.2. Molécules sécrétées par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....   | 30  |
| <b>1.4. Détection électrochimique de molécules sécrétées par <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....   | 34  |
| 1.4.1. <i>Pseudomonas</i> Quinolone Signal et 2-heptyl-4-quinolone.....  | 34  |
| 1.4.2. Pyocyanine.....   | 38  |
| 1.4.3. 2'-aminoacétophénone.....   | 45  |
| 1.4.4. Détections simultanées de molécules de plusieurs familles.....  | 47  |
| <b>1.5. Les objectifs de la thèse</b> .....  | 48  |
| <b>Chapitre 2</b> <i>Electrochimie sur carbone vitreux de métabolites de <i>P. aeruginosa</i> et analyse de surnageants de culture</i> .....       | 50  |
| <b>2.1. Contexte de l'étude électrochimique</b> .....  | 50  |
| <b>2.2. Electrochimie sur carbone vitreux des 4 métabolites sélectionnés</b> .....   | 50  |
| 2.2.1. Avant-propos.....   | 50  |
| 2.2.2. Résultats principaux : publication n°1.....   | 51  |
| 2.2.3. Résultats complémentaires sur la détection de PQS.....  | 64  |
| 2.2.4. Conclusion générale de l'étude électrochimique.....   | 67  |
| <b>2.3. Analyse électrochimique de surnageants de culture de <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....   | 67  |
| 2.3.1. Introduction de l'analyse des surnageants.....  | 67  |
| 2.3.2. Résultats principaux : publication n°2.....   | 68  |
| 2.3.3. Résultat complémentaire : Analyse d'autres milieux de culture.....  | 83  |
| 2.3.4. Conclusions sur l'analyses électrochimique de surnageants.....  | 85  |
| <b>Chapitre 3</b> <i>Electrode de PEDOT:PSS, caractérisations et détection de métabolites de <i>P. aeruginosa</i></i> .....                        | 88  |
| <b>3.1. Contexte de l'utilisation d'électrodes de PEDOT:PSS</b> .....  | 88  |
| <b>3.2. Le PEDOT, un polymère conducteur</b> .....   | 89  |
| 3.2.1. Polymérisation du PEDOT.....  | 89  |
| 3.2.2. Conductivité du PEDOT.....  | 91  |
| 3.2.3. PEDOT:PSS.....  | 92  |
| <b>3.3. Caractérisations de l'électrode de PEDOT:PSS et détection de métabolites de <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....                        | 96  |
| 3.3.1. Avant-propos : Fenêtres de stabilité de l'électrode de PEDOT:PSS.....   | 96  |
| 3.3.2. Résultats principaux : Publication n°3.....   | 99  |
| 3.3.3. Résultats complémentaires : Optimisation de la détection de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ , PYO et de PQS sur l'électrode de PEDOT:PSS..... | 117 |
| 3.3.4. Conclusions sur l'utilisation de l'électrode de PEDOT:PSS.....  | 121 |
| <b>Chapitre 4</b> <i>Mise au point et caractérisations d'une électrode 3D de PEDOT:PSS réalisée par lyophilisation</i> .....                       | 124 |
| <b>4.1. Apport attendu de l'utilisation d'une électrode 3D de PEDOT:PSS</b> .....  | 125 |
| <b>4.2. Etat de l'art des matériaux poreux réalisés à partir de PEDOT</b> .....  | 126 |

|                                  |   |            |
|----------------------------------|---|------------|
| 4.2.1.                           | Avant-propos : vocabulaire des matériaux poreux .....   | 126        |
| 4.2.2.                           | Mise en forme 3D du PEDOT .....   | 127        |
| <b>4.3.</b>                      | <b>Contraintes et choix effectués pour l'électrode 3D de PEDOT:PSS de la thèse .....</b>              | <b>131</b> |
| 4.3.1.                           | Cahier des charges technique .....  | 131        |
| 4.3.2.                           | Choix de la méthode de fabrication de l'électrode 3D .....  | 132        |
| <b>4.4.</b>                      | <b>Fabrication et caractérisation de l'électrode 3D de PEDOT:PSS .....</b>                            | <b>133</b> |
| 4.4.1.                           | La lyophilisation .....   | 133        |
| 4.4.2.                           | Formulations et notations .....   | 134        |
| 4.4.3.                           | Les caractérisations .....  | 134        |
| <b>4.5.</b>                      | <b>Résultats concernant la fabrication et la caractérisation de l'électrode 3D de PEDOT:PSS .....</b> | <b>136</b> |
| 4.5.1.                           | Etude préliminaire sur lame de verre .....  | 136        |
| 4.5.2.                           | Réalisation de dispositifs adaptés .....  | 138        |
| 4.5.3.                           | Recherche des conditions permettant d'obtenir une « bonne » électrode .....                           | 141        |
| 4.5.4.                           | Etude approfondie de l'influence de la DBSA .....   | 150        |
| 4.5.5.                           | Caractérisations complètes de la formulation PG3D0.75 .....   | 155        |
| 4.5.6.                           | Conclusions .....   | 173        |
| <b>4.6.</b>                      | <b>Protocoles des caractérisations du Chapitre 4 .....</b>  | <b>173</b> |
| 4.6.1.                           | Caractérisations morphologies .....   | 173        |
| 4.6.2.                           | Caractérisations mécaniques .....   | 174        |
| 4.6.3.                           | Caractérisation spectroscopique Raman .....   | 174        |
| 4.6.4.                           | Caractérisations électrochimiques .....   | 174        |
| <i>Chapitre 5</i>                | <i>Culture et détection de P. aeruginosa avec l'électrode 3D de PEDOT:PSS .....</i>                   | <i>176</i> |
| <b>5.1.</b>                      | <b>Contextes de l'étude microbiologique .....</b>   | <b>176</b> |
| <b>5.2.</b>                      | <b>Caractérisations physiologiques de l'électrode .....</b>   | <b>177</b> |
| 5.2.1.                           | Préparation et stérilisation .....  | 177        |
| 5.2.2.                           | Bactério-compatibilité .....  | 178        |
| 5.2.3.                           | Croissance bactérienne au sein des électrodes .....   | 181        |
| <b>5.3.</b>                      | <b>Adaptation de la puce pour les mesures en laboratoire de microbiologie .....</b>                   | <b>184</b> |
| 5.3.1.                           | Structure de la puce .....  | 184        |
| 5.3.2.                           | Contre-électrode .....  | 184        |
| 5.3.3.                           | Electrode de référence .....  | 184        |
| <b>5.4.</b>                      | <b>Analyse <i>in situ</i> de surnageant .....</b>   | <b>185</b> |
| 5.4.1.                           | Expérience « test » sur <i>Pseudomonas putida</i> .....   | 185        |
| 5.4.2.                           | Analyse de surnageants de PAO1 et PAO1 <i>ΔpqsA</i> .....   | 186        |
| <b>5.5.</b>                      | <b>Conclusions .....</b>  | <b>191</b> |
| <b>5.6.</b>                      | <b>Protocoles de microbiologie du Chapitre 5 .....</b>  | <b>191</b> |
| 5.6.1.                           | Tests de bactério-compatibilité sur boîtes .....  | 191        |
| 5.6.2.                           | Tests de bactério-compatibilité en liquide .....  | 191        |
| 5.6.3.                           | Evaluation de la croissance bactérienne dans la phase liquide intrapore .....                         | 192        |
| 5.6.4.                           | Analyse de surnageants <i>in situ</i> .....   | 192        |
| <i>Conclusion générale</i> ..... | <i>196</i>  |            |
| <i>Annexes</i> .....             | <i>200</i>  |            |
| <i>Bibliographie</i> .....       | <i>212</i>  |            |



# INTRODUCTION GENERALE

# Introduction générale

Les infections bactériennes sont très courantes. Elles peuvent être bénignes comme les angines bactérienne (infection de la gorge) ou bien très graves comme les septicémies (infection du sang). Pour traiter l'infection bactérienne, il faut utiliser des antibiotiques efficaces contre la bactérie contaminante. Les infections bactériennes composent la majorité des infections acquises à l'hôpital (les infections nosocomiales). Les infections nosocomiales sont un véritable problème de santé public car elles touchent des patients déjà malades donc plus faibles. En 2012, plus d'1 patient sur 20 était touché par une maladie nosocomiale en France [1].

Actuellement, lors de suspicions d'infections, le traitement est souvent prescrit en considérant seulement le tableau clinique et non les résultats microbiologiques. En effet, l'identification des agents pathogènes présents dans un prélèvement prend de 24 à 72h. Or le traitement doit être commencé le plus rapidement possible (particulièrement pour les infections très critiques comme celles du sang). Un premier traitement est alors prescrit d'après le tableau clinique. Il pourra être ensuite modifié selon les résultats microbiologiques. Pour s'assurer de l'efficacité de ce premier traitement, les médecins utilisent souvent une combinaison d'antibiotiques à large spectre. Cette façon de procéder permet d'augmenter les chances d'utiliser un antibiotique efficace contre la bactérie présente, et donc les chances de guérison du patient mais elle participe grandement à l'augmentation de l'antibiorésistance des bactéries.

Depuis plusieurs années, différents organismes de suivi de l'utilisation des antibiotiques réalisent des guides pour aider le personnel médical à prendre de bonnes décisions et réduire la fréquence et le nombre des antibiotiques utilisés. Toutefois, cette réduction reste faible et les effets sur l'antibiorésistance sont limités [2]. Pour pouvoir combattre l'antibiorésistance plus efficacement, les spécialistes de la question considèrent qu'il faudrait avoir accès à des tests d'identification bactérienne beaucoup plus rapides [3] pour permettre au médecin de réaliser sa prescription en connaissant le microorganisme et/ou ses susceptibilités.

Certains tests plus rapides et plus précis que les tests d'identification traditionnels sont déjà sur le marché, mais leur utilisation est limitée aux laboratoires hospitaliers de pointe à cause de leur coût et/ou de la nécessité de personnels hautement qualifiés. Pour apporter des méthodes ne présentant pas ces désavantages, de nombreuses pistes sont explorées par la recherche. Cette thèse s'intéresse à une voie nouvelle très peu développée jusqu'à présent : l'identification de bactéries par l'analyse électrochimique de leur surnageant de culture. L'électrochimie est un bon candidat pour la mise au point de tests rapides. En effet, elle permet des analyses *in situ*, faciles, « label-free » et peu chères dans la plupart des liquides. Son utilisation pour l'identification bactérienne est toutefois très récente et peu de travaux ont été effectués sur le sujet. Cette voie d'identification est envisagée depuis la découverte de molécules donnant de forts signaux redox dans le surnageant de bactéries du genre *Pseudomonas*.

Cette thèse s'intéresse à l'analyse de surnageants de la bactérie opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*. Cette bactérie était la 4<sup>e</sup> cause de maladies nosocomiales en Europe en 2011/2012 [4]. Elle peut infecter tous types d'organes et de tissus (voies respiratoires, sang, tissus cardiaques, épidermes lésés, voies urinaires, conduits auditifs, tube digestif...). Elle est particulièrement redoutable chez les patients atteints de mucoviscidose. En effet, elle infecte les poumons de 70% des patients âgés de plus de 18 ans [5] et est un facteur important de mortalité et de morbidité. Après une phase d'infection aiguë, la bactérie s'établit sous forme de biofilms et une infection chronique particulièrement difficile à traiter s'installe. Pour limiter et retarder la phase

d'infection chronique, il convient d'effectuer un suivi précis et régulier du patient. Ce suivi est difficile à effectuer avec les méthodes actuelles. En effet, des lavements de poumons et des analyses longues sont nécessaires. Certaines équipes s'intéressant à la détection électrochimique de *P. aeruginosa* espèrent mettre en place des dispositifs pouvant suivre l'activité bactérienne dans l'air expiré ou dans les crachats de patients, et ainsi simplifier le suivi.

Dans ce contexte, deux objectifs principaux ont été définis pour la thèse. Le premier est tout d'abord d'évaluer l'intérêt de l'analyse électrochimique de surnageant de milieu de culture bactérien dans le but d'identification de la bactérie *P. aeruginosa*. Le second objectif concerne la méthode d'analyse de surnageant et plus particulièrement le matériau et la structure de l'électrode de travail utilisée.

Le Chapitre 1 dresse un état de l'art des méthodes d'identification bactérienne actuellement sur le marché ou en cours de développement dans les laboratoires de recherche. Puis, il présente la stratégie choisie pour l'identification ainsi que la bactérie d'étude de la thèse, *P. aeruginosa*.

Le Chapitre 2 aborde la question de l'intérêt de l'analyse de surnageant de culture de *P. aeruginosa*. Les résultats de la caractérisation électrochimique de 4 molécules présentes dans le surnageant et pouvant servir de biomarqueurs de la présence de la bactérie seront présentés. Puis, l'analyse de surnageants de plusieurs souches cliniques de *P. aeruginosa* a été effectuée.

Le Chapitre 3 débute la partie consacrée à l'amélioration de la détection des métabolites en travaillant sur le matériau d'électrode. Une électrode réalisée à partir du polymère conducteur poly(3,4-éthylènedioxythiophène):poly(styrène sulfonate) (PEDOT:PSS) est caractérisée comparativement à une électrode plus classique de carbone vitreux.

Le Chapitre 4 s'intéresse à un nouveau moyen d'amplification du signal en réalisant une électrode structurée en 3 dimensions à base de PEDOT:PSS. L'idée est d'augmenter le signal à la fois en augmentant la surface développée de l'électrode mais aussi en permettant la colonisation de l'électrode par des bactéries et en confinant ainsi les molécules produites. Cette électrode est fabriquée grâce au procédé biocompatible de lyophilisation. Ce Chapitre décrit toutes les étapes et optimisations mises en place pour obtenir une électrode 3D possédant de bonnes propriétés pour notre application.

Le Chapitre 5 s'intéresse à la préparation de l'électrode pour son utilisation en tant que matrice pour la croissance des bactéries ainsi qu'aux premières analyses *in situ*.



# CHAPITRE 1

Etat de l'art sur les méthodes  
d'identification des bactéries  
et contexte de la thèse

# Chapitre 1 Etat de l'art sur les méthodes d'identification des bactéries et contexte de la thèse

|               |   |           |
|---------------|---|-----------|
| <b>1.1.</b>   | <b>Identification de bactéries en microbiologie clinique.....</b>                               | <b>15</b> |
| <b>1.1.1.</b> | <b>Avant-propos .....</b>   | <b>15</b> |
| 1.1.1.1.      | Détection versus identification .....   | 15        |
| 1.1.1.2.      | Taxonomie des bactéries .....   | 15        |
| 1.1.1.3.      | Du prélèvement au traitement.....   | 16        |
| 1.1.1.4.      | Caractéristiques d'une « bonne » méthode d'identification .....                                 | 18        |
| <b>1.1.2.</b> | <b>Méthodes d'identification de bactéries .....</b>   | <b>18</b> |
| 1.1.2.1.      | Méthode conventionnelle .....   | 18        |
| 1.1.2.2.      | Méthodes émergentes .....   | 19        |
| 1.1.2.2.1.    | Méthodes génomiques.....  | 19        |
| 1.1.2.2.2.    | Méthodes immunologiques .....   | 20        |
| 1.1.2.2.3.    | Méthodes spectrométriques.....  | 21        |
| 1.1.2.3.      | Méthodes explorées par la recherche.....  | 21        |
| 1.1.2.3.1.    | Augmentation de la concentration des bactéries.....   | 21        |
| 1.1.2.3.2.    | Nouvelles stratégies de détection/transduction .....  | 22        |
| <b>1.1.3.</b> | <b>Conclusions sur l'identification bactérienne.....</b>  | <b>24</b> |
| <b>1.2.</b>   | <b>L'approche de la thèse : l'analyse de surnageants bactériens .....</b>                       | <b>24</b> |
| <b>1.2.1.</b> | <b>Composition du surnageant d'une culture bactérienne .....</b>                                | <b>24</b> |
| <b>1.2.2.</b> | <b>Sécrétôme .....</b>  | <b>26</b> |
| <b>1.2.3.</b> | <b>Quorum sensing .....</b>   | <b>26</b> |
| <b>1.2.4.</b> | <b>Utilisation de l'électrochimie pour l'analyse des surnageants bactériens.....</b>            | <b>28</b> |
| <b>1.3.</b>   | <b>La bactérie d'intérêt de la thèse : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....</b>                  | <b>28</b> |
| <b>1.3.1.</b> | <b>Généralités sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....</b>                                      | <b>28</b> |
| 1.3.1.1.      | Importance clinique .....   | 28        |
| 1.3.1.2.      | Identification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en clinique.....                                | 29        |
| 1.3.1.3.      | Thématiques de recherche .....  | 29        |
| 1.3.1.4.      | Souches fréquemment utilisées dans la littérature .....   | 30        |
| <b>1.3.2.</b> | <b>Molécules sécrétées par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</b>                               | <b>30</b> |
| 1.3.2.1.      | Avant-propos : les systèmes de sécrétions de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                | 30        |
| 1.3.2.2.      | Molécules contrôlées par le quorum sensing de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....               | 30        |
| 1.3.2.2.1.    | Systèmes las et rhl, basés sur les N-acylhomosérine lactones.....                               | 31        |
| 1.3.2.2.2.    | Système pqs, basé sur les alkyl-quinolones.....   | 31        |
| 1.3.2.2.3.    | Systèmes complémentaires .....  | 32        |
| 1.3.2.2.4.    | Métabolites secondaires et facteurs de virulence.....   | 32        |
| 1.3.2.3.      | Autres molécules sécrétées .....  | 32        |
| 1.3.2.4.      | Tableau récapitulatif des molécules sécrétées .....   | 32        |
| <b>1.4.</b>   | <b>Détection électrochimique de molécules sécrétées par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....</b> | <b>34</b> |
| <b>1.4.1.</b> | <b><i>Pseudomonas</i> Quinolone Signal et 2-heptyl-4-quinolone.....</b>                         | <b>34</b> |
| 1.4.1.1.      | Biologie.....   | 35        |
| 1.4.1.1.1.    | Souches produisant la 2-heptyl-4(1H)-quinolone et <i>Pseudomonas</i> Quinolone Signal.....      | 35        |
| 1.4.1.1.2.    | Fonctions biologiques .....   | 35        |
| 1.4.1.2.      | Moyens de détection classiques et concentrations in vitro .....                                 | 35        |
| 1.4.1.3.      | Détection électrochimique .....   | 36        |
| 1.4.1.4.      | Autres molécules de la même famille .....   | 38        |
| <b>1.4.2.</b> | <b>Pyocyanine .....</b>   | <b>38</b> |
| 1.4.2.1.      | Biologie.....   | 39        |
| 1.4.2.1.1.    | Souches produisant pyocyanine .....   | 39        |
| 1.4.2.1.2.    | Fonctions biologiques .....   | 39        |
| 1.4.2.1.3.    | Moyens de détection classiques et concentrations in vitro de pyocyanine .....                   | 39        |
| 1.4.2.2.      | Détection électrochimique .....   | 40        |

|               |  |           |
|---------------|--|-----------|
| 1.4.2.3.      | Autres molécules de la même famille .....                              | 43        |
| <b>1.4.3.</b> | <b>2'-aminoacétophénone .....</b>                                      | <b>45</b> |
| 1.4.3.1.      | Biologie.....  | 45        |
| 1.4.3.1.1.    | Souches produisant la 2'-aminoacétophénone .....                       | 45        |
| 1.4.3.1.2.    | Fonctions biologiques .....  | 45        |
| 1.4.3.2.      | Moyens de détection classiques et concentrations in vitro .....        | 45        |
| 1.4.3.3.      | Détection électrochimique .....  | 46        |
| <b>1.4.4.</b> | <b>Détections simultanées de molécules de plusieurs familles .....</b> | <b>47</b> |
| 1.5.          | Les objectifs de la thèse.....   | 48        |

## 1.1. Identification de bactéries en microbiologie clinique

L'identification de bactéries est un enjeu de santé majeur dans de nombreux domaines et plus spécialement en microbiologie clinique et dans l'industrie (notamment agro-alimentaire).

En microbiologie clinique, seules les bactéries pathogènes (c'est-à-dire celles capables d'attaquer l'organisme) sont ciblées. Parmi elles, on distingue les bactéries pathogènes spécifiques qui peuvent infecter les sujets sains, des bactéries pathogènes opportunistes qui se développent seulement chez les patients ayant un mécanisme de défense altéré (lésions de la barrière cutanée, immunodéficience...). En 2005, il y avait 538 espèces de pathogènes humains bactériens répertoriés [6].

### 1.1.1. Avant-propos

#### 1.1.1.1. Détection versus identification

En microbiologie clinique, deux approches sont possibles : détection et identification. La détection de bactéries doit répondre à la question de la présence ou non de bactéries dans un échantillon alors que l'identification doit permettre de nommer les espèces présentes dans l'échantillon. Les 2 approches n'ont pas la même utilité.

La détection est utilisée pour la recherche de pathogènes dans un fluide corporel stérile (comme le sang ou le liquide céphalo-rachidien). Il y a sur le marché de nombreux automates d'hémoculture (culture du sang) dont la fonction est de signaler au plus vite un prélèvement sanguin non stérile. Le fonctionnement de ces automates est basé sur la détection du CO<sub>2</sub> car cette molécule est produite par tous les microorganismes. Une identification est souvent réalisée après la détection.

L'identification consiste à rapprocher un ensemble de marqueurs (morphologiques, métaboliques, génétiques, protéomiques...) de ceux de souches types disponibles dans des tables pour nommer la bactérie. Les différentes stratégies les plus communes pour l'identification sont présentées dans le paragraphe 1.1.2.

#### 1.1.1.2. Taxonomie des bactéries

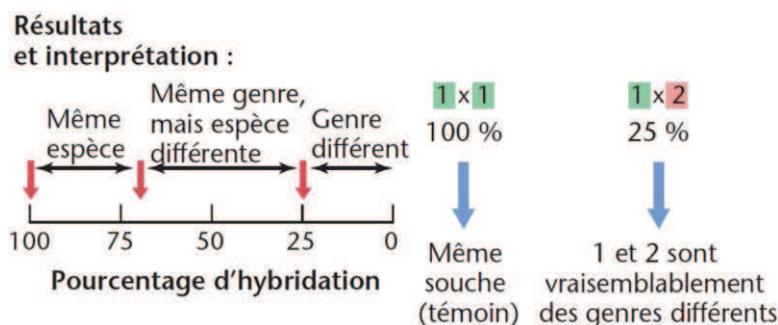
Les bactéries (*Bacteria*) sont un domaine du règne *Procaryotae*. Elles sont subdivisées en différents groupes et sous-groupes dont elles partagent des caractéristiques communes : phylum, classe, ordre, famille, genre puis espèce. Par exemple, la bactérie *Escherichia coli* est classée comme suit :

- phylum : *Proteobacteria*
- classe : *Gammaproteobacteria*

- ordre : *Enterobacteriales*
- famille : *Enterobacteriaceae*
- genre : *Escherichia*
- espèce : *Escherichia coli*

L'appellation usuelle d'une bactérie (par exemple *Escherichia coli*) est composée du genre de la bactérie (*Escherichia*) qui peut être abrégé avec son initiale (*E.*) et de l'espèce (*coli*).

Pour définir une espèce de bactérie, la taxonomie utilise le pourcentage d'hybridation ADN/ADN et la température de fusion des ADN entre la bactérie à nommer et une bactérie de référence de l'espèce. Les étapes suivantes sont réalisées. Tout d'abord, l'ADN est séparé en ses deux brins pour les deux bactéries. Les deux échantillons d'ADN simple brin sont ensuite mélangés et le taux de réassemblage des brins (ou taux d'hybridation) est mesuré. Le pourcentage d'hybridation obtenu est le reflet de la similarité génétique entre les bactéries (Figure 1-1). La taxonomie considère qu'au-delà de 70% de taux d'hybridation et si la température de fusion des ADN (c'est-à-dire la température de désassemblage des brins) n'est pas différente de plus de 5°C de celle de références, les 2 bactéries sont de la même espèce [7]. Pour des valeurs d'hybridation supérieures à 50%, les 2 bactéries sont probablement du même genre [8]. Avec la valeur de 70%, la définition d'espèce de bactéries est assez large. Pour certaines bactéries, on parle couramment de sous-espèce. Le plus fin niveau de classification est la souche. Deux bactéries d'une même souche sont théoriquement des clones (c'est-à-dire qu'elles ont le même génome).



**Figure 1-1 : Utilisation de l'hybridation comme outil de taxonomie, extrait de [8] p236.**

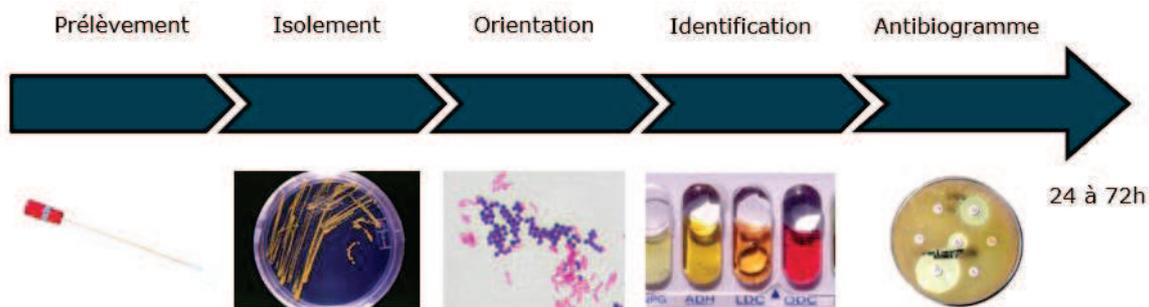
### 1.1.1.3. Du prélèvement au traitement

Lorsqu'une infection bactérienne est suspectée, la première étape est le prélèvement du fluide ou du tissu suspect (sang, urine, selles, sécrétion bronchique, pus, liquide de ponction...).

Dans le schéma classique (Figure 1-2), le prélèvement est ensuite étalé sur une boîte de Pétri dans une étape dite de pré-culture qui permet un isolement des différentes bactéries présentes dans le prélèvement. Le diagnostic est ensuite effectué en 3 étapes :

- Une étape d'orientation : constituée de tests rapides (coloration de Gram, test de l'oxydase et de la catalase...), elle permet de classer le pathogènes dans une grande famille et de déterminer le protocole d'identification à appliquer.
- Une étape d'identification : cette étape permet de nommer l'espèce. Les méthodes utilisées seront développées dans le paragraphe 1.1.2.
- Une étape de recherche de susceptibilité aux antibiotiques (antibiogramme) ou toutes autres caractérisations utiles au traitement (recherche de la production de certaines

toxines par exemple) : ces étapes sont effectuées juste après ou en parallèle de l'étape d'identification.



**Figure 1-2 : Schéma des étapes menant à l'identification de bactéries.**

La durée avant de recevoir le résultat microbiologique du prélèvement est généralement bien plus longue (24 à 72h) que la durée dans laquelle doit être prise la décision thérapeutique (par exemple, moins de 2h dans des cas critiques tels que la sepsis). C'est la raison pour laquelle, la décision thérapeutique est prise essentiellement sur le tableau clinique (c'est à dire les symptômes et la situation du patient) et réadaptée, si nécessaire, en fonction des résultats microbiologiques. Souvent une combinaison d'antibiotiques à large spectre est utilisée en attendant les résultats microbiologiques, pour augmenter les chances de prescrire un antibiotique efficace. Même en prenant ces précautions, il a été estimé en 2009 que dans 20% des cas de septicémie (c'est-à-dire d'infection du sang), le traitement prescrit en première intention est inefficace ce qui conduit à une mortalité 5 fois supérieure pour ce groupe de patients [9].

Pour améliorer cela, il faudrait que la durée entre le prélèvement et les résultats de l'analyse microbiologique soit plus courte que celle de la prise de décision thérapeutique. Cette dernière pourrait alors être optimale : le praticien aurait à sa disposition à la fois le tableau clinique et l'identification du pathogène et de ses susceptibilités.

La première conséquence, à court terme, serait une meilleure survie des patients grâce à l'utilisation du bon antibiotique à la bonne dose dès le début du traitement. A moyen terme, une baisse des fréquences d'observation des bactéries résistantes est attendue. En effet, il est reconnu que l'utilisation massive d'antibiotiques à large spectre sélectionne les souches résistantes et est la cause principale du développement des bactéries résistantes dans les hôpitaux partout dans le monde actuellement.

Bien que l'antibiorésistance soit apparue avant l'utilisation des antibiotiques par l'homme [8] (p713), la prise de conscience de sa réalité date des années 70 [10]. Le concept de « bon usage » des antibiotiques s'est alors répandu. Des instituts spécialisés sur le suivi de l'usage des antibiotiques et de l'antibiorésistance ont été créés aux niveaux national et international (par exemple pour l'Europe l'EUCAST pour *European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing*). Ils fournissent des guides de bonnes pratiques pour l'utilisation des antibiotiques selon le tableau clinique, ainsi que pour l'identification efficace des pathogènes et l'hygiène hospitalière. De plus, des campagnes de prévention destinées au grand public (traditionnellement demandeur d'antibiotiques) sont en place. Néanmoins, les chiffres de l'antibiorésistance obtenus après la mise en place de ces différentes actions restent décevants : des baisses de la fréquence d'apparition de bactéries résistantes ont été observés pour certains pathogènes et certaines régions, mais des hausses l'ont été pour d'autres. Par exemple, pour 29 pays d'Europe sur la période 2011-2014 [2], une augmentation des fréquences de *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* résistantes

aux céphalosporines de troisième génération a été observée tandis qu'une légère baisse des fréquences de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline a été rapportée. Le développement de tests d'identification rapide pourrait permettre d'inverser plus nettement la tendance [3].

Les nouvelles méthodes d'identification bactérienne cherchent à supprimer ou rassembler les étapes après le prélèvement pour réduire le temps total avant identification. Elles seront aussi présentées dans le paragraphe 1.1.2.

#### 1.1.1.4. Caractéristiques d'une « bonne » méthode d'identification

Pour qu'une méthode d'identification donne l'identification juste, il faut qu'elle ait un « bon » pouvoir discriminant (c'est-à-dire une grande différence entre le signal donné par différentes espèces bactériennes), ainsi qu'un « bon » pouvoir d'identification (c'est-à-dire peu de différence sur le signal lorsque les conditions d'analyse varient légèrement : température, opérateur...).

La pertinence de l'identification est aussi caractérisée par les notions de sensibilité et de spécificité. Une méthode sensible classera positif les échantillons effectivement positif (pas de faux négatifs). Une méthode spécifique classera négatif les échantillons effectivement négatif (pas de faux positifs).

Ces prérequis sont indispensables pour parler d'identification. Néanmoins, une méthode d'identification développée en laboratoire de recherche sera d'autant plus facilement transposée en clinique si elle est (dans l'ordre d'importance) : rapide, simple d'utilisation et peu chère (ou moins chère que les méthodes existantes).

---

### 1.1.2. Méthodes d'identification de bactéries

Les méthodes d'identification existantes peuvent être séparées en 3 catégories : la méthode conventionnelle en place actuellement dans tous les laboratoires de microbiologie clinique, les méthodes émergentes présentes dans les laboratoires hospitaliers de pointe et pour finir les méthodes au stade de la recherche.

#### 1.1.2.1. Méthode conventionnelle

Cette méthode s'intéresse au métabolisme des bactéries et plus particulièrement à leurs interactions avec leur milieu de croissance. Elle vise à mettre en évidence par exemple :

- les sources d'énergie que la bactérie peut utiliser, en observant s'il y a croissance bactérienne en présence de seulement tel ou tel substrat,
- les voies de dégradation de certains substrats sous certaines conditions de culture (activité enzymatique de la bactérie),
- les substances sécrétées par la bactérie en phase liquide ou en phase gazeuse qui sont les produits finaux d'ensemble de réactions métaboliques.

Historiquement ces différentes caractéristiques étaient testées sur boîte de Pétri. Aujourd'hui, elles sont testées grâce à des galeries commerciales (Figure 1-3) spécialisées en fonction de la famille de bactéries à détecter. Ces galeries sont composées de plusieurs petits tubes embarquant des réactifs lyophilisés pour tester différents aspects de la biochimie de la bactérie. La galerie est inoculée avec une suspension de la bactérie préalablement isolée et cultivée pour avoir une biomasse entre  $10^6$  et  $10^8$  CFU/mL. Après 18 à 24h d'incubation, chaque test peut être lu positif ou négatif grâce à des changements de couleur. On trouve sur le marché, par exemple,

les Galeries API (bioMérieux), Enterotube II (Becton Dickinson), Micro-ID (Thermo-Scientific). Il faut ensuite comparer les résultats obtenus aux bases de données du fabricant pour obtenir l'identification. Ces tests peuvent aussi être effectués par des automates qui réalisent tout seuls les étapes de remplissage, incubation et lecture des résultats. En outre, les automates d'identification donnent un résultat plus rapidement que la version manuelle du test. Il y a, par exemple sur le marché, les automates Vitek (bioMérieux) et Phoenix (Becton Dickinson).



**Figure 1-3 : Exemple de galeries commerciales pour l'identification (<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4877744>)**

Outre le désavantage lié à sa durée avant obtention des résultats (culture d'isolement + 8 à 24h), la fiabilité de cette méthode est parfois critiquée[11]. En effet, la signature obtenue est dépendante de l'historique de la souche analysée (conditions de culture). Il peut en résulter un écart entre la signature acquise sur une souche cultivée en laboratoire (base de données) et la signature acquise sur la souche isolée à partir du patient.

Pour réduire le temps et le nombre d'étape avant identification, une nouvelle technique est de plus en plus développée par les entreprises du diagnostic. Il s'agit de l'utilisation de boîte de Pétri avec un milieu chromogène. Ces milieux (par exemple chromID chez bioMérieux) contiennent un substrat chromogène qui colore le milieu, lorsqu'il est dégradé par une voie enzymatique choisie. La voie enzymatique de dégradation est choisie pour correspondre seulement à une bactérie ou une famille de bactérie particulièrement courante dans le fluide corporel étudié. La boîte de milieu chromogène peut donc être utilisée comme culture d'isolement et conduire à une identification dès cette étape si la bactérie en présence est celle visée par le substrat chromogène. Les boîtes sur le marché sont de plus en plus complexes et permettent d'identifier maintenant plusieurs bactéries en incluant plusieurs substrats. Toutefois la durée d'incubation reste longue (entre 24 et 48h).

#### 1.1.2.2. Méthodes émergentes

Ces méthodes, déjà commercialisées sont de plus en plus présentes dans les laboratoires hospitaliers. Elles appartiennent à 3 catégories différentes : les méthodes génomiques, les méthodes immunologiques et les méthodes spectroscopiques.

##### 1.1.2.2.1. Méthodes génomiques

Pour ces méthodes, l'identification repose sur la reconnaissance de fragments d'ADN ou ARN. Elles sont souvent composées de 4 étapes :

- Amplification de la biomasse. Le but est d'obtenir quelques microlitres de solutions avec au moins  $10^3$  CFU/mL.
- Lyse des cellules et extraction de l'ADN ou ARN.
- Amplification de brins d'ADN ou ARN. Pour cette étape la réaction en chaîne par polymérase (PCR) est très souvent utilisée. Elle permet en moins d'une heure de

réaliser plusieurs milliards de copie de brins d'ADN ou ARN. Le principe est d'effectuer une succession de cycles de transition de température au cours desquels le brin est dénaturé puis dupliqué. L'amplification est faite sélectivement en choisissant des amorces correspondantes aux séquences d'intérêt.

- Lecture des résultats. Ils peuvent être suivis en temps réel pendant l'étape d'amplification par fluorescence. L'électrophorèse est ensuite utilisée pour confirmer le poids moléculaire de la séquence amplifiée.

A leur apparition, les techniques de biologie moléculaire ont révolutionné le classement des bactéries comme celui des autres organismes. En effet, de nombreuses erreurs de taxonomie avaient été faites en se basant seulement sur le phénotype.

Dans la pratique, les bactéries dont l'identification échoue avec les tests biochimiques conventionnels subissent automatiquement une analyse moléculaire. La méthode qui s'est imposée comme universelle [11] est le séquençage d'une partie de l'ARN ribosomal : l'ARNr 16S. Cette partie de l'ARN intervient dans la traduction de l'ARN messager en protéines : il est présent en grande quantité chez tous les procaryotes et a de nombreuses régions variables. Les variations de cette séquence sont disponibles pour les différentes espèces dans des bases de données. Parfois, le séquençage de l'ARN 16S ne suffit pas seul, il faut compléter l'analyse en séquençant des parties de l'ADN spécifique à certain genre de bactéries (par exemple, le gène *rpoB* pour les entérobactéries ou *sodA* pour les streptocoques).

Des kits de PCR sont vendus pour la détection de certaines catégories de bactéries, par exemple ARGENE (bioMérieux), GeneOhm (Becton Dickinson). Les désavantages de ces méthodes sont néanmoins nombreux. En effet, les méthodes génomiques ne permettent pas de supprimer les étapes d'orientations car les séquences d'amorce (et donc les kits de PCR) dépendent du type de bactéries à identifier. L'étape de croissance de la biomasse prend aussi du temps et rallonge le processus d'identification. Les réactifs utilisés sont coûteux, notamment à cause de l'utilisation massive d'enzymes et un personnel qualifié est nécessaire. Pour répondre à ce dernier inconvénient, des automates de PCR sont apparus sur le marché, comme FilmArray (bioMérieux).

---

#### 1.1.2.2.2. Méthodes immunologiques

Le principe des méthodes immunologiques est de fixer sur une surface un anticorps qui devra reconnaître un ou plusieurs antigènes complémentaires. Ces antigènes complémentaires peuvent appartenir à une bactérie, des fragments bactériens ou bien au fluide corporel du patient (antigènes issus de la réponse immunitaire). Les anticorps utilisés pour la reconnaissance sont le plus souvent issus de la réponse immunitaire d'animaux.

La détection qui suit la capture peut être réalisée grâce à de nombreuses méthodes : agglutination, précipitation, chromatographie sur bandelettes, tests ELISA... Des automates fonctionnant sur ces principes sont aussi présents sur le marché : VIDAS et Mini-VIDAS (bioMérieux), Tecra Salmonella ELISA (International Bioproducts), et Salmonella Tek ELISA (Organon Teknika).

Comme pour les méthodes précédentes, un enrichissement est souvent nécessaire, ce qui rallonge la durée avant identification. De plus, les anticorps utilisés sont chers ce qui augmente le coût de la méthode.

---

### 1.1.2.2.3. Méthodes spectrométriques

Avec le perfectionnement et la baisse des coûts des spectromètres de masse, les méthodes d'identification utilisant ces appareils se développent rapidement [12]. Le principe est d'identifier la bactérie en se basant sur sa composition en protéines ou acides gras. La technique la plus courante est le MALDI-TOF (pour *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation time-of-flight-Mass Spectrometry*) [13]. Brièvement, comme pour la PCR, après une amplification de la biomasse de l'échantillon, les cellules sont lysées et les protéines ou/et les acides gras sont extraits. Ils sont ensuite désorbés et ionisés par un laser puis accélérés dans un champ électrique. Les différents fragments de protéines atteignent ensuite un détecteur après un temps, appelé temps de vol, qui dépend de leur rapport masse/charge. Un spectre qui forme une empreinte du protéome de la bactérie est obtenu. Ces spectres sont ensuite comparés à des bases de données pour réaliser l'identification.

Plusieurs appareils commerciaux basés sur cette technique sont disponibles : VITEK MS (bioMérieux), AccuPRO-ID (Accugenix), MALDI Biotyper (Bruker).

L'avantage des méthodes spectrométriques réside dans leur puissance d'identification : la sensibilité et la spécificité sont grandes. De plus, le résultat est accessible en quelques minutes à partir de la culture d'isolement. Mais, les appareils sont coûteux et nécessitent un personnel hautement qualifié.

### 1.1.2.3. Méthodes explorées par la recherche

Les méthodes explorées actuellement en recherche sont nombreuses et de natures très différentes. Chaque méthode permet d'accéder à différentes caractéristiques de la bactérie qui sont tout autant d'éléments d'identifications possibles (biochimie, affinité avec certaines molécules, signature moléculaire...). Les méthodes permettant d'exploiter ses éléments d'identification (on parle de méthodes de transduction) sont aussi très variées (optique, électrochimique, gravimétrique...). Aucune voie générique n'a été pour l'instant mise en évidence. C'est pourquoi, une multitude de voies sont étudiées. Elles peuvent être découpées en 2 catégories, celles portant sur :

- l'augmentation locale de la concentration des bactéries (paragraphe 1.1.2.3.1),
- de nouvelles stratégies de détection/transduction (paragraphe 1.1.2.3.2).

---

#### 1.1.2.3.1. Augmentation de la concentration des bactéries

La plupart des méthodes d'identification nécessite un nombre suffisant de bactéries pour fonctionner. Augmenter ce nombre est particulièrement intéressant si la méthode de transduction utilisée par la suite implique une surface. Pour cela, la principale stratégie utilisée est la capture des bactéries pour forcer leur croissance en 2D plutôt que dans le volume. Cette capture est traditionnellement réalisée grâce à un anticorps comme présenté dans le paragraphe 1.1.2.2.2 pour l'identification immunologique.

Actuellement, la recherche explore d'autres voies de capture comme l'utilisation de molécules artificielles (les aptamères par exemple) ou bien l'utilisation de protéines extraites de virus bactériens (les bactériophages).

#### 1.1.2.3.2. Nouvelles stratégies de détection/transduction

Les paragraphes ci-dessous présentent quelques-unes des nouvelles stratégies de détection/transduction connaissant un grand succès dans la recherche. La littérature étant abondante sur le sujet, cette liste n'est pas exhaustive et met l'accent sur les voies de recherche développées au Département des Technologies pour la Biologie et la Santé du CEA-LETI.

##### ➤ Amélioration des méthodes génomiques

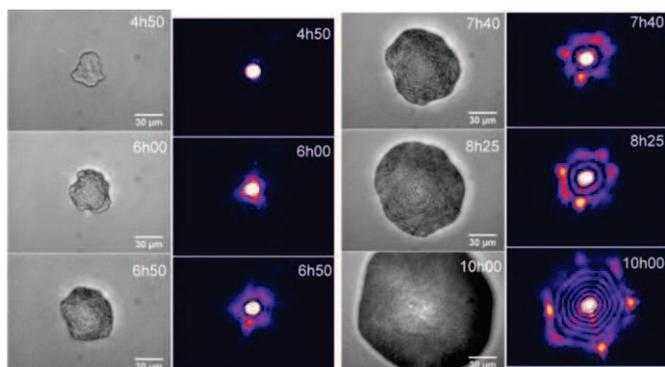
Des recherches sont effectuées pour trouver des protocoles permettant de dupliquer le matériel génétique de manière plus rapide et facile que la PCR présentée en 1.1.2.2.1. Par exemple, il y a la méthode LAMP pour *Loop mediated isothermal amplification* [14] ou la méthode RPA pour *Recombinase Polymerase Amplification* [15] qui s'effectuent, contrairement à la PCR, à température constante. L'objectif final est de proposer des méthodes de terrain à bas coût qui soient basées sur la génomique.

##### ➤ Méthodes basées sur l'application de champ physique

Le principe est d'observer comment la bactérie absorbe, réémet, interfère avec un champ physique. Les champs utilisés sont très variés et issus de la science des matériaux : microscopie optique traditionnelle, Raman [16], infrarouge, UV, électrique, magnétique....

Certaines de ces méthodes sont destructives, d'autres ne le sont pas selon le type de rayonnement et son intensité. Pour les méthodes non destructives, en plus de l'analyse de l'aspect de la bactérie isolée ou des colonies à un instant donné, des paramètres cinétiques (vitesse de croissance, changement morphologiques...) peuvent aussi être observés.

Plusieurs approches sont développées dans ce sens dans le Département des Technologies pour la Biologie et la Santé du CEA-LETI. La microscopie Raman a été utilisée pour suivre la croissance de différentes bactéries au cours du temps [17]. La signature obtenue change avec l'activité moléculaire de la bactérie. Il a aussi été montré qu'il est possible de focaliser le signal sur une unique bactérie pour en obtenir l'identification [18]. Des techniques de diffusions élastiques de la lumière sont aussi explorées. Elles ont l'avantage de ne pas être aussi dépendantes de la composition des milieux de culture que les méthodes Raman, car elles s'intéressent à des paramètres morphologiques. Il a été montré qu'une identification précoce (au bout de 6h) peut être obtenue par cette méthode [19], [20] en travaillant dans l'espace réciproque (Figure 1-4). Ces deux techniques sont développées avec de l'imagerie sans lentille pour réduire l'encombrement et le coût des dispositifs.



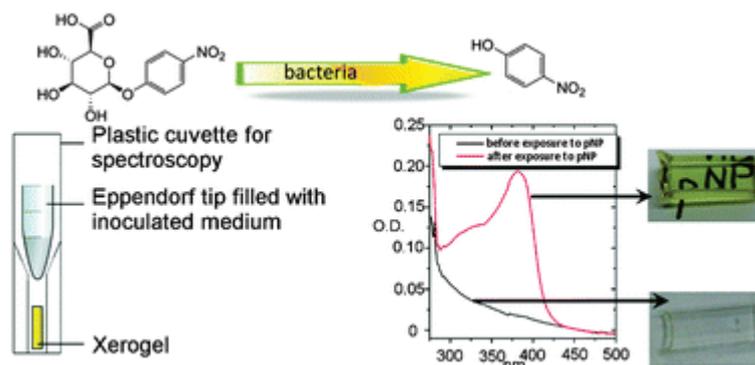
**Figure 1-4 : Image de la croissance d'une colonie de *E. coli* dans l'espace direct et dans l'espace réciproque, extrait de [19].**

#### ➤ Analyses de métabolites

Ces méthodes sont de la même nature que la méthode conventionnelle présentée en 1.1.2.1. Elles analysent la présence ou l'absence de certaines espèces en solution, ou dans la phase gazeuse au-dessus de la culture, en utilisant tout le spectre des méthodes d'analyse moléculaires. Plusieurs de ces méthodes sont très sensibles et peuvent donner des résultats plus rapides que la méthode colorimétrique conventionnelle des tests biochimiques.

Lors de l'analyse des molécules présentes en solution ou en phase gazeuse, on s'intéresse essentiellement aux molécules sécrétées par la bactérie (son secrétôme) ainsi qu'à leurs éventuelles réactions chimiques sur d'autres molécules. Cet ensemble de molécules a pour avantage d'être spécifique à une souche bactérienne dans une condition de culture [21]. Il y a à la fois des molécules produites seulement par une ou quelques espèces et d'autres émises par presque toutes les espèces [22]. L'identification est donc basée sur la présence de plusieurs molécules. On parle de signature de la bactérie.

Les méthodes en phase gazeuse sont particulièrement développées car elles permettent de s'affranchir de la matrice de croissance qui peut rendre les analyses en liquide plus compliquées. Dans cette catégorie, les méthodes de détection les plus utilisées sont la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse ou à l'ionisation de flamme et les nez électroniques [23]. Ces derniers font l'objet de nombreuses recherches car ils peuvent conduire à un dispositif portable, peu cher et applicable à de nombreux domaines autre que l'identification de pathogènes. Des recherches sont en cours au sein du Département des Technologies pour la Biologie et la Santé du CEA-LETI sur des nez électroniques à base de matrices nano-poreuses à grandes surfaces développées permettant la détection de métabolites volatils bactérien par transduction optique directe [24], [25]. Deux voies sont explorées. La première consiste à détecter les métabolites bactériens produits naturellement par la bactérie, par exemple le sulfure d'hydrogène par *Salmonella*. La seconde (Figure 1-5) consiste à ajouter au milieu de culture une espèce chimique qui pourra être métabolisée spécifiquement par la bactérie que l'on veut identifier. La molécule est choisie pour que l'un de ses produits soit volatile et ait une activité optique. Ce produit est alors pré-concentré dans une matrice nano-poreuse placée à proximité de la culture. Une détection optique est ensuite effectuée selon la nature de la molécule. L'exemple de la Figure 1-5 détecte un changement de spectre d'absorption de la matrice nano-poreuse.



**Figure 1-5 : Principe de fonctionnement de la détection de bactérie par métabolites volatiles développée au sein du Département des Technologies pour la Biologie et la Santé du CEA-LETI, extrait de [24].**

En phase liquide, les analyses sont principalement basées sur la spectroscopie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC pour *High Performance Liquid Chromatography*). Cette méthode n'est pas utilisée à une fin d'identification de bactéries mais pour leur étude fondamentale, ce type d'analyse utilisant des appareils coûteux et du personnel hautement qualifié. Le développement d'autres méthodes d'analyse, facile à utiliser, peu cher et pouvant conduire à un dispositif portable pourrait contribuer à faire de la détection de métabolites en solution une voie privilégiée pour l'identification. L'électrochimie, la méthode choisie pour la thèse, rentre dans cette catégorie.

### 1.1.3. Conclusions sur l'identification bactérienne

L'identification de bactéries est une vraie problématique de santé publique. Elle a un impact à la fois à court terme sur la survie du patient et à plus long terme sur le développement de l'antibiorésistance. De nombreuses méthodes ont été ou sont en cours de développement pour permettre une identification sensible, spécifique, rapide, peu chère et facile d'utilisation. Le but est d'obtenir une méthode qui pourrait être utilisée partout et ainsi avoir un impact sur l'antibiorésistance. Bien qu'aucune méthode parfaite n'ait encore été trouvée, les moyens d'identification explorés sont nombreux et de natures très diverses. Ils devraient probablement à terme permettre de répondre à cette problématique en trouvant des moyens d'identification adaptés à toutes les situations.

## 1.2. L'approche de la thèse : l'analyse de surnageants bactériens

Dans le cadre de cette thèse, une approche originale a été choisie : il s'agit de l'analyse électrochimique de surnageants bactériens. Les paragraphes ci-dessous présentent ce qu'est un surnageant de culture bactérienne ainsi que les molécules le constituant, puis l'intérêt de l'électrochimie pour cette analyse.

### 1.2.1. Composition du surnageant d'une culture bactérienne

On appelle surnageant de culture bactérienne, le liquide dans lequel croît la bactérie. Il peut être artificiel. C'est le cas des milieux de culture utilisés en laboratoire de microbiologie. Il

existe de nombreux milieux commerciaux qui peuvent être utilisés immédiatement ou après hydratation (milieu Bouillon Lysogène (LB), Bouillon Trypcase Soja (TSB)...), mais on peut aussi fabriquer les milieux soi-même pour pouvoir choisir exactement leurs compositions et orienter ainsi la culture. Le surnageant peut aussi être d'origine naturelle. En microbiologie clinique, il s'agit des fluides corporels dans lesquelles se sont développées les bactéries. En microbiologie industrielle : il peut s'agir de matrices alimentaires, de liquides, de préparations pharmaceutiques...

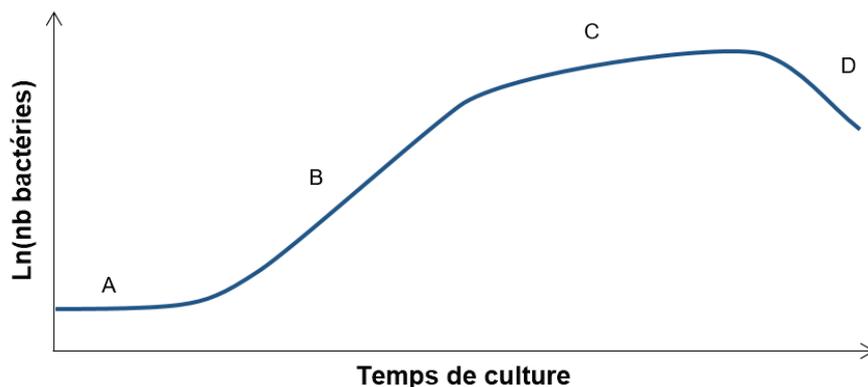
Quel que soit la nature du milieu de culture, les éléments ci-dessous doivent être présents pour pouvoir permettre une croissance bactérienne :

- source de carbone et d'énergie (par exemple le glucose),
- source de potassium et de phosphore (par exemple  $K_2HPO_4$ ),
- source d'azote et de soufre (par exemple  $(NH_4)_2SO_4$ ),
- source de magnésium (par exemple  $MgCl_2$ ),
- source de calcium (par exemple  $CaCl_2$ ),
- source de fer: (par exemple le citrate de fer),
- source d'oligo-éléments: sels de Cu, Zn, Co, Ni, B, Ti...
- source d'eau.

Un milieu de culture contenant ces éléments est appelé milieu minimum. En pratique, les milieux dits « riches » sont plutôt utilisés. Ces milieux ne contiennent plus seulement les éléments chimiques nécessaires à la vie de la bactérie mais aussi de nombreux acides-aminés et protéines que la bactérie pourra réutiliser pour ses propres synthèses. Ces milieux riches permettent ainsi une croissance plus rapide des bactéries. Pour obtenir un milieu riche, de la matière organique est ajoutée (extrait de levure, sang, œuf, hydrolysate de cœur et de cervelle...).

La croissance bactérienne est une production de biomasse, par multiplication et/ou par grandissement des bactéries. Les phases de croissance bactérienne dans un milieu non renouvelé sont présentées dans la Figure 1-6 :

- phase de latence A : c'est une phase d'adaptation à un nouveau milieu durant laquelle les bactéries synthétisent les enzymes nécessaires à extraire les éléments nutritifs du milieu. Il n'y a pas de division cellulaire.
- phase d'accélération : les bactéries commencent à se diviser.
- phase exponentielle B : le temps qui sépare deux divisions successives (ou temps de génération) est minimal. La population de bactérie double à chaque fois que le temps de génération est écoulé.
- phase de décélération : les nutriments du milieu sont plus rares et les déchets sont nombreux : le temps de génération commence à diminuer, mais la population de bactérie continue à augmenter.
- phase stationnaire C : le nombre de bactérie n'évolue plus : il y en a autant qui meurent que de nouvelles divisions.
- phase de déclin D : les bactéries meurent plus rapidement qu'elles ne se divisent à cause du manque de nutriments : la population bactérienne diminue.



**Figure 1-6 : Logarithme du nombre de bactérie au cours du temps lors d'une croissance bactérienne dans un milieu non renouvelé.**

Outre les éléments de base du milieu de culture présenté ci-dessus et toutes autres molécules présentes naturellement dans le surnageant, de nombreux autres composés du surnageant de culture sont dus à l'action des bactéries. Il peut s'agir à la fois de molécules sécrétées par les bactéries, ou de molécules venant de la dégradation d'éléments du surnageant. Ce sont ces composés qui sont intéressants pour l'identification bactérienne car ils sont le reflet du métabolisme de la bactérie.

### 1.2.2. Sécrétôme

Il s'agit de la partie intéressante du surnageant pour l'identification. Le terme secrétôme regroupe toutes les molécules sécrétées par la bactérie. Ces métabolites peuvent être de différents types : des produits de dégradation liés au métabolisme interne des bactéries, des molécules impliquées dans la communication entre individus, des toxines, des facteurs de virulence...

Ces molécules sont très étudiées par les équipes de biologie fondamentale [26], [21]. Leur but principal est de mieux comprendre le fonctionnement des bactéries, et notamment l'importance de chaque gène ou opéron sur les mécanismes de régulation et de pathogénicité. Ces études sont classiquement réalisées à l'aide de souches mutantes et des techniques de biologie moléculaires : extraction d'ADN et d'ARN, électrophorèse, hybridation fluorescente, chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS pour *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*), chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC pour *High Performance Liquid Chromatography*) ...

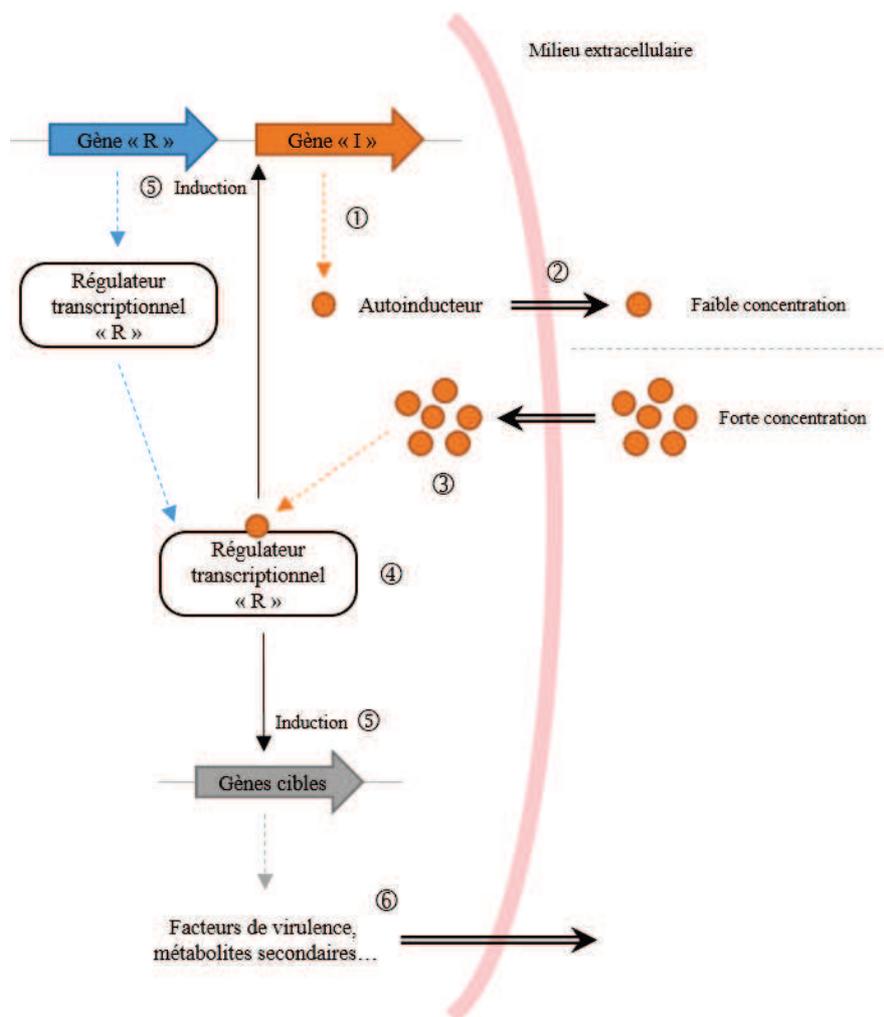
### 1.2.3. Quorum sensing

Une partie des molécules du secrétôme sont impliquées dans la communication bactérienne. En effet, les chercheurs ont mis en évidence qu'un grand nombre de bactéries sécrètent des messagers chimiques (les autoinducteurs ou AIs) leur permettant d'adapter leur comportement à leur environnement et à leur population [27]. Cet ensemble de mécanismes de coordination est appelé quorum sensing (QS). Son fonctionnement générale pour les bactéries Gram négative est de type LuxR/LuxI et est représenté sur la Figure 1-7 et décrit ci-dessous :

- Durant leur phase de croissance, les bactéries synthétisent de petites molécules : les AIs ①.

- Ces dernières sont ensuite sécrétées dans le milieu extracellulaire ②.
- Leur concentration augmente avec la population bactérienne à la fois dans le milieu extracellulaire et dans le cytoplasme ③.
- Lorsqu'un certain seuil de concentration est atteint, une réaction a lieu avec un régulateur transcriptionnel présent dans le cytoplasme des bactéries ④.
- Cette réaction déclenche l'expression de gènes cibles et une auto-induction de la production des AIs ⑤.
- Les gènes cibles s'activent et synthétisent des facteurs de virulence et des métabolites secondaires ⑥.

De cette manière, les bactéries communiquent entre elles pour mettre en place des stratégies d'attaque et/ou de survie en fonction de leur situation.



**Figure 1-7 : Représentation schématique du fonctionnement du quorum sensing.**

Les AIs peuvent être spécifiques à des bactéries ou des catégories de bactéries. Pour les bactéries Gram +, les AIs sont principalement dérivés de petits peptides, pour les Gram -, d'acides gras. Les composés régulés par le QS, eux, peuvent être de natures très variées : de protéines à petites molécules. Les AIs ainsi que ces molécules sont de bons candidats pour l'identification de bactéries car elles sont le résultat de chaînes réactionnelles faisant intervenir de nombreux gènes de la bactérie.

#### 1.2.4. Utilisation de l'électrochimie pour l'analyse des surnageants bactériens

L'utilisation de l'électrochimie pour l'analyse des molécules sécrétées dans le surnageant bactérien est très nouvelle. Elle a démarré après la découverte de plusieurs molécules donnant de forts signaux redox dans le surnageant de bactéries du genre *Pseudomonas*.

L'électrochimie a de nombreux avantages pour l'identification : c'est une méthode qui permet des analyses *in situ*, rapides et peu chères dans la plupart des milieux. A terme le développement d'un dispositif portable permettant des analyses sur le terrain et en temps réel est envisageable. Le principal désavantage de l'électrochimie pour cette application est qu'elle adresse seulement une petite partie du secrétôme de la bactérie : celle électrochimiquement active. L'un des buts de la thèse est de montrer que cette partie est suffisamment riche pour obtenir des spectres intéressants pouvant conduire à une identification de certaines bactéries.

Le lecteur pourra trouver une présentation de l'électrochimie et de ses méthodes dans l'Annexe 1.

---

### 1.3. La bactérie d'intérêt de la thèse : *Pseudomonas aeruginosa*

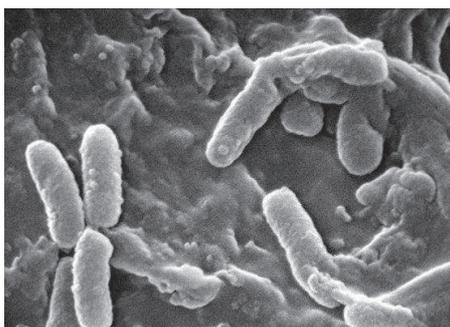
Pour évaluer l'intérêt de la détection électrochimique de molécules du surnageant bactérien, la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* a été choisie car elle produit plusieurs molécules redox (notamment la toxine pyocyanine). De plus, son importance en microbiologie clinique est grande. Ces deux caractéristiques en font un candidat de choix pour notre étude.

---

#### 1.3.1. Généralités sur *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* (PA) est un bacille (voir Figure 1-8) à Gram négatif de la famille des *Pseudomonadaceae*. Elle ne produit pas de spores et a une seule flagelle.

C'est une bactérie ubiquitaire de l'environnement humide, c'est-à-dire qu'elle peut vivre dans tous les milieux humides, qu'ils soient vivants ou non. Elle peut être un pathogène pour l'homme, le plus souvent de manière opportuniste.



**Figure 1-8 : Image de *Pseudomonas aeruginosa* par microscope électronique à balayage**  
([http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pseudomonas\\_aeruginosa\\_SEM.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pseudomonas_aeruginosa_SEM.jpg))

##### 1.3.1.1. Importance clinique

PA est l'une des 5 premières causes d'infections nosocomiales en Europe (4<sup>e</sup> en 2011/2012 pour les hôpitaux de soins de courtes durées [4], 5<sup>e</sup> en 2013 pour ceux de longues durées [28]). Elle peut infecter tous les organes et être la cause de nombreuses maladies [2] :

pneumonies (notamment acquises sous ventilation mécanique), infections des voies sanguines et urinaires, infections cutanées (notamment des plaies des grands brûlés), otites externes, infections oculaires, surinfections des patients atteints de mucoviscidose... Elle est naturellement multi-résistante à de nombreux antiseptiques et antibiotiques notamment à cause de l'imperméabilité de sa membrane et à ses pompes d'efflux qui transportent les antibiotiques en dehors de la cellule. Seuls quelques antibiotiques peuvent être utilisés : certaines fluoroquinolones, les aminosides, certains bêta-lactamines et polymyxines [2]. Environ 10% des souches examinées dans les hôpitaux européens en 2014 sont résistantes à un ou plusieurs de ces antibiotiques. 14.9% sont résistantes à au moins 3 groupes d'antibiotiques [2]. C'est donc une bactérie qui est surveillée de très près par les autorités sanitaires.

### 1.3.1.2. Identification de *Pseudomonas aeruginosa* en clinique

Si après les tests d'orientation, une bactérie du genre *Pseudomonas* ou une autre bactérie qui ne fermente pas le glucose est suspectée, la procédure d'identification conseillée par *the Public Health England* [29] est la suivante :

- Isolement sur des :
  - milieux de culture sélectifs de *Pseudomonas* (ou de l'agar classique) avec de la cétrimide à 35-37°C pendant 16 à 48h,
  - milieux de culture sélectifs de *Burkholderia* à 35-37°C pendant 48 à 72h,
  - géloses au sang ou au sang cuit sous 5 à 10% de CO<sub>2</sub> à 35-37°C pendant 16 à 48h,
  - géloses CLED (Cystine Lactose Electrolyte Déficient) ou McConkey à 35-37°C pendant 16 à 48h.
- Reconnaissance morphologique (pour PA : pousse sur les milieux sélectifs à *Pseudomonas* avec cétrimides, colonies généralement à bords dentelés, entourées de pigments bleu-vert, fluorescents à la lumière ultraviolette. Odeur de raisin.)
- Test de l'oxydase (pour PA : positif).
- Identification de l'espèce basée sur l'ensemble des caractéristiques vues. Eventuellement d'autres tests (utilisation de galeries, de la technique MALDI-TOF ou de la PCR) peuvent être faits pour confirmer le diagnostic.

Cette procédure prend du temps (entre 1 et 2 jours) et elle est complexe (beaucoup d'étapes et de boîtes de culture), ce qui retarde l'identification.

### 1.3.1.3. Thématiques de recherche

Les thématiques de recherche actuellement développées autour de PA touchent à la fois la clinique et l'environnement. En clinique, les recherches s'attachent à la compréhension de plus en plus fine du fonctionnement de la bactérie, avec notamment l'étude :

- du quorum sensing [30], [31], [32], avec comme second objectif de mettre en lumière des moyens de l'inhiber (on parle de *quorum quenching*) [33], [34],
- des mécanismes de pathogénicité [35], avec notamment des études sur le passage de la primo-infection à l'infection chronique chez les patients ayant la mucoviscidose [36], [37],
- des mécanismes de résistances aux antibiotiques [38],
- des variations de génotype de la bactérie [39], [40].

En ce qui concerne les sujets environnementaux, les deux principaux sont :

- Les piles à combustible microbiennes [41], [42] : le but est de produire de l'électricité grâce à un biofilm de PA. La recherche s'attache donc principalement à créer des souches mutantes de PA produisant plus de courant grâce à la production en plus grande quantité de certains métabolites redox.
- La décontamination des sols (bioremédiation) [43], [44] : le but est d'utiliser PA pour détruire certaines molécules carbonées.

#### 1.3.1.4. Souches fréquemment utilisées dans la littérature

A l'exception des études impliquant des prélèvements cliniques, toutes les autres études sur la bactérie sont réalisées utilisant des souches modèles conservées dans des souchiers. Ces souches sont initialement extraites d'isolats cliniques puis conservées à très basse température. Leur utilisation permet de comparer les expériences réalisées par plusieurs équipes, une même souche ayant normalement le même génome. En pratique, ce n'est pas exactement le cas, la souche étant cultivée depuis de nombreuses années, des mutations ont pu apparaître. Les publications étudient et utilisent le plus souvent les deux souches suivantes :

- PAO1 (ATCC 15692) : souche sauvage isolée chez un patient grand brûlé, c'est la souche la plus utilisée dans la littérature, son agressivité est moyenne,
- PA14 (UBPPC-PA14) : souche sauvage isolée chez un patient grand brûlé, elle est très agressive [45].

Des mutants de ces souches sont aussi utilisés pour étudier l'influence de la présence et de l'absence de certains gènes. Pour signifier, par exemple, que le gène *pqsA* a été supprimé chez la souche PAO1, la souche est identifiée sous le libellé PAO1 $\Delta$ *pqsA*.

---

#### 1.3.2. Molécules sécrétées par *Pseudomonas aeruginosa*

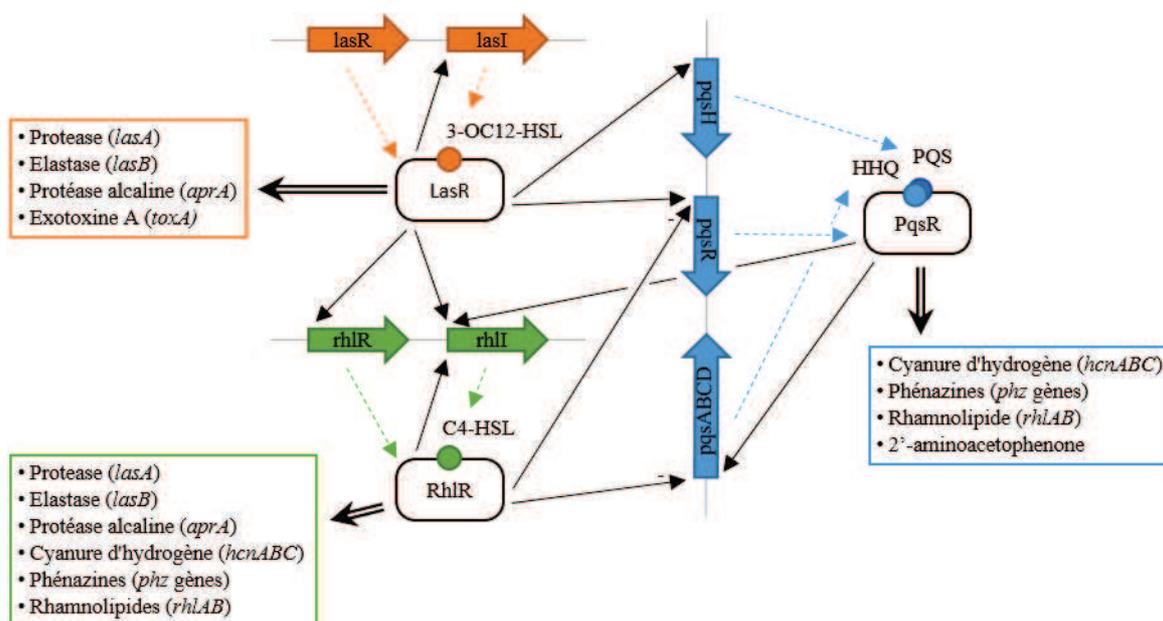
Après la présentation générale de PA ci-dessus, les paragraphes suivants s'intéressent aux molécules sécrétées par PA dans le but final de choisir certains composés comme cibles pour l'analyse électrochimique.

##### 1.3.2.1. Avant-propos : les systèmes de sécrétions de *Pseudomonas aeruginosa*

Un système de sécrétion est un ensemble de protéines assemblées en une structure particulière permettant de transférer les molécules synthétisées dans la bactérie vers le milieu extérieur (ou surnageant bactérien) au travers de l'enveloppe bactérienne. PA possède de nombreux systèmes de sécrétion de différents types [46]. Ils diffèrent par leur structure traversant soit en même temps les membranes intérieur et extérieur et le périplasme ou seulement l'une des deux membranes. Les molécules sécrétées par chaque système peuvent différer.

##### 1.3.2.2. Molécules contrôlées par le quorum sensing de *Pseudomonas aeruginosa*

PA possède le quorum sensing (QS) le plus étudié actuellement [47]. Il est composé d'au moins trois systèmes distincts. Deux sont basés sur des AIs du type N-acylhomosérine lactones (AHLs), ce sont les systèmes *las* et *rhl* [48]. Le troisième est basé sur les alkyl-quinolones (AQs), c'est le système *pqs*. Ces 3 systèmes ne sont pas indépendants : ils sont inter-régulés. La Figure 1-9 résume leurs fonctionnements détaillés dans les paragraphes suivants.



**Figure 1-9 : Schéma simplifié du fonctionnement du quorum sensing de *Pseudomonas Aeruginosa*.**

#### 1.3.2.2.1. Systèmes *las* et *rhl*, basés sur les N-acylhomosérine lactones

Les AHLs sont des acides gras liés par une liaison peptidique à des homosérines lactones. Ce type de molécule est très courant chez toutes les bactéries Gram négatif [47]. Chez PA, deux jouent le rôle d'AIs majeur : la *N*-(3-Oxododecanoyl)-L-homosérine lactone (3-OC12-HSL) et la *N*-butyryl-L-Homosérine lactone (C4-HSL). Leur concentration est directement liée à la densité bactérienne [47]. Quelques autres AHLs sont détectables à des niveaux plus bas chez PA [47].

Dans le système *las* (Figure 1-9, orange), *lasI* produit directement la 3-OC12-HSL. Cet AI va réguler, en déclenchant le transcritteur LasR, la production de plusieurs facteurs de virulence (protéase LasA, élastase LasB, métalloprotéinase alcaline AprA, exotoxine ToxA...) [48] [47]. Le déclenchement de LasR va aussi auto induire la production de 3-OC12-HSL. Dans le système *rhl* (Figure 1-9, vert), *rhlI* synthétise directement C4-HSL qui en se complexant avec RhlR va permettre l'activation de la production de : protéase LasA, élastase LasB, métalloprotéinase alcaline AprA, cyanure d'hydrogène, phénazines, rhamnolipides, sidérophores..., ainsi que de C4-HSL [48]. Ces deux systèmes sont organisés hiérarchiquement. Le système *las* et la production de 3-OC12-HSL contrôle directement l'activation de *rhlI* et *rhlR*.

#### 1.3.2.2.2. Système *pqs*, basé sur les alkyl-quinolones

Ce système a été découvert, après les deux premiers, par McKnight et al. [30] en 2000. Une soixantaine d'AQs sont produites par PA [49]. Leur production repose sur l'action de l'opéron *pqsABCD* qui produit la 2-heptyl-4(1H)-quinolone (HHQ) [47] [36], l'une des deux principales AQs, produite aussi par d'autres bactéries comme *Pseudomonas putida*, *Burkholderia cenocepacia* et *Burkholderia pseudomallei* [32]. La seconde est la Pseudomonas quinolone signal (PQS) qui est propre à PA [31] et produite par l'action de *pqsH* sur HHQ [47].

Une fois atteint un certain niveau dans le milieu extracellulaire, PQS permet l'activation (Figure 1-9, bleu) de PqsR [50] qui déclenche à nouveau l'opéron *pqsABCDE* mais aussi la production de facteurs de virulence (par l'intermédiaire de *pqsE*) dont les phénazines [35], [51], les rhamnolipides, le cyanure d'hydrogène [47], et des métabolites secondaires comme la 2'-aminoacétophénone [36].

PQS et HHQ semblent avoir le même rôle dans l'auto-induction de leur opéron ainsi que dans le déclenchement de la production de facteurs de virulence excepté pour la production de la phénazine pyocyanine qui est contrôlée par PQS et non HHQ [47]. PQS semble, de plus, avoir un rôle indispensable chez PA pour l'assimilation du fer, grâce à la présence de la fonction OH [52].

Le système *pqs* est placé sous le contrôle des 2 autres systèmes du quorum sensing : LasR le régule positivement et RhIR négativement [47]. Il régule lui positivement *rhlI*.

---

#### 1.3.2.2.3. Systèmes complémentaires

De nombreux systèmes de régulation complémentaires ont été découverts chez PA. Il y a notamment le système GAC (*Global activator of Antibiotic and Cyanide synthesis*) qui intervient dans la formation du biofilm dans le cadre de l'infection chronique [47]. Il fonctionne grâce à plusieurs sondes transmembranaires dont les actions se complètent et se modulent (GacS, LadS, RetS) [47]. Il a un impact sur les systèmes *las* et *rhl* qu'il régule en réduisant la production de leurs AIs [47].

---

#### 1.3.2.2.4. Métabolites secondaires et facteurs de virulence

Ces molécules sont contrôlées par le QS de PA comme explicité ci-dessus. Elles constituent la réponse de la bactérie à son environnement et à sa population. Certaines de ces molécules sont des protéines (protéase LasA, élastase LasB, métalloprotéinase alcaline AprA, exotoxine ToxA, AprA, sidérophores...), d'autres sont de petites molécules (cyanure d'hydrogène, phénazines dont pyocyanine, rhamnolipides, la 2'-aminoacétophénone...).

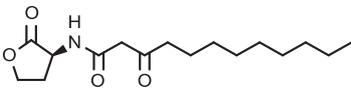
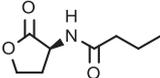
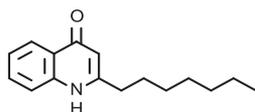
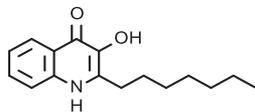
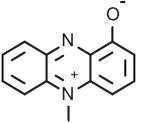
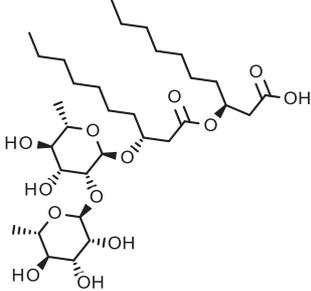
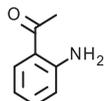
#### 1.3.2.3. Autres molécules sécrétées

De nombreuses autres molécules intervenant dans le métabolisme interne de la bactérie sont sécrétées sans qu'aient été pour l'instant rapporté une influence dans la communication inter-bactérienne.

#### 1.3.2.4. Tableau récapitulatif des molécules sécrétées

Le Tableau 1-1 ci-dessous résume les principales molécules sécrétées par PA et que l'on peut donc trouver dans le surnageant de cultures bactériennes. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux petites molécules organiques qui ont une activité redox.

**Tableau 1-1 : Molécules sécrétées par PA et leurs caractéristiques d'intérêt.**

| Nom                               | Formule chimique  | Fonctions   | Redox ?          |
|-----------------------------------|---|---|------------------|
| 3-OC12-HSL                        |    | Autoinducteur   | Non              |
| C4-HSL                            |    | Autoinducteur   | Non              |
| HHQ                               |    | Autoinducteur   | Oui              |
| PQS                               |    | Autoinducteur   | Oui              |
| Protéase A (lasA)                 | Protéine  | Facteur de virulence                                    | Non              |
| Elastase B (lasB)                 | Protéine  | Facteur de virulence                                    | Non              |
| Métalloprotéinase alcaline (aprA) | Protéine  | Facteur de virulence                                    | Non              |
| Cyanure d'hydrogène               | HCN   | Facteur de virulence                                    | Non              |
| Pyocyanine (PYO)                  |  | Facteur de virulence, tampon redox, survie en anaérobie | Oui              |
| Autres phénazines                 | voir 1.4.2.3  | Facteur de virulence,                                   | Oui              |
| Rhamnolipides                     |  | Facteur de virulence, surfactants                       | Non              |
| 2'-aminoacétophénone              |  | Régulateurs de la virulence                             | Oui              |
| Sidérophores                      | Protéine  | Extraction du fer                                       | Oui, si complexé |

Sur la base de leur activité redox, les molécules pouvant être retenues dans le cadre de la thèse sont : HHQ, PQS, Pyocyanine (PYO) et les autres phénazines, ainsi que la 2'-aminoacétophénone (2-AA). Les autres phénazines que PYO ont été éliminés pour nos études car PYO est

la seule disponible commercialement. De plus, elle est spécifiquement produite par PA contrairement à d'autres phénazines. En retenant ces quatre molécules : HHQ, PQS, PYO et la 2-AA, je cible :

- 3 familles chimiques différentes : les AQs pour HHQ et PQS, les phénazines pour PYO et une amine pour la 2-AA,
- 3 phases de production différentes, HHQ et PQS sont 2 AIs de la bactérie et HHQ est le précurseur de PQS, ces 2 molécules en se liant ensuite au transcripteur *pqsR* induisent la production de PYO et de la 2-AA.

#### 1.4. Détection électrochimique de molécules sécrétées par *Pseudomonas aeruginosa*

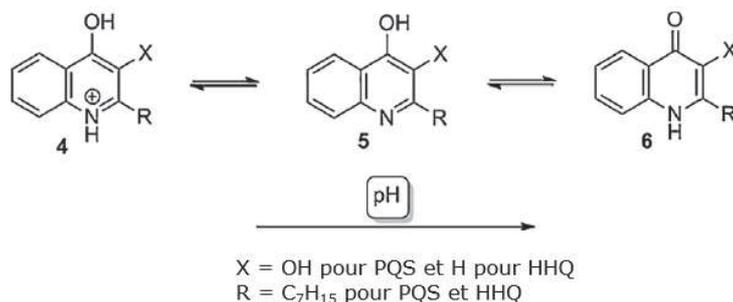
Ce paragraphe s'attache à présenter plus en détails les molécules sélectionnées pour la thèse. A la fois leur chimie, leur fonction biologique et leurs méthodes de détection (électrochimique ou autres) seront abordés. Concernant la détection électrochimique des molécules, il faut noter que beaucoup des publications citées sont sorties après le début de la thèse en octobre 2013, et que certains travaux ont donc été réalisés en parallèle.

##### 1.4.1. *Pseudomonas* Quinolone Signal et 2-heptyl-4-quinolone

Chimiquement, *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) est la 2-heptyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone. Sa masse molaire est de 259,37g/mol. C'est une molécule peu soluble : sa solubilité dans l'eau distillée à pH 7 est de 1mg/L (3,9µM) et dans le milieu de LB, elle est de 5mg/L (19,3µM) [31]. PQS peut être solubilisée par des molécules produites par la bactérie (notamment les rhamnolipides) [53].

HHQ est la 2-heptyl-4(1H)-quinolone. Sa masse molaire est de 243,34g/mol. Sa solubilité n'est pas rapportée mais doit être proche de celle de PQS, car leurs structures chimiques sont proches.

PQS et HHQ sont des espèces acido-basiques [54]. Elles existent sous forme protonée à bas pH (forme 4 sur la Figure 1-10) ainsi que sous 2 formes tautomères à plus haut pH (formes 5 et 6 sur la Figure 1-10).



**Figure 1-10 : Equilibre acidobasique des alkyls-quinolones, extrait de [54].**

Les pK<sub>a</sub> de PQS et HHQ simulés grâce au logiciel Marvin 6.8 (ChemAxon software) sont regroupés dans la Figure 1-11. Autour de pH 7 (pH physiologique), les 2 molécules sont dans la forme notée 5 sur la Figure 1-10.

| Analytes | pKa <sub>1</sub> (4) | pKa <sub>2</sub> (5/6) |
|----------|----------------------|------------------------|
| PQS      | 3.43                 | 9.89                   |
| HHQ      | 3.02                 | 11.46                  |

**Figure 1-11 : pK<sub>a</sub> estimés de PQS et HHQ, extrait de [54].**

#### 1.4.1.1. Biologie

##### 1.4.1.1.1. Souches produisant la 2-heptyl-4(1H)-quinolone et Pseudomonas Quinolone Signal

PQS et HHQ sont produites par *Pseudomonas aeruginosa*. Pour une utilisation en tant que biomarqueurs de la bactérie, il est intéressant de savoir si elles sont aussi produites par d'autres souches.

PQS n'a pas été détectée chez *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas diminuta*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas pickettii*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia stabilis*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia anthina* [32]. PQS n'étant donc pas produite par d'autres espèces du genre *Pseudomonas*, ni par d'autres espèces du genre *Burkholderia* qui lui est proche, PQS est probablement produite spécifiquement par PA.

Pour sa part, HHQ a été détectée par LC/MS chez *Pseudomonas putida*, *Burkholderia cenocepacia* et *Burkholderia pseudomallei* [32]. Elle n'a pas été détectée chez *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas diminuta*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas pickettii*, *Burkholderia stabilis*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia anthina* [32]. HHQ n'est donc pas spécifique à PA, mais c'est tout de même un élément important de son sécrétôme. De plus, sa présence permet tout de même de restreindre le nombre de bactéries possibles à quelques bactéries.

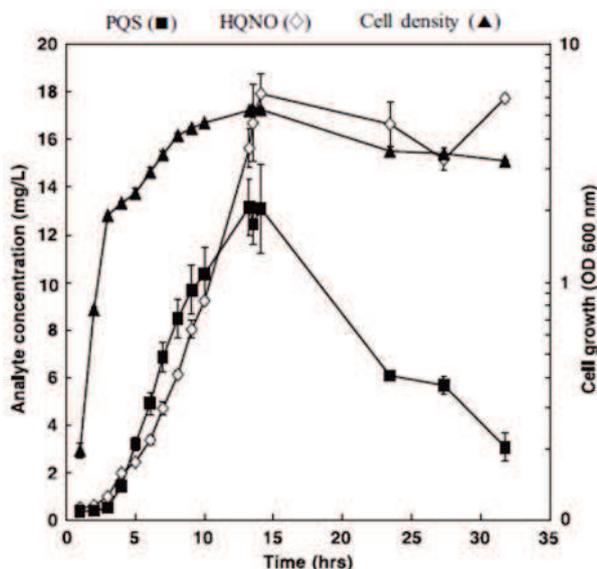
##### 1.4.1.1.2. Fonctions biologiques

La fonction biologique principale de PQS et HHQ est celle d'AIs du QS et a été explicitée dans le paragraphe 1.3.2.2.2. Néanmoins ces molécules ont aussi des rôles secondaires. PQS est notamment impliqué dans le contrôle du stress oxydant [55].

##### 1.4.1.2. Moyens de détection classiques et concentrations in vitro

De nombreuses méthodes sont rapportées dans la littérature pour la détection et quantification de HHQ et PQS dans le milieu de culture. Historiquement, les molécules étaient détectées par chromatographie sur couches minces [53]. Ensuite, après l'essor de la spectroscopie de masse (MS), des méthodes LC/MS se sont généralisées [49]. Elles ont permis une détection plus précise des molécules du surnageant et notamment de mettre en lumière que PQS et HHQ sont les 2 membres majoritaires d'une famille très représentée dans le surnageant de culture : les alkyls-quinolones (AQs) [49]. Des informations sur les autres membres de cette famille seront données dans le paragraphe 1.4.1.4. Toutes ces méthodes de détection et quantification nécessitent une extraction du milieu de culture avant analyse. Un suivi en temps réel n'est donc pas possible.

Néanmoins, en effectuant plusieurs prélèvements, les méthodes LC/MS ont permis un suivi de la concentration de PQS et HHQ dans le temps. La production de PQS augmente pendant la phase exponentielle avant d'atteindre un maximum en début de phase stationnaire, puis elle baisse pendant la phase stationnaire (Figure 1-12).



**Figure 1-12 : Evolution de la concentration de PQS en fonction de la densité optique pour la souche de *Pseudomonas aeruginosa* PA14, extrait de [31]**

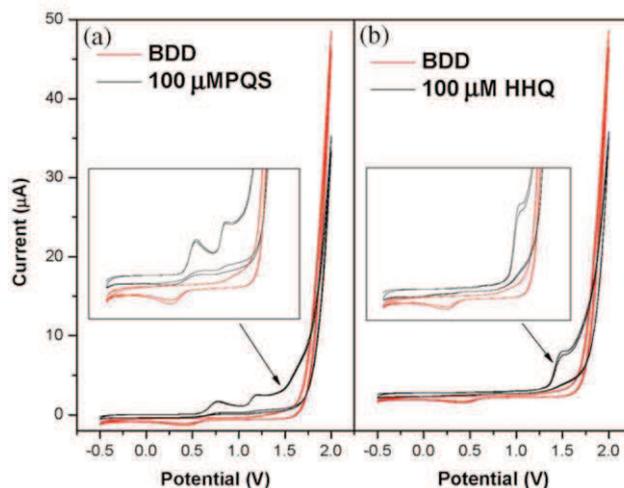
Les concentrations de HHQ et PQS semblent être très dépendantes de la souche ainsi que des conditions de culture. Les concentrations rapportées pour la souche PA14 dans le milieu de culture LB vont de  $4.5\mu\text{M}$  pour PQS et  $16.5\mu\text{M}$  pour HHQ à 9h de culture [49], jusqu'à 323 et  $247\mu\text{M}$  à 8h de culture [54].

Il a été rapporté que l'ajout des acides aminés phénylalanine et tyrosine au milieu de culture augmente fortement la production de PQS, probablement car ils interviennent en tant que précurseur dans les mécanismes de production de PQS [56]. Des milieux avec peu de phosphate conduisent au même résultat [57]. La cause serait indirecte : certains gènes régulant positivement la production de PQS (*phoB*) seraient sensibles à la concentration en phosphate.

#### 1.4.1.3. Détection électrochimique

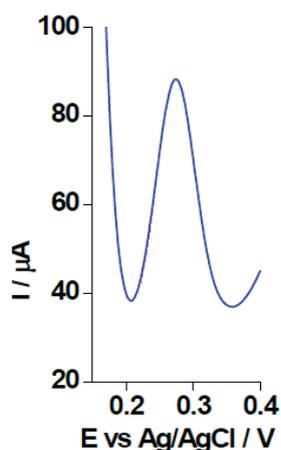
Peu d'éléments sont disponibles dans la littérature concernant la détection électrochimique de PQS et HHQ.

Zhou et al. [58], de l'université de Cork en Irlande, ont travaillé sur la détection par voltampérométrie et ampérométrie de PQS et HHQ avec une électrode diamant dopé au bore (BDD). Une étude du signal de PQS et HHQ à  $+0.8\text{V}$  en fonction du pH a été effectuée. Les auteurs ont montré que PQS donne à peu près le même signal sur toute la gamme de pH alors que le signal de HHQ disparaît en dessous de pH 6. Ils se sont donc placés à pH 2 pour le reste des expériences pour pouvoir mieux séparer les signaux de PQS et HHQ. Sous ses conditions, ils ont montré que PQS donne 2 pics d'oxydation ( $+0.77\text{V}$  et  $+1.18\text{V}$ ), alors que HHQ n'en donne qu'un ( $+1.47$ ) (Figure 1-13). Ils s'intéressent ensuite à la détection de PQS produit par des bactéries incubées 1 jour dans du LB à  $37^\circ\text{C}$  après extraction de la phase liquide et acidification pour être à pH 2.

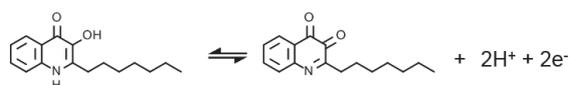


**Figure 1-13 : Voltampérométrie cyclique de PQS et HHQ (référence électrode Ag/AgCl) à pH 2, extrait de [58]**

En analysant en voltampérométrie impulsionnelle différentielle (DPV pour *Differential Pulse Voltammetry*) et voltampérométrie cyclique (CV pour *Cyclic Voltammetry*) le milieu de culture de la souche PAO1, Seviour et al., de l'université technologique de Nanyang à Singapour, [59] s'aperçoivent qu'une espèce donne un signal vers +0.25V (Figure 1-14). Il s'agit de PQS, qu'ils peuvent quantifier à l'aide de la méthode des ajouts dosés après extraction du surnageant et dilution au 5<sup>e</sup>. Suite à une étude de PQS dans le DMSO, les auteurs ont démontré que cette espèce est peu réversible et échange 2 électrons. En se basant sur cette information et sur les travaux de Haüssler et al. [55] qui ont étudié PQS grâce à des méthodes biologiques, ils postulent l'équation de la Figure 1-15 comme équation redox de PQS.



**Figure 1-14 : DPV (vitesse de balayage 5 mV/s) de la souche PAO1 à 20h de culture, extrait de [59].**

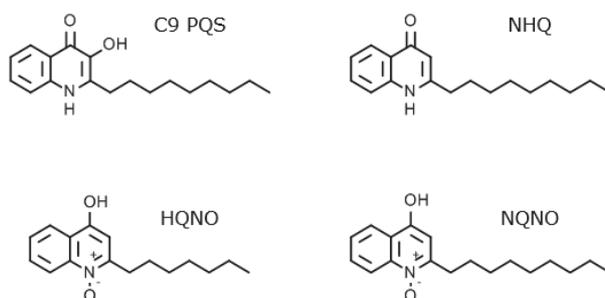


**Figure 1-15 : Equation redox de PQS, d'après [55]**

#### 1.4.1.4. Autres molécules de la même famille

Une cinquantaine d'autres AQs ont été détectées dans le surnageant de PA grâce à la LC /MS [49]. Les plus concentrées sont (Figure 1-16) :

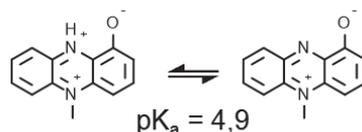
- 2-hydroxy-2-nonyl-4(1H)-quinolone (C9 PQS), similaire à PQS mais avec une queue alkyle de 9 carbones. Les concentrations rapportées sont 11 fois plus faibles que pour PQS pour PAO1 [60] et 2 fois plus faible pour PA14 à 9h de culture [49].
- 2-nonyl-4-quinolone (NHQ), similaire à HHQ comme la précédente à PQS. Concentrations rapportées 3 fois plus faibles que HHQ pour PAO1 [60] et équivalente pour PA14 à 9h de culture [49].
- 4-hydroxy-2-heptylquinoline N-oxide (HQNO), similaire à HHQ mais avec un oxygène sur le N. Les concentrations rapportées sont 3,5 fois plus élevées que HHQ pour PAO1 [60] et 1,5 fois plus faible pour PA14 à 9h de culture [49].
- 2-nonyl-4-hydroxyquinoline N-oxide (NQNO), similaire à HQNO mais avec une queue alkyle de 9 carbones. Les concentrations rapportées sont 1,7 fois plus faibles que HQNO pour PAO1 [60] et 2,5 fois plus faibles pour PA14 à 9h de culture [49].



**Figure 1-16 : Autres alkyl-quinolone présentes en quantité importante dans le surnageant de *Pseudomonas aeruginosa*.**

#### 1.4.2. Pyocyanine

Pyocyanine (PYO) de son nom chimique 5-Méthylphénazin-1-one a comme masse molaire 210,23g/mol. Elle est très soluble dans les solvants organiques : éthanol et DMSO (5g/L soit 23mM), DMF (2,5g/L soit 12mM). Sa solubilité en milieu aqueux n'est pas rapportée. C'est aussi une espèce acido-basique de  $pK_a$  4,9 [61], [62].



**Figure 1-17 : Equilibre acido-basique de pyocyanine.**

#### 1.4.2.1. Biologie

---

##### 1.4.2.1.1. Souches produisant pyocyanine

PYO est produite par 95% des souches de PA [63]. Concernant sa production par d'autres bactéries, l'équipe de Ohfuji et al. [64] fait référence à une ancienne publication en russe qui montrerait que les différentes espèces de la famille *Pseudomonas* ne produisent pas de PYO contrairement à PA.

---

##### 1.4.2.1.2. Fonctions biologiques

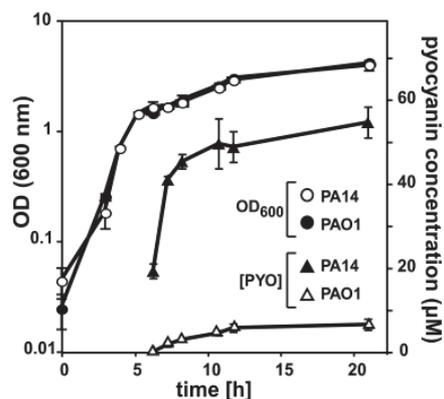
PYO a de multiples rôles. Au niveau de la bactérie en elle-même, la molécule aurait un rôle essentiel dans la survie de PA dans des conditions anaérobiques [65], ainsi qu'un rôle de tampon redox dans le milieu intra et extra cellulaire [66]. Bien qu'elle soit un métabolite secondaire, PYO a un rôle important dans le QS de PA. En effet, elle contrôle, durant la phase stationnaire de croissance, différents gènes appelés « PYO-stimulation ». Enfin, PYO est une toxine très efficace de PA. Elle a un rôle lors des infections aiguës et chroniques, car elle empêche la prolifération des lymphocytes, induit l'apoptose des granulocytes neutrophiles [67] et endommage les cellules épithéliales [47]. Son mode d'action est complexe. PYO accepte directement les électrons de donneurs d'électrons comme NADPH, et génère par la suite des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS : *Reactive oxygen species*) comme l'eau oxygénée ou l'ion super oxyde  $O^{2-}$  qui a leur tour attaquent les espèces redox de la cellule, et la soumettent à un stress oxydatif [68]. Le stress oxydatif a aussi des effets sur le système de régulation du  $Ca^{2+}$  : d'importantes quantités sont relarguées provenant des réserves de la cellule [68]. Or  $Ca^{2+}$  est important pour réguler le mécanisme de transport des ions de la cellule, la production de mucus ainsi que l'activité des cils des cellules épithéliales dans le cas d'infection pulmonaire [68]. Certaines études montrent que le PYO agit directement au niveau du transport en vésicule de l'ATP ce qui cause une multitude de perturbation de la cellule [68].

---

##### 1.4.2.1.3. Moyens de détection classiques et concentrations in vitro de pyocyanine

La détection et quantification de PYO est faite soit par des méthodes de chromatographie associées ou non à la spectroscopie de masse, soit plus simplement par spectroscopie d'absorption moléculaire après extraction dans HCl ou dans le méthanol [64] ou directement dans le milieu de culture [69].

Le profil de concentration de PYO au cours de la culture est similaire à celui de PQS discuté dans le paragraphe 1.4.1.2. La détection commence en fin de phase exponentielle, la concentration se stabilise en phase stationnaire (Figure 1-18). D'autres publications rapportent une baisse de la concentration de PYO au lieu d'une stabilisation [70]. Les concentrations rapportées dans la littérature varient, comme pour PQS et HHQ, beaucoup selon les souches et les conditions de culture. Pour la souche PAO1, des valeurs allant de  $6\mu M$  [71] à  $60\mu M$  [72] sont rapportées après 10h de culture. Il semble néanmoins reconnu que la souche PA14 produit plus de PYO que PAO1 [71], [73]

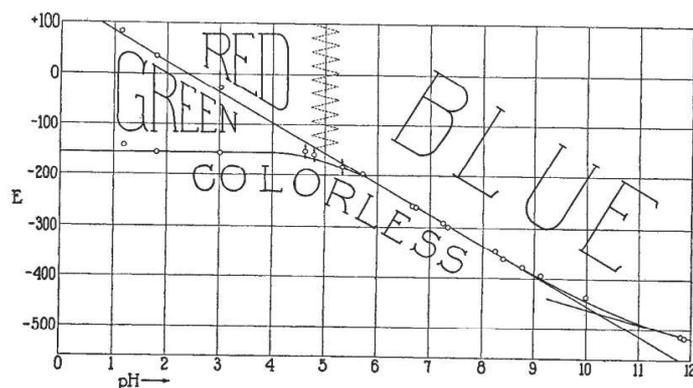


**Figure 1-18 : Production de PYO (par HPLC) et densité bactérienne pour les souches PAO1 et PA14 au cours de la culture, extrait de [71].**

L'influence du milieu de culture sur la production de PYO est documentée. Ainsi, des milieux permettant une production maximale de PYO ont été mis au point (par exemple le King'A broth [74] ou le Ingram and Blackwood broth [64]). Les milieux avec peu de phosphate donne plus de PQS mais aussi de PYO [57]. A contrario, s'il n'y a pas ou peu de fer dans le milieu, une baisse de production de PYO est enregistrée [65], comme dans le milieu minimal MOPS (milieu de culture peu chargé en sel contenant tampon du 3-(N-Morpholino)-propanesulfonique acide).

#### 1.4.2.2. Détection électrochimique

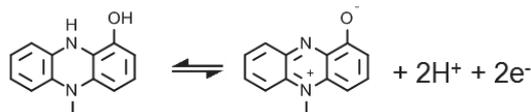
Contrairement à HHQ et PQS, PYO est très étudiée en électrochimie. La première publication concernant PYO est celle de Friedhem et al. [61] en 1931. Elle détermine par titration électrochimique le potentiel de la réaction redox en fonction du pH (Figure 1-19). Au-dessus du  $pK_a$  de PYO, une seule réaction redox est rapportée. Celle-ci met en jeu des  $H^+$  car son potentiel dépend du pH. En dessous du  $pK_a$ , il y a 2 réactions redox, l'une mettant en jeu un proton et l'autre non.



**Figure 1-19 : Relation pH-potential redox pour PYO par rapport à une électrode au calomel saturée, extrait de [61]**

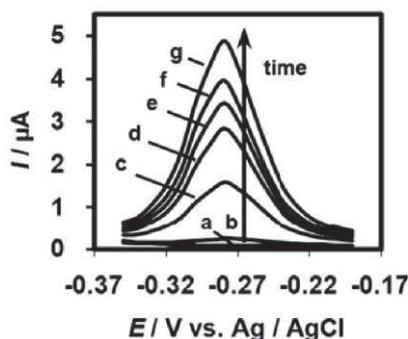
Il faut ensuite attendre 1996, pour que Vukomanovic et al. [75] détectent pour la première fois PYO par voltampérométrie par re-dissolution dans le surnageant de PA et relancent l'intérêt porté à la molécule. Entre temps, seule une étude de la molécule dans l'acétonitrile en réduction apparaît dans la littérature [62]. L'équation redox de PYO a été déterminée récemment,

en 2008, par l'équipe de Wang et al. [76]. PYO échange 2 électrons et 2 protons comme indiqué dans la Figure 1-20 ci-dessous.



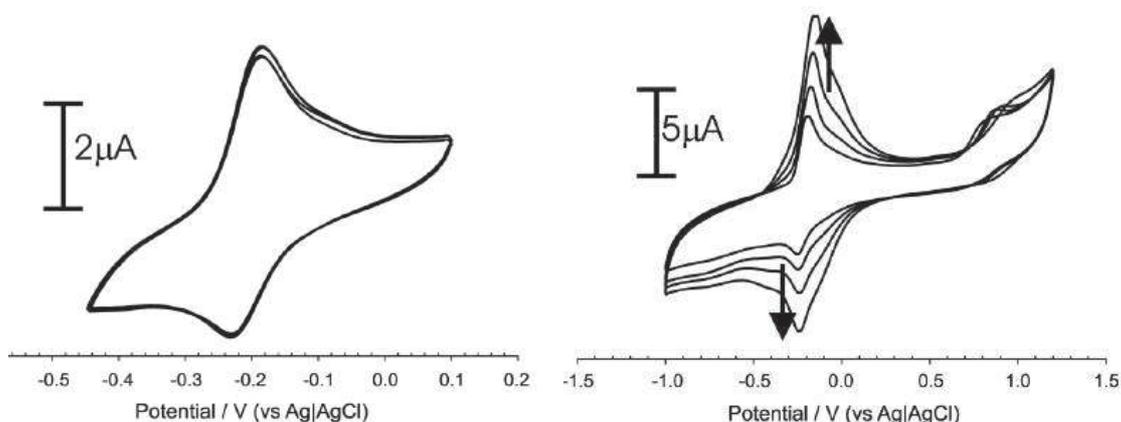
**Figure 1-20 : Réaction redox de pyocyanine.**

L'étude de PYO comme biomarqueur de PA ne connaît un grand engouement que depuis très récemment en 2009 avec l'étude de Bukelman et al. [77]. Dans celle-ci, la molécule est suivie en DPV sur une l'électrode en graphite au cours de la culture après inoculation de PAO1 à OD<sub>600</sub> 0,015 dans du LB (Figure 1-21). L'équipe rapporte alors que PYO est la seule molécule détectable en CV dans le surnageant entre -0.6 et +0.7 V.



**Figure 1-21 : DPV au cours de la culture de PAO1 dans du LB : a) 220 min, b) 409 min, c) 478 min, d) 530 min, e) 560 min, f) 621 min, g) 655 min de culture, extrait de [77].**

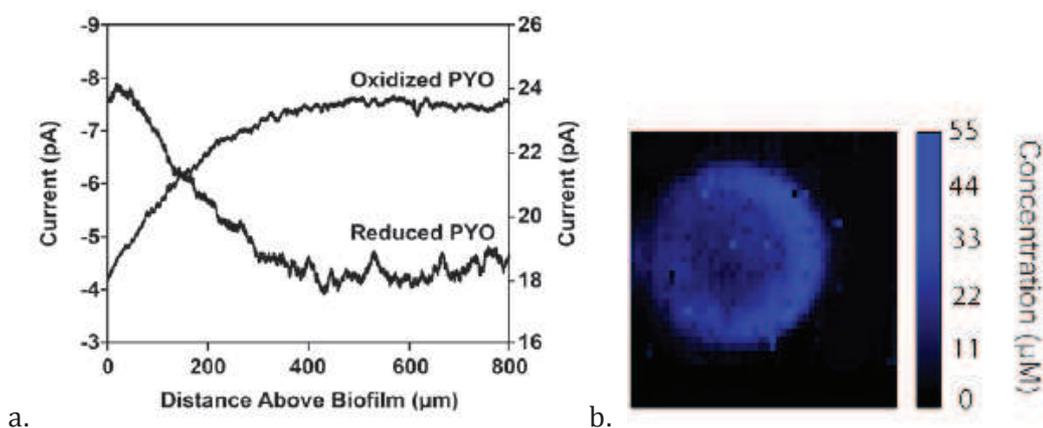
Un an après, Sharp et al. [78] rapportent que PYO subit une seconde oxydoréduction à haut potentiel qui conduit à une irréversibilité des cycles (Figure 1-22). Néanmoins, lorsque le balayage s'arrête avant le potentiel de cette seconde oxydation, PYO est très réversible. La réaction à haut potentiel est interprétée comme une oxydation phénolique qui conduit à la polymérisation de la molécule à la surface de l'électrode.



**Figure 1-22 : CV de PYO sur différentes fenêtres de balayage, extrait de [78].**

Les publications parues ensuite suivent 2 voies différentes : explorer le potentiel de PYO comme biomarqueur de PA ou utiliser l'électrochimie pour mieux comprendre où et quand PYO est produit par la bactérie.

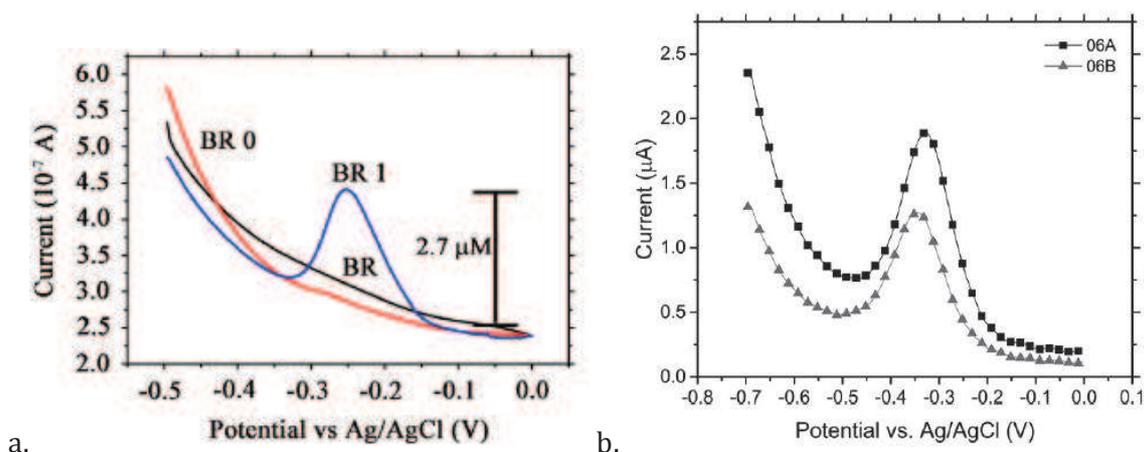
Les travaux utilisant l'électrochimie pour localiser la production de PYO commencent en 2011 avec l'équipe de Koley et al. [79], de l'université du Texas à Austin, qui ont suivi le gradient de concentration PYO au-dessus d'un biofilm de PA grâce à une microélectrode. Ils ont pu ainsi déterminer son état redox en fonction de la localisation : loin du biofilm, il y a la forme oxydée majoritairement, près du biofilm, la forme réduite (Figure 1-23a). Avec la même technique, cette équipe a étudié la communication entre 2 micro-colonies de PA, l'une qui peut produire PYO mais pas ses précurseurs et l'autre qui produit seulement les précurseurs [80]. La diffusion des précurseurs permet finalement la production de PYO par la micro-colonie qui ne les a pas. Cette idée d'image localisée de la production a ensuite été reprise dans les articles de Bellin et al., de Columbia University, en 2014 [81] et 2016 [82]. Dans ces articles, les auteurs développent une puce CMOS pouvant faire une image de la concentration de PYO (Figure 1-23b) et d'autres phénazines localisées dans l'espace (60 pixels [81] puis 1824 [82]). Ils arrivent de cette manière à cartographier la production des phénazines, certaines étant détectées sur toute la surface de la colonie comme PYO (Figure 1-23b), d'autres seulement sur le pourtour.



**Figure 1-23 : a. Etat d'oxydation de PYO selon la distance de mesure au-dessus d'un biofilm de PA [79] ; b. Concentration de PYO dans un biofilm de PA à 30h de culture [82]**

Les travaux concernant l'utilisation de PYO comme biomarqueurs de PA viennent presque tous du groupe du professeur Goluche à Northeastern University. Ainsi, ils ont commencé par vérifier en 2014 [83] que la détection de PYO était possible dans différents fluides biologiques sains (sang, urine, crachat, lavage bronchique : Figure 1-24 a). La limite de détection obtenue est autour de  $0,1\mu\text{M}$  selon les fluides. Dans ce même article, ils ont aussi vérifié que les bactéries *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermis*, et *B. cereus* ne produisent pas d'autres espèces redox pouvant donner lieu à un pic à un potentiel proche de celui de PYO, et ainsi être un interférent pour la détection de PYO. Dans une autre publication, la même équipe a essayé d'optimiser le milieu de culture de PA en ajoutant des acides aminés pour accélérer la croissance de PA et donc la production de PYO afin de détecter la bactérie plus rapidement [84]. Ils ont montré que dans un milieu de croissance riche (le TSB), l'ajout d'acides aminés ne permet pas de réduire le temps avant la détection de PYO mais seulement d'augmenter sa concentration. Le temps avant la détection de PYO semble dépendre seulement de la quantité de cellule de l'inoculum du départ. Ce fait n'est pas

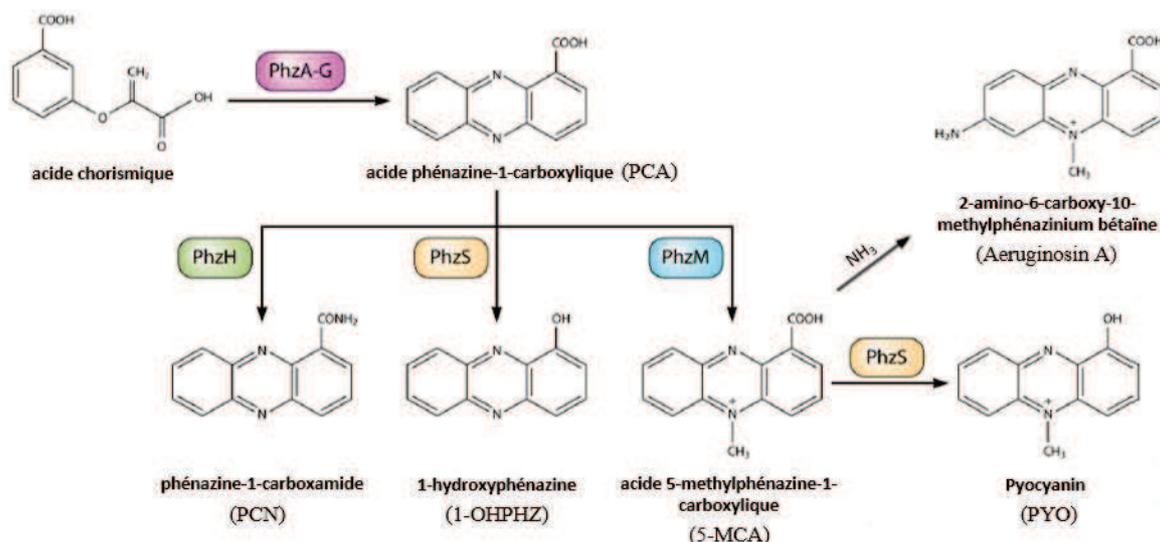
surprenant car PYO n'est produit que quand les bactéries sont assez nombreuses pour mettre en place une stratégie d'attaque. La première étude clinique a aussi été réalisée par cette équipe en 2016 [85] : l'exsudat de 12 patients ayant une plaie ouverte a été analysé. Pour chaque échantillon, deux méthodes sont confrontées pour évaluer la présence de PA. La première, qui joue le rôle de méthode de référence, est l'analyse génomique de la séquence ARN 16S. La seconde est la recherche par électrochimie de la présence de PYO. PYO est évalué comme présent si un pic d'au moins  $0,03\mu\text{A}$  est détecté dans le voltammogramme de l'exsudat. Un exemple de voltammogramme obtenu en voltampérométrie à signaux carrés de potentiel (SWV pour *Square Wave Voltammetry*) pour un échantillon classé positif est présenté dans la Figure 1-24b. Pour cette première étude, une sensibilité de 71% et une spécificité de 57% ont été obtenues.



**Figure 1-24 : a. SWV avant et après inoculation (0h et 24h) de PA14 dans du lavage bronchique sain [84] ; b. SWV d'exsudat de plaie de patient contenant PA [85]**

#### 1.4.2.3. Autres molécules de la même famille

PYO n'est pas la seule phénazine produite par PA. Sa voie métabolique de production ainsi que les autres molécules en résultant sont présentées sur la Figure 1-25. L'acide phénazine-1-carboxylique (PCA) est dérivé de l'acide chorismique par l'action de l'opéron PhzA-G. Il est le précurseur commun de la phénazine-1-carboxamide (PCN), de la 1-hydroxyphénazine (1-OHPHZ) et de l'acide 5-méthylphénazine-1-carboxylique (5-MCA), par l'action respective de PhzH, PhzS et PhzM. C'est la 5-MCA qui va donner PYO par l'action de PhzS et la 2-amino-6-carboxy-10-méthylphénazinium bêtaïne (Aeruginosin A) par l'action de l'ammoniac [86].



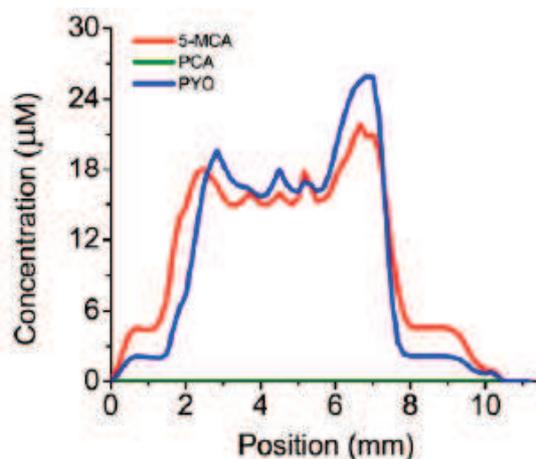
**Figure 1-25 : Production par *Pseudomonas aeruginosa* de PYO et de sa famille, adapté de [47] et de [87].**

Toutes ces molécules ont une activité redox, elles échangent 2 électrons et 2 protons comme PYO [76], [81], [87]. Le Tableau 1-2 regroupe leurs propriétés.

**Tableau 1-2 : Propriétés des autres phénazines produites par PA**

| Nom           | Couleur | E <sub>0</sub> vs Ag/AgCl à pH 7 (mV) | Produit par   |
|---------------|---------|---------------------------------------|---|
| PCA           | jaune   | -316 [76]                             | PA<br><i>Pseudomonas fluorescens</i><br><i>Pseudomonas aureofaciens</i> |
| PCN           | vert    | -340 [76]                             | PA<br><i>Pseudomonas chlororaphis</i>                                   |
| 1-OHPHZ       | vert    | -274 [76]                             | PA<br><i>Pseudomonas fluorescens</i>                                    |
| 5-MCA         | rouge ? | -105 [81]                             | PA  |
| Aeruginosin A | rouge   | -344 [87]                             | PA  |

Les productions de PCA, PCN et 5-MCA ont été étudiées en détails par Bellin et al. en 2014 [81] et 2016 [82], de Columbia University. Ils obtiennent les concentrations de ces molécules dans le biofilm de la même manière que présentée dans le paragraphe 1.4.2.2 pour PYO. Lors de l'étude de la souche PA14, les auteurs ont montré que seules la 5-MCA et PYO sont présentes en quantité suffisante pour être détectées (Figure 1-26). Leur répartition dans le biofilm est équivalente : légèrement moins concentrée au centre que sur les bords. En utilisant plusieurs mutants *phzM* de cette même souche, ils ont pu mettre en évidence la production de PCA et PCN. Pour OHPHZ et Aeruginosin A, seule l'électrochimie en solution modèle a été étudiée.



**Figure 1-26 : Concentration de 5-MCA, PCA et PYO dans un biofilm de PA à 30h de culture [82]**

#### 1.4.3. 2'-aminoacétophénone

La 2'-aminoacétophénone est un petit composé aromatique volatil de masse molaire de 135,16g/mol. Elle donne une odeur de raisin lors de la croissance de PA.

##### 1.4.3.1. Biologie

###### 1.4.3.1.1. Souches produisant la 2'-aminoacétophénone

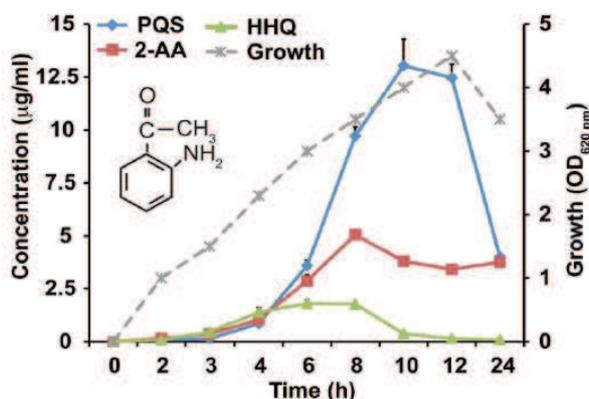
Une production de 2-AA a été rapportée pour 20 souches de PA [88], mais aussi pour *Burkholderia thailandensis* [36] et dans de faibles quantités (pM) pour certaines souches de *S. aureus* et *E. coli* [88]. Les bactéries *H. influenzae*, *L. pneumophila*, *M. multivorans*, *P. fluorescens*, *B. multivorans*, *S. pneumoniae* et *A. fumigatus* [88] ainsi que *P. cepacia*, *P. maltophilia*, *E. cloacae* [89] n'en produisent pas. Comme HHQ, la 2-AA n'est pas spécifiquement produit par PA mais fait tout de même partie de la signature électrochimique de la bactérie.

###### 1.4.3.1.2. Fonctions biologiques

La 2-AA est détectée dans l'air au-dessus des cultures de PA du fait de sa pression de vapeur saturante importante. C'est un dérivé du tryptophane, dont la production est contrôlée par le facteur de transcription *pqsR* [36]. Son effet le plus remarquable est de rendre PA mieux toléré par l'hôte qui lui survit plus longtemps [37]. D'autre part, elle permet le passage d'une infection aiguë à une infection chronique [36]. Pour cela, la 2-AA réduit l'activation des effecteurs du système immunitaire de l'hôte [37], baisse l'activation de l'opéron *pqsABCD*, et réduit la production de HHQ et PQS et des facteurs de virulence associés [36].

##### 1.4.3.2. Moyens de détection classiques et concentrations in vitro

Comme pour les molécules précédentes, le moyen de détection classique est la LC/MS. Comme attendu, la production de 2-AA suit celle de PQS et HHQ [36]. Elle apparaît en début de phase stationnaire (Figure 1-27).



**Figure 1-27 : Evolution de la concentration de PQS, HHQ et 2-AA comparée à l'évolution de la densité optique, extrait de [36]**

La concentration mesurée de 2-AA dépend beaucoup de la composition du milieu de culture [89] (Figure 1-28). Elle peut être optimisée, notamment par l'ajout de tryptophane, son précurseur direct [89]. Le milieu très classique LB semble mener à peu de production de 2-AA [36].

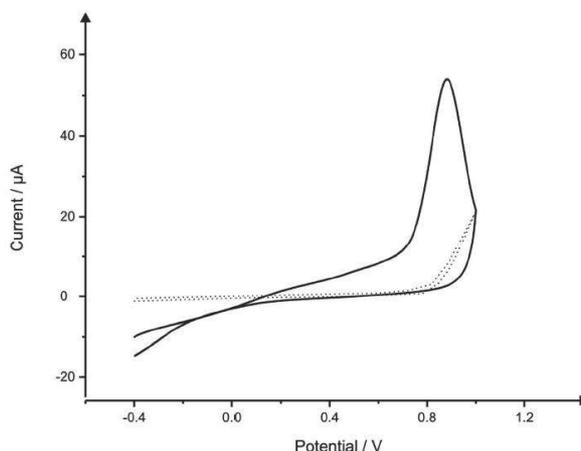
**TABLE 2. Production of 2AA in various media**

| Medium               | Concn of 2AA ( $\mu\text{M}$ ) |                 |
|----------------------|--------------------------------|-----------------|
|                      | Without tryptophan             | With tryptophan |
| <b>Rich media</b>    |                                |                 |
| Casamino Acids       | 0.21                           | 21.78           |
| Peptone              | 109.50                         | 192.70          |
| Brain heart infusion | 73.50                          | 186.42          |
| Yeast extract        | 27.60                          | 66.24           |
| Meat infusion        | 20.25                          | 129.60          |
| Tryptone             | 1.80                           | 40.96           |
| Trypticase soy broth | 0.76                           | 25.31           |
| <b>Minimal media</b> |                                |                 |
| Glycerol             | 0.08                           | 5.68            |
| Gluconate            | 0.12                           | 72.00           |
| Acetate              | 0.12                           | 89.32           |
| Succinate            | 0.12                           | 93.78           |
| Tryptophan           | 0.68                           |                 |

**Figure 1-28 : Production de 2-AA dans divers milieux avec ajout ou non de tryptophane, extrait de [89]**

#### 1.4.3.3. Détection électrochimique

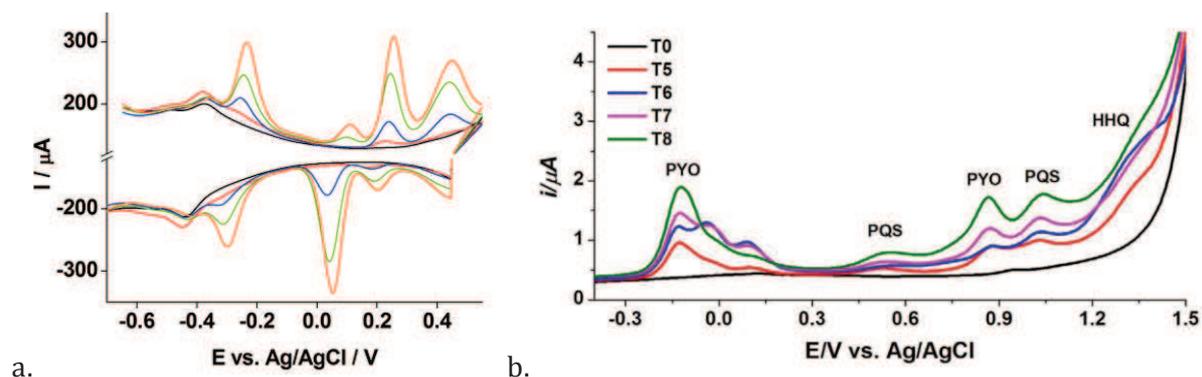
Deux publications traitent de l'électrochimie de la 2-AA. Tout d'abord, Stratan et al. en 2004 [90] ont relevé les oxydations et réductions de la 2-AA dans 0,2M de HCl avec une électrode de carbone vitreux. Au cours de la mesure, il y a polycondensation. Lors du premier cycle, il y a seulement une oxydation à +1,20V. Ensuite d'autres pics sont rapportés. Les pics d'oxydation sont à : +0,62V, +0,70V et +1,18V et les pics de réductions à +0,17V et +0,02V. Plus tard, Metters et al. [91] ont étudié l'espèce sur carbone vitreux, diamant dopé au bore et platine (Figure 1-29) dans le but de faire de la détection de PA dans le souffle des patients ayant la mucoviscidose. Le comportement de polycondensation est confirmé.



**Figure 1-29 : Voltampérométrie cyclique de la 2'-aminoacétophenone 60mM, extrait de [91].**

#### 1.4.4. Détections simultanées de molécules de plusieurs familles

Avant le début de cette thèse, aucune publication concernant la détection simultanée de plusieurs molécules sécrétées par une bactérie n'était parue. Depuis, 2 publications sont parues en plus de celles tirées du travail de cette thèse. La première est celle de l'équipe de Seviour et al., de l'université technologique de Nanyang à Singapour, [59]. Les auteurs analysent en DPV (-0,7/+0,5V) des cultures de PAO1 au cours de la croissance des bactéries. L'analyse est effectuée au cours de la culture (0, 5, 10, 15 et 20h) et *in situ*. Les voltampérogrammes obtenus (Figure 1-30a) montrent 3 pics majeurs : PYO vers -0,21V ; PQS vers +0,25V et un troisième pic, non étudié car non présent lorsque le surnageant de culture est filtré, vers +0,11V. Les concentrations de PYO et PQS sont estimées, après dilution par 5 du surnageant, par la méthode des ajouts dosés. La concentration de PYO et de PQS augmente pendant les 20h de l'expérience. La seconde publication est de l'équipe de l'université de Cork en Irlande. Dans cette publication [92], les auteurs détectent PYO, PQS et HHQ produit par la souche PA14 avec une électrode de diamant dopé au bore par SWV (-0,35V/+1,5V). Leur détection n'est pas *in situ* : ils extraient les molécules d'intérêt par double extraction (liquide-liquide avec de l'acétate d'éthyle acidifié avec de l'acide acétique et solide-liquide), puis ils les remettent en solution dans un mélange de tampon acétate à pH 5.0 et d'acétonitrile à 20%. Après cette préparation, les 3 molécules sont bien détectées (Figure 1-30b). La concentration de HHQ est forte au début de l'expérience puis décroît après 6h de culture. Les concentrations de PQS et PYO augmentent plus tard et restent croissantes pendant les 8h de culture. Ces évolutions sont cohérentes avec celles déjà rapportées par des méthodes classiques.



**Figure 1-30 : a. Voltampérogrammes par DPV obtenus au cours de la croissance de PAO1 (0, 5, 10, 15, 20h), extrait de [59] ; b. Voltampérogrammes par SWV après extraction des molécules du surnageant de culture de PA14 à 5, 6, 7 et 8h, extrait de [92].**

### 1.5. Les objectifs de la thèse

Le premier objectif de la thèse est de répondre à la question de l'intérêt de l'analyse électrochimique de surnageant de culture de PA dans une visée d'identification de la bactérie. Pour cela, 4 molécules, très différentes en termes de famille chimique mais aussi de rôles biologiques et de moment de production ont été sélectionnées. Ces molécules ont été étudiées de manière complète d'un point de vue électrochimique dans des solutions modèles. Ces résultats seront présentés dans le Chapitre 2. Ce même chapitre présente aussi l'analyse de surnageant de plusieurs souches de PA. Suites à ces expériences, nous avons exploré une voie devant permettre une meilleure détection de ces molécules dans le surnageant. Cette voie utilise le polymère conducteur poly(3,4-éthylènedioxythiophène):poly(styrène sulfonate) (PEDOT:PSS) comme électrode de travail. Ce polymère est connu pour amplifier le signal de molécules organiques. La détection des métabolites de PA ainsi que l'analyse de son surnageant avec une électrode de PEDOT:PSS sont présentés dans le Chapitre 3. Le Chapitre 4 s'intéresse à la mise en forme du PEDOT:PSS en une électrode 3D macroporeuse. L'idée est d'amplifier encore la détection en augmentant la surface d'échange de l'électrode mais aussi en confinant les bactéries dans l'électrode. Le Chapitre 4 présente les résultats sur la fabrication de l'électrode 3D, l'optimisation de sa composition et la détection d'espèces redox. Le Chapitre 5, pour sa part, explore les étapes permettant de passer de cette électrode macroporeuse qui détecte les espèces redox en solution modèle à un dispositif intégré permettant la croissance de bactéries à l'intérieur de l'électrode ainsi qu'une détection in vitro.

## CHAPITRE 2

# Electrochimie sur carbone vitreux de métabolites de *P. aeruginosa* et analyse de surnageants de culture

# Chapitre 2 Electrochimie sur carbone vitreux de métabolites de *P. aeruginosa* et analyse de surnageants de culture

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 2.1.     | Contexte de l'étude électrochimique .....  | 50 |
| 2.2.     | Electrochimie sur carbone vitreux des 4 métabolites sélectionnés .....                   | 50 |
| 2.2.1.   | Avant-propos .....   | 50 |
| 2.2.2.   | Résultats principaux : publication n°1 .....   | 51 |
| 2.2.3.   | Résultats complémentaires sur la détection de PQS.....                                   | 64 |
| 2.2.3.1. | Solubilité de PQS .....  | 64 |
| 2.2.3.2. | Influence du pré-équilibrage sur la mesure de PQS.....                                   | 66 |
| 2.2.4.   | Conclusion générale de l'étude électrochimique .....                                     | 67 |
| 2.3.     | Analyse électrochimique de surnageants de culture de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ..... | 67 |
| 2.3.1.   | Introduction de l'analyse des surnageants .....  | 67 |
| 2.3.2.   | Résultats principaux : publication n°2 .....   | 68 |
| 2.3.3.   | Résultat complémentaire : Analyse d'autres milieux de culture .....                      | 83 |
| 2.3.4.   | Conclusions sur l'analyses électrochimique de surnageants.....                           | 85 |

## 2.1. Contexte de l'étude électrochimique

Comme nous l'avons vu précédemment dans le Chapitre 1, la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (PA) sécrète de nombreuses molécules. Parmi celles-ci, plusieurs ont un comportement redox et peuvent ainsi être détectées par électrochimie. Excepté la toxine Pyocyanine (PYO), leur comportement redox a peu été étudié. De plus, pour plusieurs de ces molécules aucune réaction redox n'est rapportée dans la littérature. Le premier objectif du travail de cette thèse a été de caractériser de manière approfondie les 4 molécules sélectionnées dans le Chapitre 1. Pour ces analyses électrochimiques, une électrode classique a été choisie : l'électrode de carbone vitreux (GC pour *Glassy Carbon*). Cette électrode, très bien caractérisée en électrochimie, possède une bonne réponse électrochimique sur une large gamme de potentiel. De plus, le carbone favorise l'adsorption des espèces organiques à cause de la présence de cycles carbonés ce qui peut aider à la détection de certaines des espèces choisies.

## 2.2. Electrochimie sur carbone vitreux des 4 métabolites sélectionnés

### 2.2.1. Avant-propos

Pour bien caractériser les 4 espèces sélectionnées, nous avons commencé par les étudier de manière approfondie en solutions modèles. L'étude a été réalisée, tout d'abord, dans un solvant aprotique, l'acétonitrile. L'étude du comportement des espèces en absence de proton permet de séparer les réactions d'oxydoréduction présentes pour proposer plus facilement les mécanismes redox mis en jeu. L'acétonitrile est choisi pour sa grande fenêtre électrochimique, qui permet des analyses sur une large gamme de potentiel.

La seconde étape a été d'étudier ces mêmes espèces dans des solutions salines. Pour les études à pH physiologique, un tampon phosphate salin commercial (le PBS pour *Phosphate Buffer Saline*) a été utilisé. Pour les analyses à d'autres pH, des tampons ont été ajoutés à une solution aqueuse de 171mM de NaCl. Cette concentration correspond à 10g/L de sel, ce qui est utilisé dans le milieu de culture bactérien classique LB-Miller.

Le paragraphe ci-dessous regroupe les principaux résultats obtenus. Ces résultats ont été acceptés par la revue *Electroanalysis*.

---

2.2.2. Résultats principaux : publication n°1

## **Electrochemical characterizations of four main redox-metabolites of *Pseudomonas aeruginosa***

Julie Oziat,<sup>a,b</sup> Maxime Gougis,<sup>a</sup> George G. Malliaras,<sup>b</sup> Pascal Mailley,<sup>a\*</sup>

a CEA, Leti, MINATEC Campus, F-38054 Grenoble, France.

b Department of Bioelectronics, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, F-13541 Gardanne, France.

\* e-mail: pascal.mailley@cea.fr

### **Abstract**

Bacterial identification is of first importance in clinic nowadays. For few years, electrochemistry appears as a reliable route for characterizations outside of laboratories. Nowadays, researchers mainly focus on the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* because of its production of the Pyocyanin toxin which has an electrochemical case study behavior. Other *P. aeruginosa* secreted molecules are also studied in a lesser extent. This work deals with the systematic electrochemical characterizations in aprotic and protic solvents of 4 main metabolites of this bacterium in the view of multispecies detection of *P. aeruginosa*. We report here the behavior of the 2-Heptyl-4(1H)-quinolone (HHQ), Pseudomonas Quinolone Signal (PQS), Pyocyanin (PYO) and the 2'-aminoacetophenone (2-AA). All the mentioned species are clearly visible by using electrochemical techniques (cyclic and square wave voltammetries). The 2 most suitable species for electrochemical detection appear to be PQS and PYO because of their detection at low potential.

### **Introduction**

*Pseudomonas aeruginosa* is a gram-negative bacterium that focuses tremendous attention these last decades. Indeed, such opportunistic human pathogen is one of the major microorganism responsible for nosocomial infections in Europe [28]. Patients in intensive care units or suffering from burning, cancer or immunodeficiency present high risk of *P. aeruginosa* infection. For example, it infects chronically more than 70% of cystic fibrosis patients who are over eighteen

[5]. In addition to its pathogenicity, *P. aeruginosa* exhibits high intrinsic and acquired resistance to antibiotic making its eradication complicated.

According to the aforementioned statement, some works were dedicated to the early detection of *P. aeruginosa* using complex biochemical and/or physicochemical methods (see [93], [94] for example or recent works). However, *P. aeruginosa* was longer known as “*Bacillus pyocyaneus*” due to its ability at producing the colored metabolite pyocyanin (PYO). Indeed, PYO represents an ideal biomarker since, it is specifically secreted by *P. aeruginosa* [64] and 98% of *P. aeruginosa* strains secrete this molecule (according to [95] that has reported study made on 835 clinical samples). Thereby, PYO was early used as colorimetric indicator of *P. aeruginosa* presence in bacterial cultures [96]. Interestingly, PYO is also a redox active compound [61] and its electrochemistry was first implemented to characterize the presence of *P. aeruginosa* in bacterial culture by Vukomanovic et al. in 1996 [75]. Away from PYO, *P. aeruginosa* (as all bacteria) secrete a range of (bio)molecules in their culture medium. These (bio)molecules include components of the bacterial quorum sensing (QS), virulence factors or small metabolites issued from bacterial function.

QS molecules rely on small biomolecular species including organic molecules such as Pseudomonas Quinolone Signal (PQS), lipids such as rhamnolipids or small proteins. The aforementioned species, also known as autoinducers, are secreted by the bacterium within the culture media during growth and act as communication/regulation entities. The latter are specific from the bacterial machinery and play an important role on the development and the regulation of the bacterial colony [27], [97]. Thereby, many works are dedicated to their detection in bacterial supernatant using analytical methods such as LC-MS [49], [36], [60], [70] and to the understanding of their impact on bacterial growth.

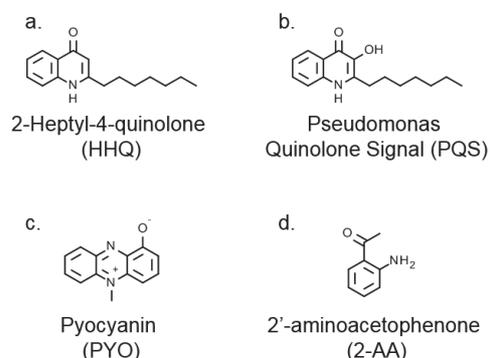
*P. aeruginosa* also generates secondary metabolites in the culture supernatant including virulence factors (such as PYO) and small molecules (such as the 2'-aminoacetophenone). These small molecular units are strongly involved in the pathogenicity of the bacteria but also play a secondary role on the bacterial regulation machinery.

As already mentioned for PYO, electrochemistry could be used for the characterization of molecular species secreted by the bacterium. Indeed, if PYO remains the main studied redox probe, other molecular species present an electrochemical activity.

First of all, phenazine derivatives from PYO family were already reported including phenazine-1-carboxamide, phenazine-1-carboxylic acid, 5-methylphenazine-1-carboxylic acid [81] and 1-hydroxyphenazine [42]. Away from phenazine family, two alkyl-quinolones, 2-heptyl-4(1H)-quinolone (HHQ) and Pseudomonas Quinolone Signal (PQS), that are part of the main *P. aeruginosa* autoinducers [32], can be detected in the bacterial culture supernatant [58]. Some articles also report the presence of secreted species including 2'-aminoacetophenone (2-AA), a highly volatile metabolite which gives PYO grape-smell [91] and (2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde, a molecule recently identified in the *P. aeruginosa* QS for its role under time of stress [98].

However, even if these molecules were already electrochemically detected, their electrochemical behavior, except PYO, is only partially known. Thereby, this contribution aims at fully characterize model species of the secretome in the view of using electrochemistry as a quantitative analysis tool for bacterial contain. Four molecules that were already identified in *P. aeruginosa* secretome (Figure 2-1) were chosen including HHQ (autoinducer), PQS (autoinducer), PYO (virulence factor) and 2-AA (small metabolite).

Accurate electrochemical detection of *P. aeruginosa* requires the detection of more than one biomarker (e.g. PYO) to obtain reliable bacterial identification. Thereby such an identification necessitates the electrochemical co-detection of all the biomarkers of interest [59], [99], [92] and further their complete electrochemical characterizations.



**Figure 2-1: The four *Pseudomonas aeruginosa* metabolites studied in this work.**

## Experimental

### Chemicals and reagents

All the chemicals and reagents were purchased from Sigma-Aldrich with the highest purity grade and used without any further purification. Stock solutions of 2-Heptyl-4-quinolone (HHQ) 10mM, Pseudomonas quinolone signal (PQS) 12.7mM, Pyocyanin (PYO) 8mM and 2'-aminoacetophenone (2-AA) 40mM were prepared in acetonitrile (ACN), aliquoted and stored in freezer (-20°C). Diluted solutions were prepared through dilution of stock solutions in adequate media: ACN containing 0.1M Tetraethylammonium Tetrafluoroborate (TEABF<sub>4</sub>) as electrolyte or PBS solution. For measurements at different pH, buffers were all prepared with ultra-purified water (Milli-Q system) containing NaCl (10mg/mL) and buffer reagents. These buffers are composed according to the pH scale: pH 2 to 5 mixtures of acetic acid and sodium acetate; pH 5 to 8 mixtures of sodium phosphate dibasic and sodium phosphate monobasic; pH 8 to 10 mixtures of borax and hydrochloric acid or sodium hydroxide.

Molecular simulations of the tautomeric forms of organic species were made with the Calculator Plugins of MarvinSketch software (Marvin 14.7.28, 2014, ChemAxon).

### Electrochemical measurements

All electrochemical measurements were made with a home-made three-electrode Teflon cell. Working electrodes were Glassy Carbon (GC) electrode (1mm diameter). Reference electrodes were non-aqueous reference system (Ag/Ag<sup>+</sup>) in organic media, and classical Ag/AgCl electrode ([KCl] 3M) for aqueous measurements. Counter electrode was a platinum foil.

Working electrodes were polished between each measurement series with a 1µm diamond paste (RadioSpares). Then, they were rinsed with ultra-purified water, ethanol and ultra-purified water once again. All electrochemical measurements were performed with a µAUTOLAB III potentiostat (Autolab Bv, The Netherlands) equipped by Nova 1.10 software using either cyclic (CV) or square wave (SWV) voltammetries. In ACN, prior to each measurement campaign,

the reference electrode was calibrated according to the ferrocenemethanol (FcMeOH) half-wave potential using CV. Potential without further indication are referred to the Ag/AgCl reference system.

## Results and Discussion

### ***Electrochemical characterization of the redox metabolites***

The four metabolites studied here (HHQ, PQS, PYO and 2-AA) are known as part of *P. aeruginosa* secretome and were studied in depth in the view of deeper understanding for efficient electrochemical sensing of *P. aeruginosa*. However, if PYO was rather well studied, the electrochemical characterization of the 3 other metabolites is less known and requires complementary studies to use them as electrochemical biomarkers of *P. aeruginosa*. By the way, the herein work describes the electrochemical characterization of the four selected metabolites following a recurrent electrochemical protocol including first voltammetric characterization of the metabolite in aqueous media and aprotic solvent and secondly the study of the effect of the surrounding pH on the metabolite electrochemical response. The former electrochemical characterization allows at providing clear electrochemical redox mechanism for further identification of the detected metabolite in bacterial supernatant while the latter assay would allow at predicting the redox potential of the studied species according to the evolution of the pH generated by bacterial colonization. These characterizations are completed by the study of the impact of each metabolite concentration on their voltamperometric response amplitude to draw the associated calibration curves.

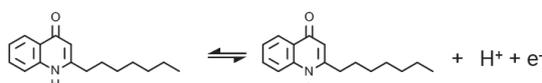
#### *Electrochemical behavior of 2-Heptyl-4-quinolone (HHQ)*

The cyclic voltammetry (CV) of HHQ in neutral PBS aqueous media (Figure 2-4a) shows only one purely irreversible oxidation wave at high potential around +0.99V over the first CV scan. This electrochemical behavior is consistent with reported first experiments on HHQ [58], [92] whereas they observed the oxidation wave at a rather higher potential of +1.351V (pH 5). This large difference in potential could be explained by the nature of the electrode material: boron doped diamond which is known to generate slight over-potential especially when partially oxidized in surface [100].

The evolution of the oxidation peak amplitude with the scan rate shows a linear increase with the square root dependency indicating a purely diffusional process without adsorption of HHQ on the electrode surface (data not shown). Otherwise, on GC electrode, the observed oxidation peak hugely decreases (-83%) in intensity over the second CV scan. This behavior suggests that the irreversible oxidation of HHQ generates strong surface fouling due either to the direct precipitation of the generated species, either to more complex dimerization/polymerization process.

Since electrochemical measurements are strongly influenced by the solution pH (and in the view of bacterial detection, this pH evolved with bacterial growth), we studied the influence of pH using square wave voltammetry (SWV). Thus, SWV of HHQ (50 $\mu$ M) was made on a large pH range, from 3.4 to 10.42 (Figure 2-4b). The oxidation peak of HHQ shifts in potential according to pH with a linear behavior on all the pH tested range. The slope of the regression curve is  $-57.6 \pm 3.6$  mV/pH unit and is consistent with a Nernstian behavior (-59mV at 25°C) for a redox reaction that implied as many protons as electrons.

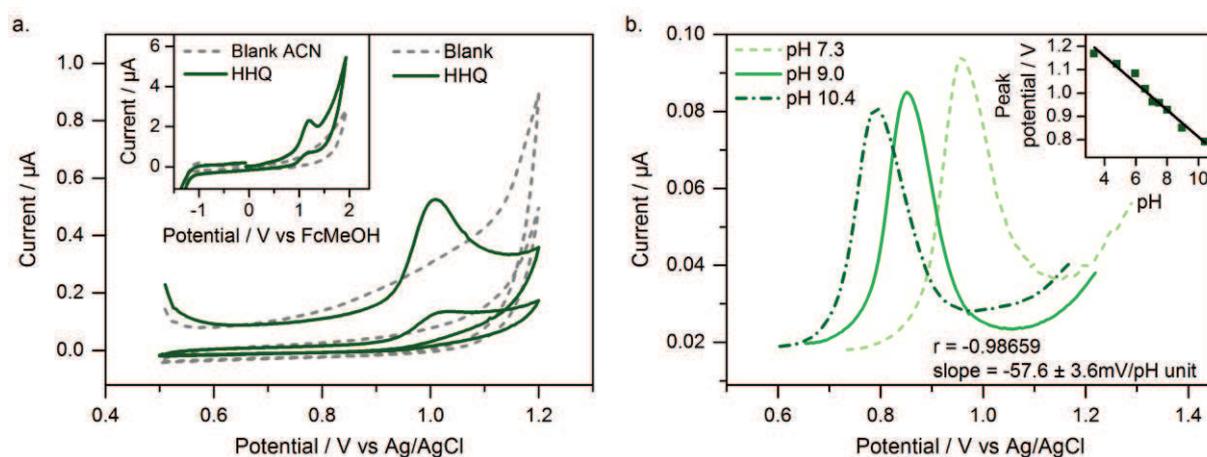
To better understand the molecular behavior of HHQ under oxidation, we performed CV in ACN. Indeed, since ACN is aprotic, experiments in this media were made to separate each electron exchange according to the applied potential. Only one oxidation peak was found near +1.2V vs FcMeOH (insert Figure 2-4a) which suggests the exchange of one electron. Thereby, according to the molecule shape, we made the hypothesis of an oxidation reaction in aqueous media that involves the exchange of one electron and one proton on the aromatic nitrogen (see Figure 2-2). The electrochemical oxidation of HHQ would produce a radical species which is chemically active and may undergo further chemical coupling and electrode fouling. Otherwise one can notice that a resonance can be observed on the position of the radical, according to molecular simulations, the oxygen radical species being the main component (see Figure 2-3).



**Figure 2-2: Postulated HHQ redox reaction.**



**Figure 2-3: Simulated tautomeric equilibrium of HHQ oxide form.**



**Figure 2-4: a. Two first cycles of Cyclic voltammetries (50mV/s) of 50 $\mu$ M HHQ in PBS on GC working electrode; Insert: Cyclic voltammetries (50mV/s) of 1mM HHQ in ACN with 0.1M TEABF<sub>4</sub> on GC working electrode; b. Square wave voltammetries (step 5mV, amplitude 10mV, frequency 2Hz) of 50 $\mu$ M HHQ in NaCl 171mM and pH buffer on GC working electrode; Insert: Extracted peak potential vs pH.**

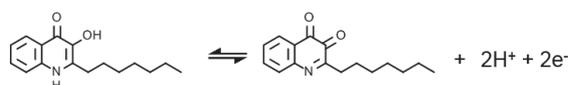
#### *Electrochemical behavior of Pseudomonas quinolone signal (PQS)*

CV of PQS (100 $\mu$ M) in neutral PBS aqueous solution (Figure 2-7a) shows one redox system with an oxidation peak at +0.233V coupled to a reduction wave at +0.178V. The oxidation peak intensity of PQS shows a non-linear dependency with the square root of the scan rate nor

with the scan rate, suggesting a slight adsorption behavior of the molecule at the electrode surface (data not shown). Oxidation and reduction peaks diverge in potential quickly when the scan rate increases (data not shown). This phenomenon strongly suggests that PQS sustains quasi-reversible redox reaction. Otherwise, the ratio of reduction to oxidation peak intensities equal to 0.53 at 50mV/s indicates that the reaction is not fully reversible thus suggesting chemical coupling of the oxidation product leading to the formation of a non-reducible species. Such hypothesis is reinforced by the decrease of the reduction peak amplitude with CV scan rate until the complete disappearance of the reduction wave for scan rates lower than 10mV/s. Otherwise, both oxidation and reduction peak intensities fall between the first and 5<sup>th</sup> CV scan. As already observed for HHQ, this compartment is consistent with electrode-surface fooling due to the precipitation of PQS oxidation products. These observations are consistent with the works of Seviour et al. [59] who have already reported an oxidation peak at similar potential for PQS and electrode poisoning in DMSO. On the other hand, Buzid et al. [92] have reported the presence of three oxidation waves for PQS at + 0.759 V, + 1.103 V and + 1.590 V at pH 5 on boron doped diamond electrodes. As already reported for HHQ, the first wave may correspond to the one observed at GC electrodes with a potential decay due to the different pH and the different electrode material.

When pushing SWV incursion potential toward higher oxidation values on GC electrode, a complex set of four non-reversible oxidation waves become visible (Figure 2-16, supplementary) between +0.45 and +1.1 V that may correspond to the other systems observed by Buzid et al. This behavior suggests that oxidized PQS goes through a series of complex electrochemical reactions. However, the repetition of these experiments shows that these peaks follow poorly reproducible behavior since shapes and intensities of each peak tend to change at each experiment. Due to this instability and also the high potential of detection close to the solvent wall, we pursued the electrochemical characterization of PQS only on the basis of the first quasi-reversible redox wave.

The evolution of the first oxidation peak potential of PQS with pH was studied over 2.87 to 10 pH range (Figure 2-7b). A linear dependence with pH was recorded with a slope of  $-66.3 \pm 1.3$  mV/pH unit slightly superior to the expected Nernstian behavior of  $-59$  mV/pH unit for redox reaction exchanging the same number of protons and electrons. According to PQS molecular structure and on the basis of their biochemical characterization, Hausler et al. [55] postulated an electrochemical reaction involving the exchange of two electrons and two protons respectively on the hydroxyl group in position 3 and on the aromatic nitrogen in position 1 (Figure 2-5).



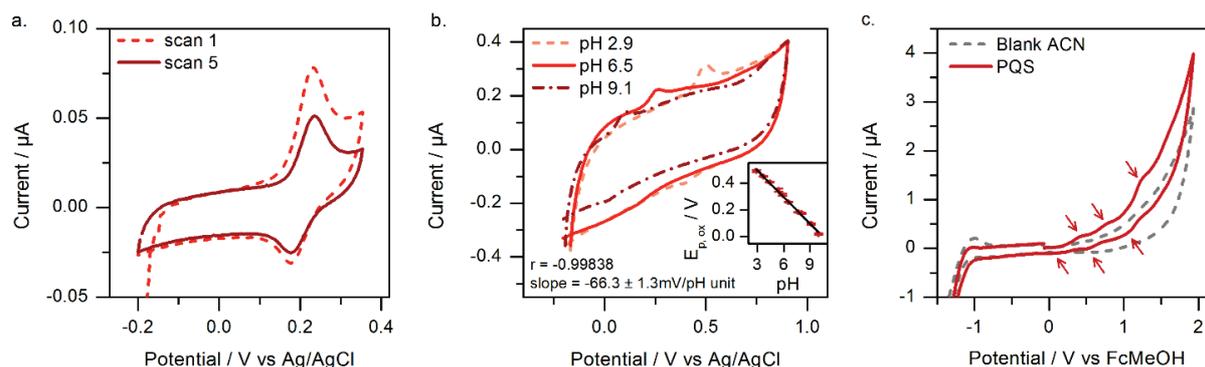
**Figure 2-5: Postulated redox reaction of PQS from [55].**

To validate the aforementioned postulated reaction, we made CV in ACN (Figure 2-7c). Surprisingly, whereas two separated quasi reversible waves are expected, three reversible redox systems (at +0.41 / +0.10V vs FcMeOH for the first couple, +0.77 / +0.53V vs FcMeOH for the second and +1.24 / 1.05V vs FcMeOH for the third one) are visible on the CV. This result seems at first sight incoherent. However, molecular simulations suggest the existence of PQS tautomeric structures corresponding to the two following resonant forms (Figure 2-6).



**Figure 2-6: Tautomeric forms of PQS.**

This resonant behavior shows clearly that there are three possible redox reactions associated to the two OH functions and to the aromatic nitrogen corresponding to the final exchange of 2 electrons and 2 protons. This observation should corroborate the redox behavior of PQS proposed by Hausler et al. [55].

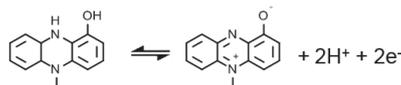


**Figure 2-7: a. Cyclic voltammeteries (50mV/s) of 100 $\mu$ M PQS in buffered NaCl 171mM (pH 7.0) on GC working electrode; b. Cyclic voltammeteries (50mV/s) of 30 $\mu$ M PQS in NaCl 171mM and pH buffer on GC working electrode; Insert: Extracted oxidation peak potential according pH, each point corresponding to the mean value of the 3 experiments; c. Cyclic voltammeteries (50mV/s) of PQS 1mM in ACN with 0.1M TEABF4 on GC working electrode.**

#### *Electrochemical behavior of Pyocyanin (PYO)*

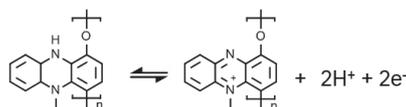
Conversely to the two-previous species, PYO redox behavior was more deeply studied in previous works reported in the literature [62], [77], [78].

Figure 2-12a displays the electrochemical response of PYO (100  $\mu$ M) obtained by CV (50 mV/s) in buffered aqueous NaCl solution at pH 5.6. The obtained voltammograms exhibits two well defined redox waves including one reversible system (ox1/red1) centered at -0.16 V and a purely irreversible oxidation wave (ox2) at a higher potential of +0.8V. When several cycles are made on the first reversible system (ox1/red1, Figure 2-12b), its voltammetric response shows nice reversibility over the 10 first cycles. By drawing the evolution of the peak current with the scan rate, we observed a pure diffusional compartment highlighted by the linear evolution of the peak current with the square root of the scan rate (data not shown). Otherwise, peak to peak potential difference ( $\Delta E_p$  PYO) was measured over the 10 first scans (Figure 2-12b) exhibiting an average value of  $27 \pm 2$  mV. This value is consistent with the theoretical value of 28mV obtained for purely reversible 2 electrons systems at 25°C. Our results are in accordance with previous works reported in the literature [77], [78], that report the reversible reaction (see Figure 2-8) which involves 2 electrons and two protons. This electrochemical behavior is also supported by the voltamperometric response of PYO in ACN that exhibits on GC electrode two irreversible oxidation waves ox1 and ox1' (Figure 2-17, supplementary) and by early results issued from [62].



**Figure 2-8: Redox reaction of pyocyanin ox1/red1 couple from [77].**

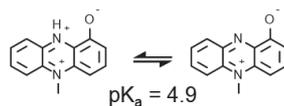
By pushing potential scanning over the second oxidation wave (ox2), the oxidation peak amplitude of the first reversible system rapidly drops (Figure 2-12a). Indeed, the oxidation peak sustains a quick decrease of its intensity of 32% after four cycles, then the amplitude stabilizes leading to the appearance of a new oxidation shoulder at higher potential of +0.03V. Conversely, the reduction wave amplitude remains stable. The irreversible wave ox2 sustains a severe decrease over the four first scans thus remaining more or less stable until the 10<sup>th</sup> cycle. When oxidation potentials larger than +0.85V are reached, the molecule sustain phenolic oxidation leading to its electropolymerization at the electrode surface [78] (see Figure 2-9). This phenolic oxidation process is also visible into the ACN voltammogram of PYO with the existence of a shoulder on the solvent front at a potential of +1.68V vs FcMeOH (Figure 2-17, supplementary). This is also supported in Sharp et al. article [78] by the rise of the ox1/red1 system upon cycling in water based media. This behavior corresponds to the accumulation of a PYO redox active polymer that is able to grow and exchange electrons owing to the reversible system ox1/red1. However, this is clearly not the case in the herein described work (Figure 2-12a) where we observed a decrease of the ox1 peak accompanied by the appearance of the aforementioned oxidation shoulder without any increase of the accumulated charge along cycling. In terms of film growth, the former behavior suggests that, in our working condition, electropolymerization of the PYO polymer is limited probably due to the PYO concentration, the pH conditions and the electrode material. Concerning the appearance of the aforementioned shoulder, it is interesting to notice that in [78] this shoulder also appears. This behavior may be related to a difference of redox activity between the two oxidation sites of PYO due to polymer internal microenvironment and conformation.



**Figure 2-9: Redox reaction of poly(pyocyanin) after polymerization due to phenolic oxidation of the molecule at high potentials from [78].**

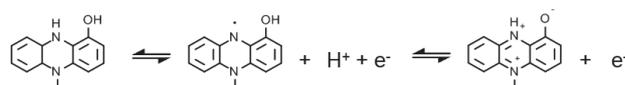
The evolution of PYO redox potential with pH was carried out for pH ranging from 1.5 to 10.3. The voltamperometric responses of PYO recorded over the pH range 5.5 to 10.3 remain similar to the one recorded at pH 5.6 exhibiting one nicely reversible system (Figure 2-12b and c). In the aforementioned pH range, the oxidation peaks potential shifts following a linear behavior ( $r = -0.998$ ) with a slope of  $-54.5 \pm 1.2$  mV/pH unit (Figure 2-12d). This value is close to the theoretical one given by the Nernst law of  $-59$  mV at  $25^\circ\text{C}$  for an exchange of two protons and two electrons and close to previously reported values ( $-55.1$  mV/pH unit [92]).

For pHs lower than 5, one can see some change in the solution color that moves from blue to red. This behavior has been already observed by Friedheim et al. [61] and was attributed to PYO acidity (see Figure 2-10) that involves one  $\text{H}^+$  exchange at a  $\text{pK}_a$  of 4.9 [62].

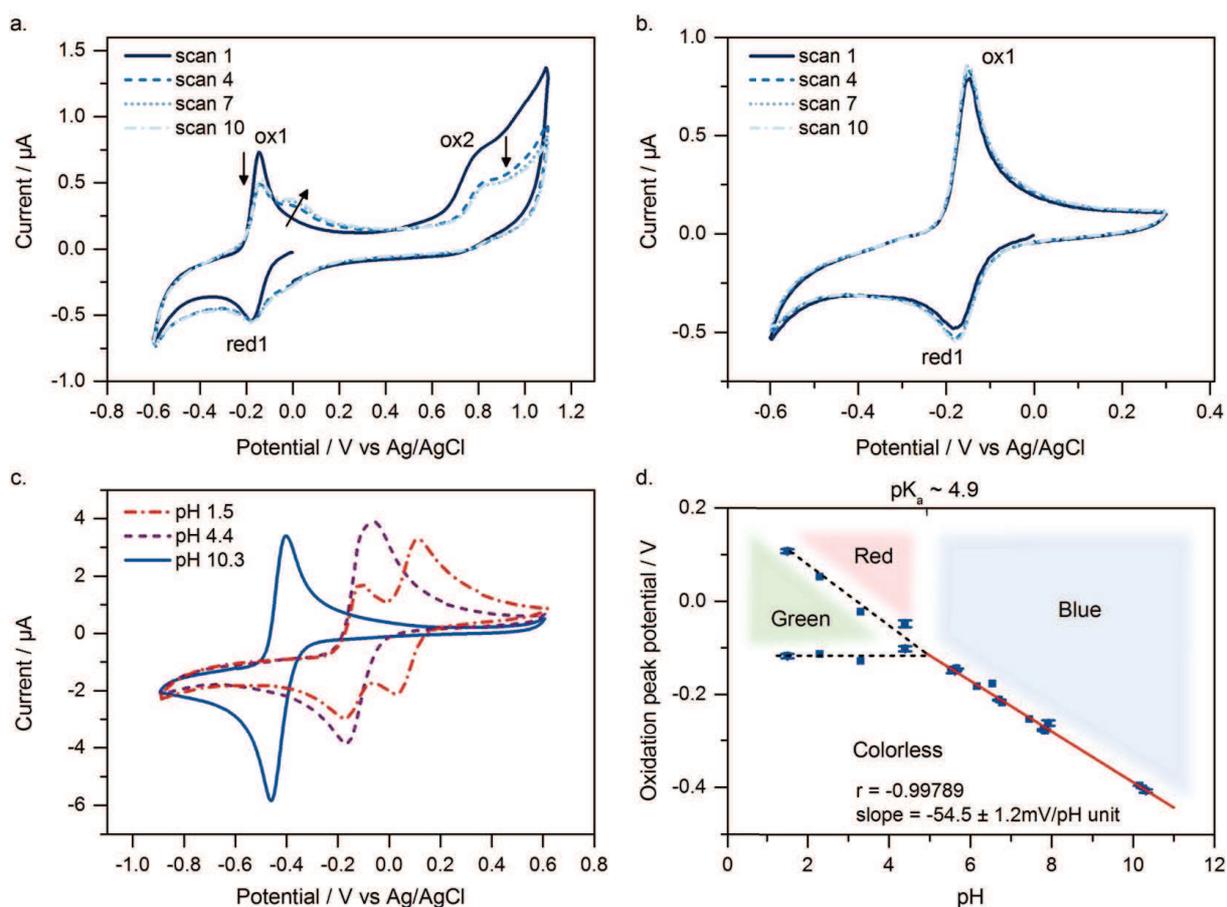


**Figure 2-10: Acid base equilibrium of pyocyanin from [62] and [61].**

At pHs smaller than PYO  $pK_a$ , the redox system (ox1/red1) associated to the reversible ( $2e^-$ ,  $2H^+$ ) exchange of PYO splits gradually with pH into two peaks as shown in Figure 2-12c. This behavior starts with a clearly visible peak broadening at pH 4.4 as displayed on the CV of Figure 2-12c leading to complete peak splitting at pH 1.5. The evolution of both peak amplitudes with the scan rate show that the two electrochemically generated species remains in solution with a purely diffusional behavior (data not shown). Below PYO  $pK_a$ , the potential of the highest oxidation peak is pH-dependent with a likely similar slope than above PYO  $pK_a$  (Figure 2-12d) consistent with a 1 electron, 1 proton reaction. Conversely, the lowest one does not evolve with pH suggesting a pure electron transfer. These results totally match Friedheim et al. ones [61] that were obtained thanks to potentiometric titration experiments. Otherwise, by testing the influence of the scan rate at all tested pH down to 5, the low potential redox system, that involves pure electronic transfer, remains purely reversible whereas the second one exhibits a quasi-reversible behavior probably due to the chemical proton exchange. These results allow us to propose the following electrochemical mechanism (see Figure 2-11) for pHs lower than the  $pK_a$  value.



**Figure 2-11: Postulated redox reactions of pyocyanin acid form ( $pK_a = 4.9$ ).**



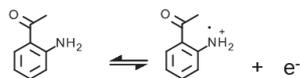
**Figure 2-12: a. and b. Repetitive cyclic voltammeteries (100mV/s) of 100 $\mu$ M PYO in 171mM NaCl aqueous solution at pH 5.6 (phosphate buffer) on GC working electrode; c. Comparison of cyclic voltammeteries (100mV/s) of 1mM PYO in 171mM NaCl aqueous solution at different pH with GC working electrode; d. PYO oxidation peak potential according pH for 1 or 0.1mM PYO aqueous solutions with 171mM NaCl and pH buffer on GC working electrode, species color information from [61].**

#### Electrochemical behavior of 2'-Acetaminophen (2-AA)

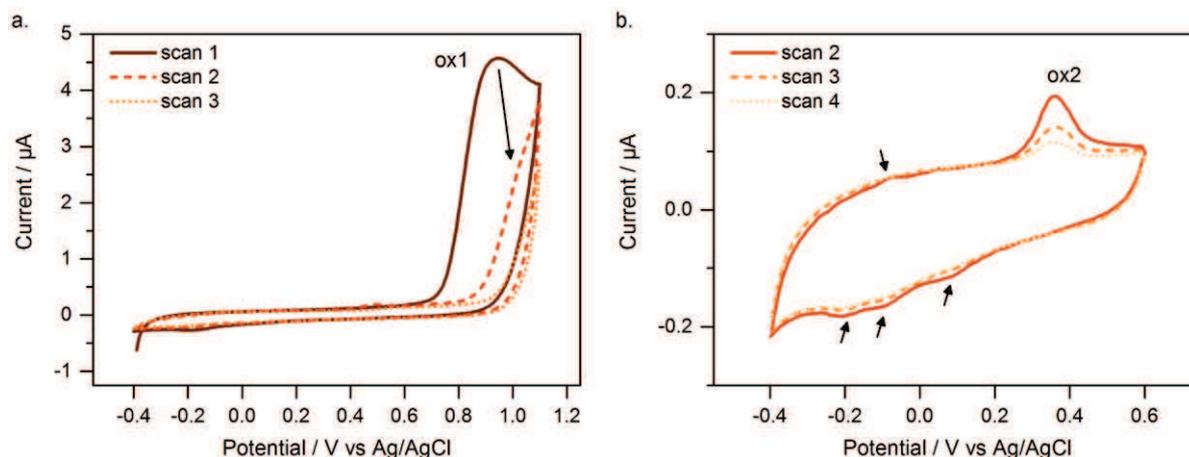
The voltamperometric characterization of 2-AA (2mM) was carried out in neutral PBS solution on GC electrode. The CV (Figure 2-14a) shows one strong irreversible oxidation peak at high potential near +0.95V. The same behavior was obtained on Pt electrode (data not shown) and was also reported by Metters et al. [91] on this electrode material. However, the amplitude of the recorded peak rapidly decreases with scanning. These phenomena strongly suggest the fouling of the electrode surface by the 2-AA oxidation product through the formation of a thin impermeable organic layer.

Otherwise, the first oxidation leads to the appearance of new secondary redox systems over the first backward and second cycles. These peaks are visible on Figure 2-14a, but quickly disappear. To better see them, one cycle is performed until the half wave potential +0,82V after that cycles are stopped at +0.6V (Figure 2-14b). With this experiment, we clearly see one main oxidation peak near +0.36V and several small oxidation or reduction peaks at lower potentials (see arrows on Figure 2-14b). Metters et al. [91] also observed a couple of redox peaks at these potentials on screen printed carbon electrodes.

Mechanism is probably much similar to the one of aniline shown in (Figure 2-13).



**Figure 2-13: Postulated reaction for the 2-AA.**



**Figure 2-14: a. Cyclic voltammeteries (50mV/s) of 2mM 2-AA in PBS with GC working electrode; b. Cyclic voltammeteries (50mV/s) of 2mM 2-AA in PBS on GC working electrode after one cycle reaching +0.92V.**

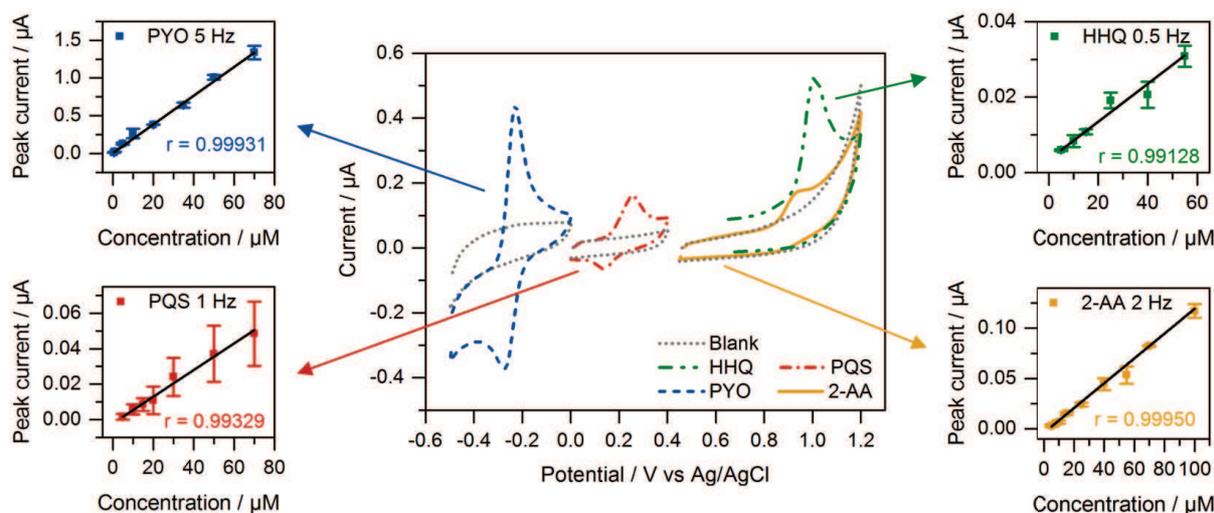
### Electroanalytical results and discussion

Figure 2-15 summarizes the CV of the four-studied species. All the species react at very different potential, except HHQ and 2-AA which have close oxidation potentials with a peak to peak difference of nearly 0.2V. This low potential separation makes their differentiation quite difficult. Moreover, their oxidation potentials are highly anodic. Thereby HHQ and 2-AA oxidation peaks may be partially hindered by water electrolysis and would be difficult but still detectable and quantifiable in PBS. Bacterium culture media are formulated owing to the mixing of lot of chemical and biochemical species to allow growth. Some of these additives may interfere with the electrochemical detection of both target species at high potential which could make their detection more difficult in real conditions. For 2-AA, the existence of identifiable secondary species at lower potential might be a solution to perform their quantification in supernatant. For HHQ, the unique possibility is to increase the pH of the supernatant to extract the peak from the background, but this method requires the buffering of the culture solution thus suppressing the advantage of electrochemistry for real time QS monitoring. We must insist in the fact that PYO and PQS are the only specific species to *P. aeruginosa*. Thereby their low potential detection and well-separated oxidation peaks show the potential of using electrochemistry as an easy and valuable tool for detection and quantification of the QS.

The respective peak amplitudes of each four target molecules are also very different. PYO and HHQ peak amplitudes are very intense compared to PQS and 2-AA ones. This behavior relies on different parameters including the number of exchanged electrons, the reversibility of

the redox behavior or the diffusivity of the specie. The quantification of each species requires the drawing of a calibration curve in different pH conditions.

The calibration curves of the 4 metabolites were recorded for concentration ranges that are consistent with real concentrations reported on literature [49], [36], [60], [70] and are displayed on Figure 2-15. All these curves are made in triplicate using SWV and optimal frequency for each metabolite. For each species, a linear behavior was found with a good correlation coefficient. Standard deviation for each concentration are good for PYO and 2-AA, correct for HHQ but mediocre for PQS due to the low solubility of this species. Nevertheless, Figure 2-15 shows the good analytical comportment of the target species thus opening the way for further bacterial detection in supernatant media.



**Figure 2-15: Central figure: Cyclic voltammeteries (50mV/s) of 100µM of: 2-Heptyl-4-quinolone (HHQ), Pseudomonas quinolone signal (PQS), Pyocyanin (PYO) and 2'-aminoacetophenone (2AA) in PBS on GC working electrode. Around: calibration curve of the 4 metabolites made in SWV (step 5mV, amplitude 10mV, frequency on the figure) using optimal parameters and triplicate experiments.**

## Conclusions

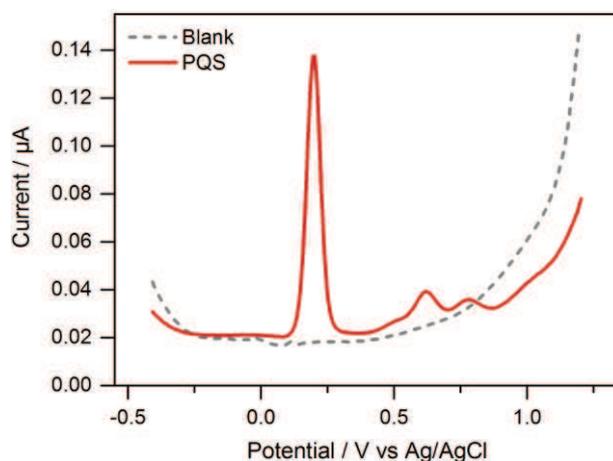
The electrochemical study of four electrochemical active metabolites of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* was carried out (2-Heptyl-4-quinolone (HHQ), Pseudomonas Quinolone Signal (PQS), Pyocyanin (PYO) and 2'-aminoacetophenone (2-AA)). Experiments in the aprotic solvent ACN allows the confirmation of HHQ and PQS redox reaction. HHQ and 2-AA undergo irreversible redox reactions at high potentials near the solvent front. For 2-AA, the electrooxidation reaction is coupled to a strong fouling and generates adducts that can undergo identifiable secondary electrochemical reactions. Peaks linked with these reactions are detectable below the solvent front thus making these adducts possible markers of 2-AA presence. PQS and PYO redox reactions are respectively partially-reversible and reversible and occur at low potential that make these two molecules good candidates for biomarkers of *P. aeruginosa* presence. Moreover, these 2 molecules are specifically produce by this bacterium. All the species exhibit linear behavior in all the studied concentration range which fit with concentration ranges classically

observed in culture conditions. Such behavior opens the way for further direct detection of *P. aeruginosa* secretome in bacteria supernatant.

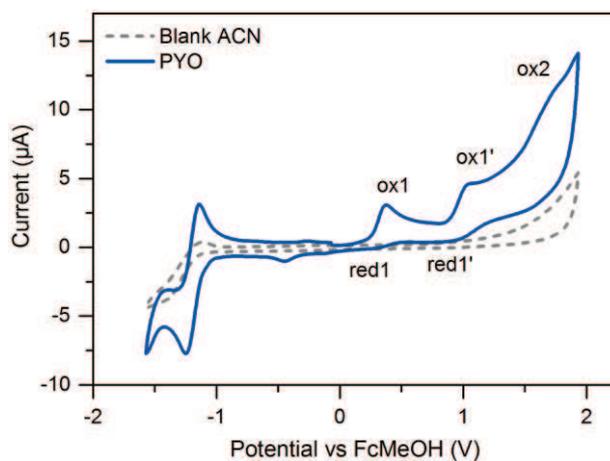
## Acknowledgements

The authors thank CEA and Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne for their financial and research supports. This work is partially supported by the Labex ARCANE (ANR-11-LABX-0003-01).

## Supplementary information



**Figure 2-16: Square wave voltammeteries (step 5mV, amplitude 10mV, frequency 2Hz) of 100 $\mu$ M PQS in PBS. Working electrode: glassy carbon, reference electrode: Ag/AgCl.**



**Figure 2-17: First scans of cyclic voltammetries (100mV/s) of pyocyanin 1mM in ACN with 0.1M TEABF4 on GC working electrode.**

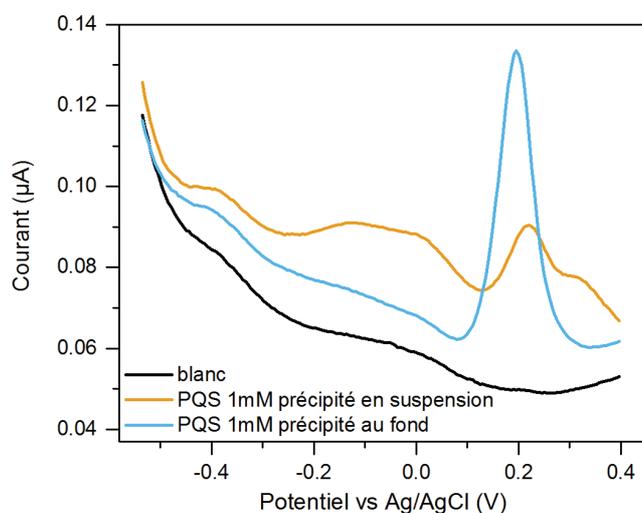
### 2.2.3. Résultats complémentaires sur la détection de PQS

D'autres résultats intéressants ont été obtenus concernant l'étude de la molécule PQS mais n'ont pas été inclus dans la publication en raison de leur importance moindre. Les paragraphes ci-dessous les détaillent.

#### 2.2.3.1. Solubilité de PQS

La longue chaîne alkyle de PQS rend sa solubilisation difficile. Dans la littérature, la solubilité trouvée est de seulement  $4\mu\text{M}$  dans l'eau distillée et de  $19\mu\text{M}$  dans le milieu de culture LB [31]. Ces valeurs sont faibles par rapport aux concentrations de PQS attendues en conditions réelles de culture : jusqu'à  $323\mu\text{M}$  pour PA14 dans du LB après 8h de culture à  $37^\circ\text{C}$  [54]. En milieu de culture, ces valeurs sont atteintes car PQS est solubilisé par des protéines produites par la cellule (notamment les rhamnolipides) [53].

Lors de nos expériences, pour ne pas complexifier le milieu, nous avons choisi de ne pas rajouter d'adjuvant. La solubilité de PQS dans le PBS doit probablement être intermédiaire entre celle de l'eau distillée et celle du milieu LB. Lorsque la concentration de PQS dépasse de beaucoup la limite de solubilité, un précipité est observé. Concernant l'analyse électrochimique, la formation du précipité se traduit par l'apparition de nombreux pics redox supplémentaires (Figure 2-18) par rapport au signal de PQS une fois le précipité décanté. Il faut donc rester dans des concentrations proches de la solubilité de PQS pour avoir une mesure électrochimique propre et représentative.

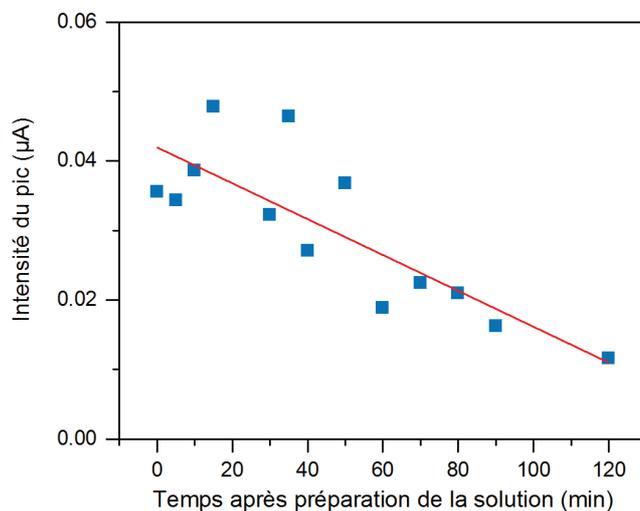


**Figure 2-18 : Détection comparative en DPV de PQS 1mM en présence ou non de précipité.**

Au cours de nos mesures, un manque de répétabilité sur la taille du pic de PQS sur GC a été observé (cf les barres d'erreurs allant jusqu'à 40% de la Figure 2-15) malgré les précautions prises pour réaliser la gamme de concentration. Pour mieux caractériser ce manque de répétabilité et comprendre son origine, plusieurs expériences ont été réalisées.

Pour la première, 40mL de solution contenant du PBS et  $30\mu\text{M}$  de PQS a été préparée. Cette solution a été répartie dans plusieurs béchers en Téflon. Des mesures ont été réalisées avec une électrode GC (polie avant chaque mesure) après différentes durées suivant la préparation de

la solution. Les voltampérogrammes obtenus montrent que l'intensité du pic de PQS varie considérablement à chaque mesure (Figure 2-19). Toutefois, une décroissance globale est observée au cours du temps après la préparation de la solution. Au bout de 2h, l'intensité du pic de PQS est divisée par 3 à 4 par rapport à l'intensité initiale. Cette expérience met en avant un phénomène lent de vieillissement de la solution lié à la précipitation de PQS et/ou son adsorption sur les éléments de la cellule électrochimique. Il faut donc ne pas trop attendre avant d'utiliser la solution de PQS.



**Figure 2-19 : Variation de l'intensité du pic d'oxydation de PQS mesuré en CV en fonction du temps après préparation de la solution.**

Pour la seconde expérience, deux types de détection ont été réalisées sur des solutions de PQS 30µM :

- La première est composée de la séquence suivante : polissage/nettoyage de l'électrode, mesure, polissage/nettoyage de l'électrode, mesure immédiate.
- La seconde est : polissage/nettoyage de l'électrode, mesure, attente 5 min, mesure. Cette expérience a été réalisée en triplicata.

Pour la 1<sup>ère</sup> séquence, la mesure réalisée après le polissage a une intensité inférieure à la 1<sup>ère</sup> mesure (-35 ± 10%). L'état de la surface de l'électrode de GC ainsi que le temps d'attente en solution avant la mesure semblent prépondérants pour l'intensité du pic de PQS. Cela n'est pas étonnant, une adsorption partielle de PQS ayant été mis en avant par l'analyse de la dépendance de la réponse en fonction de la vitesse de balayage. Juste après l'étape de polissage/nettoyage, la surface de l'électrode est moins favorable à cette adsorption partielle que lorsque le polissage nettoyage a été effectué plus tôt avant la mesure.

Pour la 2<sup>nd</sup> séquence, la mesure réalisée après le temps d'attente de 5min donne un pic plus intense que la 1<sup>ère</sup> mesure (+55 ± 10%). Ce résultat est à comparer avec les résultats obtenus en CV classique dans le paragraphe 2.3.2 qui montraient que lorsque 2 cycles de CV sont enchaînés, le pic obtenu pour le 2<sup>e</sup> cycle est très peu intense. Ce manque d'intensité a été attribué à l'oxydation de PQS partiellement irréversible ainsi qu'à la lenteur de diffusion/adsorption. En effet, après l'oxydation, des sous-produits sont formés et une partie d'entre eux est probablement adsorbés à la surface de l'électrode ce qui restreint son accès aux nouvelles molécules. De plus, les CV s'enchaînant, les nouvelles molécules ont peu de temps pour diffuser et venir s'adsorber à la surface. En attendant 5 min avant de réaliser une nouvelle détection, on laisse plus de temps

pour cette diffusion/adsorption et plus de temps aux sous-produits de l'oxydation de se décoller de la surface et ainsi de libérer de la surface active. C'est pour ces raisons qu'en enchaînant les CV le pic est moins intense qu'en laissant du temps entre.

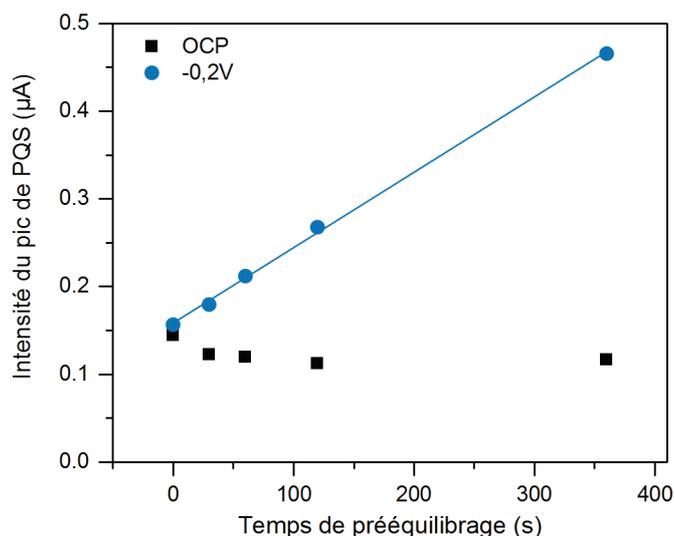
Toutefois, ces phénomènes complexes compliquent la mesure quantitative de PQS. Nous pensons que ce type de phénomène est la cause de la variabilité de l'intensité de l'expérience précédente. Les durées entre nettoyage/polissage, mise en place de l'électrode dans la solution et mesure n'ayant pas été contrôlées.

#### 2.2.3.2. Influence du pré-équilibrage sur la mesure de PQS

Le but de cette expérience est d'étudier l'influence du pré-équilibrage sur l'intensité du pic de PQS. Pour cela des SWV sont réalisées avec une électrode GC dans une solution de PQS 100 $\mu$ M après différents temps de pré-équilibrage soit au potentiel de circuit ouvert (OCP pour *Open Circuit Potential*) soit à -0,2V. Ce potentiel a été choisi car il correspond au potentiel de début du voltampérogramme. L'électrode de GC reste dans la solution pendant toute la durée de l'expérience, pour éviter de changer la surface de l'électrode par le polissage/nettoyage.

Le pré-équilibrage à l'OCP correspond au même type d'expériences que celle réalisée dans le paragraphe précédent mais avec différents temps d'attente entre chaque mesure (dans l'ordre : 0, 30, 60, 120, 360s). Les résultats obtenus sont différents de ceux de l'expérience précédente : la taille du pic diminue légèrement au cours des pré-équilibrages (Figure 2-20). L'enchaînement des détections ne laisse pas assez de temps au phénomène de diffusion/adsorption des molécules oxydées et réduites pour obtenir une détection plus intense que celle obtenue pour la première détection. Ce résultat est celui attendu pour les temps d'attente courts, mais il est au 1<sup>er</sup> abord surprenant pour les temps d'attente longs, l'expérience du paragraphe précédent ayant montré qu'un pic plus intense est obtenu après 5min d'attente. Toutefois le passé de l'électrode est différent dans les 2 cas : pour l'expérience du paragraphe précédent une seule détection est réalisée avant l'attente de 5 min alors qu'ici l'attente de 360s intervient après 4 mesures rapprochées. Ce résultat confirme la prépondérance des temps et des mesures sur la mesure suivante.

Un pré-équilibrage à -0,2V a aussi été testé dans les mêmes conditions. Le résultat obtenu est très différent. La taille du pic augmente linéairement avec la durée du pré-équilibrage (Figure 2-20). Il est donc possible de charger l'électrode en PQS, plus rapidement que le chargement naturel à l'OCP, en plaçant celle-ci à un potentiel négatif. Cette stratégie pourra être mise en place pour amplifier le signal. Ce résultat est a priori surprenant. Un potentiel négatif est appliqué à l'électrode, ce qui peut avoir comme effet d'attirer les espèces cationiques. Or PQS dans son état réduit est neutre et est clairement attiré à l'électrode à -0.2V. Cela est probablement dû à une polarisation de la molécule de PQS qui doit s'orienter dans le champ électrique de manière avantageant le transfert électronique, ce qui n'est pas le cas lorsqu'aucun champ n'est imposé.



**Figure 2-20 : Intensité du pic (SWV 1Hz) de PQS en fonction du temps et du type de pré-équilibrage.**

#### 2.2.4. Conclusion générale de l'étude électrochimique

Grâce à ces expériences, nous connaissons en profondeur les réponses électrochimiques des 4 molécules sur l'électrode GC. Ces réponses sont très différentes et devraient permettre de séparer facilement les contributions des différentes molécules dans des mélanges plus complexes. La technique électrochimique retenue pour la détection des espèces est la SWV. Elle donne une forte intensité de signal pour toutes les espèces et amplifie les réponses redox réversibles. De plus, elle permet de soustraire efficacement le courant de fond.

### 2.3. Analyse électrochimique de surnageants de culture de *Pseudomonas aeruginosa*

#### 2.3.1. Introduction de l'analyse des surnageants

Après l'étude des 4 métabolites en solution modèle, l'étape suivante a été leur détection dans des solutions réelles. Nous avons choisi de le faire dans le surnageant de culture bactérienne. Le surnageant, mélange de milieu de culture de composition complexe et de sécrétions bactériennes, est un milieu riche qui peut par des effets de matrice changer certains des paramètres de détection des molécules. Toutefois, il est important de noter que la détection dans ce milieu ne reflète pas celle qui aurait lieu dans un fluide corporel. Certains de ces fluides sont de composition plus simple, d'autres plus complexe, mais contrairement aux milieux de cultures commerciaux, ils peuvent présenter une grande variabilité de composition inter-individus et au cours du temps.

De nombreux milieux de culture bactériens sont utilisés en microbiologie. Pour cette expérience, nous voulions être dans les conditions classiques des laboratoires de microbiologie. Nous avons donc choisi une culture dans le milieu riche Bouillon Lysogène (LB) Miller : il est composé de chlorure de sodium (10g/L), d'extrait de levure (5g/L) et de peptone (10g/L).

Le surnageant de la souche classique présentée dans le Chapitre 1, PAO1, a été étudié en premier lieu. Cette analyse a été confrontée à celle de son mutant isogénique PAO1  $\Delta pqsA$ .

Puis 3 autres souches sauvages qui diffèrent de PAO1 en termes de concentrations et de nature des espèces sécrétées ont été analysées. Les résultats de ces études sont en cours de soumission

---

2.3.2. Résultats principaux : publication n°2

## Electrochemical signatures of *Pseudomonas aeruginosa* strains

Julie Oziat,<sup>a,b</sup> Sylvie Elsen,<sup>c</sup> George G. Malliaras,<sup>b</sup> Pascal Mailley,<sup>a\*</sup>

a CEA, Leti, MINATEC Campus, F-38054 Grenoble, France.

b Department of Bioelectronics, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, F-13541 Gardanne, France.

c UMR 1036, INSERM-CEA-UJF, CNRS ERL5261, BIG, CEA-Grenoble, F-38054 Grenoble, France.

\* e-mail: pascal.mailley@cea.fr

### Abstract

During infections, fast identification of the microorganisms is critical to improve patient treatment and to better manage antibiotics use. Electrochemistry exhibits several advantages for rapid diagnostic: it enables easy, cheap and *in situ* analysis of redox molecules in most liquids. In this work, several culture supernatants of different *Pseudomonas aeruginosa* strains (including PAO1 and its isogenic mutant PAO1  $\Delta pqsA$ , PA14, PAK and CHA) were analyzed by square wave voltammetry on glassy carbon electrode during the bacterial growth. Obtained voltammograms were complex: they exhibited several redox peaks with current maxima depending studied bacterium and growth. Among them the well-known redox toxin Pyocyanin (PYO) and the autoinducer Pseudomonas Quinolone Signal (PQS) could be observed. The others peaks were observed here for the first time and their corresponding chemicals had not been identified yet. All the peaks and their current maximum established a kind of “electrochemical ID-card” of the studied strain. This “ID-card” was strain-dependent which suggested possible identification of the bacterium at the strain level.

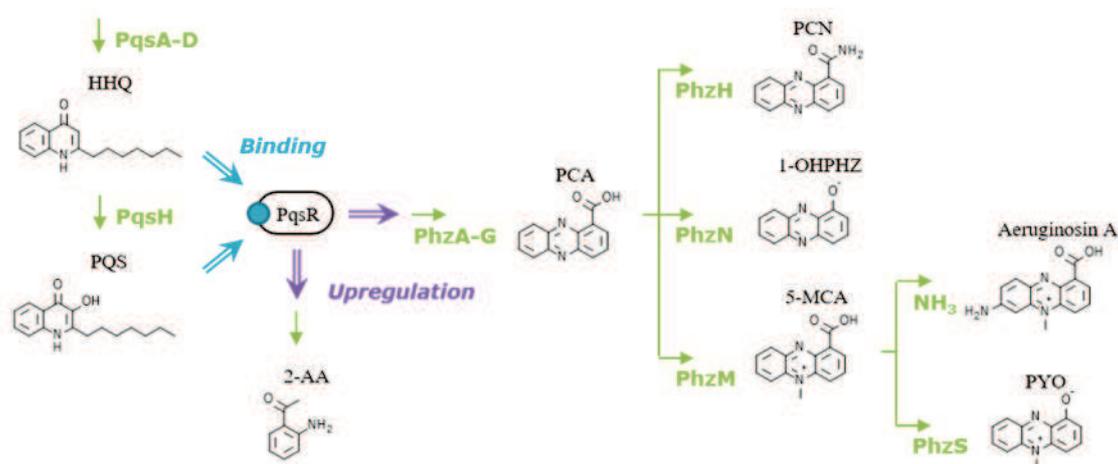
### Introduction

Detection of pathogenic bacteria is of main importance in clinical diagnostics, food processing or water quality management. Reference methods for their detection remain either time-consuming such as classical cultures on Petri dishes or complex as PCR-based detection strategies. Early *in situ* real-time detection would enable rapid treatment to avoid proliferation, further possible contamination of humans or animals and better antibiotic management leading to substantial societal and economical gains [3]. Tremendous attention has been focused on bacterial sensing with the development in the last decades of (bio)sensors to selectively detect and quantify their presence in different media including water, food, biological fluids (serum, whole blood, saliva, urine) or pharmaceutical products. Diverse biosensing strategies were proposed including microgravimetry, electrochemical impedance spectroscopy or surface plasmon resonance. All

these strategies require the use of a bioreceptor with a modification of surface properties (including inertial mass, viscoelastic properties, mass transfer or refractive index) while intercepting bacteria of interest. However, bacteria are known to secrete a wide range of small (bio)molecules involved in or/and issued from their communication process, metabolism or virulence [27]. Thereby, an *in situ* detection of these complex molecular cocktails represents an elegant alternative to detect and further characterize bacteria in media of interest without any requirement for surface functionalization with expensive bioreceptors.

Bacterial secretome is widely studied for different pathogenic bacteria including *Pseudomonas aeruginosa* [26], [21]. These studies are mainly focused on the identification of the different species present in the secretome and their implication in the bacterial regulation process or virulence. These analyses require generally complex apparatus including HPLC and mass spectrometry [49] that are impossible to miniaturize with the aim of *in situ* real time detection. The secretome is constituted of different molecules including proteins, peptides, lipids and small organic compounds. Within these (bio)molecules, some species present a redox behavior that could be exploited for analytical purpose using analytical electrochemistry. For example, *P. aeruginosa* is known to specifically produce the blue redox-active virulence factor Pyocyanin (PYO), explaining is former name of “the *Bacillus pyocyaneus*”. Such a specificity from *P. aeruginosa* has recently orientated the idea of using electrochemistry to detect the presence of the bacterium in culture media [75], [77], [83], [85]. Additionally, more recent works showed that *P. aeruginosa* is able to generate a range of redox active species that could be used as biomarkers of the bacterial presence: i) several molecules of phenazine family as PYO: the phenazine-1-carboxylic acid (PCA) and the phenazine-1-carboxamide (PCN) [76], [81], [82], the 1-hydroxyphenazine (OHPHZ) [76], the 5-methylphenazine-1-carboxylic acid (5-MCA), [81], [82], and the 5-methyl-7-amino-1-carboxyphenazinium betaine (aeruginosin A) [87]; ii) 2 alkyl-quinolones which have a role of chemical messengers: Pseudomonas Quinolone Signal (PQS) [58], [59], [92], and its direct precursor the 2-heptyl-4(1H)-quinolone (HHQ) [58], [92]; iii) a small volatile molecule: the 2'-aminoacetophenone (2-AA) [91].

All the above-cited molecules belong to *P. aeruginosa* quorum sensing (QS). QS includes all the mechanisms for evaluation by the bacteria of their population density in order to adapt their behaviors. It relies on small molecules, the autoinducers (AIs), secreted by the bacteria during growth. When AIs concentrations reach threshold levels, specific receptors are activated and allow the expression of their target genes. There are three major interconnected QS systems in *P. aeruginosa* [48], [30]. Two of them, the *las* and *rhl* systems, are based on AI molecules from the N-acylhomoserine lactones family (the N-3-oxo-dodecanoyl homoserine lactone and the N-butanoyl homoserine lactone, respectively). The AIs of the *pqs* system are HHQ and PQS that can bind to and activate the transcription factor PqsR (Figure 2-21) which in turn upregulates the genes required for synthesis of all the other above-cited redox molecules [50]: the phenazines through the action on the *phz* operons [35], [51], [47] and the 2-AA [36].



**Figure 2-21: Regulation scheme of the electrochemical responsive species of *P. aeruginosa*.** The PqsA-D proteins produce HHQ which is converted into PQS by the action of the PqsH enzyme. Both HHQ and PQS are the co-inducing ligands of the transcriptional regulator PqsR, which activates, among others genes, those leading to 2-AA and phenazine production. Phenazine synthesis begins by the production of PCA thanks to the action of PhzA-G proteins. Then, PCA is converted into 3 different phenazines: PCN, 1-OHPHZ and 5-MCA by action of PhzH, PhzN and PhzM enzymes, respectively. The last phenazine, 5-MCA, could be converted into aeruginosin A through the action of ammonia or into PYO through that of PhzS protein.

Besides its ability to secrete numerous redox components in the culture supernatant, *P. aeruginosa* presents a great medical interest: it is the fourth most common bacterium responsible for nosocomial infections in Europe [28] and it infects chronically more than 70% of cystic fibrosis patients who are over eighteen. We already demonstrated the interest of direct electrochemical characterization of *P. aeruginosa* culture supernatant on the reference *P. aeruginosa* strain PAO1 [99]. The electrochemical response displayed a voltamperometric fingerprint associated to the complexity of the molecular cocktail secreted by the bacterium. At the same time [59] and following this work [92], other researchers used this concept demonstrating the benefits of the electrochemical characterization.

The present work reported the supernatant electrochemical signatures of bacteria grown in batch culture and underlined the correlation between bacterial growth and redox biomarkers production. As it is well established that different strains of *P. aeruginosa* generate different secretomes [73], [71], [31]; due to different genome contents and metabolomic pathways, we determined the electrochemical fingerprints for different *P. aeruginosa* strain supernatants and their evolution overtime. To do so, we first characterized the electrochemical response of the wild-type strain PAO1 and compared it to that of PAO1 $\Delta$ pqsA, an isogenic mutant unable to produce any alkyl-quinolones [34]. Then, three *P. aeruginosa* strains presenting differences in the secretome composition or secretome component concentrations were studied to evaluate the selectivity of the electrochemical response with the bacterial strains.

## Material and Methods

### Chemical and reagents

All the chemicals were purchased from Sigma-Aldrich with the highest purity grade existing and used without any further purification. Stock solutions of Pseudomonas Quinolone Signal (PQS) 12.7mM and Pyocyanin (PYO) 8mM were prepared in acetonitrile, aliquoted and stored in freezer (-20°C). Working solutions were prepared by dilution of stock solutions in adequate media: phosphate buffer solution (PBS) or Lysogeny Broth (LB) medium (NaCl 10g/L, yeast extract 5g/L, tryptone 10g/L).

### Bacterial strains and growth conditions

*P. aeruginosa* strain PAO1 (Holloway collection) and its isogenic mutant PAO1  $\Delta pqsA$  [38], PA14 (R. Kolter), PAK (D. Bradley) and mucoid cystic fibrosis (CF) CHA [101] were investigated.

The same protocol was used for PAO1, PAO1  $\Delta pqsA$ , PA14 and PAK. The *P. aeruginosa* strains were first inoculated in 30 mL LB medium and incubated overnight at 37°C under agitation (300 rpm). Overnight cultures were centrifuged and washed with LB. At  $t_0$ , 1mL of each bacterial solution was added to 155 mL of fresh LB medium to obtain an optical density at 600nm (OD<sub>600</sub>) of 0.05 (about  $3 \cdot 10^7$  bacteria/mL). Then the cultures were incubated at 37°C, 300 rpm. At 0, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 and 24h of growth, 6 mL of the medium were removed, centrifuged at 6000rpm, passed through 0.2  $\mu$ m filter and stored in ice until the electrochemical analyses were performed. In parallel, bacterial growth and supernatant pH were followed by OD<sub>600</sub> spectrophotometer and a pH meter equipped with classical glass electrode, respectively.

The culture supernatant of mucoid CF CHA strain was characterized after 8h of growth. For that, 100 mL of fresh LB medium were inoculated with washed bacteria to obtain an OD<sub>600</sub> of 0.05 (about  $3 \cdot 10^7$  bacteria/mL) and one sample of 10 mL was removed after 8h of growth for analysis.

### Electrochemical analysis

All electrochemical measurements were performed in a three-electrode 1.5mL Teflon cell. The working electrode was a Glassy Carbon (GC) electrode of 1mm diameter, the reference electrode was a classical Ag/AgCl electrode ([KCl] 3M) and the counter electrode was a platinum foil.

GC working electrode was polished between each measurement with a 1 $\mu$ m diamond paste (RadioSpares). Then, it was rinsed with ultra-purified water and ethanol before being vortexed 2min in ethanol and 2min in ultra-purified water.

All electrochemical measurements were performed with a  $\mu$ AUTOLAB III potentiostat (Autolab Bv, The Netherlands) equipped by Nova 1.10 software using square wave voltammetries (SWV) with the following parameters: step 5mV, amplitude 10mV, frequency 2Hz (scan rate 10mV/s). The supernatant solutions were characterized by SWV on the potential range of -0.35/+1.2V, except for CHA strain analysis for which the potential range was -0.7/+1.4V. The current background associated to the LB medium was measured systematically for the selected potential window before each experiment batch.

### **Data analysis**

Data analysis was performed using Origin 9.1 software. For each culture experiment, the background current, issued from medium response, was modelled owing to a set of 8 experimental measurements situated in the flat response and in the foot of the LB response area (-0.35 to 0.60 V). Then, baselines were created for each new data from this set of 8 points. Following baseline subtraction, peak amplitude and potential were determined using multiple peaks fit function with Gauss shape in the potential range of -0.35V/+0.35V.

## **Results and discussions**

### **LB medium electrochemical analysis**

Bacteria are grown in complex media that provide nutrients required for cell growth. These media are enriched with proteins, peptones and other molecular species that can electrochemically react at the electrode surface leading to overestimation or/and possible hindering of *P. aeruginosa* supernatant electrochemical response. In order to enable baseline subtraction and set the electrochemical windows of the culture medium, the characterization of LB solution was performed using SWV.

SWV response of LB (see Figure 2-26, supplementary) was perfectly flat in the potential range from -0.35 to +0.50 V and presented an intense peak at a potential of +0.85 V. When repeating LB characterization, the wave associated to the medium did not come out exactly at the same potential and could exhibit additional shoulders at lower potentials in the wave front or at higher potentials. In a previous work, we showed that the main electroactive species secreted by *P. aeruginosa* were included in the potential window -0.35/+0.90 V in PBS [publication n°1]. No interfering species that may induce false detection were present in LB voltammogram, in the range of PYO and PQS detection (-0.25 to +0.52 V), indicating a possible (easy) detection for these molecules. Detection of supernatant molecules with redox potential upper than +0.5 V (such as the target species HHQ and 2-AA) was compromised in LB because of the intense peak at a potential of +0.85 V and its non-reproducibility [publication n°1]. Consequently, potentials higher than +0.6 V (foot of the LB wave) were not considered in this work and, to characterize the *P. aeruginosa* supernatants, the boundaries of the SWV cycle were fixed in the range of -0.35/0.6V.

### **Electrochemical spectra of PAO1 and PAO1 $\Delta$ pqsA supernatants**

#### *Overview of the spectra*

The study of the electrochemical responses of *P. aeruginosa* secreted molecules was assayed through SWV carried out with the supernatants of different bacterial cultures. Two strains were first studied: the PAO1 strain and its isogenic mutant PAO1 $\Delta$ pqsA deleted of the pqsA gene sequence. This sequence is mandatory to produce HHQ and PQS as presented in Figure 2-21 [102]. So PAO1 $\Delta$ pqsA strain does not produce neither HHQ and PQS nor any phenazine species that represent the main electroactive molecules secreted by *P. aeruginosa* [59], [81]. Therefore, PAO1 $\Delta$ pqsA was used in this study to corroborate peaks attribution associated to PQS production and to extract the electrochemical responses associated to secretions independent from pqs system.

To accurately compare the electrochemical responses of the strains, we followed their growing behavior by using optical density (OD) experiments as reference method. Inserts of Figure 2-22 present the evolution of the culture OD at 600 nm ( $OD_{600}$ ) during growth of PAO1 and PAO1 $\Delta pqsA$  strains, respectively. Both strains followed overall similar temporal evolution that is usually expected for bacterial cultures, including a short lag phase, an exponential growth period and then a stationary phase.

Figure 2-22a illustrated the electrochemical SWV spectra of PAO1 strain supernatant during growth. In the potential range  $-0.35/+0.60$  V, 7 to 9 peaks appeared, the first ones as soon as 3h of growth. The  $+0.25/+0.60$  V potential window was difficult to clearly analyze due to the presence of multiple peaks with significant overlapping in potential. The well-defined peaks visible in the potential range  $-0.35/+0.25$  V were numbered from 1 to 5. Figure 2-23 summarized the temporal evolution of those peak amplitudes.

Peaks 1 and 5 were assigned to PYO and PQS molecules, respectively, based on their potential location [publication n°1]. To confirm this assertion, aliquots of the two products were added to artificially increase their concentration resulting in a concomitant increase in peak intensities (data not shown). Other species of the phenazine family as PCA and PCN may be electrochemically detected at potentials close to PYO one, as reported by Bellin *et al.* [81]. We can rule out the presence of PCA and PCN in our sample as the shape of the peak associated to PYO near  $-0.25$  V was symmetrical and well resolved (Figure 2-23a). Bellin *et al.* [82] also showed that PCA and PCN are present under the detection limit in the supernatant of PA14 culture. In the following analysis, we considered that PCA and PCN concentrations were negligible compared to PYO one, and peak 1 was ascribed only to PYO.

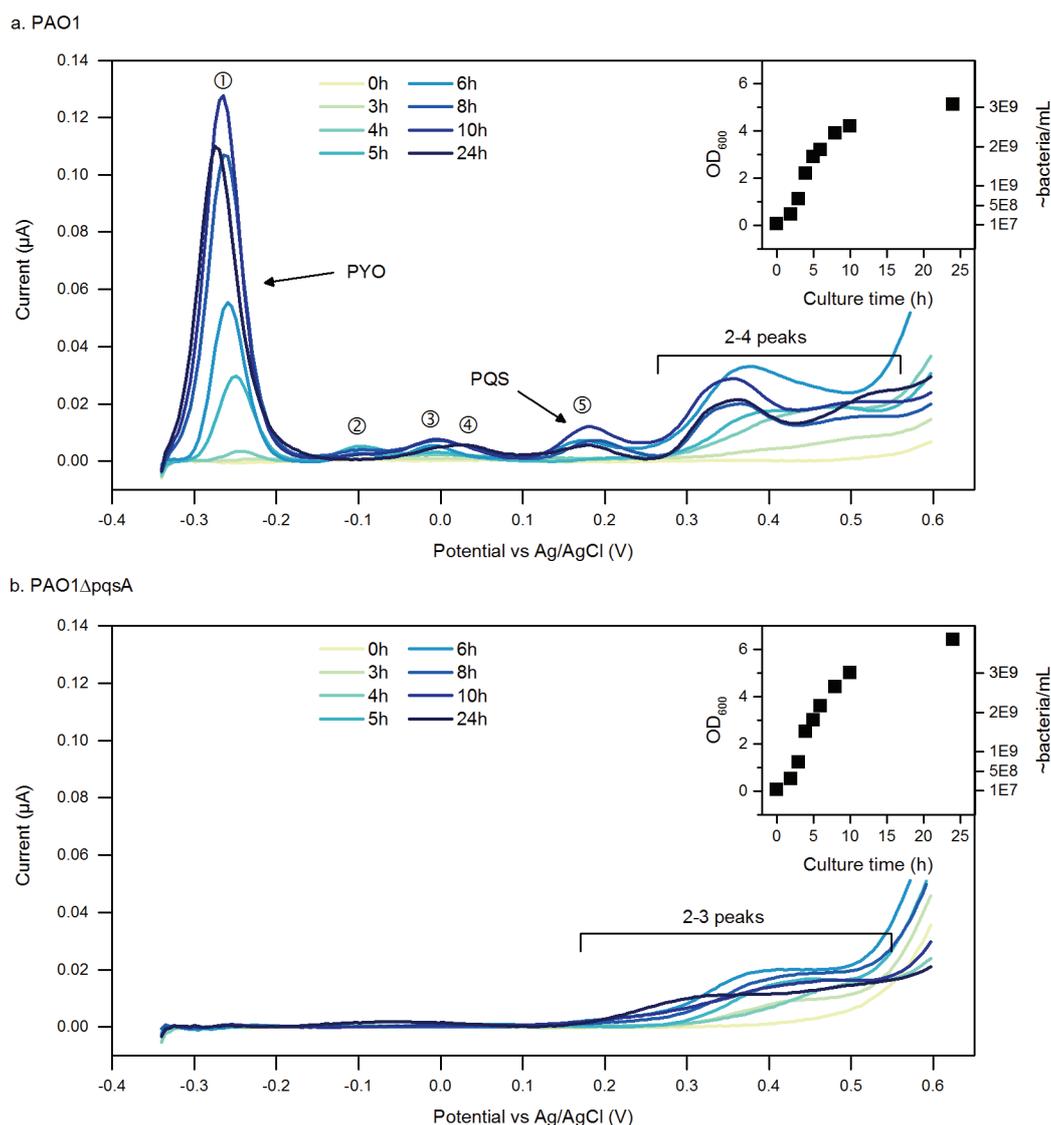
Amplitude of PYO and PQS peaks increased substantially during growth, up to 10h, then it decreased (Figure 2-22a). For PQS, this result was consistent with Lépine *et al.* [31] which reported that PQS concentration reaches a maximum level during the early stationary phase, before decreasing. For PYO, literature showed that concentration increases from 3/5h until 9/12h of growth [71], [70]. Then, concentration was reported to either remain constant [71], or decrease [70].

Peaks noted 2, 3 and 4, situated in the potential window  $-0.15/+0.10$  V (Figure 2-22a), were not related to classically studied redox species issued from *P. aeruginosa* QS. Peaks 2 and 3 reached also a maximum before falling in current as already seen for PYO and PQS during the bacterial growth. This suggested that the aforementioned species are under control of QS. From Bellin *et al.* [82], results and according to its potential location, peak 3 may correspond to 5-MCA. Concerning peak 4, it appeared late, after 8h of growth (Figure 2-23): it might correspond to products of degradation coming from secreted species since its appearance was concomitant with the inflection of the peak amplitude of PYO, PQS and that of peak 3.

To verify the specificity of the SWV response to PAO1 secretions, PAO1 $\Delta pqsA$  mutant, which is impaired in HHQ and PQS production and, consequently, does not produce any phenazines [34], was assayed (Figure 2-22b). As expected, the voltamperometric response of the mutant supernatant markedly differed from the one of PAO1 (Figure 2-22a). No response was observed in the  $-0.35/+0.25$  V area where PQS and phenazines are normally detectable. From this analysis, we could conclude that all the species detected in the aforementioned range were dependent on *pqsA* expression, the unknown species corresponding to peaks 2, 3 and 4 included. Contrary to the electrochemical response in the  $-0.35/+0.25$  V potential range, a complex voltamperometric response was observable in the  $+0.25/+0.60$  V range including 2 to 3 different peaks. So, PAO1

strains seem to produce electrochemical species that are not dependent of the *pqsA*-encoded enzyme. It is important to notice that these peaks were not yet identified in the literature. However, their attribution was out of the scope of this work and would be the aim of further studies.

Interestingly, our experiments highlighted the complex electrochemical response of secreted species in *P. aeruginosa* strain supernatants over a large potential window. In the literature, PYO was generally considered as the main electrochemical target in *P. aeruginosa* supernatant due to its response amplitude and reversibility. For example, the pioneering works of Bukelman *et al.* [77] showed that PYO is the unique electrochemically responsive species of PAO1 supernatant grown in LB over a potential window ranging from -0.7 to +0.6 V using cyclic voltammetry (CV). In fact, at the exception of PYO response, the other peaks observable in Figure 2-22a exhibited rather low amplitude and may be partially or totally hidden by background signal and capacitive current in CV experiments. Indeed, pulsed electrochemical methods (e.g. square wave and differential pulse voltammetries) provide strong advantage over CV to efficiently extract the electrochemical response from the capacitive and background currents. Recently, four other works were published and explored large potential range with utilization of pulsed electrochemical method [81], [59], [82], [92]. Bellin and co-workers [81], [82] made their detection by SWV on -0.8/+0.2V range at 50Hz or 10Hz. They did not see any other peaks than those corresponding to PYO and phenazines (PCN, PCA and 5-MCA). This is not so surprising since the utilized pulsing frequency was too high for the characterization of slow redox reactions as PQS one and the electrochemical window too short for exploiting other existing signals at more anodic potentials [publication n°1]. Seviour *et al.* [59] studied the PAO1 strain on -0.4/+0.4V potential range with differential pulse voltammetry (DPV) techniques. However, only PYO and PQS responses were found in the supernatant. Indeed, DPV is a well-adapted technique to subtract capacitive and background currents for the study of irreversible signals but does not amplify reversible signal as SWV, so weak signals could be missed out. Buzid *et al.* [82] studied PA14 strain supernatant with DPV on -0.35/+1.5V range and boron-doped diamond (BDD) electrode. They detected PYO, PQS and HHQ on extracted supernatant medium with added 50 mM acetate buffer (pH 5.0) and 20% of acetonitrile. Their voltammogram also showed the presence of two peaks near -0.1V and +0.1V, not discussed in the paper. All these reasons could explain why we observed more peaks in our experiments than in the ones that were already published.



**Figure 2-22: Temporal evolution of the SWV responses, on glassy carbon working electrode (step 5 mV, amplitude 10 mV and frequency 2Hz) with the supernatant of two *P. aeruginosa* strains: a. PAO1, b. PAO1 $\Delta$ pqsA. The inserts present the temporal evolutions of  $OD_{600}$  and estimated bacterial concentrations for each strain.**

### PYO and P QS peaks

To extract the concentration of PYO and P QS present in the supernatant, calibration curves obtained within LB medium were needed.

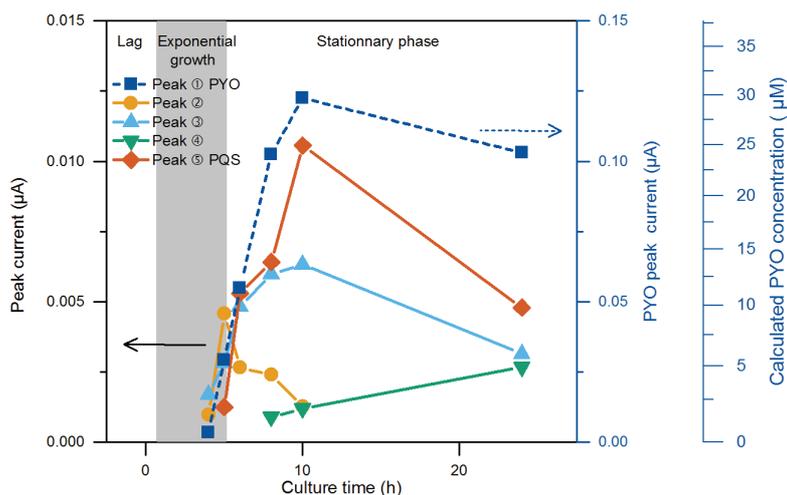
PYO calibration curves were made in triplicate in LB for concentrations ranging from 0.5 to 100  $\mu M$  by using same SWV experimental parameters than those used for supernatant characterization (Figure 2-27, supplementary). Contrary to the linear calibration curves obtained in PBS buffer [publication n°1], an allotropic behavior was observed that could be explained by a matrix effect of LB medium that contains a complex cocktail of molecular and proteinaceous components. This allotropic compartment was already reported for calibration in Muller Hinton medium [75]. Nevertheless, this calibration enabled us to determine the concentrations of PYO in the supernatant as reported in Figure 2-23. The maximum of PYO concentration was obtained

after 10h of culture and corresponded to 29.7 $\mu$ M. This value is of the same order of magnitude than the one previously reported in the literature. However, it is important to note that this value is strongly dependent on culture conditions (for example after 10h of PAO1 culture, PYO concentration was estimated at 6 $\mu$ M for an OD<sub>600</sub> equal to 2.2 in LB [71], and 60 $\mu$ M for an OD<sub>600</sub> equal to 2 in peptone broth [72]) and on cell strain variability.

We also studied in a previous work the electrochemical behavior of PQS in PBS leading to its calibration curve in the concentration range 0-60  $\mu$ M [publication n°1]. This calibration curve was accurately obtained for concentrations lower than 20  $\mu$ M whereas, for higher concentrations, large variance was observed. This comportment reflected the poor solubility of PQS in aqueous solution leading to its rapid adsorption on the electrochemical cell surface as already reported by Lépine *et al.* [31]. Such behavior was also demonstrated by the decrease in signal amplitude observed over time in PBS for PQS (10  $\mu$ M), as determined by SWV (Figure 2-28, supplementary, 20% of the signal was lost after 25 min of measurement). Surprisingly, PQS exhibited more dramatic instability in LB medium free of bacteria leading to the complete disappearance of response less than 5 min after addition (Figure 2-28, supplementary). Such comportment was already reported by Calfee *et al.* [53] for peptone Trypticase Soy Broth medium and may correspond to interaction with constitutive proteins of the medium (that would decrease PQS availability and diffusivity). Therefore, PQS calibration in bacteria-free LB was impossible.

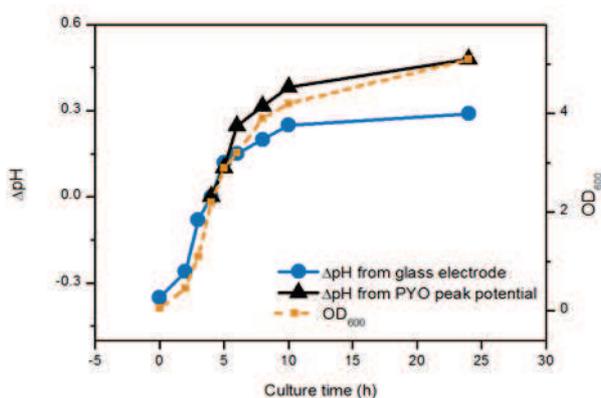
However, as displayed in Figure 2-22, contrary to the results obtained in bacteria-free LB, PQS peak was recorded in *P. aeruginosa* supernatant. This better PQS stability in LB medium containing bacteria is explained by solubilization of PQS by the rhamnolipids [53] (other secondary metabolites produced by *P. aeruginosa*), and by strong interaction between PQS and bacterial membranes [31]. Such phenomenons may generate decreased diffusivity and accessibility to the electrode for PQS which lead to underestimated PQS concentration. It could explain the impossibility to detect PQS using cyclic voltammetry in Bukelman *et al* [77] works.

As it is not possible to make a calibration curve in bacteria-free LB, the quantification of PQS concentration in supernatants is only possible through standard addition method. As already explained above, 2 aliquots of PQS were added to the 24h growth supernatant to confirm the attribution of peak 5 to the PQS response. Through this method, an estimated value of 9.3 $\mu$ M was obtained for PAO1-secreted PQS after 24h of growth. This concentration is of the same order of magnitude than that already reported for PAO1 strain: between 7 $\mu$ M after 20h of culture in modified ABTG medium (LC/MS determination [59]) and 55 $\mu$ M after 24h of culture in LB medium (HPLC determination [103]).



**Figure 2-23: Temporal evolution of the peaks amplitude recorded in supernatant for PAO1 culture.**

One can notice in Figure 2-22a the cathodic shift of the PYO peak potential measured in PAO1 supernatant during growth (from  $-0.24$  to  $-0.27$ V). The electrochemical oxidation mechanism of PYO exchanged two electrons and two protons. Thereby, according to the Nernst law, the electrochemical potential of PYO exhibited a linear pH medium dependency with a slope of  $-59$ mV/decade for a reversible redox system. Consequently, the cathodic displacement of the PYO wave could be attributed to the alkalization of the LB medium during bacterial growth as already reported [104]. By taking pH 7 as a reference point and the theoretical slop of  $-59$ mV/decade, we calculated the supernatant pH extracted from PYO peak potentials owing to the Nernst equation. The pH variation calculated from PYO peak evolution over time fitted rather well the pH measured in the supernatant using a pH glass-electrode (Figure 2-24). Moreover, the pH temporal evolution curves fitted well the evolution of the  $OD_{600}$  of PAO1 strain culture (Figure 2-24). So, pH evolution seems to be homothetic with the numbers of bacteria in the medium. As a consequence, *P. aeruginosa* bacterial growth could be estimated without need of other external measurement owing to the potential shift of PYO peak.

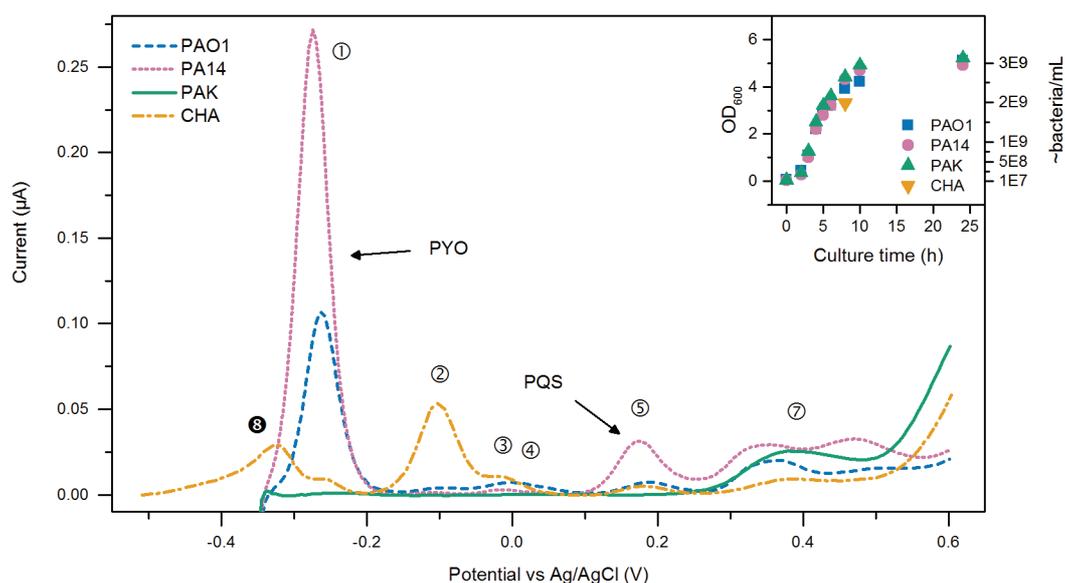


**Figure 2-24: Temporal evolution of the pH issued from glass electrode measurements and the pH calculated from the shift in potential of the PYO peak potential and of  $OD_{600}$  for the PAO1 culture in LB.**

**Is the electrochemical spectrum specific from a bacterial strain?**

Our data on PAO1 and PAO1 $\Delta$ *pqsA* supernatants clearly showed the different electrochemical profiles that can be recorded depending on the ability of the strains to produce secondary metabolites (wild-type *vs* mutant). To validate our approach, we pursued it by analyzing the supernatants of different *P. aeruginosa* clinical isolates well studied in the literature and known to produce different amounts of secondary metabolites due to different genetic backgrounds. Hence, the clinical isolate PA14, that exhibits higher virulence in various infection models compared to the PAO1 strain [39], was also reported to produce more PYO than PAO1 [73], [71], features crucial for our comparative analyses. Another valuable strain is the PAK isolate known to be a poor producer of PYO and unable to secrete PQS molecule [31]. The last strain we used is the CF isolate CHA, a mucoid strain that secretes alginate [101]. The characteristic of this strain is to produce colonies exhibiting a reddish color on Pseudomonas Isolation Agar plate [105], instead of the blue-green color observed for the other strains mentioned above. The diffusible pigment was not identified, but presumably derived from phenazines, so the analysis of its supernatant was tempting.

Figure 2-25 displays the temporal OD<sub>600</sub> evolutions (insert) of the culture media and the electrochemical SWV responses obtained for all the *P. aeruginosa* strain supernatants after 8h of culture. All the studied strains exhibited similar growth based on the OD temporal evolution. The electrochemical voltammograms clearly exhibited marked differences in terms of peak amplitudes (PAO1 *vs* PA14) or peak repartition (PAO1 and PA14 *vs* PAK and CHA).



**Figure 2-25: Comparison of the SWV responses (step 5mV, amplitude 10mV and frequency 2Hz) on Glassy Carbon working electrode of PAO1, PA14, PAK and CHA supernatants after 8h of growth. Insert: temporal evolution of OD600 and corresponding bacterial concentrations.**

The electrochemical response obtained for PA14 was very similar to that of PAO1 (Figure 2-25 and Figure 2-29, supplementary). The same repartition of current peaks was obtained at the same potentials with a marked predominance of PYO and PQS peaks as already observed for PAO1. The electrochemical response of PQS and PYO (Figure 2-30, supplementary) followed the

same evolution over time for both strains with a first detection at around 4h. As already seen for PAO1, PYO and PQS responses decreased markedly after 10h of growth. However, PA14 response was clearly higher for PQS and PYO biomarkers. Indeed, the ratio between PA14 and PAO1 peak maximum for PYO takes a value of 2.7. This higher PYO production was consistent with previous measurements, using classical biochemical detection tools [73], [71]. The maximum of PQS electrochemical response was 3 times higher for PA14 than PAO1. But, the amount of PQS produced by the two strains is more controversial in the literature since higher or similar PQS levels were reported for PA14 [54] and PAO1 [31] in previous works. This first experiment showed that the electrochemical detection of redox biomarkers enabled us to differentiate two strains exhibiting marked difference in PYO and PQS production.

As expected, the electrochemical SWV spectrum of PAK supernatant (Figure 2-25) did not reveal the presence of any PQS nor PYO, but one peak (peak 7) was identified at a potential of +0.38V: its amplitude increased from 3 to 6h before falling down after 10h (Figure 2-31, supplementary). This component may correspond to the one present in the unidentified potential area of PAO1, PA14 and PAO1 $\Delta pqsA$ . Nevertheless, after a longer time of growth, a new component (peak 6) appeared at +0.24 V while the former +0.38V peak completely disappeared. This peak was highly specific of PAK strain since no peak was observed for the other strains at this potential. Unfortunately, we are not able to clearly attribute these electrochemical responses to specific redox species. No peak was observed with PAK supernatant in the -0.35/+0.2V range, where PYO and PQS are usually detected.

The SWV response of the CHA supernatant (Figure 2-25) showed marked differences with the electrochemical SWV spectra of PAO1 and PA14 strains, as expected. The peaks 1, 2, 3 and 5 already observed for PAO1 were clearly present but with different amplitudes (peak 4 was absent here but was generally under the limit of detection at 8h for PAO1). Peak 1 corresponding to PYO was highly depleted whereas peaks 2 and 3 were markedly enhanced in intensity, peak 2 being the main component of the signal. PQS response (peak 5) remained at a level similar to that measured with PAO1. Moreover, one new broad peak (peak 8) appeared at a lower potential than that of PYO (-0.32V). According to the peak potential, this component may be attributed to another phenazine that have close half-wave potential: PCA (-0.31V) [76], PCN (-0.34) [76] or aeruginosin A (-0.34V) [87]. On the potential range +0.30/+0.55V, only one peak appeared at a potential similar to that of peak 7 already observed for PAK.

All the data clearly indicated that our electrochemical method is a powerful tool to analyze the electrochemical response of *P. aeruginosa* strain supernatants in rich medium, and to identify different patterns linked to differences in secondary metabolites produced by the strains. Therefore, SWV analysis of *P. aeruginosa* strain supernatants may be implemented as fast and simple screening methodology for either identification of the exoproducts secreted by an unknown *P. aeruginosa* strain, evaluation of the *P. aeruginosa* strain diversity present in a biological sample of interest or detection of a specific *P. aeruginosa* strain owing to its exoproduct fingerprint. Nevertheless, further works are still needed to obtain a complete ID card of the *P. aeruginosa* supernatant electrochemical signature. This requires first the identification of all the redox species associated to the bacterial strains of interest by mass spectrometry and secondly the electrochemical characterization of an enlarged *P. aeruginosa* strain database.

## Conclusions

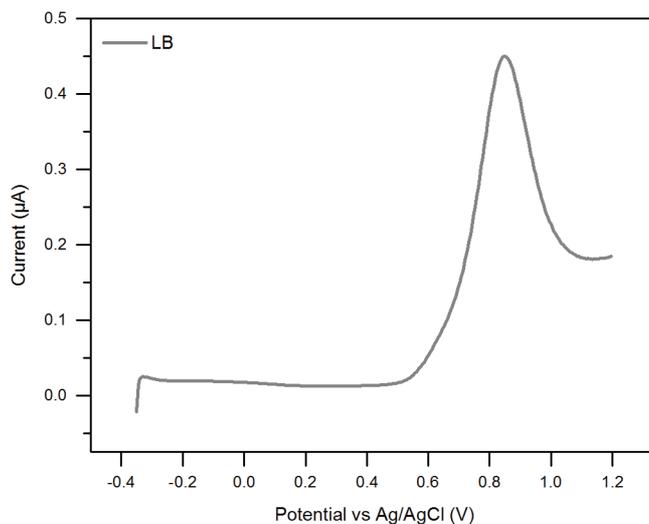
Direct electrochemical analysis of supernatant (without further purification and/or extraction) of several *P. aeruginosa* strains grown in LB medium was performed with success in this work. First, supernatants of the reference strain PAO1 were analyzed by SWV techniques all along the growth. The obtained voltammograms exhibited a complex electrochemical response composed of at least 7 redox peaks that are the electrochemical image of the secretome complexity. Among them, two intense and well-defined peaks were assigned to PYO and PQS. Their temporal evolutions as well as their concentrations were in good accordance with results reported in the literature by LC-MS or HPLC methods. Thus, the electrochemical analysis allowed easy and fast detection of these 2 *P. aeruginosa* important metabolites. Beyond that, all the peaks observed on the voltammograms and their temporal evolution constitute the electrochemical ID-card of PAO1 strain. It could be used as a signature to recognize this strain but also, by extension, to discriminate mutant strains that intrinsically generate their own secretome in terms of species concentrations and/or nature.

To verify this assertion, we analyzed the electrochemical response of supernatants issued from the culture of different *P. aeruginosa* strains. The study of the supernatants of the isogenic mutant PAO1 $\Delta pqsA$  showed that most of the peaks detected in the PAO1 supernatant were dependent on the *pqs* operon, as expected. But peaks over +0.3V were still present in the mutant supernatant which suggested that bacteria which do not possess functional *pqs* system could also produce interesting redox species usable to detect them by electrochemistry. We did not analyze the supernatants of other bacterial species, but we compared the supernatants of 3 others *P. aeruginosa* clinical strains: PA14, PAK, CHA. Our data demonstrated that the electrochemistry is an efficient tool to identify different metabolites production patterns. In conclusion, electrochemical analysis of bacterial supernatant could provide a quick and easy way to visualise the main redox secreted species of an unknown PA strain. This information could be useful, for example, for researchers to find easily strains with original metabolome.

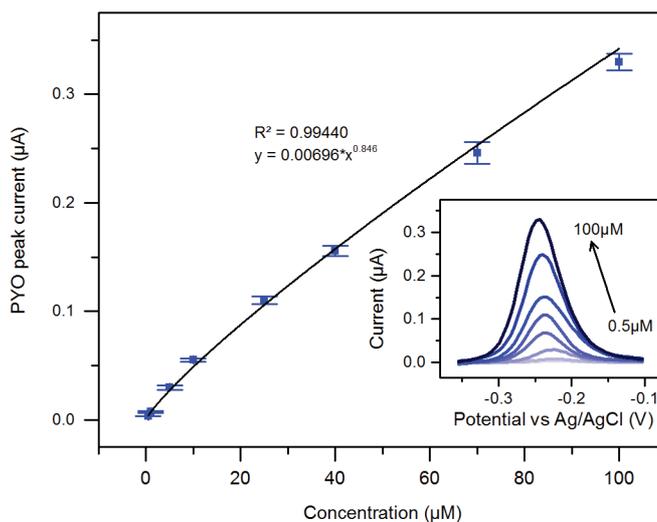
## Acknowledgements

We are grateful to Prof Paul Williams (University of Nottingham) for the gift of PAO1 strains and Sigolène Lecuyer (LIPhy, University Grenoble Alpes) for that of PA14. The authors thank CEA and Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne for their financial and research supports. This work is partially supported by the Labex ARCANE (ANR-11-LABX-0003-01).

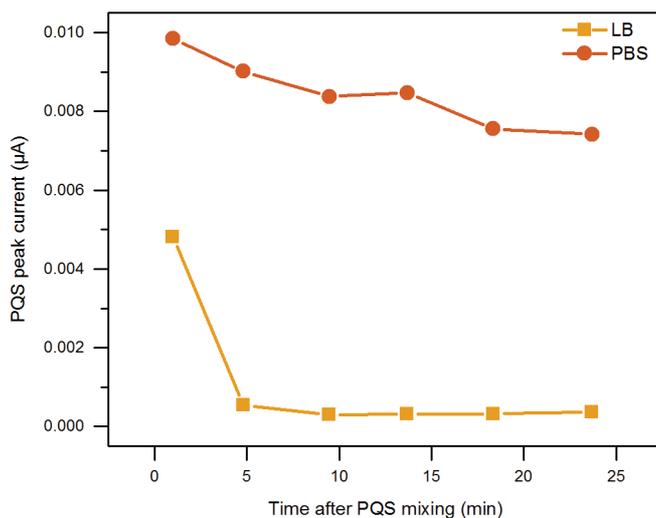
## Supplementary



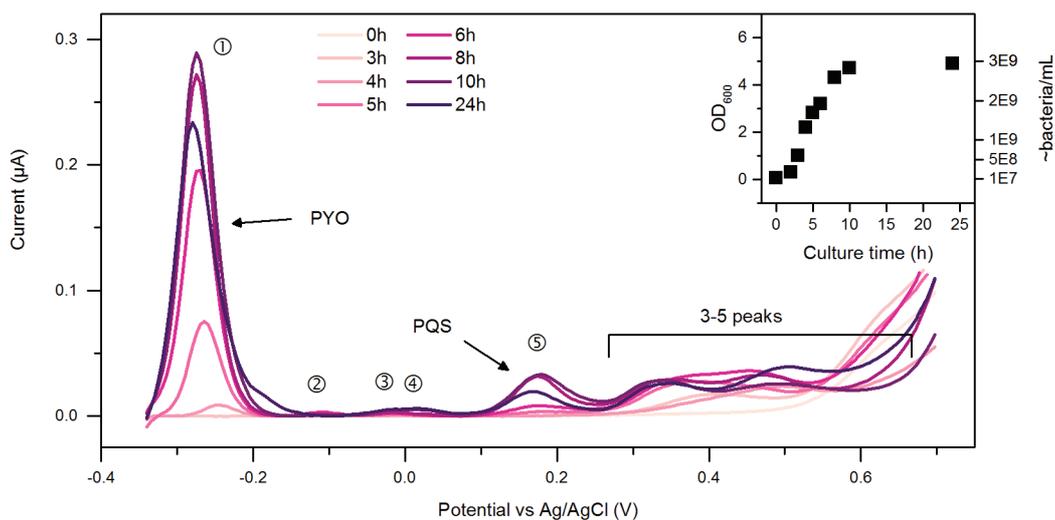
**Figure 2-26: Square wave voltammetry (step 5mV, amplitude 10mV and frequency 2Hz) of LB on glassy carbon working electrode.**



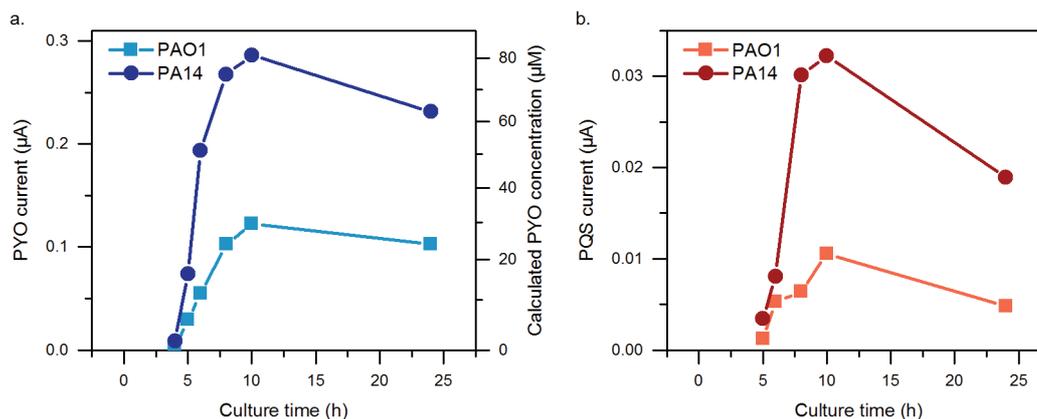
**Figure 2-27: Calibration curve of PYO in LB obtained from SWV experiments (step 5mV, amplitude 10mV and frequency 2Hz) on glassy carbon working electrode. Each point was made in triplicate. Insert: Evolution of the SWV response with PYO concentration.**



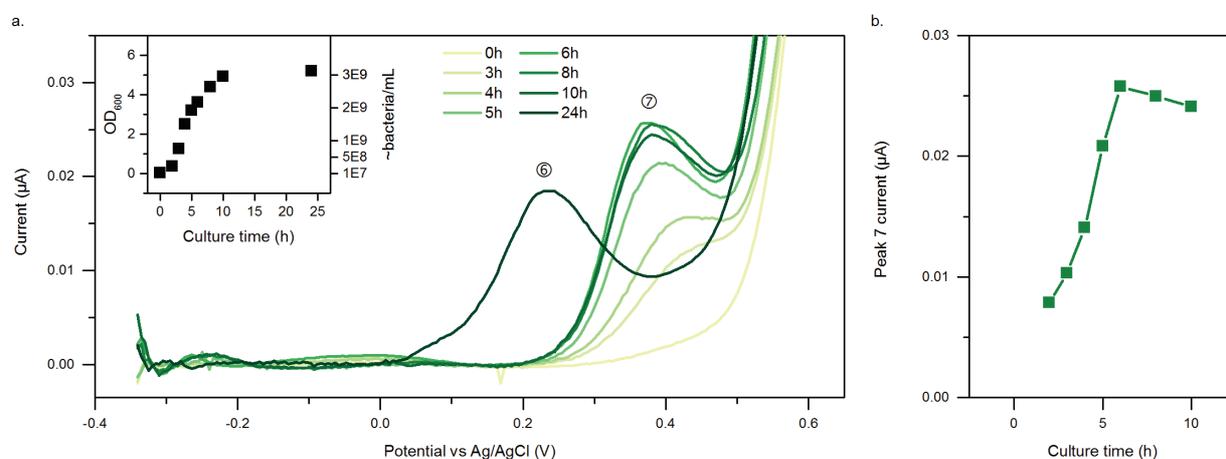
**Figure 2-28: Comparison of PQS peak intensities measured using SWV (step 5mV, amplitude 10mV and frequency 2Hz) on glassy carbon working electrode in LB and PBS media according to the time after addition of 10µM PQS.**



**Figure 2-29: Temporal evolution of the square wave voltammetric response, on glassy carbon working electrode of the supernatant (step 5 mV, amplitude 10 mV and frequency 2Hz) of *P. aeruginosa* strain PA14. The insert shows the temporal evolution of OD<sub>600</sub> and the bacterial concentrations.**



**Figure 2-30: a. Evolution of PYO peak amplitude and concentration for PAO1 and PA14 supernatants; b. Evolution of PQS peak amplitude for PAO1 and PA14 supernatants.**



**Figure 2-31: a. Temporal evolution of the square wave voltammetric response, on glassy carbon working electrode of the supernatant (step 5 mV, amplitude 10 mV and frequency 2Hz) of *P. aeruginosa* strain PAK. The insert shows the temporal evolution of  $\text{OD}_{600}$  and bacterial concentrations; b. Evolution of the current for peak 7.**

### 2.3.3. Résultat complémentaire : Analyse d'autres milieux de culture

Le milieu LB a été choisi pour les expériences ci-dessus car c'est l'un des milieux le plus communément utilisé dans les laboratoires de microbiologie. Toutefois, il en existe de nombreux autres. Nous avons analysé en SWV (pas 5mV, amplitude 20mV, fréquence 0,5Hz), 6 milieux de culture :

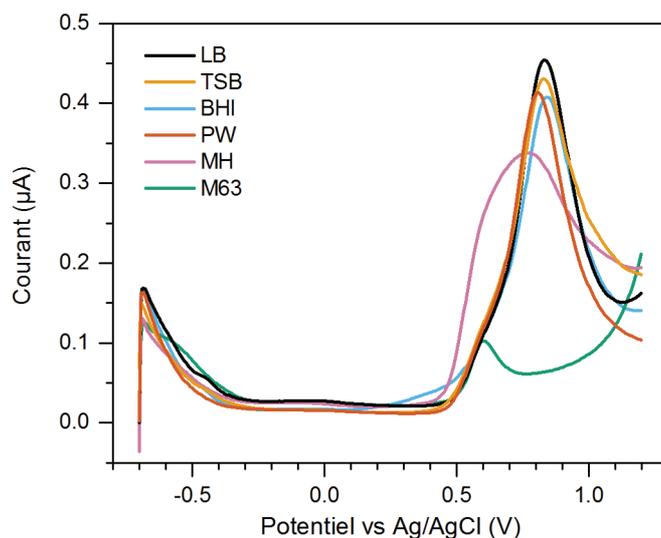
- milieu LB-Miller, BD,
- bouillon tryptone-soja (TSB pour *Tryptic Soy Broth*), bioMérieux,
- bouillon cœur-cerveille (BHI pour *Brain Heart Infusion*), BD,
- eau peptonée (PW pour *Peptone Water*), bioMérieux,
- milieu Mueller Hinton (MH), BD,
- milieu M63, BD, complété avec du glucose, des casamino acides et du sulfate de magnésium,

La composition de ces différents milieux de culture est indiquée dans le Tableau 2-1 ci-dessous.

**Tableau 2-1 : Composition des 7 milieux de culture analysés.**

|              |   | LB | BHI | MH   | TSB | PW | M63 cpl. |
|--------------|---|----|-----|------|-----|----|----------|
| Nutriments   | Peptones (petits peptides, acides aminés, graisses, minéraux, sels, vitamines et autres composés biologiques obtenus par hydrolyse acide ou enzymatique de matière première d'origine animal, laitière ou végétale) | 15 | 32  | 19,5 | 25  | 10 | 0,04     |
|              | Glucose   |    | 2   |      | 5   |    | 4        |
|              | Amidon de maïs  |    |     | 1,5  |     |    |          |
| Sel minéraux | NaCl  | 10 | 5   |      | 5   | 5  |          |
|              | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ou Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>   |    | 2,5 |      | 2,5 |    |          |
|              | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>   |    |     |      |     |    | 13,6     |
|              | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>   |    |     |      |     |    | 2        |
|              | FeSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O  |    |     |      |     |    | 0,5      |
|              | MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O  |    |     |      |     |    | 0,2      |

Pour tous les milieux testés, les voltampérogrammes se ressemblent pour la gamme de potentiel -0,7/+0,4V (Figure 2-32). Quelques petits épaulements peuvent apparaître mais aucun pic n'est détecté. A plus haut potentiel, les voltampérogrammes des milieux LB, TSB, BHI et eau peptonée présentent un pic très intense entre +0,8 et +0,9V. Ce pic correspond probablement à l'oxydation des peptones présentes dans tous ces milieux. Le milieu MH donne pour sa part un pic beaucoup plus large et à plus petit potentiel (maximum à +0,75V). D'autres types de peptones qui s'oxydent à différents potentiels doivent être présents dans ce milieu comparé au 4 précédents. Pour sa part, le milieu M63 complété présente aussi un pic à haut potentiel (+0,6V) mais beaucoup moins intense. Ce milieu est un milieu minimal qui ne possède pas de peptones. Les éléments chimiques nécessaires à la croissance de la bactérie sont introduits sous la forme de sels minéraux qui présentent moins de composés redox. Le pic à +0,6V est le pic de Fe<sup>2+</sup> de FeSO<sub>4</sub>. De prime abord, on pourrait conclure que le milieu de culture M63 complété est meilleur pour l'analyse électrochimique des métabolites car il y a moins d'interférents. Les pics de HHQ et de la 2-AA pourraient être observés sans être gênés par le pic des peptones. Toutefois, il a été rapporté dans la littérature qu'après 10h de culture de PAO1 dans ce milieu, aucun pic de PYO n'est observé alors qu'il est intense pour une culture témoin réalisée dans du TSB [84]. La difficulté d'accès aux fonctions chimiques semble ralentir ou inhiber la production de PYO. Pour cette raison, le milieu M63 complété n'est pas un candidat raisonnable pour nos analyses.



**Figure 2-32 : SWV (5mV, 20mV, 0,5Hz) avec une électrode GC de 6 milieux de culture différents.**

D'un point de vue électrochimique les 4 milieux LB, TSB, BHI et eau peptonée sont équivalents pour les mesures. Nous avons toutefois conservé le milieu LB pour les mesures car il est le plus communément utilisé pour la culture bactérienne.

#### 2.3.4. Conclusions sur l'analyse électrochimique de surnageants

Les analyses de surnageant ont montrés plusieurs résultats très positifs. En premier lieu, la détection électrochimique de 2 des 4 métabolites sélectionnés a été possible. Les 2 autres étant masqués par les peptones présentes dans le milieu de culture. Les profils obtenus pour les 2 espèces détectées sont cohérents avec la littérature en termes de concentration mais aussi de cinétique. De plus, les voltampérogrammes sont beaucoup plus riches qu'attendu : de nombreux autres pics redox sont aussi présents. Pour certains de ces pics, des pistes d'identification sont données par la littérature, mais pas pour tous. L'identification de ces espèces est une des perspectives ouvertes par ce travail. D'autre part, il a aussi été montré que toutes les espèces redox détectées ne sont pas contrôlées par le système du QS *pqs* de PA. Ce qui laisse la possibilité de détecter des espèces redox chez des espèces ne possédant pas de système similaire. Enfin, nous avons montré que les voltampérogrammes sont très différents selon la souche de PA étudiée. La variabilité inter-souches est grande pour cette bactérie et l'électrochimie peut permettre de discriminer rapidement entre différents profils de sécrétion.

Ces résultats montrent que l'analyse de surnageant bactérien par électrochimie est une approche intéressante. Nous ne sommes malheureusement pas allés plus loin dans cette voie pour cette thèse. La suite du travail s'est concentrée sur le développement d'une électrode plus performante que l'électrode de GC pour la détection des métabolites.



## CHAPITRE 3

# Electrode de PEDOT:PSS, caractérisations et détection de métabolites de *P.* *aeruginosa*

# Chapitre 3 Electrode de PEDOT:PSS, caractérisations et détection de métabolites de *P. aeruginosa*

|            |   |     |
|------------|---|-----|
| 3.1.       | Contexte de l'utilisation d'électrodes de PEDOT:PSS.....  | 88  |
| 3.2.       | Le PEDOT, un polymère conducteur.....   | 89  |
| 3.2.1.     | Polymérisation du PEDOT.....  | 89  |
| 3.2.1.1.   | Polymérisation chimique oxydative.....  | 89  |
| 3.2.1.2.   | Polymérisation en phase vapeur.....   | 91  |
| 3.2.1.3.   | Dépôt électrochimique.....  | 91  |
| 3.2.2.     | Conductivité du PEDOT.....  | 91  |
| 3.2.3.     | PEDOT:PSS.....  | 92  |
| 3.2.3.1.   | PSS : poly(styrène sulfonate).....  | 93  |
| 3.2.3.2.   | Organisation du PEDOT:PSS.....  | 93  |
| 3.2.3.3.   | Le mélange PEDOT:PSS utilisé.....   | 94  |
| 3.2.3.3.1. | L'éthylène glycol.....  | 94  |
| 3.2.3.3.2. | Le GOPS.....  | 95  |
| 3.2.3.3.3. | La DBSA.....  | 96  |
| 3.3.       | Caractérisations de l'électrode de PEDOT:PSS et détection de métabolites de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                             | 96  |
| 3.3.1.     | Avant-propos : Fenêtres de stabilité de l'électrode de PEDOT:PSS.....   | 96  |
| 3.3.1.1.   | En CV.....  | 96  |
| 3.3.1.2.   | En configuration résistance.....  | 97  |
| 3.3.2.     | Résultats principaux : Publication n°3.....   | 99  |
| 3.3.3.     | Résultats complémentaires : Optimisation de la détection de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ , PYO et de PQS sur l'électrode de PEDOT:PSS..... | 117 |
| 3.3.3.1.   | La SWV de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ sur PEDOT:PSS.....   | 117 |
| 3.3.3.2.   | La SWV de PYO sur PEDOT:PSS.....  | 118 |
| 3.3.3.3.   | La SWV de PQS sur PEDOT:PSS.....  | 119 |
| 3.3.3.4.   | Explication de l'allure des SWV.....  | 120 |
| 3.3.4.     | Conclusions sur l'utilisation de l'électrode de PEDOT:PSS.....  | 121 |

## 3.1. Contexte de l'utilisation d'électrodes de PEDOT:PSS

Le premier objectif de la thèse était de montrer l'intérêt de l'analyse électrochimique de surnageants bactériens. Cet objectif a été rempli dans le Chapitre 2 avec des résultats très prometteurs sur les voltampérogrammes de surnageants de plusieurs souches sauvages de PA. Le second objectif est relié à la mise en œuvre de ces analyses, et plus particulièrement au matériau d'électrode. Il s'agit d'étudier si l'utilisation d'une électrode de poly(3,4-éthylènedioxythiophène):poly(styrène sulfonate) (PEDOT:PSS) améliore la détection des métabolites.

Le PEDOT:PSS est un polymère conducteur électronique qui connaît un grand engouement depuis quelques années. Il possède de nombreux avantages :

- bonnes caractéristiques électrochimiques (stabilité, réponse électrochimique...) [106],
- biocompatibilité [107],
- facilité de mise en forme [106],
- détection amplifiée de molécules organiques [108], [109], [110].

Pour ces raisons, ce matériau est utilisé avec succès depuis plusieurs années dans le laboratoire de Bioélectronique de l'École des Mines de Saint-Etienne pour des applications couplant biologie et électronique. Les domaines d'applications des recherches menées au laboratoire couvrent en 2016 :

- la neuro-ingénierie, avec l'enregistrement de l'activité cérébrale à l'aide de transistor électrochimique de PEDOT:PSS implantés [111],
- le diagnostic in vitro, avec 2 volets de recherche différents :
  - la caractérisation de l'attaque de toxines ou de pathogènes sur des tissus épithéliaux ou endothéliaux grâce à un transistor électrochimique [112], [113],
  - la détection de métabolites humains comme le glucose ou le lactate grâce à des enzymes redox couplés aux transistors électrochimiques [114], [115],
- les textiles connectés, le principe est de réaliser des électrodes portées sur la personne pouvant mesurer différents signaux physiologiques [116], [117].

Le PEDOT:PSS a aussi été choisi dans cette thèse pour pouvoir réaliser dans le futur la détection des métabolites en utilisant le matériau en configuration transistor électrochimique. Le but serait d'amplifier le signal en réalisant la détection des molécules à la grille et la mesure du signal dans le drain, de la même manière que Tybrandt et al. [118].

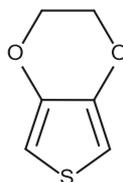
Après une introduction sur le PEDOT, ce Chapitre est consacré à la caractérisation de l'électrode de PEDOT:PSS par rapport à l'électrode de GC du Chapitre précédent pour la détection de molécules redox.

### 3.2. Le PEDOT, un polymère conducteur

Le PEDOT est un polymère conducteur de la famille des polythiophènes. Cette famille de polymère appartient au groupe des semi-conducteurs de type p (déficit d'électrons).

#### 3.2.1. Polymérisation du PEDOT

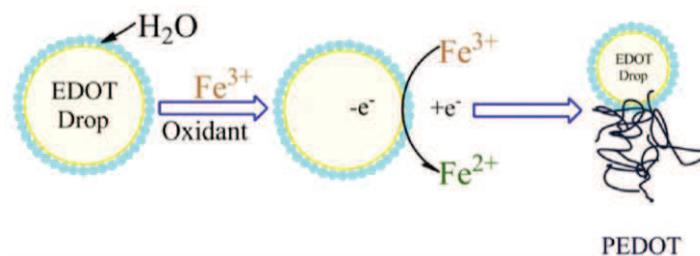
Le PEDOT est issu de la polymérisation du 3,4-éthylènedioxythiophène (EDOT) (Figure 3-1). Plusieurs méthodes de synthèse sont couramment employées pour cette polymérisation. Elles sont présentées dans les paragraphes ci-dessous.



**Figure 3-1 : Monomère d'EDOT.**

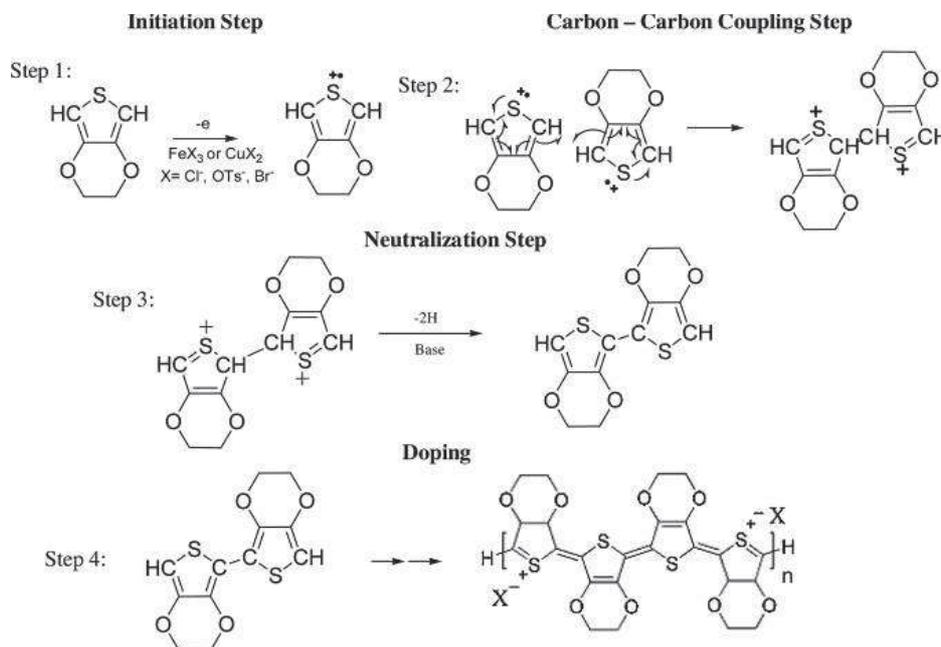
##### 3.2.1.1. Polymérisation chimique oxydative

La polymérisation chimique oxydative consiste à polymériser chimiquement en phase homogène l'EDOT (généralement en solution aqueuse). L'EDOT étant peu soluble en solution aqueuse (2,1g/L [106]), un agent surfactant est utilisé pour créer des gouttes d'EDOT dans la solution. Puis un agent oxydant est ajouté pour polymériser l'EDOT (Figure 3-2).



**Figure 3-2 : Représentation schématique des étapes de la polymérisation chimique oxydative de l'EDOT, extrait de [119].**

La polymérisation du PEDOT se déroule en 4 étapes (Figure 3-3). Tout d'abord une étape d'initiation dans laquelle l'oxydant vient générer un cation radical porté par l'atome de soufre (Figure 3-3 « Step 1 »). Dans la seconde étape, il y a dimérisation de 2 cations radicaux d'EDOT en formant une liaison covalente entre 2 des carbones liés au soufre (Figure 3-3 « Step 2 »). Le dimère perd ensuite 2 protons pour retrouver un état neutre et stable (Figure 3-3 « Step 3 »). Puis le dimère va à son tour s'assembler à un nouveau cation radical d'EDOT ou d'oligomères d'EDOT (Figure 3-3 « Step 4 »). Ce processus se poursuit tant qu'il y a des agents oxydants présents en solution. La charge portée par le soufre est délocalisée sur l'ensemble de la chaîne ce qui la stabilise. De plus, elle est compensée par les anions du milieu qui viennent former des liaisons ioniques. Le PEDOT est ainsi polymérisé directement sous sa forme chargée et conductrice. Cet aspect sera abordé plus en détail dans le paragraphe 3.2.2.



**Figure 3-3 : Etapes de l'oxydation chimique de l'EDOT en PEDOT, extrait de [120].**

Cette polymérisation est celle mise au point par Bayer AG pour leur commercialisation de dispersion de PEDOT. L'EDOT est polymérisé dans une solution aqueuse de PSS en utilisant  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  comme agent oxydant [121]. La réaction se fait à température ambiante et le résultat est une dispersion de PEDOT:PSS bleu foncé. Pour obtenir le polymère sous forme solide, une étape

de dépôt doit être effectuée (à la tournette, à la pipette...), puis une étape de séchage. Un film très conducteur et insoluble dans la plupart des solvants est ainsi obtenu [121].

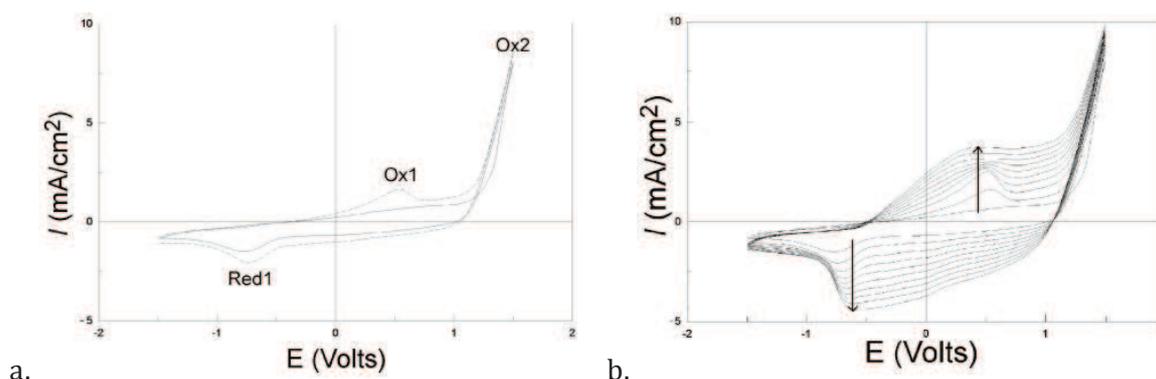
### 3.2.1.2. Polymérisation en phase vapeur

Cette polymérisation est aussi une polymérisation chimique oxydative mais elle présente 2 grandes différences avec celle présentée ci-dessus. L'agent oxydant (par exemple le Fer III) est déposé directement sur la surface de dépôt. Puis, cette dernière est exposée à des vapeurs d'EDOT [122]. Pour cela, un peu d'EDOT liquide est placé dans une enceinte étanche chauffée. Au bout de quelques minutes un film de PEDOT est créé sur la surface de dépôt. Des étapes de rinçages sont ensuite réalisées pour enlever l'oxydant en surplus.

### 3.2.1.3. Dépôt électrochimique

L'électropolymérisation permet de faire croître un film de polymère sur une électrode de travail par oxydation électrochimique du monomère. Elle peut être réalisée dans de nombreuses conditions différentes. Tout d'abord, de nombreux électrolytes peuvent être utilisés (par exemple : eau ou bien acétonitrile, avec différents sels) [122]. La synthèse peut ensuite être effectuée avec 3 grandes méthodes électrochimiques : des méthodes à courant imposé (galvanostatiques), à potentiel imposé (potentiostatiques) et des méthodes de cyclages où le potentiel varie autour du potentiel d'oxydation du monomère.

Par exemple, l'électropolymérisation peut être réalisée par chronopotentiométrie. L'équipe de Bobacka et al. [123] utilise une solution aqueuse d'EDOT 0,01 M et de NaPSS 0,1 M et impose une densité de courant de 0,2 mA/cm<sup>2</sup>. D'autres équipes utilisent la voltampérométrie cyclique (CV). Par exemple, l'équipe de Zhu et al. [124] réalisent 10 cycles de CV à la vitesse de 100mV/s dans de l'acétonitrile avec de l'EDOT 0,01M et du LiClO<sub>4</sub> 0,1M. Au 1<sup>er</sup> cycle, seul le pic d'oxydation de l'EDOT apparaît sur la CV (Figure 3-4a, pic Ox2). Au cours des cycles suivants apparaissent les pics d'oxydation et de réduction du PEDOT (Figure 3-4a, pics Ox1 et Red1). Leurs intensités augmentent au fur et à mesure de la croissance du film (Figure 3-4b).



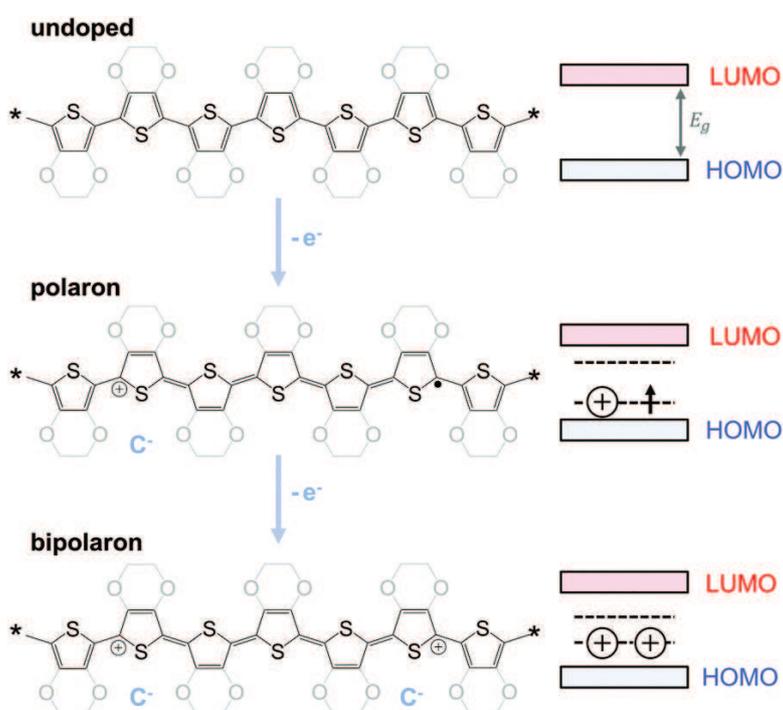
**Figure 3-4 : CV (100mV/s), versus Ag/AgCl électrode, obtenues au cours de l'électropolymérisation de PEDOT à la surface d'une électrode de GC, extrait de [124].**

### 3.2.2. Conductivité du PEDOT

Le PEDOT peut avoir des conductivités très différentes selon son état d'oxydation. Quand il est sous forme neutre, il est isolant. Il n'y a pas d'état d'énergie intermédiaire autorisé

dans la bande interdite entre la bande de conduction et la bande de valence (Figure 3-5). En oxydant le polymère, de nouveaux états d'énergie apparaissent dans la bande interdite. Le gap d'énergie à franchir devient plus faible ce qui augmente la conductivité du matériau. Un matériau de type semi-conducteur est alors obtenu. Ce matériau semi-conducteur et donc oxydé est dit « dopé » par analogie avec les semi-conducteurs extrinsèques dont la conductivité est augmentée en ajoutant des impuretés dans le matériau.

Lorsque le matériau est faiblement dopé (ou oxydé une seule fois tous les 3 monomères), une bande d'énergie un peu au-dessus du niveau de la plus haute orbitale moléculaire occupée (HOMO pour *Highest Occupied Molecular Orbital*) de la bande de valence devient autorisée (Figure 3-5). On parle de configuration polaron. Lorsque le matériau est fortement dopé (ou oxydé une 2<sup>e</sup> fois tous les 3 monomères), la bande d'énergie créée dans la bande interdite est plus haute en énergie, et la conductivité du matériau est ainsi plus grande (Figure 3-5). On parle de configuration bipolaron. C'est dans cet état que le PEDOT est le plus conducteur, le gap à franchir étant le plus faible.



**Figure 3-5: Etat d'oxydation du PEDOT, extrait de [125].**

S'il l'on oxyde encore le matériau (suroxydation), des fonctions cétones ou acide carboxyliques sont ajoutées sur le squelette carboné. La conjugaison est alors rompue et la conductivité décroît de manière irréversible.

### 3.2.3. PEDOT:PSS

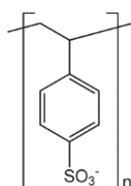
Lorsque le PEDOT est dans son état conducteur (oxydé), il possède des charges positives. Des anions doivent donc être introduits dans le matériau pour obtenir la neutralité électrique. Comme explicité ci-dessus, l'introduction de ces charges est considérée comme un dopage. Elle a généralement lieu en même temps que la synthèse du polymère via l'incorporation des

anions présents dans la solution. En effet, l'oxydation du monomère ayant lieu à plus haut potentiel que celle du polymère (Figure 3-4a Ox2 a plus haut potentiel que Ox1), cela conduit à l'obtention du polymère dans son état dopé.

De très nombreux contre-ions peuvent être utilisés à cette fin. Celui utilisé dans cette thèse est un polymère : le poly(styrène sulfonate) (PSS).

### 3.2.3.1. PSS : poly(styrène sulfonate)

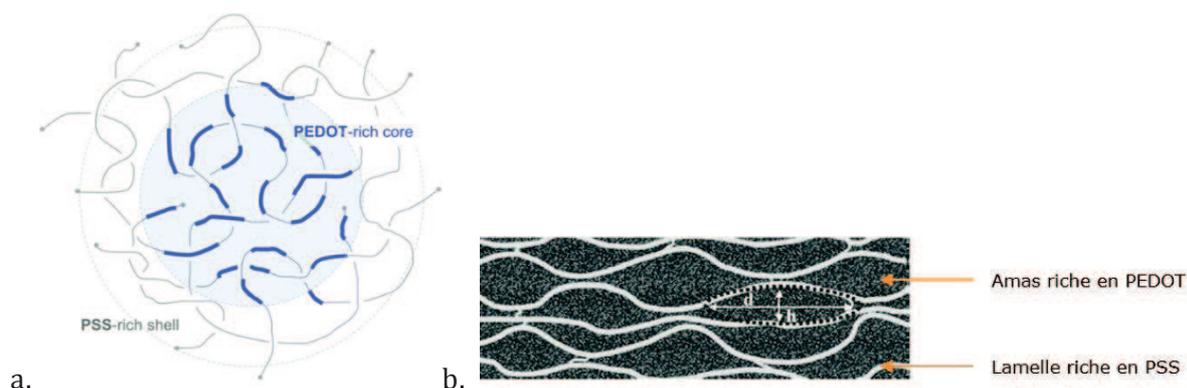
L'utilisation du PSS (Figure 3-6) comme contre-ion est particulièrement intéressante car il est très soluble dans l'eau et permet de solubiliser l'EDOT [106] pour la synthèse chimique mais aussi les chaînes de PEDOT synthétisées. Des dispersions aqueuses de PEDOT:PSS très stables peuvent ainsi être obtenues. Il n'est pas seulement intéressant pour la synthèse et la stabilité des dispersions, mais aussi pour la stabilité et la tenue mécanique des films obtenus à partir des dispersions. En effet, le PSS étant lui-même un polymère, il ne diffuse pas hors des films de PEDOT:PSS, ce qui permet d'obtenir des films très stables. De plus, il permet de renforcer la tenue mécanique du film.



**Figure 3-6 : Motif élémentaire du PSS.**

### 3.2.3.2. Organisation du PEDOT:PSS

L'organisation des 2 polymères en solution ou ensuite sous forme de film a été rapportée dans la littérature. La dispersion aqueuse de PEDOT:PSS contient de nombreuses particules de taille inférieure à 100nm [106] composées d'un cœur de PEDOT entouré par une coquille de PSS (Figure 3-7a). Après évaporation de l'eau, le film de polymère obtenu possède lui aussi une organisation séparée des 2 polymères. Des amas de chaînes de PEDOT de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres sont séparés par des lamelles riches en PSS (Figure 3-7b) [126]. Cette organisation ne permet pas d'avoir une conductivité maximale du matériau. En effet, les zones de PEDOT sont séparées par des zones de PSS ce qui coupe la communication inter-chaînes. Bien qu'une meilleure conductivité du film puisse être obtenue par l'utilisation d'autres contre ions [106], le PSS reste le plus communément utilisé grâce à la très bonne stabilité qu'il confère à la dispersion et au film.



**Figure 3-7 : a. Représentation schématique de l'organisation des particules de PEDOT:PSS en dispersion aqueuse, extrait de [125] ; Représentation schématique de l'organisation des chaînes de PEDOT et des chaînes de PSS dans le film de polymère, adapté de [126].**

### 3.2.3.3. Le mélange PEDOT:PSS utilisé

L'électrode de PEDOT:PSS utilisée dans ce Chapitre est directement adaptée des transistors électrochimiques utilisés dans le laboratoire de Bioélectronique de l'Ecole des Mines de Saint-Etienne. En effet, la même formulation est utilisée ainsi que le même recuit. Ce choix a été effectué pour tirer pleinement parti des optimisations réalisées au cours des années par le laboratoire. J'ai néanmoins conscience que ces optimisations ont été réalisées pour une application différente de la nôtre (transistor électrochimique et non électrode). Toutefois, nous avons considéré que le matériau optimisé donne de bonnes électrodes et nous n'avons pas cherché à l'améliorer dans ce chapitre.

La formulation utilisée dans ce chapitre est la suivante :

- PEDOT:PSS PH 1000 de Clevios. Ce grade de PEDOT:PSS commercial est celui préconisé pour les applications demandant une grande conductivité. Il s'agit d'une dispersion aqueuse contenant 1,2% massique (%m) de matière et une répartition massique PEDOT:PSS de 1:2,5.
- Ethylène glycol (EG) : 5% en volume.
- 3-glycidoxypropyltriméthoxysilane (GOPS) : 1%<sub>m</sub>.
- Acide 4-dodécylbenzène sulfonique (DBSA) : 0,5% en volume.

Le laboratoire de Bioélectronique de l'Ecole des Mines de Saint-Etienne utilise cette formulation pour fabriquer en salle blanche des transistors électrochimiques à base de PEDOT:PSS. Leurs fabrications impliquent des étapes d'évaporation, de gravure et de dépôt à la tournette. Dans notre cas, nous avons utilisé cette formulation de manière plus simple : elle est simplement déposée à la pipette sur une électrode d'or délimitée par une cuve en une zone de 4\*4mm.

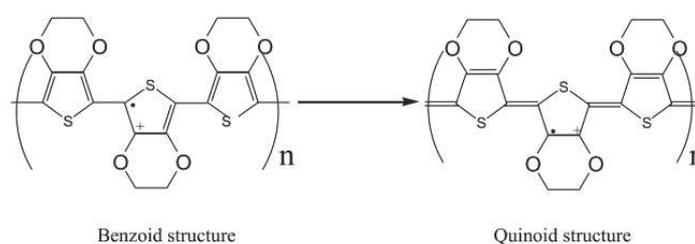
Les 3 paragraphes suivants décrivent le rôle des 3 additifs introduits dans la dispersion de PEDOT:PSS.

#### 3.2.3.3.1. L'éthylène glycol

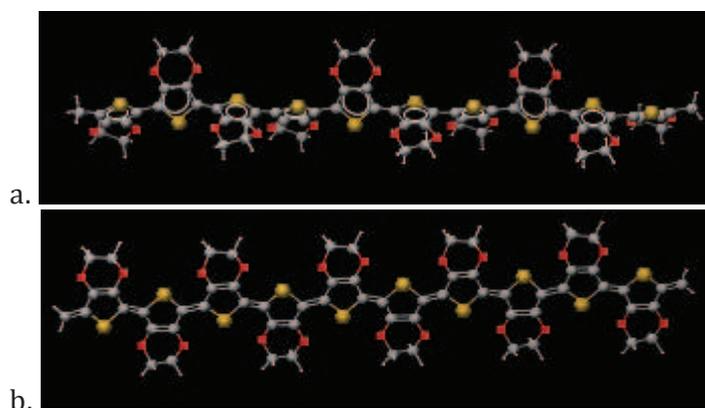
Au début des années 2000, les scientifiques se sont aperçus que l'ajout d'additifs (EG, diméthylsulfoxyde, N,N-diméthylformamide, glycérol, sorbitol,...) à la dispersion aqueuse de

PEDOT:PSS rendait les films plus conducteurs. La conductivité passe ainsi de  $10^0$ - $10^1$  S/cm à  $10^2$ - $10^3$  S/cm. A cause de leur influence sur la conductivité, ces additifs sont appelés dopants secondaires. Mais contrairement au dopage primaire du PEDOT (oxydation), ces additifs n'influencent pas la densité de porteurs de charge mais leur mobilité en modifiant la microstructure du matériau [126].

Le mode d'action de ces additifs fait encore débat aujourd'hui. Parmi les explications les plus citées, il y a celle présentée originellement par l'équipe d'Ouyang et al. [127]. D'après leurs travaux, l'augmentation de la conductivité est due à un changement de conformation des chaînes de PEDOT. Les chaînes passent d'une forme aromatique (ou benzoïde) à une forme quinoïde (Figure 3-8). Cette dernière structure rend la chaîne de PEDOT plane (Figure 3-9) ce qui facilite le déplacement des trous, et augmente ainsi la conductivité. D'autres explications sont avancées, par exemple l'augmentation de la conductivité pourrait venir d'un meilleur degré de cristallinité dans le matériau [125].



**Figure 3-8 : Forme aromatique et quinoïde du PEDOT, extrait de [127].**



**Figure 3-9 : Simulation 3D de la forme aromatique et quinoïde du PEDOT à l'aide du plugin Molecular Surface Area (3D) de Marvin Sketch 14.7.**

#### 3.2.3.3.2. Le GOPS

Le GOPS est introduit dans la dispersion en tant que réticulant pour éviter une redispersion du matériau lors du trempage [128]. En effet, le matériau est très hydrophile à cause de la grande proportion de PSS et se redispense facilement. De plus, le GOPS sert à renforcer l'adhésion du film de PEDOT:PSS sur son substrat. Toutefois, son introduction produit d'autres effets. Elle ralentit la diffusion des ions au sein du film car le matériau est plus réticulé [129] et baisse sa conductivité à cause de la réticulation avec des chaînes de PEDOT [129].

---

### 3.2.3.3.3. La DBSA

La DBSA est un surfactant. Son ajout aide à réaliser des films homogènes par dépôt à la tournette [130].

---

## 3.3. Caractérisations de l'électrode de PEDOT:PSS et détection de métabolites de *Pseudomonas aeruginosa*

Les résultats de la caractérisation électrochimique de ces électrodes à base de PEDOT:PSS (impédance, CV, détection d'espèces modèles et de métabolites bactériens) sont en cours de soumission.

---

### 3.3.1. Avant-propos : Fenêtres de stabilité de l'électrode de PEDOT:PSS

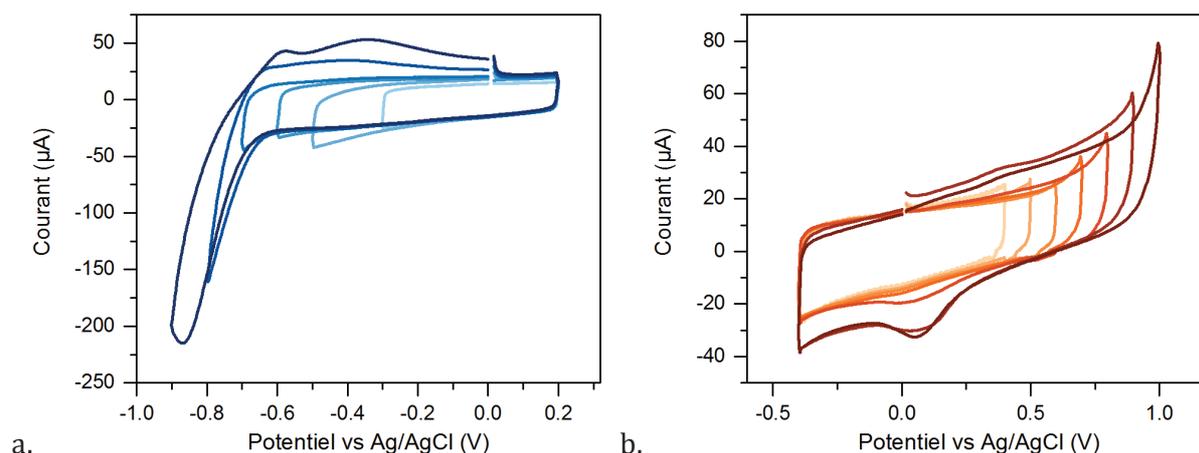
Deux expériences ont été réalisées pour explorer la fenêtre de stabilité de l'électrode de PEDOT:PSS et ainsi définir la fenêtre de potentiel à utiliser pour l'électrode de PEDOT:PSS.

#### 3.3.1.1. En CV

Tout d'abord, des CV ont été effectuées en élargissant successivement la fenêtre de potentiel en réduction ou en oxydation sur une électrode de PEDOT:PSS déposée sur une électrode de platine. Pour chaque fenêtre de potentiel, 5 cycles ont été effectués.

La Figure 3-10 présente le 1<sup>er</sup> cycle obtenu pour chacune de ces CV. Les voltampérogrammes obtenus sont très capacitifs, comme attendu pour le PEDOT [131]. En descendant à bas potentiel (Figure 3-10a), un couple de pic redox est observé respectivement vers -0,87V pour la réduction et -0,58V pour l'oxydation. Ce couple correspond probablement au couple  $H^+/H_2$  de l'eau. Un pic d'oxydation plus large est aussi visible vers -0,4/-0,35V selon les cycles. Ce pic est attribué à l'oxydation du PEDOT. On modifie donc le matériau dans cette zone. Toutefois, ce pic peu intense et large n'empêche pas la détection dans cette gamme de potentiel. En réduction, des espèces dont le potentiel redox est supérieur à -0,7V peuvent donc être à priori détectées par notre électrode.

En balayant vers les potentiels positifs (Figure 3-10b), les CV présentent peu de différences avant que la borne supérieure atteigne +0,8V. A partir de cette valeur, un pic de réduction apparaît vers +0,05V. Ce pic est probablement lié à l'oxydation du platine supportant le PEDOT au-dessus de +0,8V, ce qui donne un pic en réduction correspondant à la réduction des oxydes de platine et de l'oxygène. Lorsque la borne supérieure atteint +1,0V, les 5 cycles de CV sont très différents, à la fin il n'y presque plus de courant mesuré. Ce phénomène est dû à la suroxydation du PEDOT. En oxydation, des espèces dont le potentiel redox est inférieur à +0,9V peuvent donc être à priori détectées par notre électrode



**Figure 3-10 : 1<sup>er</sup> cycle de CV (50m/s) dans du NaCl 171mM de PEDOT:PSS déposé sur une électrode de platine.**

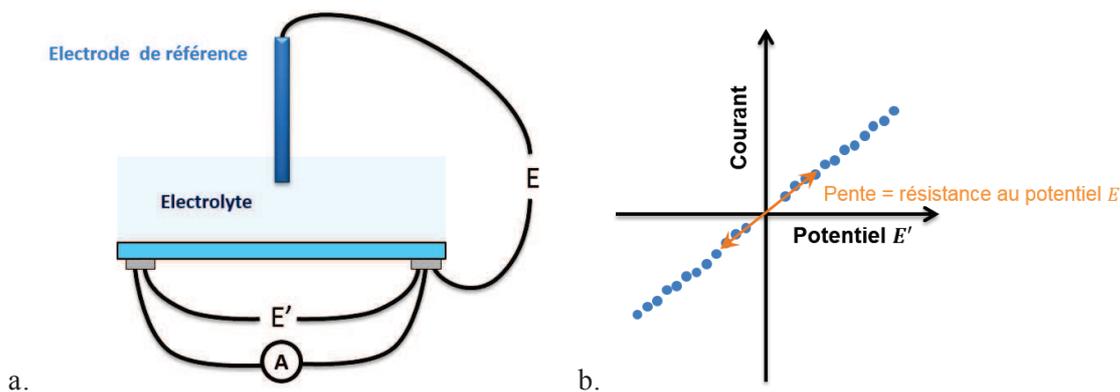
Cette première étape a permis de déterminer une fenêtre de potentiel (-0,7/+0,9V) pour laquelle il n'y a pas de phénomènes redox susceptibles d'interférer avec la détection électrochimique de molécules. Nous avons ensuite voulu évaluer sur quelle partie de cette fenêtre de potentiel le matériau est stable et n'est pas dégradé ayant constaté des oxydations/réductions du matériau dans cette fenêtre. Pour cela, nous avons réalisé 100 CV pour différentes fenêtres de potentiel. La charge à chaque cycle est mesurée, et les potentiels extrêmes sont considérés comme ne dégradant pas le matériau si aucun changement de charge n'est mesuré au cours des 100 cycles.

En oxydation, dès +0,4V la charge du cycle de CV baisse continuellement au cours de la répétition des cycles. La suroxydation de PEDOT commence donc dès +0,4V. Ce résultat est cohérent avec les mesures Raman réalisés à différents potentiels électrochimiques par Łapkowski et Proń [132] qui ont montré que la signature du PEDOT suroxydé apparaissait dès +0,4V. Il faut donc éviter de dépasser cette valeur pour ne pas dégrader irréversiblement l'électrode.

Concernant la borne inférieure, une diminution de la charge est observée dès -0,1V et pour tous les potentiels testés jusqu'à -0,55V. Toutefois cette diminution se stabilise au cours des 100 cycles, ce qui signifie que le matériau ne se dégrade pas continuellement mais atteint au bout de quelques cycles un état stable. Ces résultats semblent indiquer que l'état redox du PEDOT est modifié sur cette gamme de potentiel.

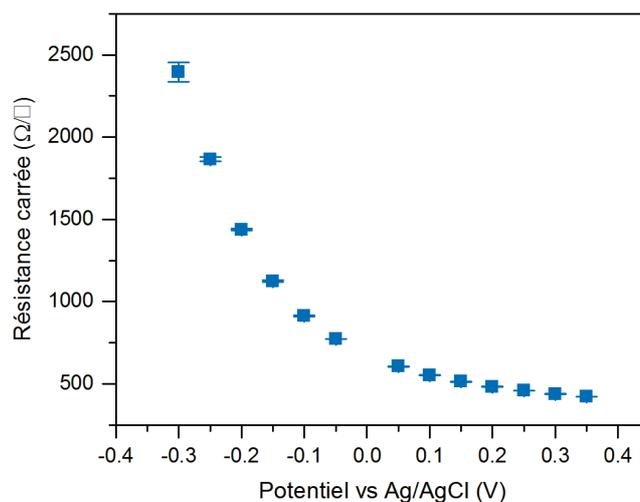
### 3.3.1.2. En configuration résistance

Pour confirmer notre hypothèse de changement d'état redox du PEDOT pour ces potentiels, une expérience de mesure de résistance du matériau à différents potentiels électrochimiques a été effectuée. Pour cela, un film de PEDOT est déposé sur une lame de verre possédant 2 pistes conductrices à chacune de ses extrémités. Un potentiel électrochimique  $E$  est appliqué par rapport à une référence à l'une des extrémités du film, et une petite variation de potentiel  $E'$  est appliquée entre les deux extrémités du film (Figure 3-11a). Le courant entre les 2 extrémités pour une rampe de potentiel  $E'$  de -0,02 à +0,02V est alors mesuré. Ces données forment une droite (Figure 3-11b) dont la pente à l'origine donne la résistance du matériau au potentiel électrochimique  $E$ .



**Figure 3-11 : a. Montage pour la mesure de la conductivité en fonction du potentiel ; b. Allure des courbes obtenues et pente à l'origine.**

L'expérience est réalisée en triplicata pour chaque potentiel testé. La résistance carrée obtenue (c'est-à-dire rapportée à la surface du film) varie sur tous les potentiels testés (Figure 3-12). La variation est petite entre +0,35 et -0,05V, mais grande entre -0,1 et -0,3V. Cela montre que l'état redox du matériau connaît de grands changements dans cette dernière fenêtre de potentiel, confirmant ce que la différence de charge laissait supposer. Toutefois, l'état redox du matériau varie aussi légèrement entre -0,1 et +0,3V. Cette variation n'était pas visible en CV lors de l'expérience réalisée dans le paragraphe précédent.



**Figure 3-12 : Résistance carrée en fonction du potentiel imposé d'un film de PEDOT:PSS plongé dans du PBS.**

Cette évolution de l'état redox du PEDOT correspond probablement à une modification de la proportion des polarons et bipolarons dans les chaînes. Ces ratios évoluent sur une grande plage de potentiel et donnent un changement lent de conductivité. Il est difficile de donner une borne limite en réduction pour l'utilisation de l'électrode de PEDOT:PSS. Si le critère était de peu changer l'état redox du matériau, il faudrait s'arrêter à -0,05V. Toutefois, ces changements redox étant réversibles, une fenêtre plus grande peut être autorisée. Pour les détections présentées dans ce Chapitre, nous avons choisi de prendre comme borne basse un potentiel environ -0,2V en dessous du potentiel redox de l'espèce considérée pour observer toute la réaction tout en diminuant au minimum la conductivité de l'électrode.

3.3.2. Résultats principaux : Publication n°3

## **Effective detection of redox molecules secreted by *Pseudomonas aeruginosa* owing to PEDOT:PSS amplification**

Julie Oziat,<sup>a,b</sup> George G. Malliaras,<sup>b</sup> Pascal Mailley,<sup>a\*</sup>

a CEA, Leti, MINATEC Campus, F-38054 Grenoble, France.

b Department of Bioelectronics, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, F-13541 Gardanne, France.

\* e-mail: pascal.mailley@cea.fr

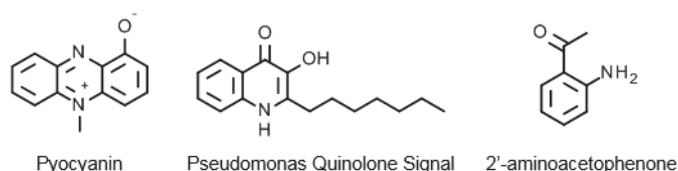
### **Introduction**

Since their discovery in 1977, electronically conductive polymers sustain tremendous attention with potential applications in electronics, energy, surface modification or (bio)electroanalysis for example [133]. From this family of polymers, PEDOT focuses specific interest since the last decade. Such an interest comes from its intrinsic properties including high electronic conductivity, suitable electroactivity, long term (electro)chemical stability, ease of processing [106] or biocompatibility [107] for example that make it a valuable material for electrochemical applications.

For example, PEDOT was early implemented in electroanalysis owing to its volume 3D electrode compartment for the fabrication of all plastic ion-selective electrodes. In such a context, PEDOT was used as internal layer to provide interfacial charge accumulation owing to its capacitive properties [134]. Owing to this capacitive behavior coupled to the concomitant excellent reversibility of the polymer switching (from doped conductivity to dedoped semiconductivity) and due to its excellent biocompatibility, PEDOT was further applied to the design of neurostimulation and monitoring electrodes [107]. Such a biocompatibility represents also an issue for the fabrication of amperometric electrochemical biosensors. Thereby PEDOT acts in these applications as effective membrane for enzyme immobilization [131]. Moreover, it shown improved stability over constant polarization that allows the fabrication of stable biosensors. Away from biochemical or biological applications, PEDOT could also behaves as a faradic electrode material for the electroanalysis of chemicals dissolved in complex media. In such a way, some researches focused on the modification of the PEDOT matrix with exogenous molecules or supramolecular objects or on the modification of the doping molecular units to direct the electrochemical characteristics of PEDOT toward the detection of acetaminophen [135], the co-detection of urate, ascorbate and dopamine [108], [136] or the electrocatalysis of phenol [109]. However, PEDOT films are generally obtained through direct electropolymerization within monomer solutions. Indeed, this fabrication methodology appears simple at the laboratory scale and allows straightforward modification of the physico-chemical characteristics of the electrogenerated polymers. However, it appears incompatible with more advanced processing techniques, including spin-coating or electrospinning for example, that are compatible with industrial applications, such as electronics

that requires parallelized fabrication. In such a way, PEDOT:PSS blends are now commercially available that bring easy processing of the conductive polymer for the design of (bio)electrochemically active films [115] or fibers for drug release [137]. Interestingly for electroanalysis in complex media, Heras et al. [110] also described the antifouling properties of these PEDOT:PSS films.

All the aforementioned properties make PEDOT:PSS valuable material for electroanalysis in complex media that requires advanced biocompatibility of the electrode material. In such a context, we propose in this contribution to implement PEDOT:PSS film as a 3D electrode material for the accurate and amplified detection of metabolites issued from *Pseudomonas Aeruginosa* (PA) secretome. In such a way, we deeply characterized the electrochemical behavior of PEDOT:PSS modified electrodes in respect to the classical glassy carbon electrode using outersphere electrochemical probes exhibiting different charges (ferri/ferrocyanide, ruthenium hexamine and Ferrocene methanol). Such a characterization helped at interpreting the electrochemical compartment of typical species issued from PA quorum sensing (e.g. Pyocyanin, *Pseudomonas* quinolone signal and 2'-aminoacetophenone, see Figure 3-13) at PEDOT:PSS modified electrodes. Finally, the designed electrodes were implemented for the detection of the aforementioned metabolites directly in bacterial culture supernatants.



**Figure 3-13: The 3 *P. aeruginosa* metabolites studied.**

## Material and Methods

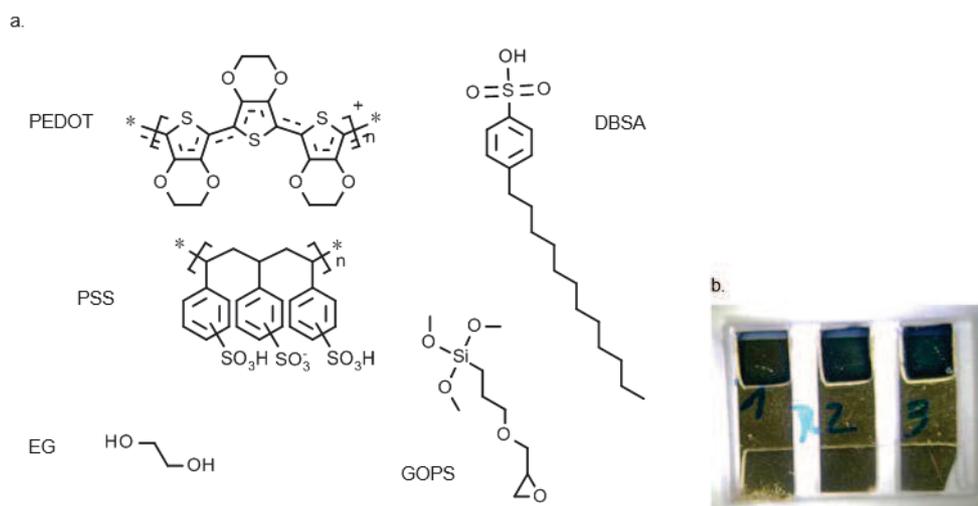
### Chemical and reagents

All the chemicals and reagents were purchased from Sigma-Aldrich with the highest purity grade existing and used without any further purification except poly(3,4-ethylenedioxythiophene), doped with poly(styrene sulphonate) (PEDOT:PSS) PH 1000 grade purchased from Clevios.

Stock solutions of Potassium Ferricyanide  $K_3Fe(CN)_6$  10mM, Hexaammineruthenium chloride  $Ru(NH_3)_6Cl_3$  10mM, Ferrocenemethanol (FcMeOH) 10mM, Pyocyanin (PYO) 8mM, *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) 12.7mM and 2'-aminoacetophenone (2-AA) 40mM were prepared in acetonitrile (ACN), aliquoted and stored in freezer ( $-20^\circ C$ ). Diluted solutions were prepared through dilution of stock solutions in PBS aqueous solution (1x). For measurements at different pH, buffers were prepared with ultra-purified water (Milli-Q system) containing NaCl (10mg/mL) and buffer reagents. These buffers are mixtures of sodium phosphate dibasic and sodium phosphate monobasic (0,1mM).

**PEDOT:PSS electrodes**

PEDOT:PSS dispersion was mixed with 5 vol% of Ethylene glycol, 0.2 vol% of 4-dodecyl benzene sulfonic acid (DBSA) and 1 wt% of 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GOPS) (Figure 3-14a). Solution was sonicated in ultrasound bath during 30min before being filtrated on 5 $\mu$ m syringe filter. Then, it was drop-casted with micropipette on Cyclic Olefin Copolymer (COC) cuvette of 4\*4mm on the bottom of which 150nm of gold was evaporated. Then, annealing at 120°C were performed during 1 hour under ambient atmosphere to obtain the PEDOT electrodes (Figure 3-14b).



**Figure 3-14: a. Chemical species used to make the PEDOT:PSS electrode ; b. PEDOT:PSS obtained electrodes**

To obtain the real volume of the PEDOT electrode, 9 drops of 4, 6 and 9 $\mu$ L were drop-casted on silicon wafer. After annealing using the above-mentioned conditions, surface profiles of the deposits were acquired on a DEKTAK 150 profilometer (step 0.167 $\mu$ m, power 5mg). This profile is further integrated under cylindrical symmetry hypothesis to obtain the dry PEDOT-PSS film volume.

**Electrochemical measurements**

All electrochemical measurements were made in custom built three-electrode Teflon cell. Working electrodes were Glassy Carbon (GC) electrode 1mm diameter or PEDOT:PSS electrode mentioned above. The reference electrode was a classical Ag/AgCl electrode ([KCl] 3M). The counter electrode was a platinum foil.

All electrochemical measurements were performed with a  $\mu$ AUTOLABIII potentiostat (Autolab Bv, The Netherlands) equipped by Nova 1.10 software using either impedance measurement, cyclic (CV) or square wave (SWV) voltammetries. Impedance measurement were done at a bias potential of +0.3V (closed to the PEDOT-PSS OCP) with an RMS amplitude of 0.1V from 10kHz to 0.02Hz. CV were made with a scan rate of 10mV/s and SWV with a step of 5mV (square wave amplitude and frequency of 20mV and 0.5Hz respectively). To characterize the influence of PEDOT films on the detection of electroactive species, the electrochemical responses obtained on GC and PEDOT electrodes, were compared using current densities normalized by the geometric surface of the electrode.

CVs obtained on PEDOT-PSS film electrodes were reproducible over successive scans except in reduction at lower potentials (Figure 3-21, supplementary) thus requiring at least 15 cycles before stabilization. Following this conditioning, the voltammograms made on the -0.4/+0.4V window exhibit high stability over more than 100 successive cycles (data not shown). Thereby, before use for analytical purpose, PEDOT-PSS working electrodes were preconditioned before each set of experiment by cycling the electrode between -0.4/+0.4V at 50mV/s 25 times. PEDOT working electrodes were rinsed with ultra-purified water and changed after each set of measurement. GC working electrodes were also rinsed with ultra-purified. Between each measurement series, GC electrode was polished with a 1 $\mu$ m diamond paste (RadioSpares) and further rinsed with ultra-purified water, ethanol and ultra-purified water once again.

Data analysis was performed using Origin 9.1 software. To measure peak current, peak potential and voltammetry area, the baseline was subtracted from the CV or SWV to remove background signals. Baselines were created for each data from a set of 30 points.

### **Supernatant measurement**

*Pseudomonas aeruginosa* (PA) strains PAO1 (Holloway collection) were investigated. The PA strain was first inoculated in 30 mL LB medium and incubated overnight at 37°C under agitation (300 rpm). Overnight cultures were centrifuged and washed with LB. At T0, 1mL of bacterial solution was added to 155 mL of fresh LB medium to obtain an optical density at 600nm (OD<sub>600</sub>) of 0.05 (about 3.0\*10<sup>7</sup> bacteria/mL). Then the cultures were incubated at 37°C, 300 rpm. At 0, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 and 24h of growth, 6 mL of the medium were removed, centrifuged at 6000rpm, passed through 0.2  $\mu$ m filter and stored in ice until the electrochemical analyses were performed. In parallel, bacterial growth was followed by OD<sub>600</sub> spectrophotometer.

## **Results and discussions**

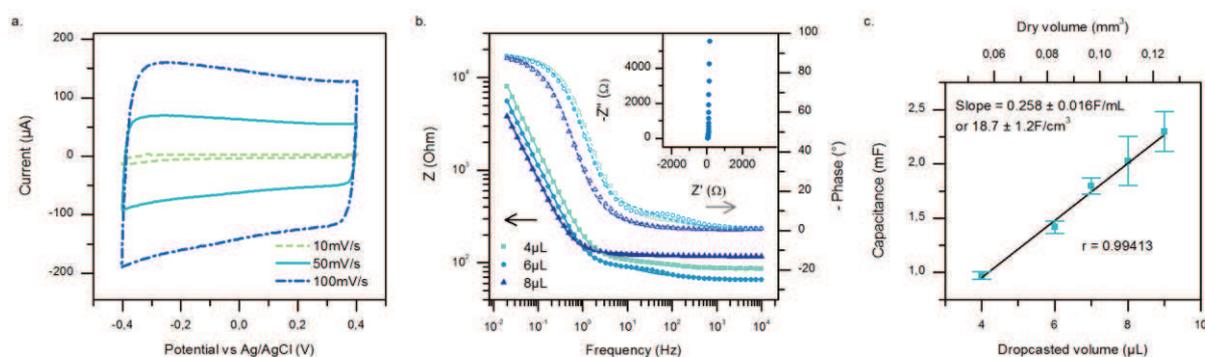
PEDOT:PSS thin film electrodes were studied in three steps to characterize their electrochemical behaviour in view of amplified detection of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) metabolites. The first step consists on electrochemical characterization in PBS model media using CV and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The second step deals with the study of the two well-known outersphere redox species Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> and Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>2+/3+</sup> that exhibits pure mono-electronic redox process (these redox probes were selected according to their ionic charges that would involve different electrostatic behaviours in presence of the PSS backbone). The third step consists in the characterization of the electrochemical response of the three PA metabolites PYO, PQS and 2-AA. All these steps are needed for the interpretation of the electrochemical responses obtained with culture supernatants of PAO1 strain at several growth times.

### **Characterization of the PEDOT electrode in PBS**

CV of PEDOT:PSS film electrodes in neutral PBS aqueous solution (Figure 3-15a) exhibit purely capacitive behaviour for all the tested scan rates, the evolution of the charge integrated under each CV scan being proportional to the scan rate. This enhanced capacitive compartment (according to a classical smooth electrode) was expected for PEDOT:PSS film electrodes [131]. To investigate more in details, the aforementioned electrochemical behaviour, EIS characterizations were carried out on the modified electrodes. More precisely, different volumes of electroactive polymer were drop-casted at the surface of the electrode to characterize the

influence of the PEDOT-PSS film thickness (for a given geometric surface) on the impedance behaviour (Figure 3-15b).

All the recorded impedance spectra show the same behaviour, whatever the volume used for the electrode surface modification (Figure 3-15b), with the predominance of the aforementioned capacitive behaviour as shown by the Nyquist plots displayed in the Figure 3-15b insert. This compartment is consistent with Bobacka et al. [123] works made on electropolymerized PEDOT. The obtained Bode-Plots were analysed using equivalent circuit modelling to have an insight in the evolution of the electrochemical behaviour of PEDOT-PSS modified electrodes with the drop-casted polymer volume. For that purpose, all the spectra were fitted owing to the RT circuit, where  $R$  is the series resistance of the circuit (metal +electrolyte) and  $T$  represents the tangent hyperbolic element. The latter element is classically implemented to describe capacitive behaviour of porous electrodes, including metal foams [138], due to finite length diffusion of ions inside the electrode pore volume. This model was successfully implemented to PEDOT films characterization by analogy to describe diffusion length of the ions inside the electronically conductive polymer network [123].



**Figure 3-15: a. CV in PBS at different scan rate of PEDOT:PSS 6 $\mu$ L dropcasted electrode; b. Bode impedance spectrum at +0.3V on the range of 0.02 to 10kHz for PEDOT electrodes of different volume and fitting plot with RT circuit, insert: Impedance data for the electrode of 6 $\mu$ L in Nyquist representation; c. Capacitance extracted from impedance measurement at low frequency according PEDOT electrode volumes (dropcasted and real).**

The aforementioned equivalent circuit enables to fit the recorded impedance spectra, whatever is the PEDOT-PSS volume, with good accuracy ( $\chi^2 < 0.04$  leading to an error on the components value down to 3 %). Indeed, the analytical expression of  $T$  impedance is given by the following equation:

$$Z_D = \tau_D / C_D * \coth(j\omega\tau_D)^{1/2} / (j\omega\tau_D)^{1/2} \quad (1)$$

where  $\tau_D$  is the diffusional time constant,  $C_D$  is the diffusional pseudocapacitance,  $j$  is  $(-1)^{1/2}$  and  $\omega$  the angular frequency.

Indeed, the latter diffusional capacitance  $C_D$  corresponds for 3D electrodes to the total capacitance of the material [138]. Thereby, PEDOT film capacitances were extracted from the  $T$  values obtained from fitting. As depicted in Figure 3-15c, the capacitance of the modified electrode evolves linearly with the dropcasted PEDOT:PSS volume. Such linear relationship between PEDOT:PSS drop-casted volume and modified-electrode capacitance is also confirmed by cyclic voltammetry (Figure 3-23, supplementary). Otherwise, to compare the specific capacitance of

the modified electrodes obtained in this article with such reported in the literature, the thickness of the different dry-state PEDOT:PSS films were measured by profilometry. The dry-state volume of each drop-casted film was then estimated through integration using cylindrical symmetry approximation. A linear relationship is obtained between the drop-casted and the dry-state volumes of PEDOT:PSS leading to an estimated volume capacitance of  $18.7 \pm 1.2 \text{ F/cm}^3$ , this specific capacitance being in the range of theoretical values (6 and  $57 \text{ F/cm}^3$ ) calculated by Proctor et al. for PEDOT:PSS films [139]. These capacitance characterizations show that PEDOT:PSS behaves as a volume 3D electrode, this property being of great interest for electroanalysis and sensing [140], [139] owing to the available electroactive surface. Moreover, the electrostatic and molecular properties of PEDOT:PSS films may be used to accumulate or/and adsorb analytes in the view of amplified electrochemical detection.

### **Study of 2 redox species with simple 1 electron transfer: $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ and $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$**

To characterize more in depth the electrochemical behaviour of PEDOT:PSS modified electrodes, two well-known redox systems,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  and  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$ , were assayed. These two species were selected according to their simple outsphere one electron transfer but also due to their opposite charge that should involve markedly different interaction with PEDOT:PSS, this assertion being supported by the previous works of Lin et al. [141] on slightly over-oxidized electropolymerized PEDOT. The obtained electrochemical responses were systematically compared to the ones obtained on a classical GC electrode of the same geometrical surface.

The voltammograms of  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  ( $150 \mu\text{M}$ ) recorded in neutral PBS (Figure 3-16a) are rather stable over multiple cycling and show the expected reversible redox behaviour on GC and also, as already reported [141], on PEDOT:PSS electrodes (the only marked difference between the CVs resulting in the PEDOT:PSS capacitive background). The obtained half-wave potentials are close for both electrodes ( $E_{1/2}^{\text{PEDOT}} = 0.194 \text{ V}$  and  $E_{1/2}^{\text{GC}} = 0.205 \text{ V}$ ). For PEDOT:PSS electrode the peak to peak potential difference,  $\Delta E_p$ , takes a value of  $60.4 \text{ mV}$  close the Nernst theoretical value of  $59 \text{ mV}$  for 1 electron exchange at  $25^\circ\text{C}$ . The ratio  $A_{\text{PEDOT:PSS/GC}}$  between the charges integrated under PEDOT:PSS and GC peaks  $A_{\text{PEDOT:PSS/GC}}$  is equal to 1.45 for  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ . Such a ratio shows that PEDOT:PSS modified electrodes exhibits a slightly larger electroactive surface than GC electrode. However, the modified electrode behaves as a classic 2D electrode, the PEDOT:PSS film only slightly enhancing the electrode surface due to surface film structuration. Indeed, this poor signal amplification may be attributed to the electrostatic repulsion of the ferri/ferrocyanide anions by the negatively charged PSS backbone that would avoid redox probe penetration in the 3D PEDOT electrode framework. To sustain such an hypothesis, the positively charged  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$  redox probe was assayed.

Similar experiments were carried out with  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$  ( $150 \mu\text{M}$  in neutral PBS). While  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$  CV responses on GC electrodes exhibit a nice reversible behaviour ( $E_{1/2}^{\text{GC}} = -0.174 \text{ V}$ ) with a  $\Delta E_p$  of  $59.9 \text{ mV}$  close to the expected theoretical value, the voltamperometric response obtained at the PEDOT:PSS modified electrode is drastically different (Figure 3-16b). Upon successive cycles, the redox signal of the ruthenium complex increases with cycle number until reaching a maximum after 25 cycles (Figure 3-16b insert). Concomitantly to the increase of the CV amplitude, the ruthenium solution sustains a slight colour attenuation. The two aforementioned behaviour are related respectively to the accumulation of the positively charged ruthenium hexamine into the globally negatively charge PEDOT:PSS matrix and to the concomitant depletion of the amount of ruthenium complex free in solution. One can note also that the peak to peak

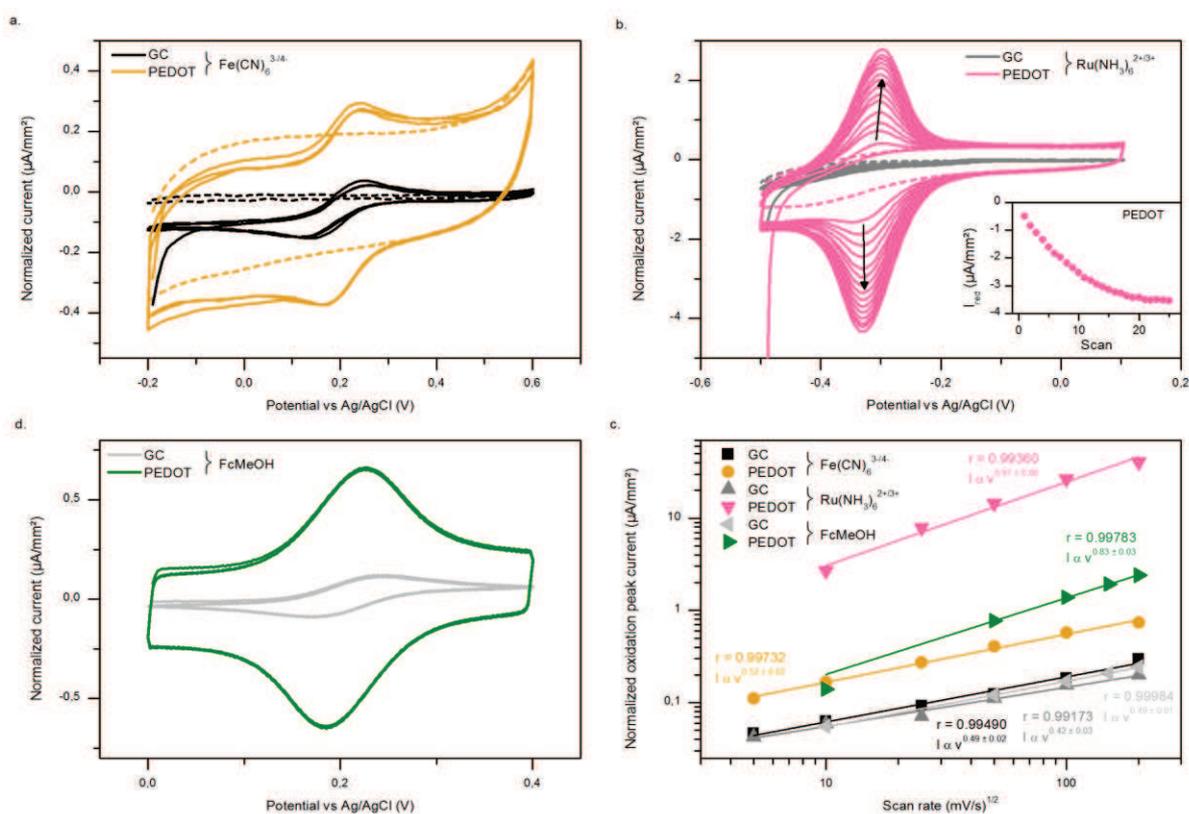
potential difference of the CVs reported in Figure 3-16b for PEDOT:PSS takes a value of 30.2 mV at 10 mV/s that increases with the scan rate (Figure 3-24b, supplementary). This value, that is markedly lower than the expected theoretical value observed for purely diffusive species, corroborates the hypothesis of cationic complex accumulation in the PEDOT:PSS matrix. To verify the reversibility of this electrostatic interaction, a PEDOT:PSS electrode saturated with  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$  was transferred in a PBS solution free of ruthenium complex. As expected, the cationic exchange with the solution took place progressively leading to the release of the complex in the solution as depicted by the ruthenium redox peaks depletion with time (Figure 3-24a). Such a behaviour corroborates, the cation exchange properties of PEDOT: PSS films and so the accumulation of ruthenium hexamine.

Otherwise, the half wave potential of the Ruthenium complex is markedly displaced toward negative potentials taking a value of -0.314V. Such large displacement may be ascribed to the electrostatic interaction with the PSS backbone. Indeed, as reported by Nardes et al. [126], spin-coated PEDOT:PSS films form nano-domains in which PEDOT rich particles are separated by quasi continuous PSS lamella. Thereby, this negatively charge PSS gangue interacts with the cationic ruthenium complexes enabling thus their accumulation. Conversely, such phenomenon may imply larger energy demand for electrochemical reaction with the PEDOT (than such observed on GC electrodes) due to electrostatic attraction away from the electroactive and electronically conductive PEDOT nanodomains.

The evolution of ten CV peak intensities of the two species against scan rate was measured for bare and PEDOT:PSS modified GC electrodes (Figure 3-16d). As expected, for both species the electrochemical behaviour is controlled by the diffusion process on bare GC electrode as highlighted by the dependency of the CV peak amplitude with the scan rate. The peak intensity of  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  evolves linearly with the square root of the scan rate on PEDOT:PSS modified electrode confirming that the electrochemical behaviour of ferri/ferrocyanide is controlled by the diffusion process. Conversely,  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$  exhibits on PEDOT:PSS electrode a dependency of the peak intensity with the scan rate elevated at a power of  $0.91 \pm 0.06$ . This quasi linear evolution of the peak intensity with the scan rate prove the temporal compartment of ruthenium hexamine due to accumulation in the PEDOT:PSS matrix. One can note also in Figure 3-16d that such an accumulation process enables large amplification of the signal with an amplification factor  $A_{\text{PEDOT:PSS/GC}}$  of nearly two orders of magnitude at 10 mV/s. Otherwise, whereas the electrochemical response of ferri/ferro cyanide is rapid on the PEDOT:PSS modified electrode whatever is the scanning rate (data not shown), the CVs recorded for ruthenium hexamine show increasing peak-to-peak potential difference with the scanning rate (Figure 3-24b). Such compartment denote slower oxido-reduction process on PEDOT:PSS that could be ascribed to a partial dedoping of PEDOT and concomitant decrease in intrinsic electronic conductivity of the conjugated polymer at the  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$  detection potential.

Finally, these two redox probes,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  and  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$ , exhibits opposite electrochemical behaviour on PEDOT:PSS film electrode and thereby image two radically different behaviour of the electrode. The negatively charge species  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  are detected under diffusion control at the electrode surface without access to the PEDOT volume. Conversely, the positively charge species  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$  accumulate on the PEDOT:PSS film leading to sensitive signal amplification owing to the bulk electrode compartment of the PEDOT:PSS film. However, this article focuses at detecting molecular species issued from PA secretome. These species are in general neutral but present systematically aliphatic moieties. Thereby, even if no electrostatic accumulation occurs, these species may interact with the unsaturated backbone of PEDOT or/and PSS

polymer within the PEDOT:PSS film. To evaluate such a possible phenomenon, a third outersphere molecular probe, ferrocenemethanol (FcMeOH) was assayed. Indeed, FcMeOH is a neutral molecules that exhibits two pentadienyl moieties that may interact with styrene and EDOT rings through  $\pi$ -stacking. Figure 3-16c displays the voltamperometric responses of FcMEOH on bare GC and PEDOT:PSS modified electrodes. These voltammograms exhibit the expected redox response of FcMeOH centred at a half wave potential of 0.208 and 0.206 V respectively. close to the tabulated value respectively on PEDOT:PSS modified and bare GC electrodes. First, one can clearly distinguish the marked amplification of the FcMeOH response onto the PEDOT:PSS modified electrode that highlights the expected role of 3D electrode bring by the PEDOT conjugated polymer. Away from this macroscopic observation, the peak-to-peak difference recorded for GC electrode is equal to 61 mV (which is coherent with the diffusion controlled detection of FcMeOH) whereas, it appears markedly lower for the PEDOT:PSS electrode (29 mV). Such a behaviour can be ascribed to the adsorption of FcMeOH onto the polymer backbones of PEDOT and/or PSS. Such an assertion is reinforced by the evolution of the FcMeOH voltamperometric response amplitude with the scan rate. Indeed, on GC electrode, the peak amplitude vary linearly with the square root of the scan rate (Figure 3-16d) as expected for diffusion controlled electrochemical detection. Conversely, the evolution of the amplitude for the PEDOT:PSS modified electrode follows a 0.83 power law (Figure 3-16d) than denotes mixed diffusion-adsorption control. Finally, the electrochemical behaviour of the FcMeOH gives a valuable insight on the possible comportment of species issued from PA secretome (typically PYO and PQS) since it exhibits similar size and diffusion coefficient as well as the ability to molecularly interact with the PEDOT and/or PSS polymers.



**Figure 3-16: a. Comparative CV (10mV/s) of  $150\mu\text{M K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  in PBS on GC and PEDOT working electrode; b. Comparative CV (10mV/s) of  $150\mu\text{M Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  in PBS on GC and**

**PEDOT working electrode; Insert: reduction peak current according number of scans; c. Comparative CV (10mV/s) of 150 $\mu$ M FcMeOH in PBS on GC and PEDOT working electrode; d. Peak current normalized against apparent surface of the electrodes according CV scan rate for GC and PEDOT electrodes and 150 $\mu$ M K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>Cl<sub>3</sub> and FcMeOH in PBS.**

### **Study of 3 redox metabolites of PA**

The electrochemical responses of the three model outersphere redox systems gave an insight on the PEDOT:PSS behaviour. More particularly, the existence of accumulation phenomena was demonstrated that could lead to amplification of the recorded signal owing to the aliphatic nature of the polymers and/or to the charge of the PSS backbone. Indeed, the goal of this article aims at detecting molecules secreted by PA. Thereby, to analyse the impact of the electrode modification with PEDOT:PSS, three redox metabolites, PYO, PQS and 2-AA issued from PA secretome were assayed. A fourth important component of PA quorum sensing, HHQ, was also studied on bare GC electrodes in a previous work [publication n°1]. However, the electrochemical detection of HHQ on PEDOT:PSS modified electrode was impossible due to its high oxidation potential that overlaps with PEDOT overoxidation phenomena.

#### *The PA toxin PYO*

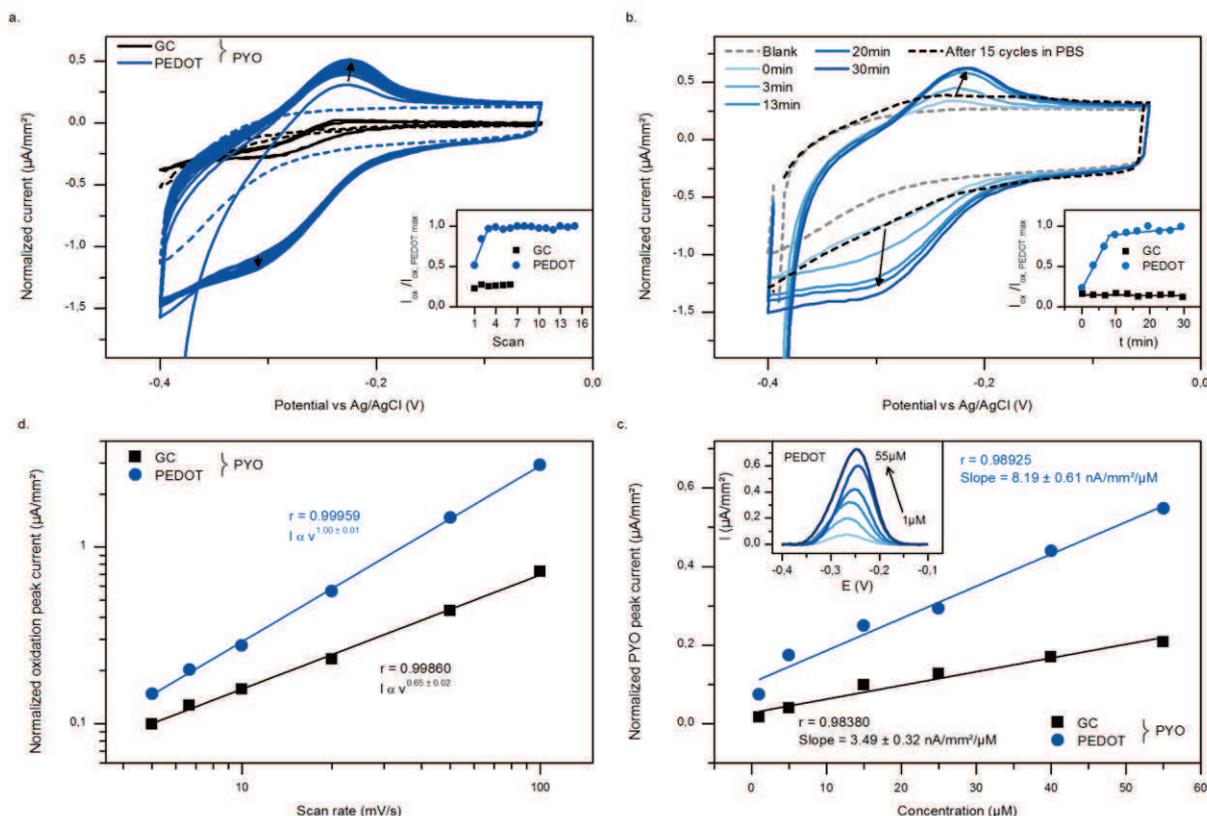
PYO is a zwitterionic species that presents an half-wave potential close to the one of Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>2+/3+</sup>. In the assayed pH range 5.5-8, PYO is globally neutral. Figure 3-17a displays the electrochemical response of PYO (55 $\mu$ M) on PEDOT:PSS modified (blue line) as well as on GC (black line) electrodes in pH 7.4 PBS media. The redox reversible wave of PYO is seen at a half wave potential of nearly -0.26 V for both bare GC and PEDOT:PSS modified electrodes. As mentioned earlier for the ruthenium complex, the peak-to-peak potential difference  $\Delta E_p$  recorded for PYO is higher on the PEDOT:PSS electrode than such measured on bare GC electrode one [publication n°1]. This may be also explained by the partial reduction of the PEDOT at this potential that would slow down the electron transfer process. As already observed for the positively charged Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>2+/3+</sup>, successive cycling leads to the growth of the recorded redox signature associated to PYO. However, the CV amplitude evolves rapidly with cycling along the four first cycles before weakly increasing over further cycles. Accordingly, virtually no accumulation effect is seen on bare GC electrode thus demonstrating the role of PEDOT:PSS in the accumulation/amplification process. Finally, the amplification associated to the accumulation of PYO in PEDOT:PSS in respect to the response observed at bare GC electrode is markedly lower than such observed for ruthenium hexamine with an amplification factor of only 4.4. Such a difference in comportment can be attributed only very partially to the difference in PYO and ruthenium hexamine concentrations (55 and 150 M respectively). Since, both species present similar weight and diffusion coefficients and regarding the zwitterionic nature of PYO (PYO is globally neutral in the studied pH range), the accumulation process of PYO is more likely due to molecular interaction between the phenazine structure and PEDOT or/and polystyrene backbones, instead of electrostatic interaction for ruthenium hexamine, leading to weaker driving force and so lower penetration depth of the detected molecules within the polymer film structure.

We also assayed passive accumulation (instead of accumulation during potential cycling) of PYO within the PEDOT:PSS film. Figure 3-17b displays the voltamperometric responses of PYO at GC bare and PEDOT:PSS modified electrodes following increasing soaking time of

the electrode in a solution of pH7.4 PBS containing 55  $\mu\text{M}$  of PYO. As already observed under potential cycling, PYO accumulates rapidly in the polymer films over 9 mins of passive accumulation leading to sensitive amplification before slowly evolving over longer dipping durations (Figure 3-17b insert). This delay before reaching a maximum of accumulation is slightly higher than when using potential cycling for which the maximum of response is reached after 6 min. Such a complementary experiment shows first that potential cycling does not bring any significant activation of the accumulation process within the PEDOT:PSS film and secondly that accurate measurements can be carried out after only 10 minutes of equilibration in the solution containing PYO. Otherwise, we performed successive cyclic voltammeteries in a PBS solution free of PYO following accumulation and detection of the redox species on the PEDOT:PSS modified electrode. After 15 successive scans, the voltamperometric trace displayed in Figure 3-17b (black dashed line) still exhibits the response of PYO thus showing that PYO accumulation in the PEDOT:PSS film is only partially reversible. Such a behaviour is coherent with the aforementioned existence of molecular interaction between PYO and the polymer film. To confirm the latter hypothesis, the evolution of PYO response amplitude with the scan rate of the cyclic voltammetry was studied (Figure 3-17c). The intensity of the oxidation peak associated to PYO evolves linearly with the scan rate for the PEDOT:PSS modified electrode whereas it evolves with a 0.65 power law at bare GC electrode. Thereby we can assume pure temporal compartment on PEDOT:PSS modified electrodes due to the accumulation/adsorption of PYO at the polymer backbone whereas only weak adsorption was seen on glassy carbon for which the major contribution to the response remains purely diffusive.

Since the final application of the PEDOT:PSS modified electrode deals with the electrochemical detection of molecules secreted by bacteria in their supernatant culture media, the evolution of the response with PYO concentration was characterized using square wave voltametry. SWV was preferred to CV to extract more accurately the electrochemical response of the target secreted molecule from the background response of the culture media and from the capacitive behaviour of the PDOT:PSS film. The insert of Figure 3-17d displays the SWV response of PYO in PBS for different concentrations ranging from 1 to 55  $\mu\text{M}$  that are representative of typical PYO concentrations reported in the literature for PA cultures. Each SWV response exhibits a well-defined peak centred on PYO half wave potential. The calibration curves of PYO at bare GC and PEDOT:PSS modified electrodes, drawn from the aforementioned SWV voltamperograms, are represented in Figure 3-17d. The electrochemical response evolves linearly with PYO concentration on both electrodes with respective sensitivities of 8.19 and 3.49  $\text{nA}/\text{mm}^2 \cdot \mu\text{M}$  for PEDOT:PSS and bare GC electrodes corresponding to an amplification factor of 2.35. This amplification is lower than such determined using CV. Such a difference could be explained by SWV parameters that were optimized for the ferri/ferrocyanide probe which is a more rapid and reversible system that is detected at potential for which PEDOT is fully doped (and thus more conductive).

To complete the study PYO response on PEDOT:PSS electrode, the influence of pH was assessed around neutrality (pH ranging from 5.5 to 7.7, Figure 3-25, supplementary). Similar results were obtained on PEDOT:PSS modified and bare GC electrode. The SWV peak potential decrease linearly with the pH with a slope of nearly 50 mV that is coherent with 2 protons and 2 electrons exchange.



**Figure 3-17: a. Comparative CV (10mV/s) of 55μM PYO in PBS on GC and PEDOT:PSS working electrode; b. CV (10mV/s) of 55μM PYO in PBS on PEDOT:PSS working electrode made after different soaking time of the electrode in the solution; Insert: Comparative evolution of PYO oxidation peak current according accumulation time in 55μM PYO PBS solution on GC and PEDOT:PSS working electrode. ; c. Oxidation peak current normalized against apparent surface of the PEDOT:PSS and GC electrodes according CV scan rate with 100μM of PYO in NaCl 171mM; d. Calibration curve of PYO in PBS on GC and PEDOT:PSS working electrode, data extracted from SWV (step 5mV, amplitude 20mV and frequency 0.5Hz) normalized with the apparent surface of the electrodes. Insert: obtained SWV on PEDOT:PSS electrode.**

*The quorum sensing main metabolites PQS*

The second studied metabolite is the alkyl-quinolone PQS. PQS is one of the main components of PA quorum sensing. This species exhibits on bare GC electrode an half-wave potential of 0.2 V [publication n°1] that is, as PYO, within the electrochemical window of the PEDOT:PSS modified electrode.

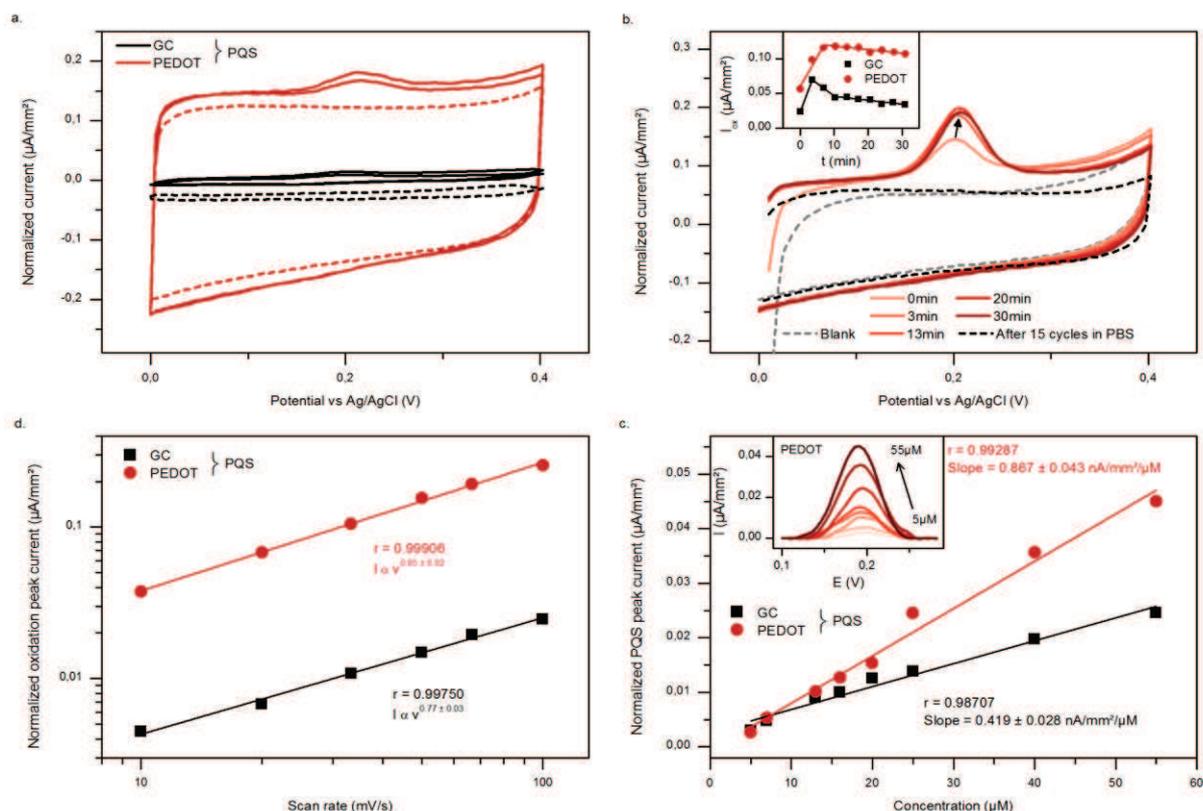
PQS voltammograms made at 10 mV/s (Figure 3-18a) exhibit similar appearances on both electrodes but with a markedly larger amplitude on PEDOT:PSS modified electrode than on bare GC (amplification factor 6.02). The oxidation peak only was visible and its intensity decreased between the 2 first cycles. This comportment is consistent with electrode-surface fouling due to the precipitation of PQS oxidation products as already reported in our previous works ([publication n°1]. Otherwise, the reduction peak is not visible for both electrodes. This behaviour is consistent with our previous works [99] [publication n°1], which have reported the disappearance of the reduction peaks for scan rates under 10mV/s. Voltammograms carried out with faster

scan rates shown conversely the presence of the reduction peak also on PEDOT:PSS electrodes (data not shown) but with incomplete recovery of the oxidation charge due to the poor reversibility of PQS system.  $E_{1/2}$  is more positive on PEDOT:PSS modified than on bare GC electrode (+0.211V against +0.196V). So, the electrochemical reaction appears less rapid on PEDOT:PSS surface probably due to lower conductivity of the PEDOT backbone regarding unmodified GC surface .

As previously reported for PYO, passive accumulation was carried out on PEDOT:PSS modified and bare GC electrodes in a PBS solution (pH 7.4) containing 55 $\mu$ M of PQS. PQS accumulates rapidly on both electrodes (Figure 3-18b) as suggested by the increase in the recorded peak potential with time (Figure 3-18b and insert). After 9 min, the accumulation process was ended on PEDOT:PSS modified electrode and was followed, conversely than PYO, by a weak decrease of the recorded peak intensity with time. PQS adsorbed also rapidly with time on GC reaching a maximum of response after only 2 minutes. However, along longer accumulation time, the PQS response decreased rapidly before reaching a plateau after 10 minutes of immersion of the electrode. These surprising results may be associated to the lack of solubility of PQS, as already observed [publication n°1] [publication n°2]. Figure 3-18c displayed the evolution of the peak amplitude associated to PQS oxidation with the scan rate of the cyclic voltammetry. For both materials, PQS peak amplitude increase with the scan rate following respectively 0.77 and 0.85 power laws for bare and PEDOT:PSS modified GC electrodes suggesting mixed adsorption diffusion detection process.

Otherwise, the PQS release from the PEDOT:PSS film was assayed by transferring in a PBS media free of PQS the modified electrode after 10 mins of accumulation. After 15 cyclic voltammetries on the PBS solution, the PQS peak was no more visible on the PEDOT:PSS electrodes (Figure 3-18b, black dashed line). Contrary to PYO, PQS appears to be completely realised from PEDOT:PSS film. Finally, PQS was detected owing to SWV method. The obtained voltamperograms are well-resolved and centred on the PQS half-wave potential. Like for the previous studied species, linear calibration curve is found (Figure 3-18d) with 2.05 time higher slope for PEDOT:PSS electrode than GC electrode. Such a result shows again the interest in using PEDOT:PSS film to amplify the electrochemical response of the secreted species probably thanks to the adsorption through  $\pi$ -stacking of the PQS aromatic rings onto the EDOT or styrene moieties.

SWV were performed at different pH around 7 (Figure 3-26, supplementary) on PEDOT:PSS and GC electrode. Peak potential according pH is linear on both tested electrode, what is in coherence with PQS redox equation [publication n°1].



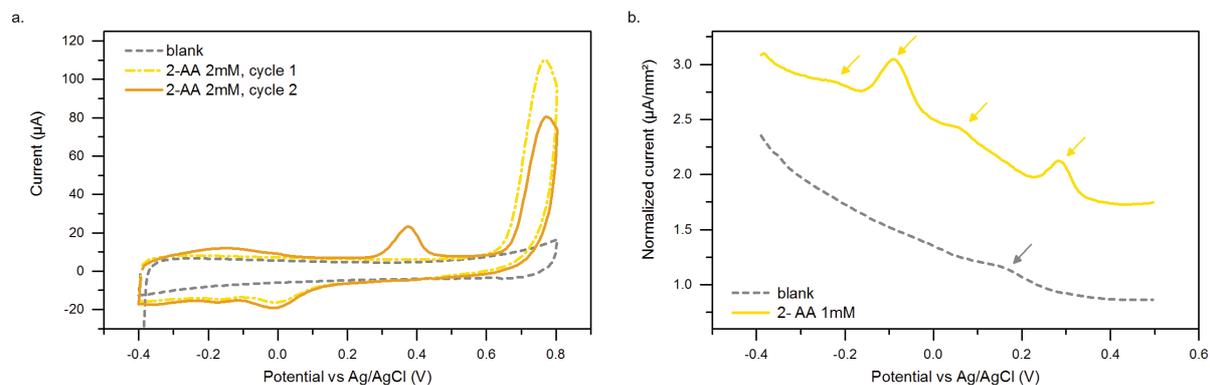
**Figure 3-18: a. Comparative CV (10mV/s) of 55μM PQS in PBS on GC and PEDOT:PSS working electrode; b. CV (10mV/s) of 55μM PQS in PBS on PEDOT:PSS working electrode made after different soaking time of the electrode in the solution; Insert: Comparative evolution of PQS oxidation peak current according accumulation time in 55μM PQS PBS solution on GC and PEDOT:PSS working electrode. ; c. Oxidation peak current normalized against apparent surface of the PEDOT:PSS and GC electrodes according CV scan rate with 100μM of PQS in NaCl 171mM; d. Calibration curve of PQS in PBS on GC and PEDOT:PSS working electrode, data extracted from SWV (step 5mV, amplitude 20mV and frequency 0.5Hz) normalized with the apparent surface of the electrodes. Inset: obtained SWV on PEDOT:PSS electrode.**

*A volatiles late-metabolite: 2-AA*

Because of its very high oxidation potential, 2-AA appears at the limit of PEDOT:PSS stability windows (e.g. at the potential of irreversible PEDOT over-oxidation). So direct detection of 2-AA would not be accurate leading to the concomitant destruction of electron delocalisation and thus of the PEDOT electronic conductivity. However, our previous works on GC electrode [publication n°1] have shown that secondary peaks appeared after short-time oxidation of 2-AA that are detectable at lower potentials.

The same behaviour was also found on PEDOT:PSS electrode (Figure 3-19a). Along the first forward cycle, the recorded voltammogram exhibits only one intense and irreversible oxidation peak at very high potential (+0.768V). During the reverse and the second forward scans secondary peaks are directly visible in reduction and oxidation. Among them, one can distinguish especially one poorly reversible but rather intense couple of peaks at potentials of +0.375 and -0.012V. One possible strategy to enable the detection of 2-AA with restricted degradation of the

PEDOT electronic properties deals with the detection of these secondary peaks following short oxidation of the 2-AA. Such strategy is illustrated through the recording of these secondary peaks using SWV. The SWV response displayed on Figure 3-19b exhibits as expected 2 intense peaks at potentials of -0.088 and 0.285 V that are accompanied by two poorly defined shoulders at -0.224 and 0.058 V. However, due to the rapid degradation of the PEDOT electronic conductivity upon high potential exposition and to the poor signal to background ratio of the SWV response, we decided to shorten the potential detection window thus excluding possible 2-AA detection.



**Figure 3-19: a. Comparative CV (50mV/s) of 2mM 2-AA buffered NaCl 171mM (ph ~7) on PEDOT working electrode ; b. SWV (5mV, 20mV, 0.5Hz) of 1mM 2AA in PBS after 0.5s at +0.9V on PEDOT working electrode.**

### Summary of the electrochemical characteristics of the 5 studied species

Finally, Table 3-1 summarizes the different electrochemical characteristics of the studied redox probes on PEDOT:PSS modified electrode in comparison with bare GC electrode. From this table one can assume the interest in using PEDOT:PSS film to amplify the electrochemical response of the target species.

**Table 3-1: The electrochemical characteristics of  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ,  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$ , FcMeOH, PYO, PQS on GC and PEDOT:PSS electrode.  $E_{1/2}$  and  $\Delta E_p$  are given for CV at 10mV/s.**

|                                    | $E_{1/2}^{\text{PEDOT}}$<br>(mV) | $E_{1/2}^{\text{PEDOT}} - E_{1/2}^{\text{GC}}$<br>(mV) | $\Delta E_p^{\text{PEDOT}}$<br>(mV) | $A_p^{\text{PEDOT}}/A_p^{\text{GC}}$ | $p^{\text{PEDOT}}$ | $p^{\text{GC}}$ | $I_p(\text{C})^{\text{PEDOT}}$<br>(nA/mm <sup>2</sup> /μM) | $I_p(\text{C})^{\text{PEDOT}}/I_p(\text{C})^{\text{GC}}$<br>(nA/mm <sup>2</sup> /μM) |
|------------------------------------|----------------------------------|--|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------|-----------------|--|--|
| $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   | 204                              | +11  | 60.4                                | 1.45                                 | 0.52               | 0.49            | 1.50 <sup>(a)</sup>  | 2.65 <sup>(a)</sup>  |
| $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$ | -314                             | -139   | 30.2                                | 103                                  | 0.91               | 0.42            | -- <sup>(b)</sup>  | -- <sup>(b)</sup>  |
| FcMeOH                             | 208                              | -2   | 29,3                                | 13.5                                 | 0,83               | 0,49            | -- <sup>(b)</sup>  | -- <sup>(b)</sup>  |
| PYO                                | -261                             | -2.4   | 60.4                                | 4.40                                 | 1.0                | 0.65            | 8.19   | 2.35   |
| PQS                                | 194                              | +7.6   | 35.3                                | 6.02                                 | 0.85               | 0.77            | 0.867  | 2.07   |

<sup>(a)</sup>See Figure 3-27.

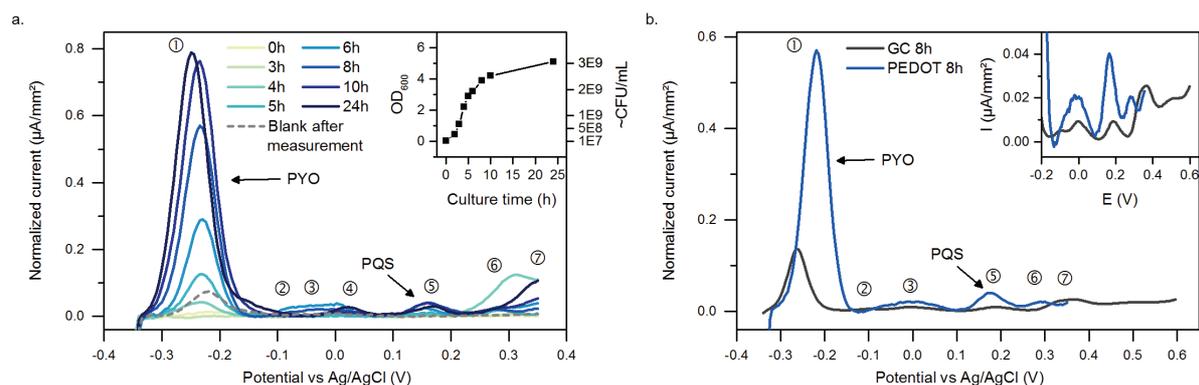
<sup>(b)</sup>Calibration curve not done.

**Characterization of PAO1 strain supernatants using PEDOT:PSS modified electrode**

As mentioned in the previous results of this article, the adjunction of a PEDOT:PSS film at the surface of the electrode enables sensitive amplification of the electrochemical response of molecular species issued from PA secretome. However, these encouraging results were obtained in artificial solutions free of proteins or peptones that are usually found in culture media (these biomolecules being able to generate quick fouling of the electrode surface thus avoiding any qualitative nor quantitative detection of the secreted molecules). To validate the interest in using PEDOT:PSS modified electrodes for the detection of the redox species issued from PA quorum sensing, further experiments were done directly in the supernatant of the PA strain PAO1 for different culture times. These experiments were carried out in the same conditions than such reported in previous works using bare GC electrodes [publication n°2].

As already observed on bare GC electrodes [publication n°2], the SWV voltammograms recorded in the PAO1 supernatant exhibit a complex signature with at least 7 distinct peaks after several hours of growth (Figure 3-20a). PYO and PQS are clearly visible on the SWV spectra at the expected potentials. Otherwise, the position of the PYO peak potential shifts toward more cathodic potentials with the culture time. Such comportment denotes the alkalisation of the culture media along PA growing process as already observed for supernatant characterization using bare GC electrodes.

Nevertheless, small noticeable differences appear also between the voltammograms recorded on the PEDOT:PSS modified electrode and on the previously reported bare GC electrode (Figure 3-20b). First of all, as expected, the direct comparison of the curves obtained at 8h growth (Figure 3-20b) shows marked amplification of the recorded signals for all the redox species present in the supernatant thus highlighting the improvement associated to the PEDOT:PSS electrode modification. Away from this macroscopic view, all peak potentials show a noticeable shift when passing from bare GC to PEDOT:PSS modified electrodes. Otherwise, we previously observed at potential above +0.2V on GC electrode a peak complex from which clear dissociation of all the different contributions appeared rather complex due to peak overlapping (Figure 3-20b insert black line). Comparatively, on PEDOT:PSS modified electrode, the different contributions present in the potential range situated between +0.2/0.4V (Figure 3-20b insert) are more clearly separated in potential thus making their analysis easier and more accurate. Finally, we shown on bare GC electrode that PYO response attained a maximum during the stationary phase (typically around 10 h) following by a slight decrease after 24h of culture. Here, PYO response constantly increases during the overall culture time. Indeed, such behaviour is presumably related to the partially irreversible accumulation of PYO on the PEDOT:PSS film (the surface of the carbon electrode being renewed between each experiment in the case of GC electrode conversely to the PEDOT:PSS modified electrode). Such artefact may cause a lack of accuracy in the quantitative treatment of the SWV spectra but does not invalidate the accurate measurement of the electrochemical fingerprint of the PA strain.



**Figure 3-20: a. Evolution according culture time of square wave voltammetry (step 5mV, amplitude 10mV and frequency 2Hz) of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain on PEDOT working electrode. The inserts show  $OD_{600}$  and corresponding CFU/mL according culture time. b. Comparison of the SWV obtained at 8h of growth on GC and PEDOT working electrodes. The insert is a zoom on the same curve.**

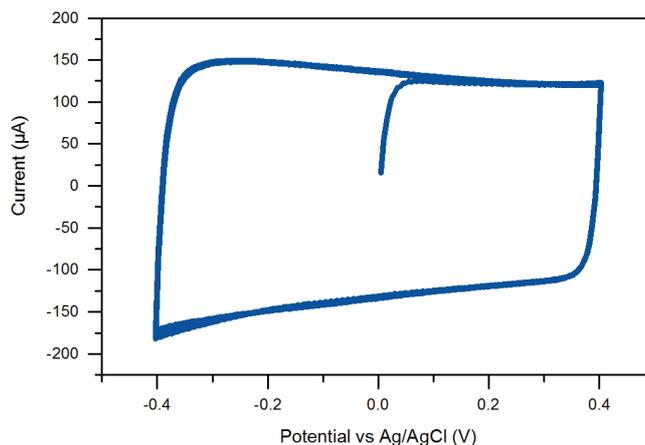
## Conclusion

For the first time, the non-conventional electrode material, PEDOT:PSS, was assayed here for the detection of redox species issued from PA quorum sensing. Prior to this application, we shown that the PEDOT:PSS film behaves as a 3D electrode owing to the electronic conductivity of the doped conjugated polymer fibers. Different outersphere redox probes (e.g. ferri/ferrocyanide, ruthenium hexamine and ferrocene methanol) were assayed on the PEDOT:PSS modified electrodes thus highlighting the favorable electrochemical comporment of PEDOT as electrode material as well as its ability in signal amplification owing to electrostatic and/or molecular interactions between the probes and the sulfonated moieties of PSS and/or the aromatic functions of the PEDOT and PSS respectively. Such a strategy was further used for the electrochemical analysis of molecules issued from PA secretome (PYO and PQS) in artificial media. Such study shown marked amplification effects on the targets detection that would be useful for PA secretome analysis. Finally, the PEDOT:PSS modified electrode was successfully applied to the direct detection in bacterial culture supernatant (in other words without the use of any kind of purification, extraction or/and separation processes) of the secreted redox molecules. A complex and well resolved electrochemical fingerprint of the PA was obtained that could be further implemented in the view of bacterial detection and identification. Further works are now currently on the way to generate a PEDOT:PSS based 3D electrode structure in which bacterial growing could be proceeded to enhance the detection capabilities in the view of early detection and identification of pathogenic bacteria.

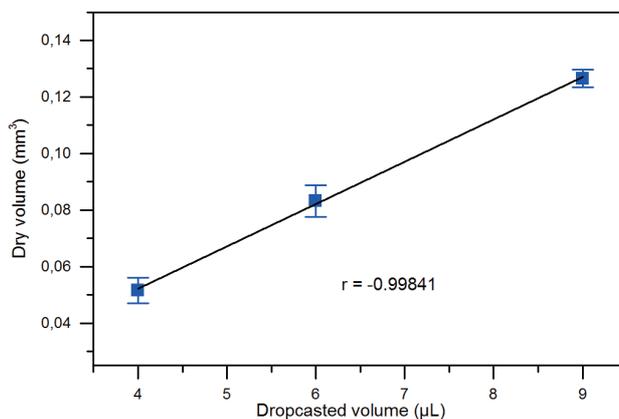
## Acknowledgements

We are grateful to Prof Paul Williams (University of Nottingham) for the gift of PAO1 strain. The autors thank Sylvie Elsen for the bacterial culture. The authors thank CEA and Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne for their financial and research supports. This work is partially supported by the Labex ARCANÉ (ANR-11-LABX-0003-01).

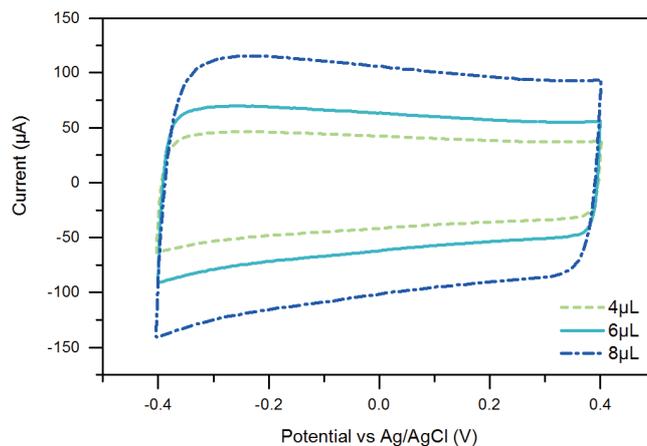
## Supplementary



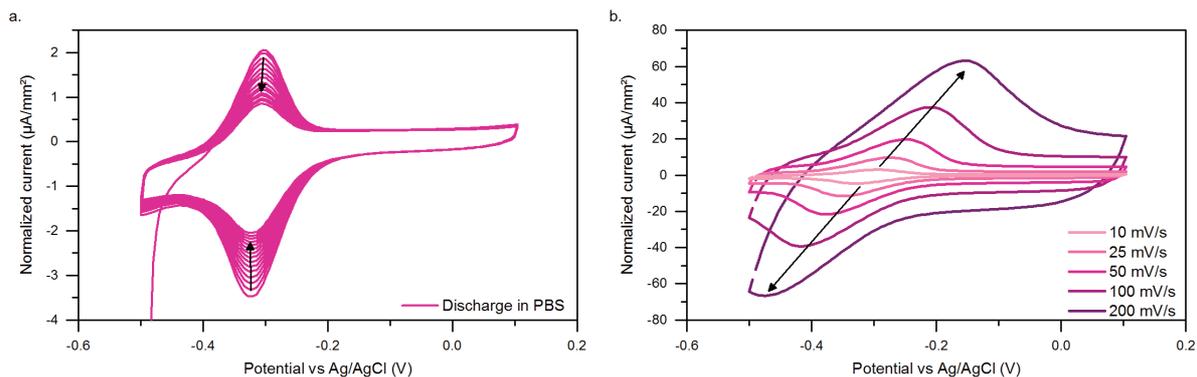
**Figure 3-21: Stabilization CV of 32 scans at 50mV/s of PEDOT working electrodes.**



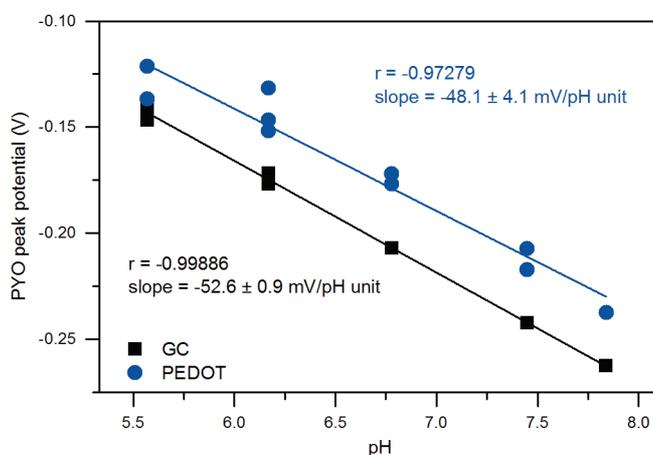
**Figure 3-22: Correspondence between dry PEDOT:PSS electrode volume and dropcasted solution volume.**



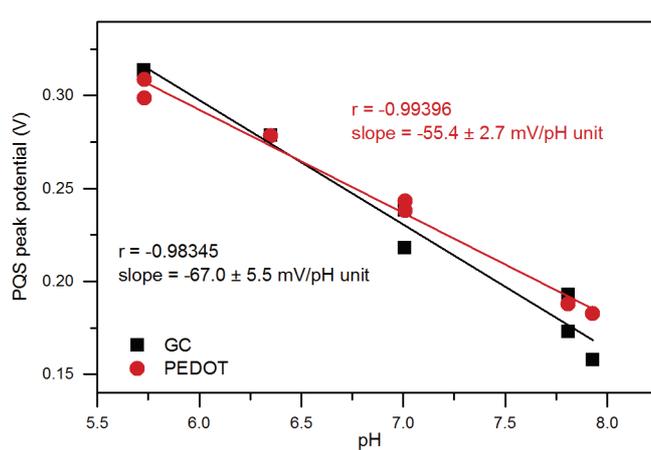
**Figure 3-23: CV at 50mV/s of PEDOT working electrodes with different dropcasted volume.**



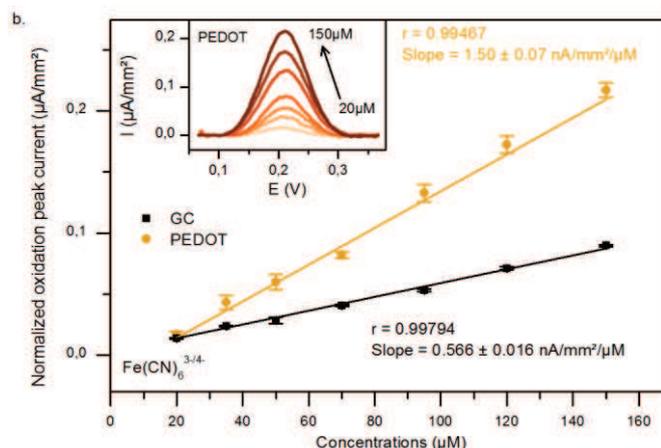
**Figure 3-24: a. Discharge in PBS of the PEDOT electrode after accumulation of Figure 3-16c; b. CV at several scan rates for PEDOT electrodes and 150µM Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>Cl<sub>3</sub> in PBS.**



**Figure 3-25: SWV (5mV, 10mV, 50Hz) potential peak of PYO 100µM according pH solution for PEDOT and GC working electrode.**



**Figure 3-26: SQW (5mV 20mV 2,5Hz) potential peak of PQS 100µM according pH solution for PEDOT and GC working electrode.**



**Figure 3-27: Calibration curve of  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  in PBS on GC and PEDOT:PSS working electrode, data extracted from SWV (step 5mV, amplitude 20mV and frequency 0.5Hz) normalized with the apparent surface of the electrodes. Insert: obtained SWV on PEDOT:PSS electrode.**

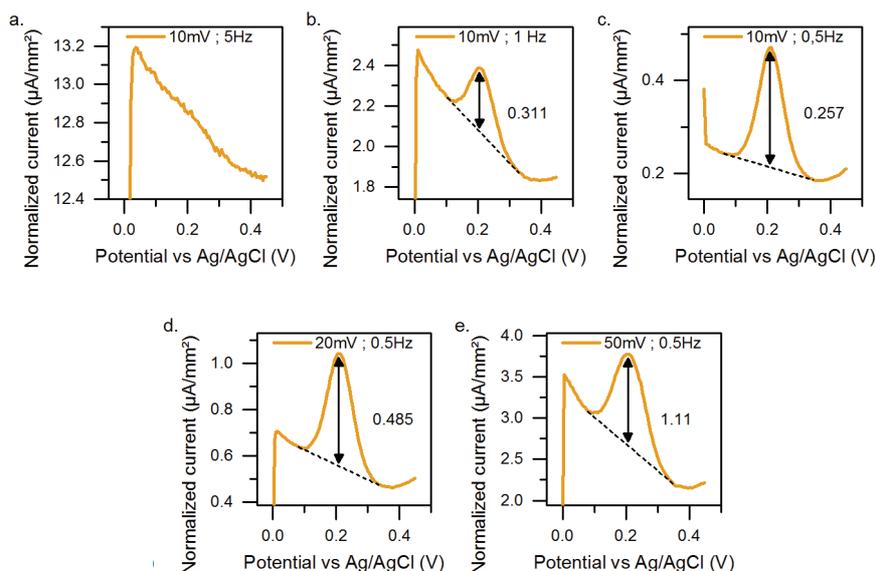
### 3.3.3. Résultats complémentaires : Optimisation de la détection de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ , PYO et de PQS sur l'électrode de PEDOT:PSS

#### 3.3.3.1. La SWV de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ sur PEDOT:PSS

Ce paragraphe est un complément direct à la publication ci-dessus. Il présente l'optimisation des paramètres de la SWV pour la détection de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ . Ce sont ces paramètres qui ont été utilisés tout au long de la publication pour les courbes de calibration des différentes espèces.

Nous avons tout d'abord fait varier la fréquence de la SWV. Lorsqu'elle est effectuée à 5Hz (Figure 3-28a) ou plus rapidement, aucun pic n'est détecté. A 1 et 0,5Hz (Figure 3-28b et c), le pic du  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  est présent. Leurs intensités respectives (0,311 and 0,257 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$  respectivement) sont presque équivalentes pour les 2 fréquences, mais les lignes de bases sont très différentes. Elle est à courant plus important (2,15 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$ ) et à une pente plus prononcée (1,9 $\mu\text{A}/\text{mm}^2/\text{V}$ ) pour la SWV effectuée à 1Hz que pour celle à 0,5Hz (courant de 0,22 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$  et pente de 0,22 $\mu\text{A}/\text{mm}^2/\text{V}$ ). On a donc sélectionné 0,5Hz pour la fréquence de la SWV.

Lorsqu'on on augmente l'amplitude de la SWV (Figure 3-28c, d, e), l'intensité du pic augmente ainsi que le courant de la ligne de base et sa pente. Un bon compromis nous semble trouvé pour une amplitude de 20mV. On a donc choisi ces paramètres amplitude 20mV et fréquence 0,5Hz dans la publication.

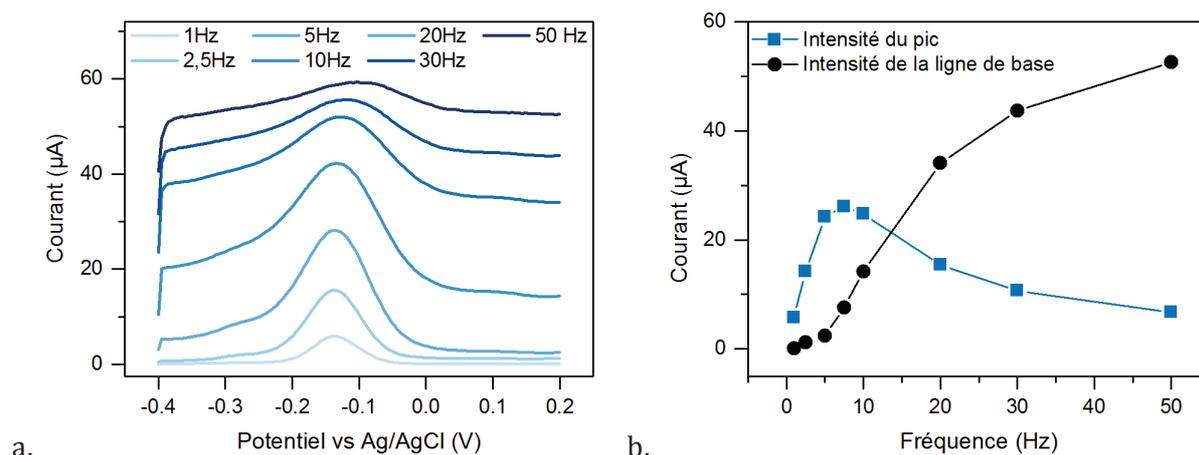


**Figure 3-28: Optimisation de la SWV sur PEDOT:PSS pour la détection de 220µm de  $K_3Fe(CN)_6$  dans du PBS.**

Toutefois,  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ , contrairement à PYO et PQS ne s'adsorbe pas à l'électrode. Les paramètres optimisés ci-dessus et utilisés dans la publication ne sont donc pas probablement les optimaux pour la détection de PYO et de PQS. Les 2 paragraphes suivants présentent une optimisation des paramètres de la SWV pour la détection de ces 2 espèces.

### 3.3.3.2. La SWV de PYO sur PEDOT:PSS

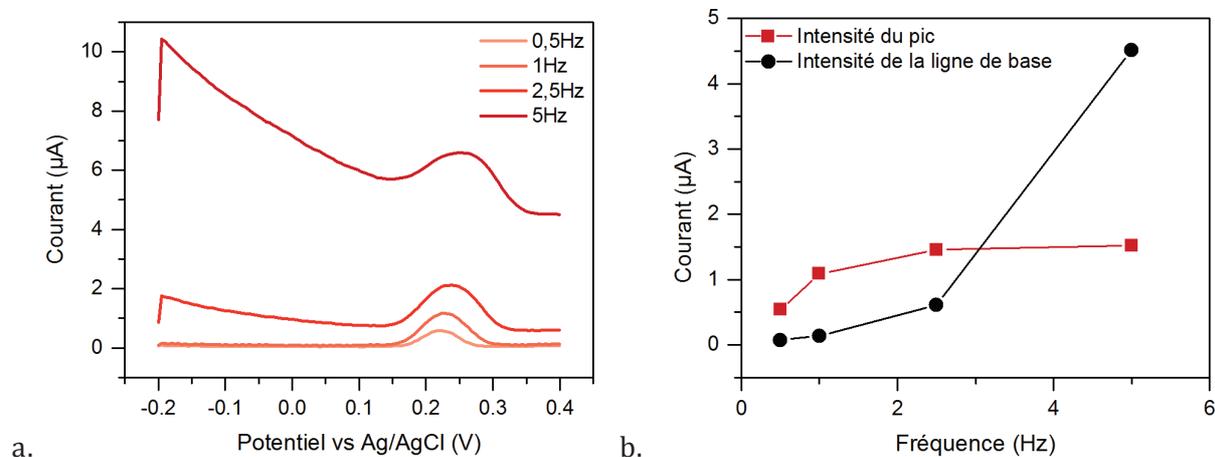
L'influence de la fréquence des SWV (pas 5mV, amplitude 10mV) réalisées en présence de 100µM de PYO dans du NaCl 171mM est évaluée entre 1 et 50Hz (Figure 3-29a). Pour les basses fréquences, la ligne de base est peu intense et le pic est bien défini mais peu intense. Pour les hautes fréquences, la ligne de base est haute, le pic très aplati est large. Les fréquences intermédiaires présentent un pic bien défini, relativement intense ainsi qu'une ligne de base intermédiaire. En traçant la taille du pic et l'intensité de la ligne de base en fonction de la fréquence de la SWV (Figure 3-29b), 5Hz apparaît comme la fréquence qui permet le meilleur compromis pour la détection (pic intense, et ligne de base peu intense).



**Figure 3-29 : a. SWV (pas 5mV, amplitude 10mV) à différentes fréquences de PYO 100µM dans NaCl 171mM sur électrode de PEDOT:PSS ; b. Intensité des pics et de la ligne de base aux différentes fréquences.**

### 3.3.3.3. La SWV de PQS sur PEDOT:PSS

La même expérience d’optimisation des paramètres de SWV est réalisée avec PQS. A la différence de PYO, PQS est une espèce à réaction redox lente (cf Chapitre 2). Une fréquence optimisée plus faible est donc attendue. L’allure des courbes obtenues est similaire à celle obtenue pour PYO (Figure 3-30a). A 10Hz (données non présentés), le pic de PQS disparaît complètement. En dessous, il faut chercher un compromis entre intensité de la ligne de base et taille du pic. Avec la même réflexion que ci-dessus, 1Hz est choisie (Figure 3-30b).



**Figure 3-30 : a. SWV (pas 5mV, amplitude 10mV) à différentes fréquences de PQS 100µM dans NaCl 171mM sur électrode de PEDOT:PSS ; b. Intensité des pics et de la ligne de base aux différentes fréquences.**

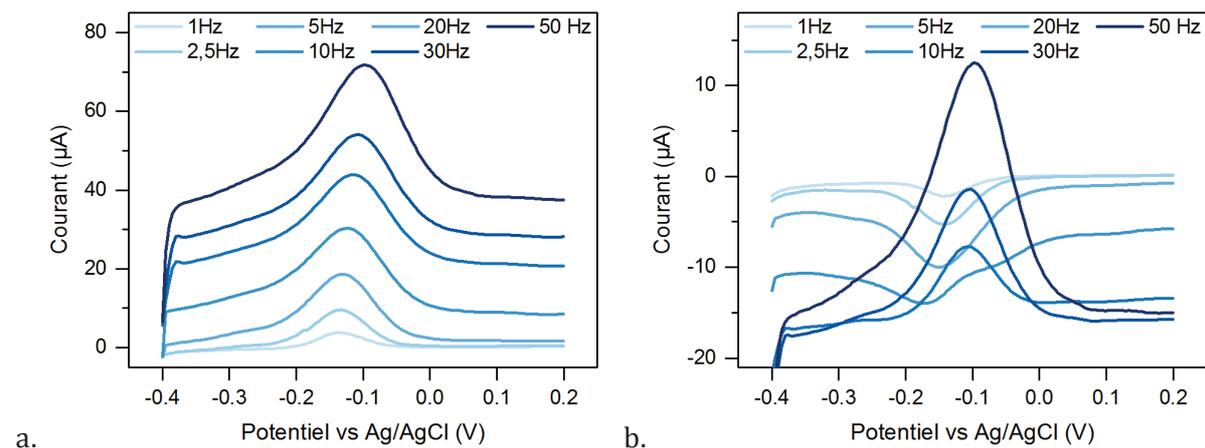
Ces expériences sont utiles pour donner une idée de la meilleure fréquence à utiliser pour la SWV sur électrode de PEDOT. Toutefois, elles sont à prendre avec précaution, la taille de la ligne de base ainsi que celle du pic dépendant de la géométrie de l’électrode de PEDOT:PSS. Pour des expériences mettant en présence à la fois PYO et PQS, une fréquence intermédiaire doit être utilisée. Nous avons choisi 2Hz, pour être plus proche de la fréquence optimale de PQS que de celle PYO pour conserver une bonne lecture du pic de PQS plus faible en intensité.

#### 3.3.3.4. Explication de l'allure des SWV

Sur une électrode classique (par exemple de GC), la taille du pic augmente avec la racine carrée de la fréquence en SWV (voir la formule du courant de pic en SWV en Annexe 1). Hors pour toutes les espèces testées ici, il diminue. Pour mieux comprendre ce phénomène, nous nous sommes intéressés au courant obtenu pour les impulsions positives et négatives des SWV de PYO de manière séparée. Les signaux obtenus pour les impulsions positives de la SWV (Figure 3-31a) ont une allure tout à fait normale : la ligne de base ainsi que la taille du pic augmentent avec l'augmentation de la fréquence d'analyse. Par contre, les signaux retours n'ont pas l'allure attendue (Figure 3-31b). Jusqu'à 5Hz, les signaux ont une allure classique : un pic négatif en réduction. Leurs lignes de base sont plus basses et leurs pics plus intenses lorsque la fréquence augmente. Au-dessus de 20Hz, la ligne de base est bien négative comme attendue mais le pic lui est positif. De plus, il augmente de taille avec la fréquence. Un résultat similaire est obtenu pour PQS. Il apparaît alors évident que la différence des 2 signaux conduit à un pic intense à basse fréquence, les pics étant de signes opposés, alors qu'elle conduit à une disparition partielle du pic quand les pics sont de même signes (Figure 3-29).

Ce pic positif pour les impulsions négatives indique qu'au voisinage de l'électrode PYO n'est pas réduit comme il le devrait, mais encore oxydé. La durée de l'impulsion positive n'a donc pas été assez longue pour permettre d'oxyder toutes les molécules à proximité de l'électrode. La réaction électrochimique de PYO étant très rapide, ce résultat est à première vue surprenant. Toutefois, l'électrode de PEDOT:PSS étant très capacitive, les courants non-faradiques sont très importants à chaque pas de potentiel. Le courant faradique nécessaire à la réaction électrochimique ne peut être mis en place sur le même laps de temps. L'oxydation est donc décalée dans le temps. Ainsi, lorsque la vitesse de balayage est trop rapide, l'oxydation des molécules à proximité de l'électrode est incomplète et elle continue donc pendant l'impulsion négative (lorsque celle-ci est réalisée au-dessus du potentiel redox de PYO).

Pour tout de même profiter de l'effet amplificateur de la SWV, il faut alors se placer à des vitesses de balayages lentes et ainsi ne pas profiter d'un des avantages de la SWV qui est de permettre des analyses très rapides. Toutefois la SWV conserve tout de même un autre de ces avantages, celui d'être une méthode « presse bouton » et très simple à analyser pour des non-spécialistes, comme des microbiologiques. Pour obtenir une amplification plus grande tout en étant plus rapide, on pourrait utiliser une CV combinée avec un traitement numérique permettant de soustraire le courant capacitif avant de sommer les 2 pics.



### 3.3.4. Conclusions sur l'utilisation de l'électrode de PEDOT:PSS

Les électrodes de PEDOT:PSS étudiées dans ce chapitre présentent un bon comportement électrochimique : stabilité, voltampérogrammes propres... La détection d'espèces modèles apporte la preuve de la grande capacité d'amplification de l'électrode par rapport à l'utilisation d'électrode classique de GC. Toutefois, cette capacité est dépendante du type de molécules testées. Elle est meilleure pour les petites molécules chargées positivement. Pour les molécules d'intérêt de la thèse, l'amplification est moins importante à cause de leur taille et de leur charge.



## CHAPITRE 4

# Mise au point et caractérisations d'une électrode 3D de PEDOT:PSS réalisée par lyophilisation

# Chapitre 4 Mise au point et caractérisations d'une électrode 3D de PEDOT:PSS réalisée par lyophilisation

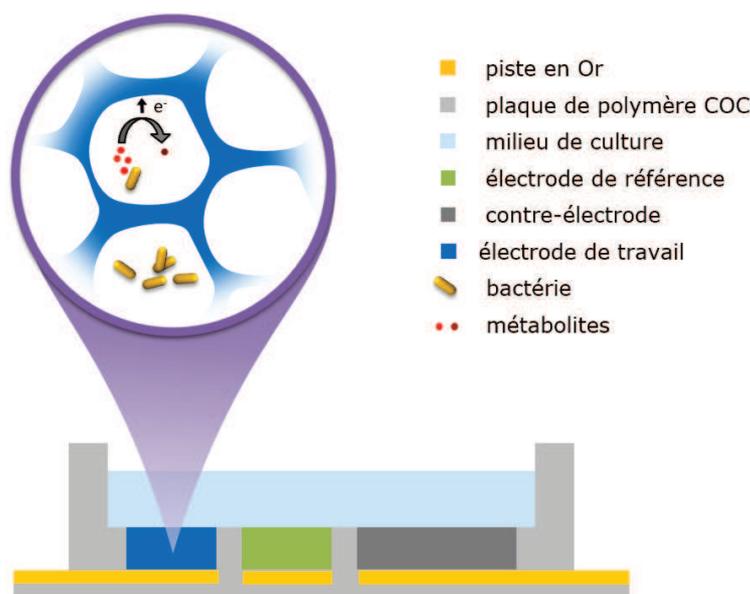
|            |   |     |
|------------|---|-----|
| 4.1.       | <i>Apport attendu de l'utilisation d'une électrode 3D de PEDOT:PSS</i> .....                          | 125 |
| 4.2.       | <i>Etat de l'art des matériaux poreux réalisés à partir de PEDOT</i> .....                            | 126 |
| 4.2.1.     | <b>Avant-propos : vocabulaire des matériaux poreux</b> .....  | 126 |
| 4.2.2.     | <b>Mise en forme 3D du PEDOT</b> .....  | 127 |
| 4.2.2.1.   | Electropolymérisation du PEDOT .....  | 127 |
| 4.2.2.2.   | Utilisation de supports physiques .....   | 128 |
| 4.2.2.3.   | Electro-filage .....  | 128 |
| 4.2.2.4.   | Séchage par fluide supercritique .....  | 129 |
| 4.2.2.5.   | Lyophilisation .....  | 129 |
| 4.3.       | <i>Contraintes et choix effectués pour l'électrode 3D de PEDOT:PSS de la thèse</i> .....              | 131 |
| 4.3.1.     | <b>Cahier des charges technique</b> .....   | 131 |
| 4.3.2.     | <b>Choix de la méthode de fabrication de l'électrode 3D</b> .....                                     | 132 |
| 4.4.       | <i>Fabrication et caractérisation de l'électrode 3D de PEDOT:PSS</i> .....                            | 133 |
| 4.4.1.     | <b>La lyophilisation</b> .....  | 133 |
| 4.4.2.     | <b>Formulations et notations</b> .....  | 134 |
| 4.4.3.     | <b>Les caractérisations</b> .....   | 134 |
| 4.4.3.1.   | Avant-propos .....  | 134 |
| 4.4.3.2.   | Caractérisations électriques .....  | 134 |
| 4.5.       | <i>Résultats concernant la fabrication et la caractérisation de l'électrode 3D de PEDOT:PSS</i> ..... | 136 |
| 4.5.1.     | <b>Etude préliminaire sur lame de verre</b> .....   | 136 |
| 4.5.1.1.   | Formulation de base pour matériau 3D .....  | 136 |
| 4.5.1.2.   | Influence de l'évaporation et de l'étalement de la goutte .....                                       | 137 |
| 4.5.1.3.   | Conclusion .....  | 138 |
| 4.5.2.     | <b>Réalisation de dispositifs adaptés</b> .....   | 138 |
| 4.5.2.1.   | Choix technologiques et design des puces .....  | 138 |
| 4.5.2.2.   | Lyophilisation sur puces .....  | 140 |
| 4.5.3.     | <b>Recherche des conditions permettant d'obtenir une « bonne » électrode</b> .....                    | 141 |
| 4.5.3.1.   | Influence de la teneur en GOPS .....  | 141 |
| 4.5.3.2.   | Influence de la vitesse de congélation .....  | 144 |
| 4.5.3.3.   | Recherche d'une formulation donnant des électrodes conductrices .....                                 | 146 |
| 4.5.3.3.1. | Electrochimie de la composition PG3 .....   | 146 |
| 4.5.3.3.2. | Post-traitements .....  | 147 |
| 4.5.3.3.3. | Ajouts d'additifs .....   | 149 |
| 4.5.4.     | <b>Etude approfondie de l'influence de la DBSA</b> .....  | 150 |
| 4.5.4.1.   | Influence sur le séchage après immersion .....  | 150 |
| 4.5.4.2.   | Influence sur la morphologie .....  | 151 |
| 4.5.4.3.   | Influence sur la conductivité .....   | 152 |
| 4.5.4.3.1. | Epaisseur de la structure 3D .....  | 152 |
| 4.5.4.3.2. | Conductivité avant et après recuit en fonction de la teneur en DBSA .....                             | 153 |
| 4.5.4.3.3. | Conductivité d'un film plan de même formulation .....   | 154 |
| 4.5.4.3.4. | Conclusion sur la conductivité du matériau 3D .....   | 154 |
| 4.5.5.     | <b>Caractérisations complètes de la formulation PG3D0.75</b> .....                                    | 155 |
| 4.5.5.1.   | Caractérisations morphologiques .....   | 155 |
| 4.5.5.1.1. | Imagerie .....  | 155 |
| 4.5.5.1.2. | Porosimétrie au mercure .....   | 156 |
| 4.5.5.1.3. | Pesage .....  | 158 |
| 4.5.5.2.   | Caractérisations mécaniques .....   | 158 |
| 4.5.5.3.   | Caractérisations électriques .....  | 159 |

|   |            |
|---|------------|
| 4.5.5.3.1. En statique .....                                    | 159        |
| 4.5.5.3.2. En dynamique.....                                    | 160        |
| 4.5.5.4. Caractérisation spectroscopique Raman .....            | 161        |
| 4.5.5.5. Caractérisations électrochimiques .....                | 165        |
| 4.5.5.5.1. Comparaison 3D et plan .....                         | 165        |
| 4.5.5.5.2. Influence du volume de l'électrode .....             | 168        |
| 4.5.5.5.3. Détection du ferricyanure de potassium .....         | 170        |
| 4.5.5.5.4. Détection de PYO .....                               | 171        |
| 4.5.5.5.5. Détection de PQS.....                                | 172        |
| <b>4.5.6. Conclusions.....</b>                                  | <b>173</b> |
| <b>4.6. Protocoles des caractérisations du Chapitre 4 .....</b> | <b>173</b> |
| <b>4.6.1. Caractérisations morphologies.....</b>                | <b>173</b> |
| <b>4.6.2. Caractérisations mécaniques .....</b>                 | <b>174</b> |
| <b>4.6.3. Caractérisation spectroscopique Raman .....</b>       | <b>174</b> |
| <b>4.6.4. Caractérisations électrochimiques .....</b>           | <b>174</b> |

#### **4.1. Apport attendu de l'utilisation d'une électrode 3D de PEDOT:PSS**

Nous avons montré précédemment que le polymère conducteur PEDOT:PSS est un bon matériau pour la détection des exo-produits sécrétés par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Néanmoins, l'utilisation d'une électrode de PEDOT:PSS plane n'est pas pleinement satisfaisante. En effet, nous avons obtenu une amplification du signal plus faible pour PYO, PQS et la 2-AA que celle obtenue pour le ruthénium hexamine. Les raisons principales de cette limitation sont la charge, la taille et l'hydrophobie des molécules que l'on veut détecter, qui limitent leurs diffusions au sein du polymère. Ainsi, seule une couche proche de la surface est utilisée et non toute l'épaisseur du matériau.

Pour trouver une solution à ce problème, nous proposons de réaliser une électrode en 3 dimensions qui offrira une plus grande surface développée et une porosité qui permettra une meilleure accessibilité du PEDOT à nos molécules. Cette stratégie offre de plus une autre opportunité pour augmenter le signal : si l'électrode a des pores assez grands (dizaines ou centaines de microns), la bactérie pourrait croître directement en son sein. Ainsi, la collection des métabolites, et donc le signal seraient augmentés par rapport à une électrode avec des pores plus petits qui serait seulement plongée dans la solution. La Figure 4-1 présente schématiquement le fonctionnement du dispositif final avec l'électrode 3D et les bactéries à l'intérieur de celle-ci comme nous l'imaginons.



**Figure 4-1 : Schéma de l'utilisation de l'électrode 3D de PEDOT:PSS pour la détection d'exo-produits redox de bactéries**

Ce Chapitre décrit la première étape dans la réalisation de ce dispositif : la mise au point et la caractérisation de l'électrode 3D de PEDOT:PSS. Tout d'abord un état de l'art des matériaux 3D de PEDOT sera présenté, avant de définir un cahier des charges pour notre électrode puis de présenter les choix technologiques effectués dans le cadre de la thèse. Les paragraphes suivants présenteront les méthodes de mise en forme pour réaliser et caractériser l'électrode 3D ainsi que les résultats obtenus.

## 4.2. Etat de l'art des matériaux poreux réalisés à partir de PEDOT

### 4.2.1. Avant-propos : vocabulaire des matériaux poreux

D'après la nomenclature de l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC), le terme polymère poreux est utilisé lorsqu'un polymère possède de nombreux pores qui se conservent à la fois dans les états sec et hydraté [142]. De plus, le polymère doit subir peu de changements de volume entre ces 2 états, sinon le terme de gel est utilisé [142]. Les matériaux poreux sont ensuite classés en fonction de la taille de leurs pores [142], on parle de matériau :

- microporeux pour une taille de pores inférieure à 2 nm,
- mésoporeux pour des pores compris entre 2 and 50 nm,
- macroporeux pour des pores de taille supérieure à 50 nm. Lorsque la taille de pores dépasse 1 $\mu$ m, le terme de « supermacroporeux » est parfois employé.

La porosité d'un matériau est définie comme le volume des pores sur le volume total du matériau. On parle de porosité ouverte (Figure 4-2) si les pores sont accessibles de l'extérieur et connectés entre eux. Dans le cas contraire, on parle de porosité fermée. Les 2 types de porosité peuvent être présents dans le même matériau.



**Figure 4-2 : Représentation schématique de matériaux à la porosité ouverte et fermée.**

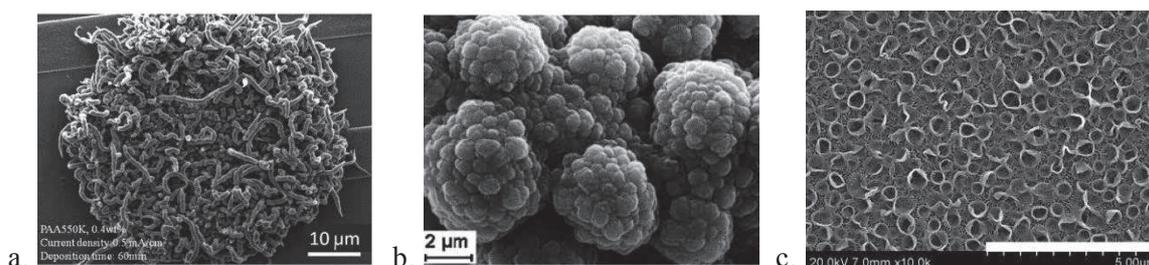
#### 4.2.2. Mise en forme 3D du PEDOT

Chercher à augmenter le courant mesuré en augmentant la surface développée de l'électrode est une approche courante en électrochimie. Elle concerne tous les types de matériaux d'électrodes, aussi bien métalliques que polymères. La littérature étant abondante sur le sujet, cette partie introductive aborde uniquement la mise en forme 3D du PEDOT.

Ce paragraphe s'intéressera tout d'abord à l'électropolymérisation classique du PEDOT qui conduit à un matériau avec une structuration 3D. Puis, les 4 voies principales utilisées dans la littérature pour réaliser un PEDOT 3D plus épais seront décrites : l'utilisation d'empreintes solides, l'électro-filage, le séchage avec un fluide supercritique et la lyophilisation.

##### 4.2.2.1. Electropolymérisation du PEDOT

L'électropolymérisation est la méthode la plus utilisée pour réaliser des électrodes de PEDOT. En jouant sur les conditions d'électropolymérisation (potentiels, cycles) et les électrolytes utilisés (solvants, sels), des dépôts de morphologies très différentes sont obtenus. La revue de Martin et al. [122] est très complète sur le sujet. Pour citer quelques exemples, des dépôts de PEDOT formant des nanofibres [143] (Figure 4-3a), des choux fleurs [144] (Figure 4-3b) ou des cratères [145] (Figure 4-3c) ont été rapportés.



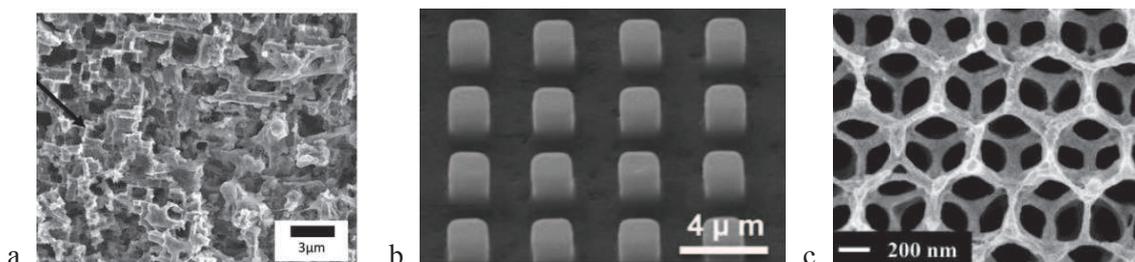
**Figure 4-3 : Observation au MEB de dépôts électrochimiques de PEDOT présentant diverses morphologies : a. nanofibres, extrait de [143] ; b. choux fleurs, extrait de [144] ; c. cratères, extrait de [145].**

L'avantage de cette technique provient de la polymérisation réalisée directement à la surface du conducteur qui servira ensuite pour connecter l'électrode. Une bonne reprise de contact ainsi qu'une bonne adhésion sont assurées. Le désavantage réside dans le fait que les morphologies obtenues sont relativement peu épaisses. La surface développée obtenue reste limitée et il n'est pas possible de réaliser une croissance de bactéries au sein de l'électrode. De plus, les structures sont mésoporeuses et non macroporeuses, comme notre application le nécessite.

#### 4.2.2.2. Utilisation de supports physiques

L'utilisation de supports physiques est très courante pour la mise en forme 3D. Le principe est de former le matériau autour d'un objet physique. Pour cela, 2 types de voies sont distinguées :

- celles qui recouvrent l'objet physique : le matériau forme alors une couche fine qui suit les contours de l'objet physique choisi. C'est par exemple le cas du matériau présenté en Figure 4-4a pour lequel le PEDOT est polymérisé chimiquement à la surface d'une feuille d'aluminium gravée électrochimiquement [146].
- Celles qui mettent en œuvre l'objet physique comme un moule. Par exemple, un moule physique, parfois réutilisable, peut être utilisé. C'est ce qui a été utilisé pour réaliser des micro-piliers de PEDOT par polymérisation chimique dans un moule de PDMS [147] (Figure 4-4b). Des petits objets peuvent aussi être utilisés comme empreintes pour les pores. Cette technique est souvent utilisée avec des billes pour contrôler parfaitement la taille des pores. La Figure 4-4c présente un matériau obtenu après auto-assemblage de billes de polystyrène à la surface de verre recouvert d'oxyde d'étain dopé au fluor. Le PEDOT a été électropolymérisé autour des billes, qui sont ensuite dissoutes pour révéler la porosité [148].



**Figure 4-4 : Observation au MEB de mise en forme de PEDOT grâce à une empreinte solide : a. PEDOT recourant une feuille d'aluminium gravée électrochimiquement, extrait de [146] ; b. micro-piliers de PEDOT réalisés grâce à un moule de PDMS, extrait de [147] ; c. PEDOT mis en forme en nid d'abeille grâce à des billes, extrait de [148].**

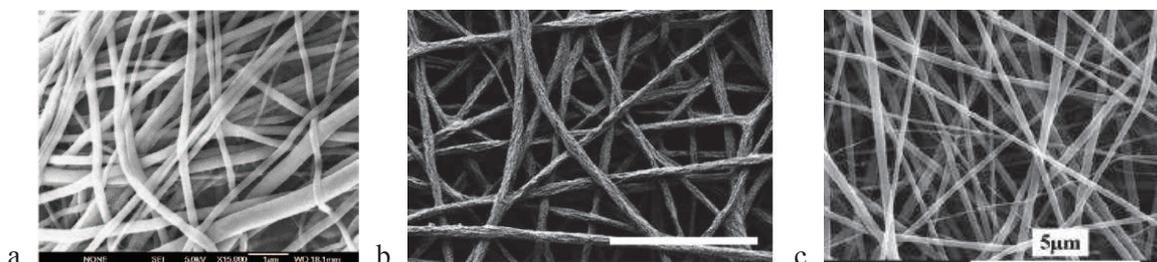
L'avantage de ces méthodes est qu'elles permettent de réaliser de nombreuses formes 3D différentes de manière très reproductible. En effet, la structure est fixée par l'objet physique et ne dépend pas de processus aléatoires comme pour les autres méthodes présentées dans ce paragraphe.

#### 4.2.2.3. Electro-filage

L'électro-filage (*electrospinning* en anglais) permet d'obtenir un réseau non-tissé de fibres polymères de tailles allant de la dizaine de nanomètres à quelques microns. Pour cela, une solution contenant le polymère est placée dans le réservoir d'une seringue. Un champ électrique intense (plusieurs milliers de volts) est appliqué entre l'aiguille de la seringue et un collecteur placé à une dizaine de centimètres. Ce champ déforme la goutte sortant de l'aiguille et l'étire jusqu'au collecteur en un filament très mince. Ce filament se dépose sur le collecteur puis sèche rapidement pour former des fibres.

Concernant le PEDOT, il existe trois approches : filer un polymère connu puis le recouvrir de PEDOT [149] (Figure 4-5a), filer des précurseurs du PEDOT et réaliser la polymérisation ensuite [150] (Figure 4-5b), ou filer directement le PEDOT (Figure 4-5c) [151]. La première

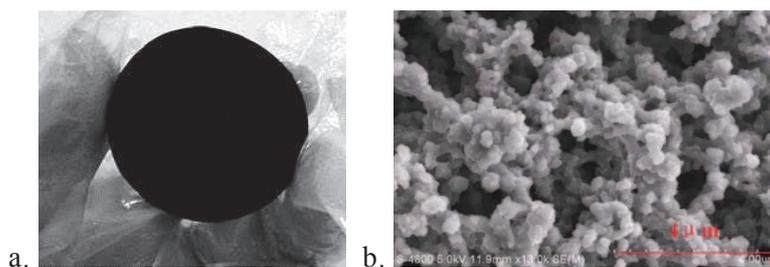
méthode est la plus simple à mettre en œuvre, mais l'élément conducteur (le PEDOT) n'est présent qu'en surface du matériau ce qui limite sa conductivité. Pour la seconde méthode, la polymérisation est difficile à réaliser dans tout le volume de la fibre, ce qui conduit à sa rétractation quand les précurseurs sont rincés [150] (Figure 4-5b). La troisième méthode, mise au point très récemment, permet d'avoir une fibre entièrement conductrice, mais les valeurs de conductivités rapportées sont pour l'instant très faibles [151].



**Figure 4-5 : Images MEB de : a. Fibre de polyéthylène téréphtalate recouverte de PEDOT déposé par polymérisation en phase vapeur, extrait de [149] ; b. Fibre de PEDOT obtenues après polymérisation en phase vapeur d'EDOT sur des fibres de polyvinylpyrrolidone contenant du p-toluènesulfonate de fer (III), extrait de [150] ; c. Fibre de PEDOT et de polyvinylpyrrolidone, extrait de [151].**

#### 4.2.2.4. Séchage par fluide supercritique

Cette stratégie est développée par l'équipe du professeur Zhang de l'institut de technologie de Pékin, Chine [152], [153]. L'idée est de partir d'un hydrogel de PEDOT puis de remplacer par étapes l'eau du matériau pour obtenir des pores. L'hydrogel est tout d'abord changé en alcogel en remplaçant l'eau par l'alcool, puis l'alcool est remplacé par du CO<sub>2</sub> liquide. Le matériau est ensuite séché en passant par le point critique du CO<sub>2</sub>. Un solide poreux, appelé aérogel, est obtenu (Figure 4-6). Les pores obtenus par cette méthode sont réguliers mais la porosité est nanométrique, donc trop petite pour notre application.



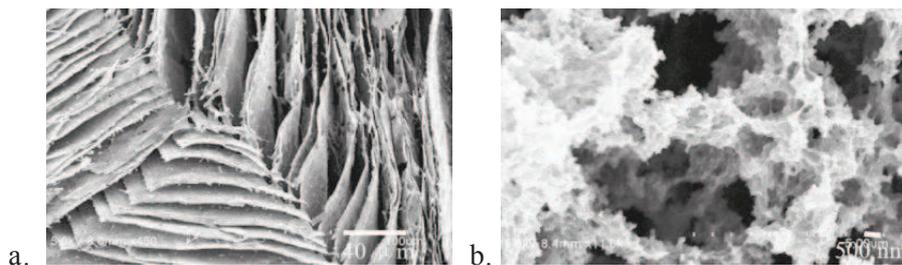
**Figure 4-6 : Aérogel de PEDOT obtenu à partir d'un hydrogel et d'un séchage par CO<sub>2</sub> supercritique : a. image macroscopique, extrait de [152] ; b. image par microscopie à balayage, extrait de [153].**

#### 4.2.2.5. Lyophilisation

La lyophilisation consiste à congeler un échantillon solvaté (en général dans l'eau) puis à sublimer l'eau par action de la pression et de la température. Lorsqu'une solution de polymère est congelée, l'eau en cristallisant rejette les molécules de polymères à l'extérieur du cristal. Un solide composé de cristaux de glaces entourés de zones très denses en polymère est obtenu.

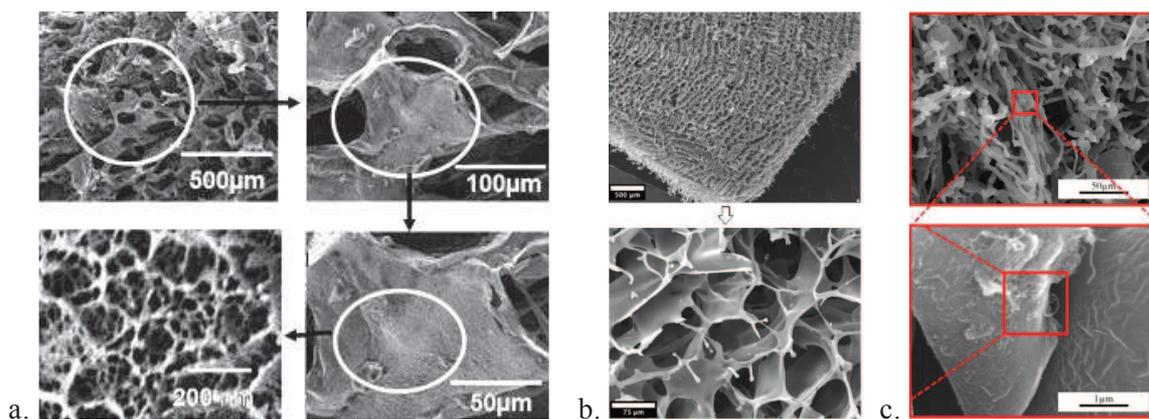
L'étape suivante du procédé est la sublimation de l'eau. Le matériau obtenu est alors structuré en empreinte inverse des cristaux d'eau.

Les premiers travaux rapportés pour la lyophilisation du PEDOT sont ceux de Zhang et al. en 2011 [154]. Ils réalisent une congélation directionnelle (du bas vers le haut) de 2 types de solutions différentes : une dispersion de PEDOT:PSS et un hydrogel. Leur lyophilisation conduit à des matériaux poreux. Dans le premier cas, la congélation directionnelle conduit à l'obtention de feuillets (Figure 4-7a) alignés dans la direction de la congélation. Dans le second, la structure organisée de l'hydrogel empêche l'organisation de la cristallisation et des pores homogènes de très petite taille sont obtenus (Figure 4-7b).



**Figure 4-7 : Images MEB de PEDOT:PSS 3D obtenus par lyophilisation après congélation directionnelle, à partir : a. d'une dispersion de PEDOT :PSS ; b. d'un hydrogel de PEDOT :PSS, extrait de [154].**

Depuis le début de la thèse, 3 autres équipes ont publié des travaux concernant la lyophilisation du PEDOT:PSS. Ces résultats ont donc été obtenus en parallèle de nos travaux. Ranjusha et al. en 2014 [155] ont réalisé des électrodes poreuses avec deux niveaux de porosité : une macroporosité de 100 à 150µm et une mésoporosité avec des pores d'environ 50nm (Figure 4-8a). L'application visée est une l'utilisation du matériau en tant que super-capacité. Pour obtenir cette double porosité, ils ont lyophilisé du PEDOT:PSS avec du dioxyde de manganèse et du poly(acétate de vinyle) (PVA). Le PVA sert à renforcer mécaniquement la structure alors que le dioxyde de manganèse est utilisé comme une empreinte solide, dissoute après la lyophilisation pour donner la seconde porosité. Les seconds travaux sont ceux de Wan et al., publiés en 2015 [156]. Ils concernent la réalisation de structure 3D de PEDOT:PSS de taille de pores de 40µm (Figure 4-8b). L'application est l'utilisation du matériau en tant que transistor électrochimique pour suivre la croissance de cellules. La lyophilisation est réalisée à partir d'une dispersion commerciale de PEDOT:PSS à laquelle est ajouté un réticulant. Pour finir, Zhao et al. [157] ont publié en 2016 la lyophilisation d'une solution de PEDOT:PSS à laquelle est ajouté un réticulant et des nanotubes de carbone pour augmenter la conductivité du matériau. L'application visée est la super-capacité. Le matériau obtenu a un aspect assez fibreux avec des pores de 2 à 10µm.



**Figure 4-8 : Images MEB de : a. Structure de PEDOT:PSS à deux niveau de porosité, extrait de [155] ; b. Structure de PEDOT:PSS, extrait de [156] ; c. PEDOT:PSS lyophilisé avec des nanotubes de carbones, extrait de [157].**

La lyophilisation est une méthode simple qui permet de faire facilement des matériaux poreux de taille de pores de l'ordre de la dizaine ou centaine de microns comme exigé par nos applications. Toutefois, aucune des publications n'utilisent ces matériaux pour la détection de composé redox, ni pour la croissance de bactéries. Ils ne remplissent donc pas toutes nos contraintes.

### 4.3. Contraintes et choix effectués pour l'électrode 3D de PEDOT:PSS de la thèse

#### 4.3.1. Cahier des charges technique

Pour la détection de métabolites redox produits par des bactéries se développant à l'intérieur de l'électrode, le matériau 3D de PEDOT:PSS que nous cherchons à développer doit satisfaire un cahier des charges à multiples volets.

- Un volet physiologique, lié à la présence des bactéries :
  - Biocompatibilité : la méthode choisie pour la fabrication de l'électrode ne doit pas mettre en péril la biocompatibilité du PEDOT:PSS.
  - Taille de pores : la taille de pores doit être bien supérieure à la taille de la bactérie (0.5 à 2µm) pour pouvoir à la fois laisser entrer les bactéries mais aussi laisser diffuser les nutriments. Une taille de pores comprise entre la dizaine et la centaine de µm est souhaitée.
  - Connexions des pores : les pores doivent être bien connectés entre eux pour que tout le volume de l'électrode soit accessible au liquide et aux bactéries. Nous voulons que les conditions de croissance soient proches des conditions classiques en milieu de culture liquide.
  - Stérilisation : l'électrode doit pouvoir être stérilisée par des méthodes conventionnelles sans perte de ses propriétés (notamment électriques et mécaniques).
- Un volet électrochimique, lié à la détection de molécules redox :

- Conductivité : le matériau doit être suffisamment conducteur pour permettre le passage du courant
- Electroactivité : le matériau doit permettre un bon transfert électronique avec les espèces redox,
- Surface développée : la porosité de l'électrode doit être importante et les parois entre les pores assez fines pour pouvoir exposer le maximum de volume du matériau aux molécules à détecter.
- Un volet physique :
  - Manipulation : l'électrode doit avoir une tenue mécanique suffisante pour être manipulée facilement.
  - Adhésion : une bonne adhésion est nécessaire entre l'électrode et l'élément de reprise de contact.
  - Immersion : l'électrode doit garder son intégrité en solution aqueuse (pas de dissolution ou de gonflement important).
  - Séchage : le séchage ne doit pas dégrader l'électrode, cette étape pouvant intervenir lors de la stérilisation de la mousse.
- Un volet procédé :
  - Rapidité et facilité de la fabrication : la méthode choisie doit permettre une fabrication rapide (quelques heures au maximum) et facile (peu d'étapes) de l'électrode dans un objectif d'industrialisation future.
  - Disponibilité commerciale des solutions : nous ne voulons pas, pour des raisons de temps et de moyens, réaliser la synthèse du polymère dans le cadre de cette thèse. La méthode choisie doit donc permettre la fabrication de l'électrode à partir de solutions commerciales de PEDOT:PSS.

---

#### 4.3.2. Choix de la méthode de fabrication de l'électrode 3D

Nous avons choisi la lyophilisation comme méthode de fabrication de l'électrode 3D. Ce choix est soutenu par les éléments suivants :

- Biocompatibilité : cette méthode ne nécessite aucun solvant pouvant mettre en péril la biocompatibilité déjà prouvée du PEDOT:PSS.
- Facilité de mise en œuvre : cette méthode est facile pour l'opérateur. Une fois les solutions préparées, il suffit de les placer dans l'enceinte du lyophilisateur et de lancer le programme dans lequel les paramètres de température et de pression sont enregistrés.
- Méthode « verte » : la lyophilisation peut être considérée comme une méthode verte car elle ne nécessite aucun bain et solvant et car elle met en jeu des écarts de température relativement faible (moins d'une centaine de degrés).
- Géométrie des pores : la lyophilisation donne des pores bien connectés et de taille ajustable.

Ce choix a été effectué dès le début de la thèse alors que seuls les travaux de Zhang [154], présentés dans le paragraphe 4.2.2.5, étaient publiés. Le choix a été effectué sur la base de premières expériences réalisées lors d'un partenariat entre le laboratoire de Bioélectronique des

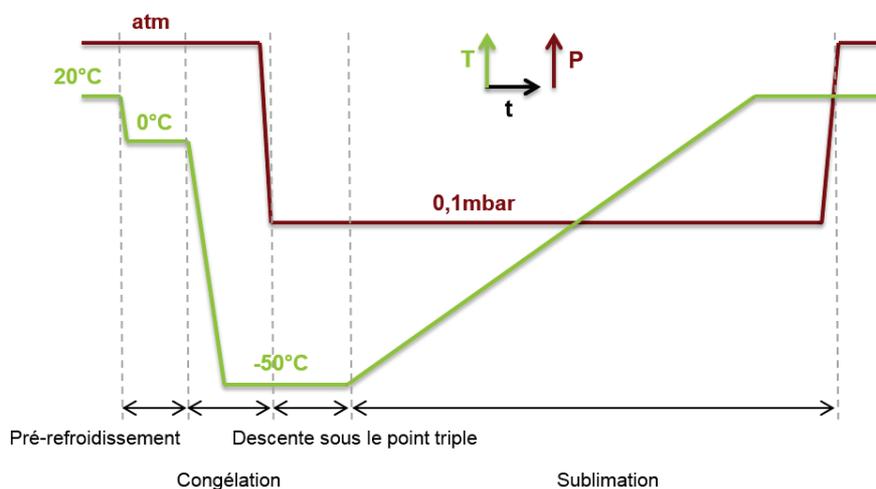
Mines de Saint-Etienne dirigé par George Malliaras, le directeur de thèse, et l'équipe du professeur Gordon à l'université de Cornell, New York. Ces travaux ont donné lieu plus tard à la publication de Wan et al. [156] présentée dans le paragraphe 4.2.2.5. Concernant la thèse, exceptée pour l'idée de départ (l'utilisation de la lyophilisation), le développement du matériau poreux s'est fait en parallèle à celui de cette publication et de manière indépendante.

#### 4.4. Fabrication et caractérisation de l'électrode 3D de PEDOT:PSS

Ce paragraphe présente les méthodes utilisées pour fabriquer l'électrode 3D dont le développement sera détaillé dans la partie 4.5, ainsi que les caractérisations développées. Les protocoles des caractérisations génériques sont regroupés en fin de chapitre dans le paragraphe 4.6.

##### 4.4.1. La lyophilisation

L'annexe 2 présente en détail la lyophilisation et ses différentes étapes. Ce paragraphe s'intéresse seulement aux paramètres choisis dans la thèse. Ils sont souvent choisis en fonction de la  $T_g$  du polymère en solution. Malheureusement, dans notre cas, le PEDOT:PSS ne semble pas avoir de  $T_g$  bien définie [158]. J'ai donc choisi pour mes expériences d'utiliser la température la plus basse atteignable par le lyophilisateur :  $-50^\circ\text{C}$ . Le but est d'éviter autant que possible l'effondrement de la structure. La vitesse de descente en température a fait l'objet d'une optimisation présentée dans le paragraphe 4.5.3.2. La pression utilisée pour la lyophilisation primaire est choisie à 0,1mbar pour passer sous le point triple de l'eau. En ce qui concerne la remontée en température, les échantillons étant d'épaisseur moyenne, une rampe plutôt lente (remontée à  $20^\circ\text{C}$  en 10h c'est-à-dire à  $0,117^\circ\text{C}/\text{min}$ ) a été choisie. La Figure 4-9 présente les variations pression/température utilisées en routine au cours de cette thèse.



**Figure 4-9 : Schéma des variations de pression et température utilisées au cours du cycle de lyophilisation dans la thèse.**

Après la lyophilisation, un recuit d'1h à  $120^\circ\text{C}$  sous atmosphère ambiante est réalisé, comme pour les échantillons du Chapitre 3.

#### 4.4.2. Formulations et notations

Les dispersions sont préparées le matin même de la lyophilisation. Le protocole suivant est appliqué :

- Sonication 30 min de la dispersion de PEDOT:PSS conservée à 4°C,
- Filtration de la solution sur un filtre seringue de 5µm,
- Ajout des additifs,
- Mélange plusieurs minutes avec un vortex,
- Conservation à température ambiante et à l'abri de la lumière jusqu'à la lyophilisation,
- Mélange avec un vortex puis mise à 4°C 15min avant la lyophilisation.

De nombreuses formulations ont été testées. Pour simplifier leur notation, la lettre P sera utilisée pour le PEDOT:PSS PH 1000 de Clevios, la lettre D pour la DBSA et la lettre G pour le GOPS. Les chiffres après la lettre sont le pourcentage massique de l'élément par rapport à la masse totale de la dispersion. Par exemple, une formulation avec 1% massique (%m) de GOPS et 0,2% de DBSA, sera notée PG1D0.2. Pour rappel, la dispersion PEDOT:PSS PH 1000 de Clevios contient comme dans le Chapitre 3 environ 1,1% de matière avec un ratio PEDOT:PSS de 1 pour 2,5.

---

#### 4.4.3. Les caractérisations

##### 4.4.3.1. Avant-propos

Les matériaux obtenus ont été caractérisés pour vérifier s'ils répondaient ou non au cahier des charges (structure, conductivité, tenue mécanique...). La plupart de ces caractérisations ont été réalisées facilement grâce à des outils et des méthodes connues, leurs protocoles sont présentés en fin de chapitre dans le paragraphe 4.6. Mais la mesure de conductivité a nécessité une réflexion et un développement spécifique. Elle est présentée ci-dessous. Les analyses en lien direct avec la microbiologie seront présentées dans le Chapitre 5.

##### 4.4.3.2. Caractérisations électriques

L'objectif des caractérisations électriques est d'obtenir la conductivité des différentes formulations testées. Ces caractérisations, primordiales lorsque l'on cherche à mettre au point des électrodes, n'ont pas été simples. En effet, bien que de nombreuses méthodes de mesure de la conductivité de films minces soient rapportées, la littérature est pauvre pour les matériaux 3D. Les publications (citées dans le paragraphe 4.2.2.5 ainsi que d'autres sur des électrodes poreuses d'autres matériaux) ne décrivent pas les méthodes utilisées et se contentent de citer la méthode 2 ou 4 pointes. Sur cette base, une méthode de mesure 4 pointes a été développée en premier lieu dans la thèse mais n'a pas montré une fiabilité assez grande. En effet, les pointes s'enfonçaient plus ou moins dans le matériau qui est mou, ce qui rendait les mesures non reproductibles. Une autre méthode dite de « mesure de la ligne de transmission » (TLM pour *Transmission Line Measurement*) a ensuite été mise en place avec succès. Cette méthode est habituellement utilisée pour l'analyse de la conductivité et de la résistance de contact de couches minces déposées à la surface de pistes conductrices. Sa pertinence pour des matériaux épais sera explorée dans le paragraphe

4.5.4.3.1. Le principe est de placer au contact du matériau plusieurs pistes métalliques espacées de différentes distances (Figure 4-10a). La résistance  $R$  entre chaque couple de pistes est la somme de plusieurs composantes : la résistance de contact entre le matériau et la piste pour chacune des 2 pistes et la résistance de la portion de matériau.

$$R = 2 * R_C + R_{mat}$$

avec,  $R_C$  la résistance de contact matériau métal et  $R_{mat}$  la résistance du matériau.

Or  $R_{mat}$  est défini par la géométrie de l'échantillon :

$$R_{mat} = \frac{L}{W * t * \sigma}$$

avec  $L$  la longueur de matériau mesuré,  $W$  sa largeur,  $t$  son épaisseur et  $\sigma$  sa conductivité.

La combinaison des 2 équations précédentes donne :

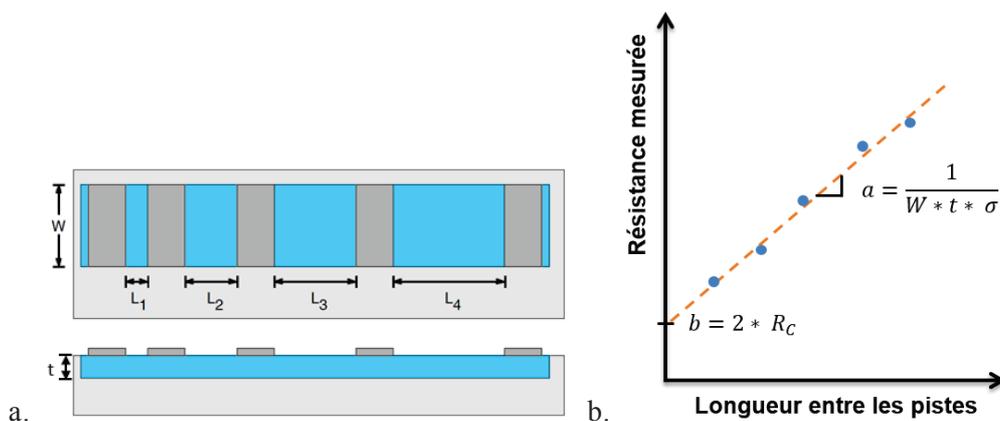
$$R = 2 * R_C + \frac{1}{W * t * \sigma} * L$$

Lorsque  $R$  en fonction de  $L$  est tracé, une droite d'équation  $R = a * x + b$  est obtenue (Figure 4-10b). La conductivité du matériau  $\sigma$  peut alors être déterminée en utilisant l'équation suivante :

$$\sigma = \frac{1}{a * t * W}$$

La résistance de contact  $R_C$  peut être déterminée à partir de  $b$ . Toutefois pour s'affranchir de la surface de contact matériau métal  $A_C$ , la résistivité de contact  $\rho_C$  est le paramètre à considérer. Elle vaut :

$$\rho_C = \frac{b}{2} * A_C$$



**Figure 4-10 : a. Géométrie des pistes utilisées pour la méthode TLM, extrait de [159] ; b. représentation graphique des mesures.**

Pour compléter la caractérisation, la résistance du matériau a été calculée en fonction de son potentiel électrochimique de la même manière que dans le Chapitre 3 paragraphe 3.3.1.2.

## 4.5. Résultats concernant la fabrication et la caractérisation de l'électrode 3D de PEDOT:PSS

Cette partie décrit les résultats obtenus concernant la fabrication d'électrodes 3D à partir de solutions commerciales de PEDOT:PSS. En pratique, 3 points ont été critiques dans le développement : la fabrication d'un dispositif permettant d'obtenir un matériau de morphologie reproductible et une reprise de contact facile, l'obtention de matériaux résistants à des cycles d'immersion /séchage et l'obtention d'un matériau conducteur.

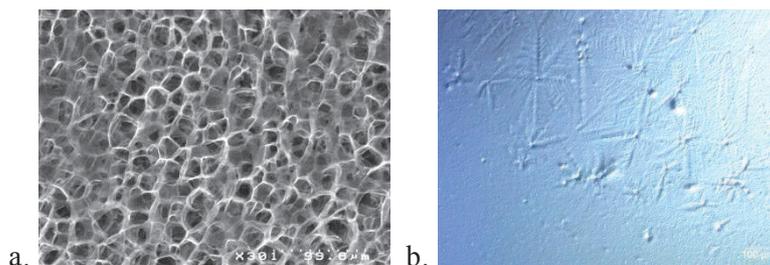
Le premier paragraphe présente les résultats obtenus pour la lyophilisation de gouttes de PEDOT:PSS déposées sur des lames de verre. Le second paragraphe présente la création et la fabrication du dispositif évoqué ci-dessus. Le troisième paragraphe aborde l'optimisation des formulations utilisées pour atteindre les objectifs de résistance mécanique et conductivité. Le quatrième s'intéresse aux caractérisations du matériau optimisé.

### 4.5.1. Etude préliminaire sur lame de verre

Pour réaliser facilement les premières expériences sur la faisabilité de la lyophilisation de PEDOT:PSS, des dépôts de gouttes de solution à la surface de lames de verre ont été réalisés.

#### 4.5.1.1. Formulation de base pour matériau 3D

Des gouttes de 10 $\mu$ L de PEDOT:PSS ou du mélange utilisé dans le Chapitre 3 (PG1D0.2 + éthylène glycol (EG) 5% en volume) ont été lyophilisées sur des lames de verre conductrices. La congélation a été effectuée de 20°C à -50°C en 2h15 (-0.52°C/min). La lyophilisation du PEDOT:PSS (Figure 4-11a) conduit à un dépôt poreux alors que celle du mélange du Chapitre 3 donne un film présentant des structures de cristallisation (Figure 4-11b). Ce résultat n'est pas étonnant car le second dépôt paraissait non congelé à -50°C. La cause est probablement la présence d'EG qui a un point de fusion bas (-12,69°C) et qui est couramment utilisé en tant qu'anti-gel. Pour sa part, le dépôt de PEDOT:PSS présente des pores bien définis et homogènes de plusieurs dizaines de  $\mu$ m (Figure 4-11). Cette taille de pores est dans la fourchette exigée par notre application. Suite à ce résultat, la dispersion de PEDOT:PSS a été choisie comme formulation de base pour la suite des expériences. Les éléments autres que l'EG du mélange du Chapitre 3 seront introduits plus tard ci-nécessaire. Pour rappel, le GOPS est un réticulant permettant la non-redispersion de la formulation lors de l'immersion et la DBSA était utilisée en tant que surfactant pour optimiser le dépôt à la tournette.

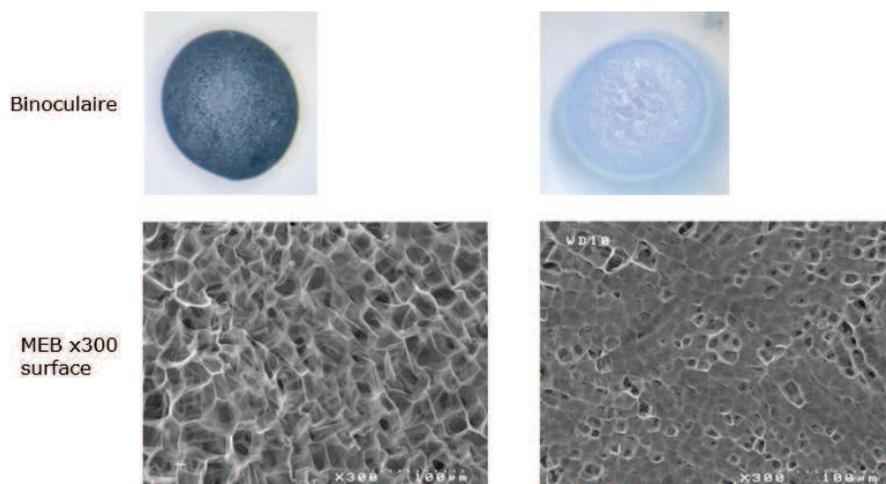


**Figure 4-11 : a. Image MEB du matériau obtenu après lyophilisation d'une goutte de 10µL de PEDOT:PSS ; b. Image au microscope optique du matériau obtenu après lyophilisation d'une goutte de 10µL de PG1D0.2 + EG 5% en volume.**

#### 4.5.1.2. Influence de l'évaporation et de l'étalement de la goutte

En répétant la lyophilisation de PEDOT:PSS dans les mêmes conditions, des matériaux plus ou moins poreux sont obtenus. La première cause de ces différences semble être l'évaporation partielle de l'eau de la dispersion avant la congélation. En effet, la goutte est déposée à température ambiante et subit des temps d'attente différents avant congélation (selon l'ordre des dépôts, la rapidité de lancement de chaque expérience...). Ces temps qui n'excèdent pas quelques minutes sont tout de même suffisamment grands pour laisser une goutte de quelques microlitres s'évaporer partiellement. La vitesse d'évaporation d'une goutte dépend à la fois de la température, du taux d'humidité et de la nature du matériau support. Pour limiter l'évaporation, nous avons choisi de jouer sur le paramètre de la température car il est facile à contrôler. Pour la suite des expériences, la goutte est déposée à 5°C dans un réfrigérateur, puis transportée dans la chambre de lyophilisation dans un récipient fermé. Ensuite, la rampe de congélation est commencée à 0°C au lieu de 20°C.

Ce changement améliore un peu la répétabilité des structurations 3D obtenues, mais des différences de morphologies importantes sont encore observées. Ces différences semblent être liées à l'étalement de la goutte à la surface du matériau support. L'étalement d'une goutte dépend de la structuration du matériau mais aussi de son caractère hydrophile ou hydrophobe. Nos dépôts sont jusqu'alors effectués sur des lames de verre propres ou bien sur des lames recouvertes de PEDOT:PSS. L'étalement des gouttes est très différent selon le type de lame ainsi que le temps passé depuis le nettoyage ou le dépôt de PEDOT:PSS. Pour ces raisons, l'étalement de goutte obtenu sur chaque lame est différent. Ensuite, le dépôt 3D obtenu après lyophilisation garde l'aspect macroscopique de la goutte : il peut être épais et peu étalé ou très fin et très étalé (Figure 4-12). Cela a un impact sur la morphologie des pores obtenus. En effet, lorsque la goutte s'étale peu les pores ressemblent à ceux présentés dans le paragraphe précédent : ouverts et bien définis, alors que lorsque la goutte s'étale beaucoup, des pores plus petits et peu ouverts en surface sont obtenus (Figure 4-12). Une goutte plus étalée est plus fine qu'une goutte moins étalée de même volume. Or, la descente en température pour la congélation est réalisée par les plateaux de la chambre de lyophilisation et donc par la surface en contact avec la lame. Plus elle est grande et plus le matériau est fin, plus il congèlera vite. La congélation rapide semble donner dans notre configuration des pores plus petits et moins ouverts.



**Figure 4-12 : Photographies à la binoculaire et images MEB de matériaux obtenus après la lyophilisation de gouttes de PEDOT:PSS d'étalement initial différent.**

#### 4.5.1.3. Conclusion

Cette étude préliminaire a permis de montrer que la lyophilisation de solution de PEDOT:PSS PH 1000 est possible et donne un matériau ayant une structure 3D. Toutefois la morphologie des dépôts obtenus n'est pas très reproductible. Il apparaît donc nécessaire de mieux contrôler les conditions de dépôts avant d'aller plus loin.

#### 4.5.2. Réalisation de dispositifs adaptés

Plusieurs stratégies ont été envisagées pour mieux contrôler la morphologie du dépôt : modifier la surface de dépôt pour définir des zones hydrophiles et hydrophobes et ainsi contrôler l'étalement de la goutte, ou bien créer des puits physiques qui contiendront la solution. C'est la deuxième stratégie qui a été choisie dans cette thèse. En remplissant un puits jusqu'au bord, l'épaisseur de la solution est la même sur toute la surface, contrairement à un dépôt de goutte. Ainsi, les effets de bords souvent observés lors des dépôts sur lame seront minimisés.

##### 4.5.2.1. Choix technologiques et design des puces

La stratégie choisie pour réaliser les puits repose sur les compétences présentes dans le Département des Technologies pour la Biologie et la Santé du CEA-LETI. En effet, une partie importante des activités du département porte sur la micro-fluidique, ce qui a conduit au développement de la fabrication de cartes. Ces cartes plastiques sont usinées puis assemblées entre elles (Figure 4-13). Concernant les matériaux, 2 plastiques sont traditionnellement utilisés : le poly méthacrylate de méthyle (PMMA) et le copolymère d'oléfine cyclique (COC). Le COC a été choisi dans le cadre de cette thèse car il est possible de le sceller thermiquement. Ainsi, aucune colle ne devra être utilisée, ce qui élimine les problèmes de tenue pendant le processus de lyophilisation et de toxicité pour les bactéries. De plus, il s'agit d'un matériau peu adsorbant.

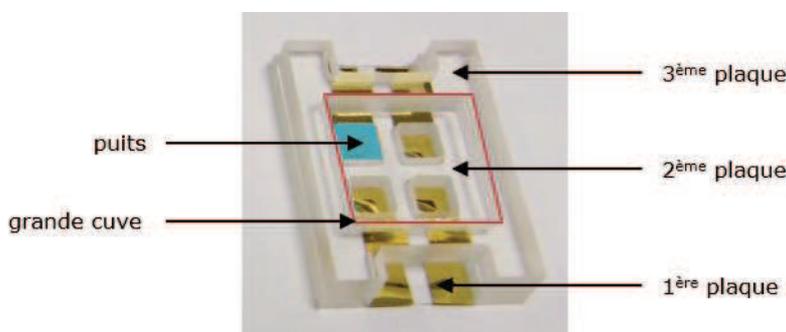


**Figure 4-13 : Exemple de carte micro fluidique fabriquée dans le Département des Technologies pour la Biologie et la Santé du CEA-LETI.**

En adaptant cette technologie, nous voulons réunir dans une même puce les éléments suivants :

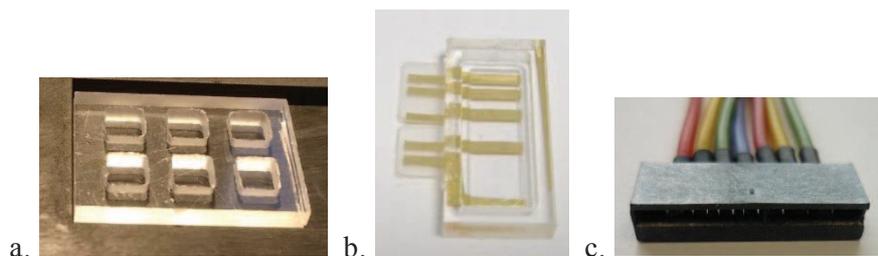
- Puits pour déposer la solution à lyophiliser,
- Contact électrique pour connecter l'électrode,
- Grande cuve pour contenir l'électrolyte.

La Figure 4-14 est une photographie de la puce imaginée pour remplir ces conditions. Elle est composée de trois plaques de COC. Sur la première, des pistes en or ont été évaporées pour la reprise de contact. La deuxième plaque est usinée avec plusieurs trous qui vont définir les puits une fois scellée à la première. La troisième est usinée avec un seul grand trou pour définir la cuve de l'électrolyte. Le détail de la fabrication des puces est présenté en Annexe 3.



**Figure 4-14 : Dispositif réalisé pour la lyophilisation et les analyses électrochimiques.**

Par la suite, de nombreuses autres puces ont été réalisées : des puces pour les analyses morphologiques sans pistes en or (Figure 4-15a) et d'autres pour les mesures de conductivité par la technique TLM présentée dans le paragraphe 4.4.3.2 (Figure 4-15b). La reprise de contact, d'abord réalisée par des petites pinces clippées sur les pistes, a ensuite été assurée par un connecteur encartable commercial (Figure 4-15c). Cette amélioration a été apportée pour rendre la reprise de contact plus reproductible.



**Figure 4-15 : a. Dispositif pour les analyses morphologiques ; b. Dispositif pour les mesures de conductivité ; c. Connecteur encartable pour la reprise de contact dispositif/instrument de mesure.**

#### 4.5.2.2. Lyophilisation sur puces

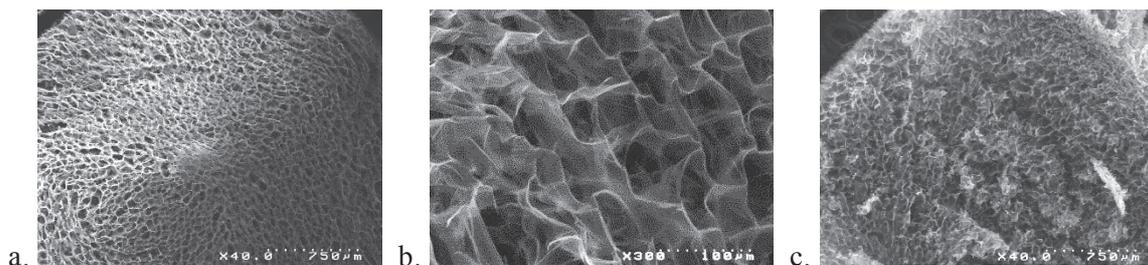
Les structures poreuses obtenues ont une morphologie beaucoup plus reproductible grâce à l'utilisation des puits (Figure 4-16a). Toutefois la surface obtenue n'est pas plane : un dôme est observé en son centre. Cela n'est pas surprenant. En effet, la descente en température s'effectuant par les plateaux de la chambre de lyophilisation, la congélation est légèrement unidirectionnelle. Lors de ce type de congélation, l'excédent de polymère est rejeté vers le haut et fini par former un cône très peu poreux [154].

A l'aide d'une aiguille fine, le matériau peut être sorti de la cuve sans l'abimer (Figure 4-16b). Toutefois, la partie inférieure du matériau reste collée à la surface de la plaque (Figure 4-16c). Ces résidus ne se décolent pas même après 10 min d'ultrasons dans de l'eau DI, de l'éthanol et de l'acétone. Cela est le signe d'un probable bon contact entre les pistes en or et le PEDOT:PSS, mais cela montre qu'on ne pourra pas réutiliser les dispositifs pour plusieurs expériences. De plus, ce résultat met en évidence que la porosité est présente sur toute l'épaisseur du matériau. Il n'y a pas de partie non poreuse, même au contact de l'or.



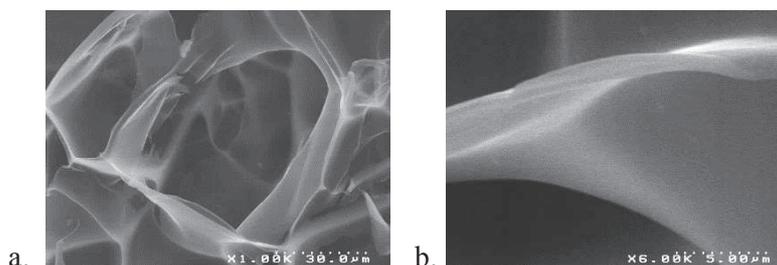
**Figure 4-16 : Photographies sous binoculaire du matériau obtenu après lyophilisation (dimension 4\*4\*2mm) : a. dans son puits ; b. sorti du puits, et c. le fond du puits.**

Des observations MEB confirment la porosité du matériau à la fois en surface (Figure 4-17a, b), et à l'intérieur, grâce à une coupe au scalpel (Figure 4-17c). En surface, les pores obtenus sont plutôt carrés (Figure 4-17b). Ils sont ouverts sur l'extérieur et d'environ 55  $\mu\text{m}$ . Ces caractéristiques sont aussi retrouvées à l'intérieur.



**Figure 4-17 : Images MEB du matériau obtenu après lyophilisation : a. et b. vue de la surface ; c. vue de l'intérieur après coupe au scalpel.**

La Figure 4-18a présente un zoom sur un pore. Sa paroi est bien définie. En observant de près le polymère, une surface plutôt lisse a été observée (Figure 4-18b).



**Figure 4-18 : Image MEB d'un pore et de sa paroi.**

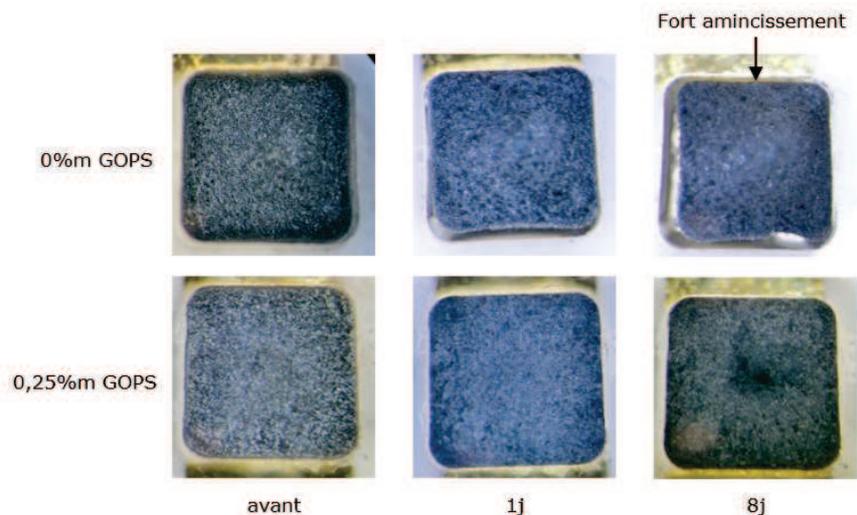
#### 4.5.3. Recherche des conditions permettant d'obtenir une « bonne » électrode

Grâce à l'utilisation des puces et de leurs puits, les matériaux obtenus ont des caractéristiques morphologiques répétables. Les étapes d'optimisation des conditions de lyophilisation et de formulation peuvent donc être réalisées.

##### 4.5.3.1. Influence de la teneur en GOPS

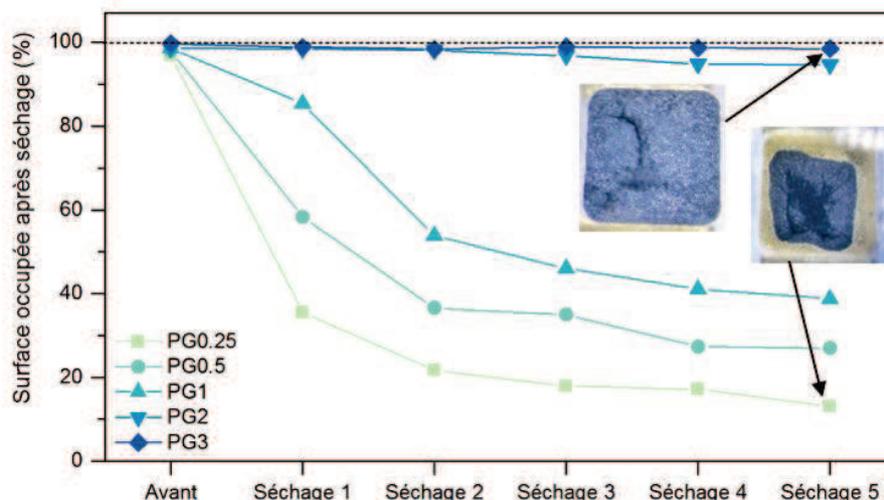
La première préoccupation a été de réaliser des électrodes ayant une bonne tenue mécanique. En effet, il a été remarqué qu'en utilisant uniquement la dispersion de PEDOT:PSS, le matériau se redispère une fois plongé en solution aqueuse (Figure 4-19, fort amincissement de l'épaisseur de la structure 3D). Ce phénomène est connu, c'est lui qui a nécessité l'ajout de réticulant dans la formulation utilisée dans le Chapitre 3. Nous avons donc choisi d'insérer le même réticulant (le GOPS) dans la dispersion avant lyophilisation. Cet ajout ne change pas l'aspect tridimensionnel du matériau obtenu.

Concernant l'immersion, à partir de 0,25% de GOPS, il n'y a pas de redispersion visible du matériau même après 8 jours (Figure 4-19).



**Figure 4-19 : Image à la binoculaire démontrant l'effet de la concentration massique de GOPS sur la redispersion de l'électrode lors de l'immersion.**

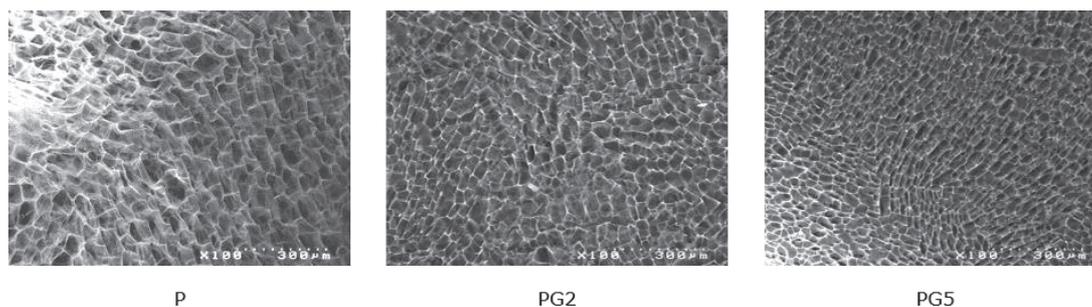
La résistance mécanique à 5 cycles de séchage/immersion a ensuite été explorée sous les conditions décrites en 4.6.2. Bien que notre application ne nécessite pas plus d'un ou 2 cycles, un nombre plus important a été choisi pour porter le matériau à ses limites. Pour les concentrations massiques de GOPS inférieures à 1% m (Figure 4-20), l'électrode se contracte beaucoup au séchage. Elle parvient à regonfler à l'immersion suivante pour les premiers cycles puis de moins en moins. Pour les teneurs en GOPS supérieures à 2% m, la contraction après séchage reste faible même au bout de 5 cycles (Figure 4-20). Pour avoir une bonne tenue mécanique des électrodes, il faut donc choisir une concentration de GOPS supérieure à 2% m. A 2% m, la contraction obtenue lors de l'expérience de cyclage est faible, mais d'autres expériences menées après celle-ci ont montré qu'elle est parfois plus importante. Cette valeur semble donc être une valeur limite. Pour ces raisons, la concentration massique optimisée en GOPS a d'abord été choisie à 2% m avant d'être portée à 3% m. Ces teneurs sont plus grandes que celles utilisées dans la composition optimisée du Chapitre 3 (1% m) pour les films plans. La structure poreuse est probablement plus fragile qu'une structure film car plus exposée au solvant, et nécessite donc plus de réticulant pour garder sa forme durant le séchage.



**Figure 4-20 : Surface occupée par le matériau après plusieurs cycles d'immersion/séchage.**

Nous avons ensuite étudié l'influence de la présence de GOPS dans la dispersion initiale sur la morphologie du matériau final. Sans GOPS (Figure 4-21 P), la surface du matériau présente un cône de rejet de matière discuté dans le paragraphe 4.5.2.2. Ce rejet de matière n'est plus observé dès 0,25% de GOPS. Cela atteste du changement de cohésion entre les chaînes de polymères par l'ajout de GOPS. Les chaînes en excès ne sont plus assez mobiles pour migrer au fur et à mesure de la congélation. Elles restent en place et le cône de rejet de matière n'est pas créé.

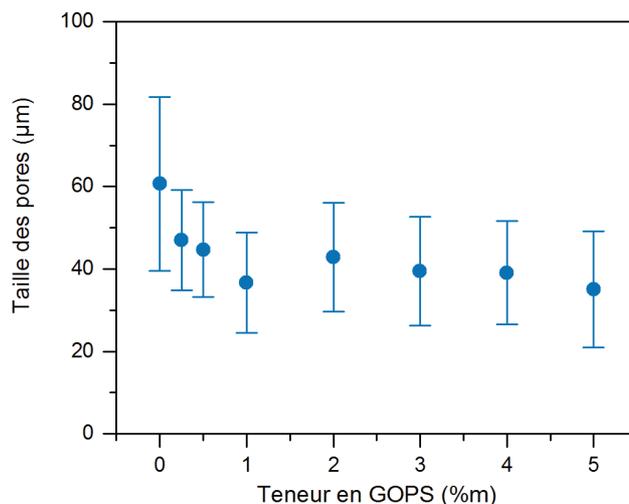
Une autre différence est observée : sans GOPS les pores de la surface sont peu organisés (Figure 4-21 P), alors que lorsque la concentration de GOPS augmente, ils le sont de plus en plus (Figure 4-21 PG2 et PG5). De plus, lorsque la concentration devient importante (Figure 4-21 PG5), les pores s'allongent. Ces deux phénomènes sont aussi la conséquence de la rigidité plus grande du mélange de polymères. Le mélange est alors moins malléable pour s'adapter à la croissance des cristaux d'eau et impose des limites physiques aux cristaux.



**Figure 4-21 : Image MEB de matériaux obtenus à partir de plusieurs concentrations massiques de GOPS.**

Le diamètre des pores présents à la surface de la structure 3D a été mesuré pour plusieurs concentrations massiques de GOPS à partir d'images MEB (Figure 4-22). Les pores obtenus en présence de GOPS sont plus petits et plus homogènes en taille qu'en absence de GOPS. Toutefois la concentration en GOPS semble peu influencer cette taille. L'allongement des pores observé pour des concentrations élevées de GOPS, n'influence donc pas la taille moyenne des pores. La limite de ces mesures est qu'elle concerne seulement les pores surfaciques et non ceux du volume

du matériau. Nous ignorons donc si le comportement observé en surface est valable sur la profondeur.



**Figure 4-22 : Taille apparente des pores en fonction de la teneur en GOPS de la dispersion de départ.**

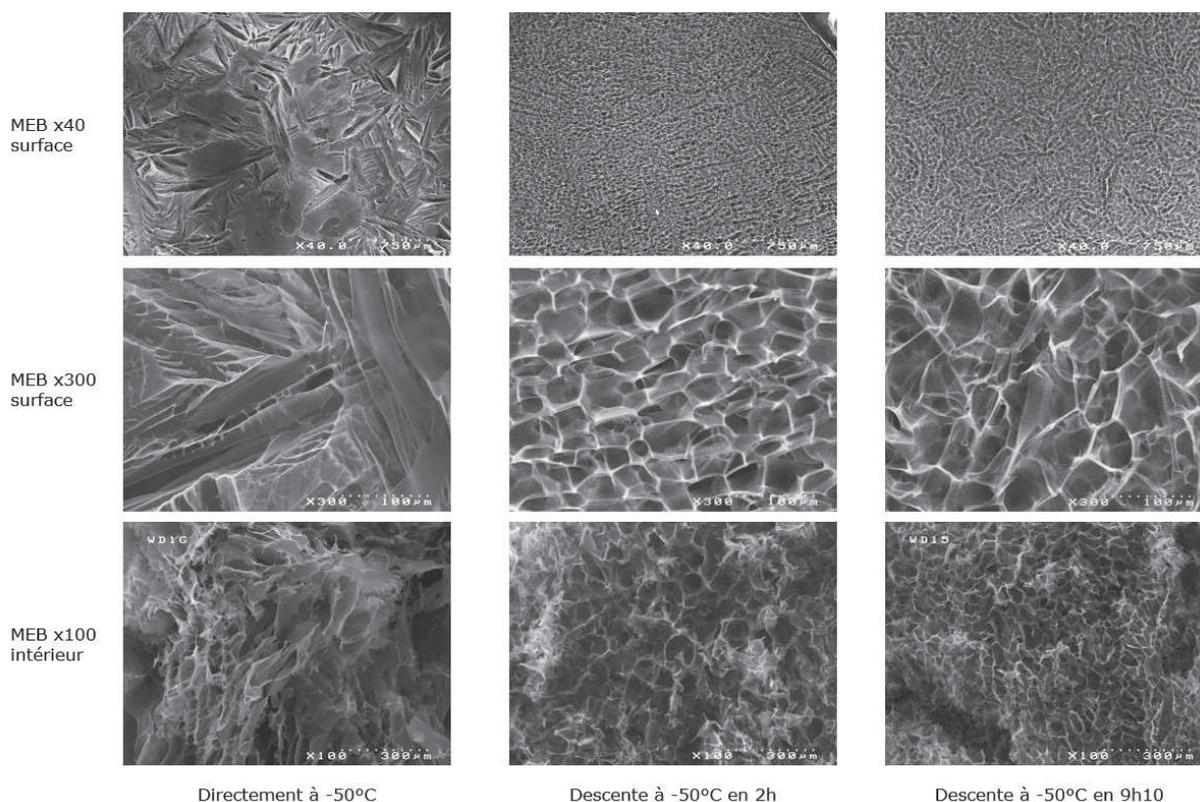
#### 4.5.3.2. Influence de la vitesse de congélation

La congélation étant une étape clé pour la détermination de la morphologie de l'électrode, plusieurs vitesses de congélation ont été testées. Une comparaison a été effectuée entre une congélation standard ( $-0,45^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), une congélation très rapide (le dispositif contenant la dispersion est placé sur les plateaux déjà à  $-50^{\circ}\text{C}$ ), et une congélation lente ( $-0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ). L'observation macroscopique révèle d'importantes différences morphologiques (Figure 4-23). Après congélation rapide, l'aspect de la surface n'est pas homogène : des zones sont plus claires et d'autres plus foncées. La congélation rapide n'a pas laissé beaucoup de temps aux chaînes pour s'organiser ce qui explique cette absence d'homogénéité. Après congélation lente, un matériau d'apparence homogène est obtenu, comme pour la congélation standard. Toutefois, sa surface est creusée vers l'intérieur. Le volume final du matériau est donc plus faible que celui du puits. Deux hypothèses sont envisagées pour expliquer ce résultat. Il peut être dû à une plus grande évaporation du solvant avant congélation (la durée avant congélation est grande pour cette congélation lente). Ou bien, cela peut être la conséquence d'une meilleure organisation des molécules lors de la congélation, qui conduit à moins de vide dans la structure, et donc à un matériau plus dense. Ce résultat expérimental a été exploité par la suite afin d'obtenir un matériau de même volume que celui du puits, et ainsi obtenir une surface d'électrode plane. La vitesse de congélation adéquate dépend de la formulation de la dispersion, mais est proche de  $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .



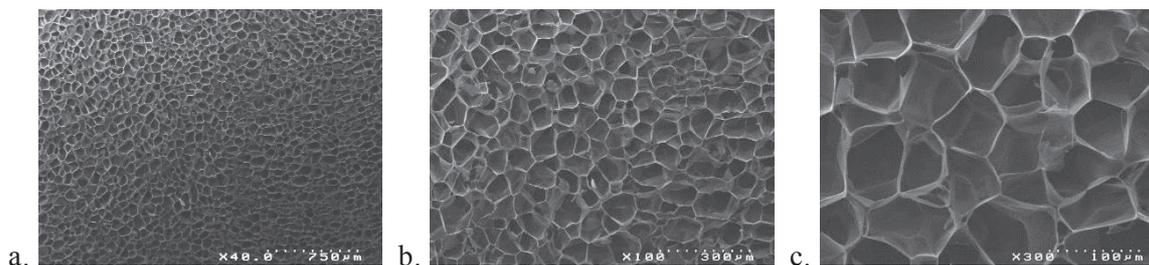
**Figure 4-23 : Images prises à la binoculaire de matériaux obtenus après congélation à plusieurs vitesses.**

Lorsque l'on observe ces mêmes structures au MEB, les différences se confirment (Figure 4-24). Pour la congélation rapide, il n'y a pas de réelle porosité en surface, mais seulement des empreintes de cristaux de glace en forme d'étoile. Par endroit, l'aspect de la surface suggère d'éventuels pores dans le volume qui seraient fermés en surface. L'intérieur est assez cohérent avec l'aspect surfacique : quelques pores mais très désorganisés. Le matériau présente probablement une mauvaise interconnexion entre les pores. De plus, le matériau a peu de tenue mécanique. En effet, il se décompose en paillettes lorsqu'on le manipule pour le couper en 2 avec un scalpel. Pour la congélation lente, les pores ressemblent à ceux obtenus pour la congélation standard. Leurs tailles ne semblent pas très différentes. La vitesse de congélation n'est donc, à priori, pas un bon paramètre pour modifier cette taille.



**Figure 4-24 : Influence de la vitesse de congélation sur la structure microscopique des dépôts. Image MEB.**

A ce stade de l'étude, les meilleurs matériaux sont obtenus pour une concentration mas-  
sique de GOPS de 3%, et une vitesse de congélation de  $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (Figure 4-25).



**Figure 4-25 : Images MEB du matériau PG3 obtenu avec une vitesse de congélation de  $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .**

#### 4.5.3.3. Recherche d'une formulation donnant des électrodes conductrices

Après avoir obtenu un « bon » aspect morphologique des structures macroporeuses, nous nous sommes intéressés à leur conductivité.

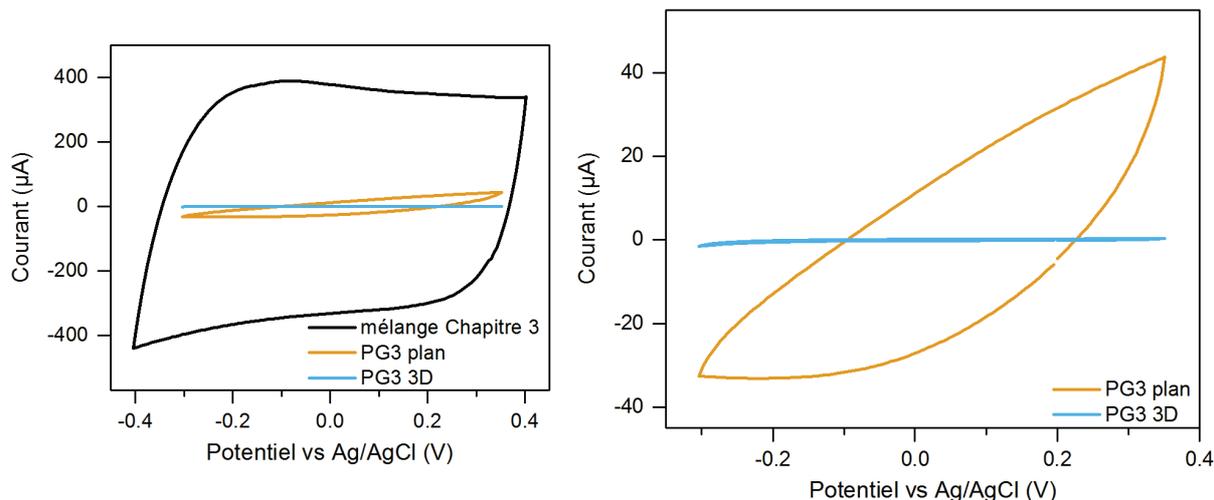
##### 4.5.3.3.1. Electrochimie de la composition PG3

L'étude électrochimique consiste à comparer les voltampérogrammes obtenus pour les 3 électrodes suivantes :

- électrode 2D de la formulation du Chapitre 3,
- électrode 2D PG3,
- électrode 3D PG3.

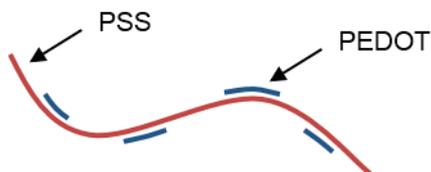
Les CV obtenues (Figure 4-26) pour la formulation PG3 sont très différentes de celles obtenues pour un dépôt de la même formulation que celle du Chapitre 3 : elles sont beaucoup moins capacitives. Or, nous savons que le PEDOT a une capacitance volumique, et le même volume ayant été utilisé pour toutes les électrodes, on en déduit que la formulation PG3 conduit à des électrodes peu conductrices. Cela n'est pas étonnant, car la composition du Chapitre 3 contient de l'éthylène glycol (EG) dont le rôle est d'augmenter de plusieurs ordre de grandeur la conductivité du matériau en changeant l'organisation des chaînes [127], alors que la formulation PG3 n'en contient pas. Mais l'ajout d'EG dans la dispersion initiale est impossible, car il empêche la congélation de la dispersion et donc l'obtention d'un matériau poreux (voir 4.5.1.1),

Néanmoins, les 2 types d'électrode de la formulation PG3 n'ont pas le même voltampérogrammes. Celui obtenu pour l'électrode de PG3 plane est plus résistif et capacitif que celui de l'électrode 3D. Cette électrode accumule donc plus de charges. Ainsi, la conductivité semble meilleure pour l'électrode plane que pour l'électrode 3D.



**Figure 4-26 : 3<sup>e</sup> cycle de CV (50mV/s) dans du PBS pour une électrode du mélange utilisé dans le Chapitre 3, PG3 plan et PG3 3D.**

Cela n'est pas surprenant en raison de la structure du PEDOT:PSS. En effet, le matériau est composé de longues chaînes de PSS, sur lesquelles se placent de courtes chaînes de PEDOT [158] (Figure 4-27). La connexion entre les chaînes de PEDOT n'est pas directe et les trous doivent passer de chaînes en chaînes. Ce phénomène est plus facile lorsque toutes les chaînes présentes sont confinées dans un petit volume (le matériau plan), que lorsqu'elles sont dispersées dans une structure 3D, séparées par des pores.



**Figure 4-27 : Organisation des chaînes de PEDOT et de PSS après recuit.**

La formulation PG3 n'est pas assez conductrice pour effectuer des mesures électrochimiques intéressantes. Pour trouver une solution à ce problème, nous avons exploré 2 stratégies souvent utilisées dans la littérature pour augmenter la conductivité des films de PEDOT:PSS : les post-traitements (immersion et exposition à la vapeur de solvants) et l'ajout d'autres additifs que l'EG.

#### 4.5.3.3.2. Post-traitements

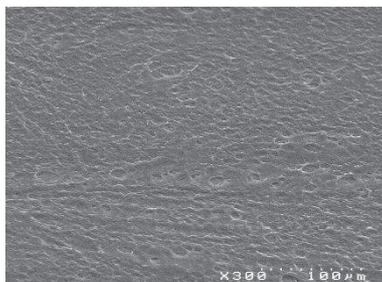
Ces voies ajoutent une étape d'immersion ou d'exposition à la vapeur de solvants du matériau après la lyophilisation. Nous avons testé plusieurs immersions et expositions à la vapeur de solvants, rapportés pour améliorer significativement la conductivité du matériau.

- Immersions :
  - EG [160] ou méthanol [161] ou éthanol [161] : recuit 20 min à 120°C, immersion 30 min, recuit 20 min à 120°C,

- HCl 10% : immersion 15 min, 5 rinçages dans l'eau DI pendant 1h, séchage à l'air libre, recuit 120°C 1h [162].
- Expositions à la vapeur :
  - EG ou Diméthylsulfoxyde (DMSO) : exposition à la vapeur pendant 3 jours dans un récipient fermé [163].

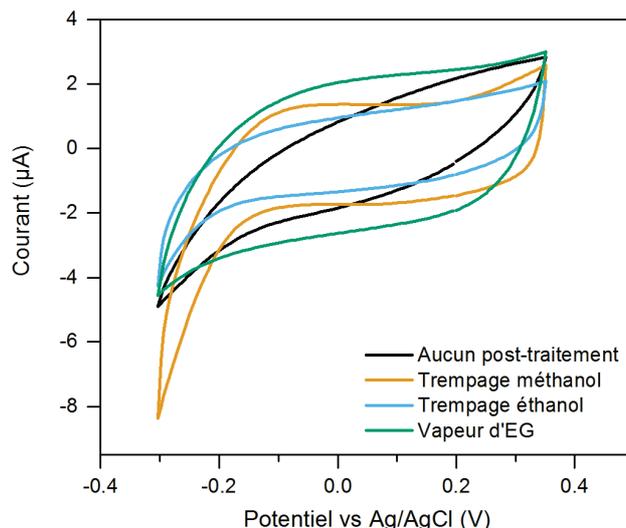
Deux explications différentes sont données concernant les mécanismes d'augmentation de la conductivité. Pour les immersions, une partie des chaînes de PSS en excès dans la structure est dissoute dans le solvant utilisé ce qui permet de concentrer les chaînes de PEDOT et donc d'augmenter la conductivité [160], [161], [162]. Pour l'exposition à la vapeur de solvants, les vapeurs se recondensent dans le matériau et le font gonfler. Les chaînes se réorganisent alors dans une conformation plus conductrice [163].

En réalisant ces différents post-traitements sur notre matériau PG2, nous avons remarqués que plusieurs d'entre eux dégradent l'électrode et la rendent inutilisable. Après recuit ou séchage, les matériaux sont complètement affaissés (Figure 4-28). C'est le cas des bains d'HCl et d'EG, ainsi que l'exposition à la vapeur de DMSO. Les bains d'éthanol ou de méthanol ainsi que l'exposition à la vapeur d'EG ne dégradent pas les électrodes.



**Figure 4-28 : Image MEB du matériau obtenu après immersion dans l'EG.**

Pour ces derniers post-traitements, des CV ont été réalisées pour évaluer leur impact sur la conductivité du matériau. Malheureusement, aucun de ces 3 post-traitements ne permet d'obtenir la CV très capacitive que l'on recherche (Figure 4-29). Toutes les CV obtenues ressemblent à celle de l'électrode sans post-traitement : peu capacitive et légèrement résistive.

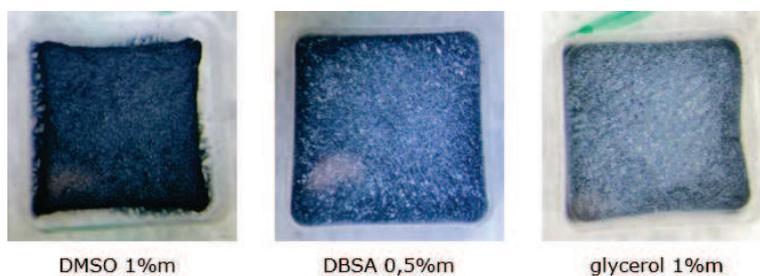


**Figure 4-29 : 3<sup>e</sup> cycle de CV (50mV/s) dans du PBS pour l'électrode de base et 3 post-traitements.**

#### 4.5.3.3.3. Ajouts d'additifs

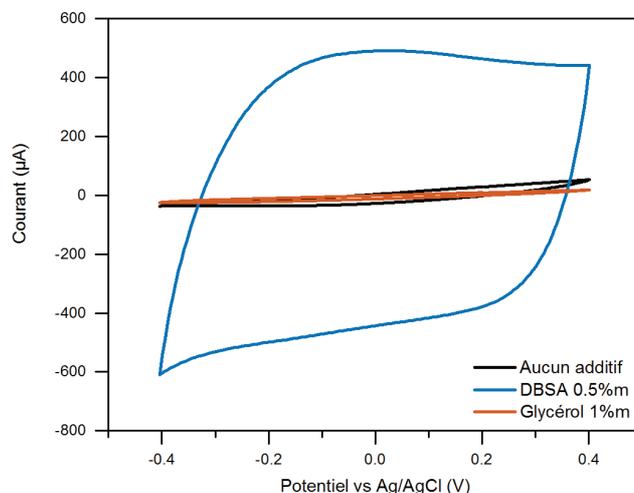
Face à l'échec de la 1<sup>ère</sup> voie, une seconde voie a été explorée : celle de l'ajout d'additifs dans la dispersion avant la lyophilisation. Trois additifs extraits de la littérature des films minces ont été testés : le DMSO 1%*m* [163], la DBSA 0,5%*m* [130] et le glycérol 1%*m* [130]. La DBSA intervenait déjà dans la composition utilisée dans le Chapitre 3 pour son rôle de surfactant permettant d'obtenir des films réguliers. La recherche d'informations sur les additifs permettant d'augmenter la conductivité a permis de trouver une publication qui montre qu'elle a aussi des effets sur la conductivité [130].

L'ajout de DMSO (comme celui d'EG de la partie 4.5.1.1) ne permet pas d'obtenir à l'issu de la lyophilisation une structure poreuse massive (Figure 4-30). Néanmoins, pour les 2 autres additifs, la structure 3D est conservée. Le DMSO est donc éliminé de la liste des additifs potentiels. La conservation de la structure poreuse avec ajout de glycérol est surprenante car le glycérol est comme l'EG utilisé en tant qu'antigel.



**Figure 4-30 : Photographies à la binoculaire de matériaux obtenus après lyophilisation de PEDOT:PSS en présence de DMSO 1%*m*, de DBSA 0,5%*m* et de glycérol 1%*m*.**

Des CV ont été réalisées pour les formulations avec DBSA et glycérol. Cette fois-ci, l'une des CV est très capacitive : celle obtenue en présence de DBSA (Figure 4-31). Le glycérol lui ne semble pas avoir d'influence.



**Figure 4-31 : 3<sup>e</sup> cycle de CV (50mV/s) dans du PBS pour l'électrode obtenue sans additif, et deux électrodes obtenues avec de la DBSA 0,5% m et du glycérol 1% m.**

Nous avons donc trouvé un additif permettant, à priori, d'augmenter la conductivité de l'électrode tout en préservant la structuration 3D. Le mode d'action conduisant à l'augmentation de la conductivité du PEDOT par l'ajout de DBSA n'a pas été précisément rapporté dans la littérature. Néanmoins, deux hypothèses peuvent être formulées d'après sa chimie. Tout d'abord la DBSA possède une fonction acide sulfonique  $\text{SO}_2\text{OH}$  ( $\text{pK}_a < 1$ ) présent sous forme dissociée d'ion sulfonate dans la dispersion de PEDOT:PSS PH 1000 ( $1 < \text{pH} < 2$ ). Ce groupement est identique au groupement négatif du PSS qui sert de dopant. La DBSA peut donc facilement se substituer au PSS pour doper le PEDOT. De plus, la DBSA est un surfactant et pour cette raison agit sur la répartition des molécules de PEDOT dans la structure. Un meilleur alignement ou regroupement des molécules de PEDOT est peut-être obtenu. Des expériences ont été réalisées pour essayer de mieux comprendre le mode d'action de la DBSA, elles seront présentées dans la partie 4.5.5.

#### 4.5.4. Etude approfondie de l'influence de la DBSA

Les paragraphes précédents ont permis de mettre en évidence la nécessité d'introduire dans la dispersion de PEDOT:PSS deux additifs : le GOPS comme réticulant et la DBSA comme agent « dopant ». Cette partie présente la recherche de la formulation idéale avec ces 2 additifs.

##### 4.5.4.1. Influence sur le séchage après immersion

Pour vérifier que l'ajout de DBSA ne change pas les conclusions de l'expérience sur la résistance mécanique des mousses après immersion puis séchage du paragraphe 4.5.3.1, un cycle immersion/séchage a été effectué pour différentes concentrations massiques de GOPS et de DBSA. Le Tableau 4-1 regroupe les résultats obtenus. L'absence de contraction est obtenue à partir de 3% m de GOPS comme en absence de DBSA. La concentration massique en DBSA semble peu influencer le résultat. Pour la suite des expériences, nous avons choisi de garder 3 ou 3,5% m de GOPS.

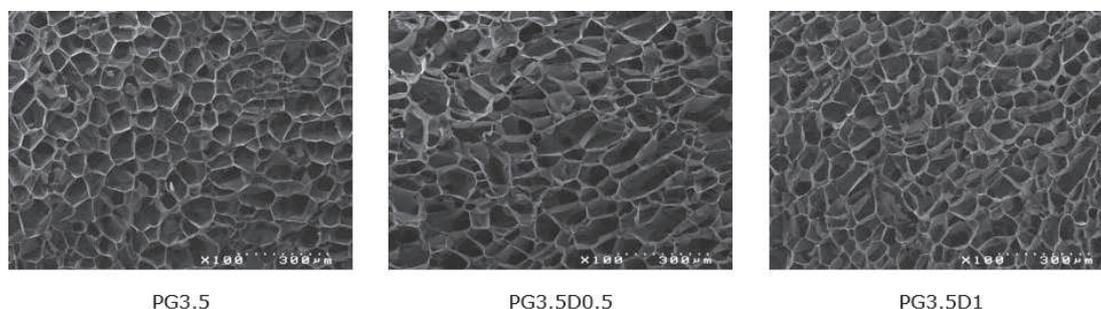
**Tableau 4-1 : Contractions après séchage pour un cycle immersion/séchage et différentes concentrations massiques de GOPS et de DBSA.**

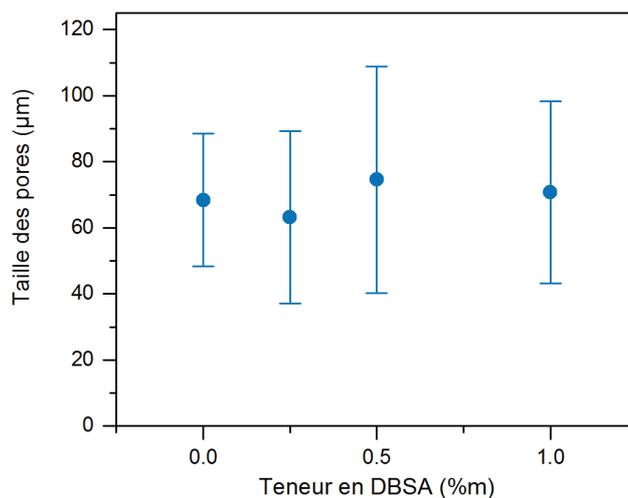
| Contraction après séchage ? |      | GOPS (%m) |     |     |     |     |         |         |     |     |
|-----------------------------|------|-----------|-----|-----|-----|-----|---------|---------|-----|-----|
|                             |      | 0         | 0.5 | 1   | 1.5 | 2   | 2.5     | 3       | 3.5 | 4   |
| DBSA (%m)                   | 0.1  | Oui       | Oui | Oui | Oui | Oui | Oui/Non | Oui/Non | Non | Non |
|                             | 0.25 | Oui       | Oui | Oui | Oui | Oui | Oui/Non | Non     | Non | Non |
|                             | 0.5  | Oui       | Oui | Oui | Oui | Oui | Oui/Non | Non     | Non | Non |

#### 4.5.4.2. Influence sur la morphologie

L'influence de l'ajout de DBSA sur la morphologie des pores pour une concentration massique de GOPS de 3,5% a été étudiée. A partir de 1,5% de DBSA, l'aspect macroscopique des électrodes est différent : elles sont creusées en surface et non homogènes. Cette non-homogénéité créée par un ajout trop important de DBSA a été rapportée dans la publication qui étudiait son effet sur la conductivité [130] : sa teneur pour un film mince est choisie à 0,5% pour éviter ces effets. Elle est due à une séparation de phase entre la DBSA et la dispersion de PEDOT:PSS. Les mélanges impliquant de la DBSA ne sont donc pas thermodynamiquement stables ce qui explique la non homogénéité des structures obtenues après lyophilisation lorsqu'il y a trop de DBSA. Toutefois la valeur limite de notre processus de lyophilisation (1,5%), est plus élevée que celle donnée par Zhang et al. [130] concernant leur processus de dépôt à la tournette.

Pour les concentrations massiques en dessous de 1,5%, aucune influence franche de la teneur en DBSA sur la morphologie n'a été mise en évidence à la fois par les observations réalisées à la binoculaire et celles au MEB (Figure 4-32). La taille des pores et leur dispersion est similaire quelle que soit la composition (Figure 4-33).

**Figure 4-32 : Image MEB d'électrodes de différentes teneurs en DBSA.**

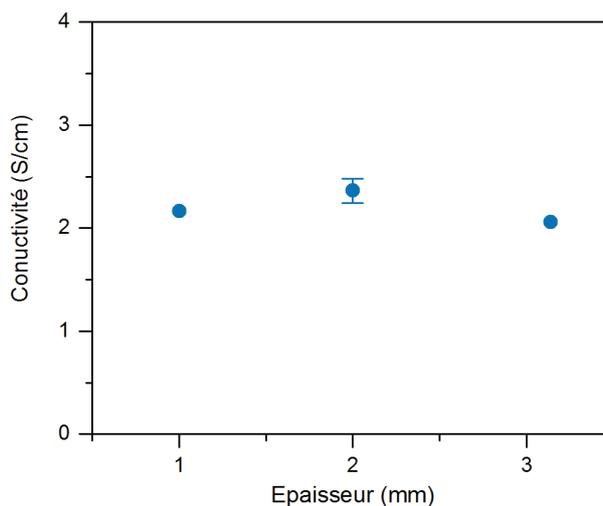


**Figure 4-33 : Taille apparente des pores en fonction de la teneur en DBSA de la dispersion de départ.**

#### 4.5.4.3. Influence sur la conductivité

##### 4.5.4.3.1. Epaisseur de la structure 3D

Pour commencer, nous avons étudié l'applicabilité de la méthode TLM présentée dans le paragraphe 4.4.3.2 aux électrodes 3D. Pour cela, les puces avec 5 pistes d'or présentées dans le paragraphe 4.5.2 ont été fabriquées avec 3 épaisseurs différentes de puits : 1, 2 et 3,14mm. La conductivité a été mesurée après recuit sur la formulation PG3.5D1. Les valeurs mesurées de conductivité semblent constantes en fonction de l'épaisseur (Figure 4-34). Il n'y a pas de biais visible lié à l'épaisseur, nous avons donc considéré que la méthode permet de donner une indication fiable de la conductivité.



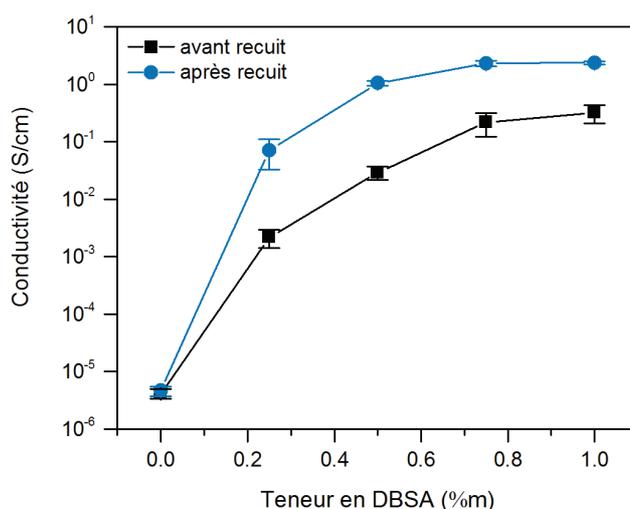
**Figure 4-34 : Conductivité en fonction de l'épaisseur de l'électrode pour la formulation PG3.5D1 après recuit.**

#### 4.5.4.3.2. Conductivité avant et après recuit en fonction de la teneur en DBSA

L'étude a été poursuivie par des mesures en triplicata de la conductivité en fonction de la teneur en DBSA, avant et après recuit. Pour chacune des 3 électrodes d'une même formulation, une nouvelle solution a été préparée pour inclure l'erreur liée à la fabrication des solutions (qui doivent être renouvelées à chaque lyophilisation). Avant recuit, la conductivité augmente fortement dès que la DBSA est introduite dans la formulation (Figure 4-35). Elle continue d'augmenter pour chaque augmentation de la concentration massique testée. La valeur maximale de conductivité est de 0,32S/cm pour 1%<sub>m</sub> de DBSA.

Après recuit, la conductivité ne change pas pour la formulation PG3. Par contre, elle s'améliore d'un peu plus d'un ordre de grandeur lorsqu'il y a de la DBSA. Ce phénomène a déjà été observé pour la polyaniline (PANI) [164]. La conductivité de la PANI augmentait de deux ordres de grandeurs après recuit à 150°C lorsque de la DBSA avait été introduit dans la suspension de PANI. Aucune augmentation n'avait été observée quand de l'acide sulfurique avait été introduit à la place de la DBSA. Les auteurs expliquent ce résultat à la fois par une augmentation de la pénétration de la DBSA au sein de la PANI sous l'effet de l'agitation thermique et à la fois par une réorganisation des chaînes de DBSA et de PANI qui passent d'un état compacté désorganisé à une organisation plus linéaire. Des phénomènes similaires interviennent probablement dans notre cas.

La conductivité obtenue après recuit atteint un plateau à 2,36S/cm à partir de 0,75%<sub>m</sub> de DBSA. Ce comportement est identique à celui rapporté dans la publication de Nevrela et al. [165] qui ont étudié la conductivité de film plan après ajout de 4 additifs (DMSO, sorbitol, EG et N,N-diméthylformamide). Sur la base de ces résultats, nous avons choisi de garder comme formulation optimisée la formulation PG3D0.75. Nous avons choisi 0,75%<sub>m</sub> de DBSA et non 1%<sub>m</sub>, car l'influence sur la conductivité après recuit est minime et que l'ajout de plus de 0,5%<sub>m</sub> de DBSA a été rapporté dans la littérature comme rendant la dispersion moins homogène [130].



**Figure 4-35 : Conductivité de l'électrode en fonction du pourcentage massique de DBSA.**

---

#### 4.5.4.3.3. Conductivité d'un film plan de même formulation

Nous avons ensuite mesuré la conductivité d'un film mince de formulation PG3D0.75. Ce film mince est obtenu en déposant à la tournette la dispersion sur un wafer puis en effectuant un recuit 1h à 120°C sous atmosphère ambiante. La conductivité obtenue est de 1,7S/cm. Cette conductivité est du même ordre de grandeur que celle obtenue pour le matériau 3D. Ce résultat est plutôt surprenant. En effet, le matériau 3D étant poreux, nous nous attendions à une conductivité 1 ou 2 ordres de grandeurs plus grande pour le film mince. Cela montre que l'organisation des chaînes (qui est primordiale pour la conductivité) est très différente lorsque le matériau est déposé à la tournette puis recuit ou lorsque le matériau est lyophilisé puis recuit. Cette 2<sup>e</sup> méthode est plus favorable pour la conductivité, sans qu'on sache l'expliquer.

---

#### 4.5.4.3.4. Conclusion sur la conductivité du matériau 3D

Le Tableau 4-2 regroupe les valeurs de conductivité des publications citées dans l'état de l'art du chapitre (partie 4.2.2). La dispersion utilisée pour réaliser les matériaux peut être commerciale ou réalisée par les équipes. Dans le premier cas, la meilleure valeur de conductivité rapportée est celle de l'équipe de Zhao et al. [157] :  $8,7 \cdot 10^{-2}$  S/cm pour un matériau lyophilisé en présence de polyéthylène glycol pour assurer une bonne tenue mécanique. Cette valeur étant faible, ils ajoutent des nanotubes de carbone. La conductivité obtenue est alors de 115 S/cm. Le matériau développé dans la thèse, avec une conductivité de 2,3 S/cm, est plus conducteur que leur matériau de base mais moins que celui avec les nanotubes de carbone. Toutefois, notre approche par ajout de DBSA présente l'avantage de ne pas utiliser de nanomatériau qui peut s'avérer toxique s'il est relargué.

L'utilisation de solutions commerciales présente des avantages pratiques, mais ne permet pas d'atteindre de grandes conductivités sans ajout. Cela est dû à l'importante quantité de PSS présente dans ces solutions, ajouté dans le but de solubiliser le PEDOT qui est une molécule hydrophobe. En effet, ces dispersions contiennent entre 2,5 et 3 unités de PSS pour 1 unité de PEDOT, alors qu'il y a besoin de seulement 1 unité de PSS pour 3 unités de PEDOT pour que le PEDOT soit dans son état conducteur. Pour contourner ce problème et avoir des matériaux plus conducteurs, des équipes réalisent leurs propres dispersions à base de PEDOT. La meilleure conductivité obtenue pour un matériau 3D à partir de ce type de dispersions est de 12,3 S/cm [153]. Pour cette formulation, le PSS n'est pas utilisé, la solubilisation du PEDOT est atteinte par greffage d'un surfactant sur une partie des molécules d'EDOT avant la polymérisation.

**Tableau 4-2 : Conductivités de PEDOT 3D rapportées dans la littérature.**

| Technique de mise en forme 3D | Composition   | Allure 3D                       | Conductivité (S/cm)   | Réf.        |
|-------------------------------|---|---------------------------------|-----------------------|-------------|
| Electro-filage                | PEDOT:PSS (dispersion commerciale) et Polyvinylpyrrolidone                      | Fibres de 153.5nm               | $2,34 \cdot 10^{-12}$ | [151]       |
| Séchage CO <sub>2</sub>       | Hydrogel de PEDOT:PSS (1:1)   | Pores de 15,3nm                 | $10^{-1}$             | [152]       |
| Séchage CO <sub>2</sub>       | PEDOT:PEDOT-Surfactant (3:1)  | Pores de 10nm                   | $1,23 \cdot 10^1$     | [153]       |
| Lyophilisation                | Hydrogel de PEDOT:PSS (1:2)   | Pores de                        | $10^{-1}$             | [154]       |
| Lyophilisation                | PEDOT:PSS (1:2)   | Feuillets                       | $10^{-3}$ à $10^{-6}$ | [154]       |
| Lyophilisation                | PEDOT:PSS (dispersion commerciale) et polyéthylène glycol                       | Pores de 2 à 10 $\mu$ m         | $8,7 \cdot 10^{-2}$   | [157]       |
| Lyophilisation                | PEDOT:PSS (dispersion commerciale), polyéthylène glycol et nanotubes de carbone | Pores fibreux de 5 à 10 $\mu$ m | $1,15 \cdot 10^2$     | [157]       |
| Lyophilisation                | PEDOT:PSS (dispersion commerciale), GOPS et DBSA                                | Pores de 40 $\mu$ m             | $2,3 \cdot 10^0$      | Cette thèse |

Notre matériau 3D présente une conductivité parmi les meilleures pour les matériaux à base de PEDOT:PSS de la littérature.

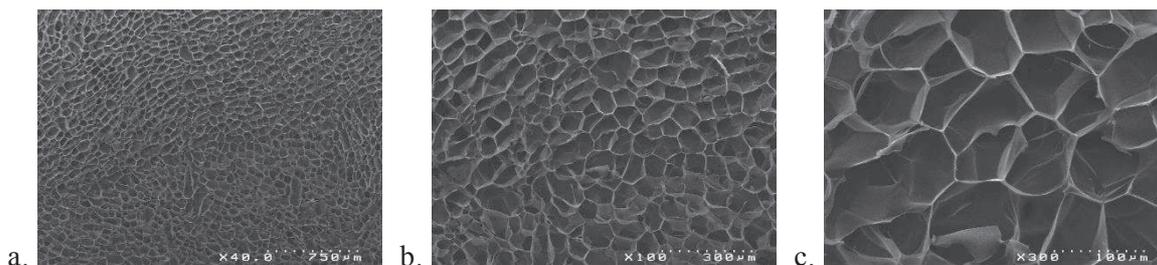
#### 4.5.5. Caractérisations complètes de la formulation PG3D0.75

La formulation optimisée PG3D0.75 a ensuite été caractérisée plus en détails (morphologie, mécanique, conductivité, spectroscopie, électrochimie) avec de nombreuses techniques.

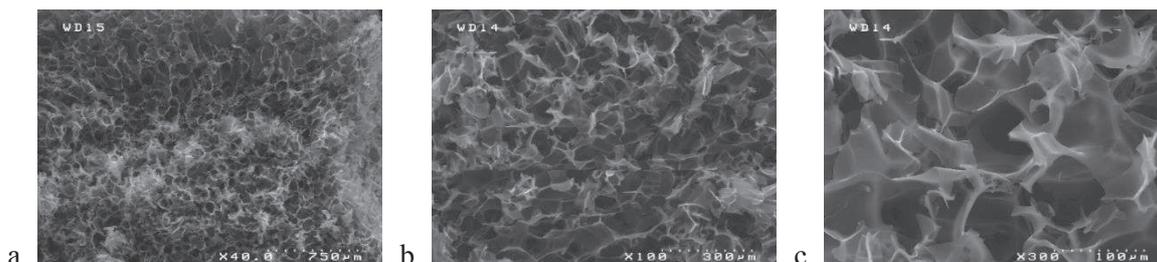
##### 4.5.5.1. Caractérisations morphologiques

###### 4.5.5.1.1. Imagerie

La morphologie du dépôt a été étudiée de manière détaillée. Les images MEB obtenues en surface (Figure 4-36) et à l'intérieur (Figure 4-37) du matériau sont similaires à celles déjà présentées dans les paragraphes précédents. En surface, les pores sont ouverts vers l'extérieur, et bien alignés. Ils sont aussi longs que larges et homogènes en taille. En profondeur, les pores ont des caractéristiques similaires à ceux de la surface : taille plutôt homogène et forme plutôt sphérique.

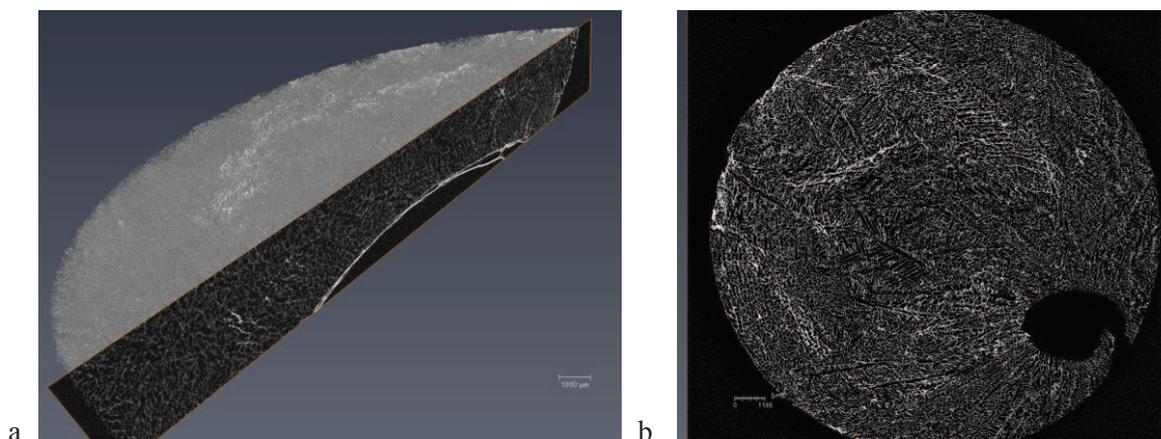


**Figure 4-36 : Image MEB de la surface d'une électrode PG3D0.75.**



**Figure 4-37 : Image MEB de l'intérieur d'une électrode PG3D0.75.**

Des images réalisées en tomographie aux rayons X confirment l'aspect tridimensionnel de la porosité (Figure 4-38a). Une coupe en surface (Figure 4-38b) montre que l'alignement des pores suit parfois des lignes de cristallisation.



**Figure 4-38 : Reconstruction par tomographie aux rayons X de la morphologie d'une électrode PG3.5D0.5.**

#### 4.5.5.1.2. Porosimétrie au mercure

Des mesures de porosité au mercure ont été effectuées pour mieux caractériser le matériau. Brièvement, le matériau est placé dans une enceinte étanche et une étape de dégazage sous température est effectuée pour obtenir le vide dans l'enceinte. Le mercure est ensuite injecté dans l'enceinte avec différentes pressions. Après stabilisation, le volume de mercure injecté est mesuré. Il est relié à la taille et la géométrie des pores, qui peuvent alors être calculés.

Tout d'abord, des paramètres macroscopiques ont été calculés (Tableau 4-3). La porosité obtenue est très grande, conformément à nos observations MEB.

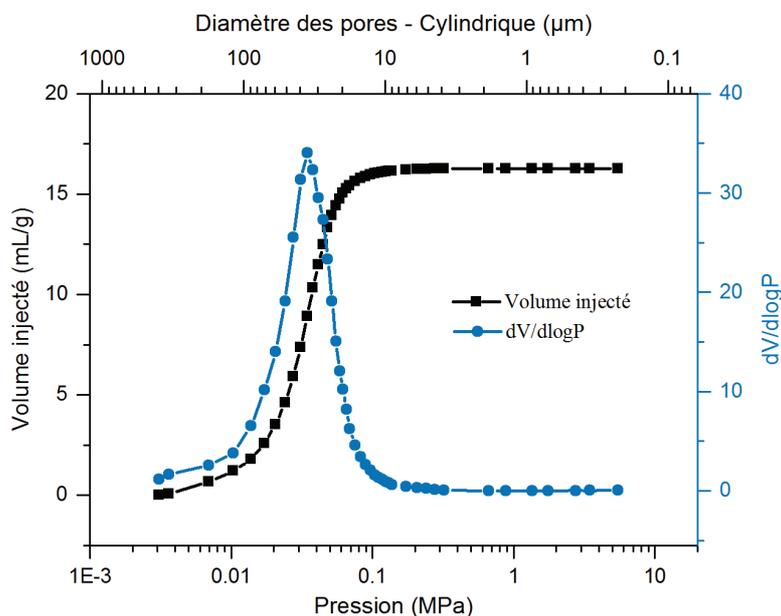
**Tableau 4-3 : Données macroscopiques d'une électrode PG3.5D0.5 calculées grâce à la porosimétrie au mercure.**

|  |       |
|--|-------|
| Volume total de mercure injecté = volume des pores, par g de matériau (mL/g) | 16,25 |
| Densité apparente (g/cm <sup>3</sup> )                                       | 0,06  |
| Densité du squelette (g/cm <sup>3</sup> )                                    | 2,67  |
| Porosité (%)   | 97,8  |

Des paramètres microscopiques ont aussi été étudiés. Une seule population de pores semble présente dans le matériau (Figure 4-39). Cette famille de pores est remplie par le mercure pour une pression médiane d'environ 3,3kPa. Les analyses de porosité au mercure fournissent une correspondance pression/diamètre de pores pour des pores cylindriques. Ici, ce calcul donne une taille de pores médiane de 38,2 $\mu$ m. Cette taille est proche de la taille trouvée par Wan et al. [16] par la même méthode et pour une formulation PG3 (39,1 $\mu$ m).

La dispersion de la taille des pores de notre matériau a été évaluée grâce à une fonction Gaussienne. L'écart type est estimé à 12 $\mu$ m. Cette valeur est cohérente avec l'écart-type obtenu lors des mesures de taille de pores sur des images MEB. Cette valeur peut sembler grande à première vue, mais elle est en réalité plutôt petite pour un matériau obtenu sans support physique.

Avec le modèle cylindrique, la surface totale des pores obtenue a été calculée. Elle est de 1,7m<sup>2</sup>/g, valeur proche de la valeur trouvée par Wan et al. [156] de 2,2m<sup>2</sup>/g. Toutefois, le modèle de pore cylindrique est éloigné de la géométrie réelle de nos pores bien qu'il soit couramment utilisé pour tous types de porosité dans la littérature. Il permet, en l'absence de meilleurs modèles, d'accéder à des ordres de grandeurs.

**Figure 4-39 : Diamètre des pores en fonction de l'intrusion différentielle du mercure.**

#### 4.5.5.1.3. Pesage

Une dernière expérience a été réalisée pour évaluer le volume de liquide que le matériau peut retenir. Pour cela, 5 structures poreuses ont été pesées avant et après 24h d'immersion dans du PBS. Les calculs de masse volumique ont été réalisés en utilisant pour le volume du matériau, le volume de dispersion initialement lyophilisé, le matériau 3D obtenu étant de volume peu différent.

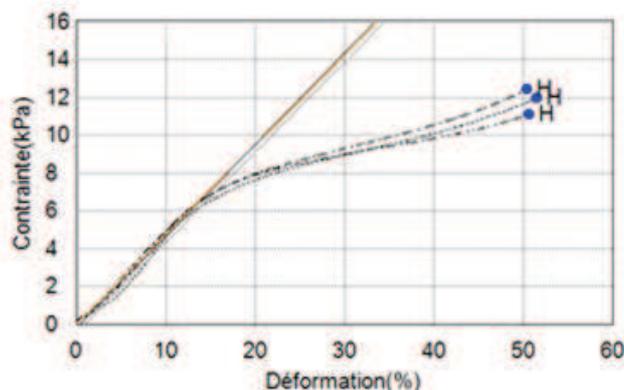
En pesant les structures avant immersion, la masse volumique à sec est obtenue. Elle est de  $45,7 \pm 1,0 \text{ mg/mL}$  de solution initiale. Bien que l'ordre de grandeur soit conservé, cette masse volumique est légèrement plus petite que celle de  $0,06 \text{ g/cm}^3$  (soit  $60 \text{ mg/mL}$ ) trouvée par porosimétrie au mercure. Toutefois, il s'agit ici d'une valeur calculée par rapport à un volume de dispersion et non par rapport à un volume par mouillage de gaz. Le volume du matériau est donc probablement surestimé par notre méthode, ce qui est cohérent avec une masse volumique légèrement plus faible.

Après 24h d'immersion, la masse volumique des structures est de  $1079 \pm 27 \text{ mg/mL}$  de solution initiale. Le matériau peut donc retenir plus de 22 fois son poids en PBS, sans changement de volume visible à l'œil nu.

#### 4.5.5.2. Caractérisations mécaniques

Des tests mécaniques de compression uni-axiale ont permis d'obtenir le comportement mécanique du matériau hydraté à température ambiante. La courbe contrainte-déformation obtenue (Figure 4-40) est similaire pour les 3 électrodes testées. Pour les déformations en dessous de 15%, les électrodes ont un comportement élastique linéaire. A partir de 15%, les déformations deviennent plastiques. Aucune rupture du matériau n'est observée pour la gamme de déformations testées.

Le module d'élasticité trouvé est de  $47,8 \pm 0,6 \text{ kPa}$ . Son ordre de grandeur correspond à ceux classiquement atteint par des polymères (de la dizaine au millier de kPa). Celui obtenu par Wan et al. [156] pour la composition PG3 est 10 fois inférieur. Toutefois, les auteurs ont montré que le module est très dépendant de la composition, il va de  $0,2 \text{ kPa}$  pour une formulation sans GOPS à  $4,5 \text{ kPa}$  pour la formulation PG3. Notre module, un ordre de grandeur plus grand, peut tout à fait être la conséquence de l'ajout de DBSA, mais aussi des conditions de lyophilisation différentes. En effet, nous avons montré précédemment que l'ajout de DBSA a une grande influence sur la conductivité, très probablement en réorganisant les chaînes de polymères. Une autre conséquence de cette réorganisation pourrait être mécanique. De plus notre congélation s'effectue à petite vitesse ( $-0,3^\circ\text{C/min}$ ) comparée à leur congélation ( $-0,9^\circ\text{C/min}$ ), ce qui laisse plus de temps aux chaînes pour se réorganiser avant d'être figés. Elles sont ainsi mieux réorganisées et donc plus « solides ».



**Figure 4-40 : Courbe contrainte-déformation pour 3 électrodes de PG3D0.75.**

#### 4.5.5.3. Caractérisations électriques

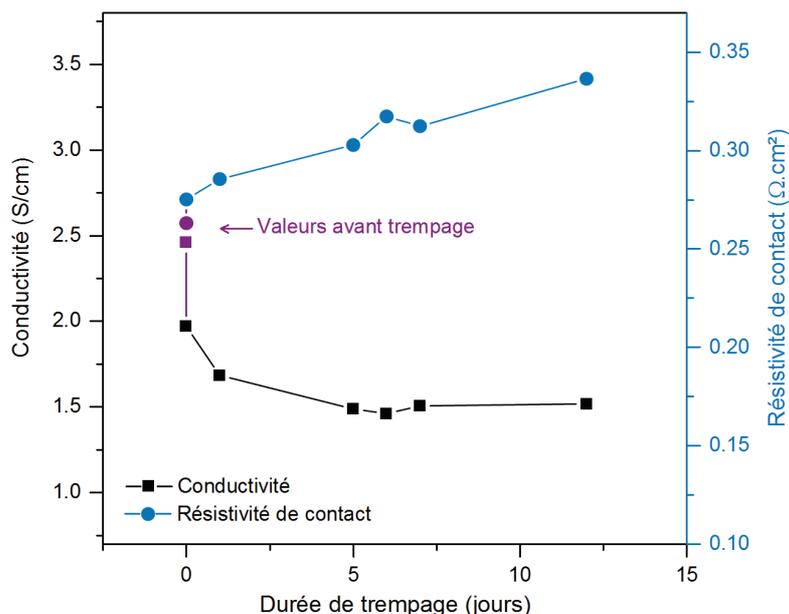
##### 4.5.5.3.1. En statique

La conductivité mesurée dans le paragraphe 4.5.4.3 pour la formulation PG3.5D0.75 après recuit est de  $2,31 \pm 0,25$  S/cm. La résistivité de contact or/matériau a été évaluée dans la même expérience à  $0,35 \pm 0,15$   $\Omega \cdot \text{cm}^2$ . Cette résistivité de contact est plus élevée que les résistivités typiquement mesurées par la méthode TLM pour des films minces qui sont de l'ordre de  $10^{-3}$  à  $10^{-6}$   $\Omega \cdot \text{cm}^2$  [159]. Toutefois, dans notre cas, le contact est réalisé par un matériau poreux. Cela signifie que la surface réelle de contact est bien plus petite que la surface considérée dans le calcul (celle des pistes en or). La valeur de résistivité ne peut donc pas être directement comparée à celle des films.

Les valeurs du paragraphe ci-dessus sont obtenues pour des matériaux secs. Or, pour nos expériences l'utilisation des électrodes se fera en milieu aqueux, il est donc nécessaire de mesurer la conductivité aussi dans ces conditions. Pour cela, des mesures ont été réalisées pendant 12 jours après remplissage des cuves des puces par du PBS. Cette durée est plus grande que la durée d'utilisation qui devrait être de seulement quelques heures. Toutefois, elle permet de caractériser le comportement du matériau sur le long terme. La conductivité du PBS est d'environ  $1,6 \cdot 10^{-2}$  S/cm, soit 2 ordres de grandeurs plus faibles que la conductivité de notre matériau à sec. La mesure de la conductivité de notre matériau est donc possible sans interférence du PBS.

La conductivité (Figure 4-41) passe de 2,46 à 1,97S/cm immédiatement après l'immersion. Puis, elle continue de diminuer pendant les premiers jours avant de se stabiliser vers 1,5S/cm. Cette baisse de conductivité est probablement due à la fois à la pénétration du PBS dans le PEDOT:PSS, qui doit faire gonfler légèrement le matériau et ainsi diminuer sa conductivité et au relargage partielle de la DBSA. En effet, en agitant le PBS après relargage, plus de bulles sont observées qu'avant relargage, ce qui est témoin d'ajout de surfactant dans le PBS.

La résistivité de contact augmente elle aussi légèrement au cours de l'immersion. Toutefois, cette baisse de conductivité et cette augmentation de résistance de contact sont faibles, et ne vont pas mettre en péril l'utilisation de l'électrode pendant la durée testée.



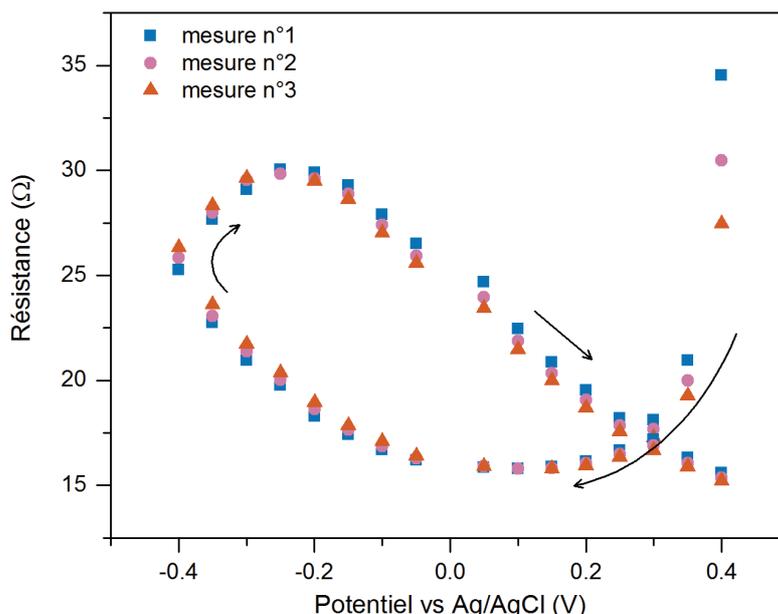
**Figure 4-41 : Evolution de la conductivité et de la résistivité de contact en fonction du temps d'immersion dans du PBS.**

#### 4.5.5.3.2. En dynamique

Le PEDOT est un matériau redox qui est conducteur seulement dans son état oxydé. Or, en l'utilisant en tant qu'électrode, différents potentiels électrochimiques lui sont imposés, ce qui influence son état d'oxydation. L'expérience suivante a pour but d'évaluer l'impact d'un cycle de potentiels allant de -0,4V à +0,4V (gamme de potentiel utilisé pour la détection de PYO et PQS) sur la conductivité du matériau.

L'électrode subit pour commencer 50 CV de stabilisation de -0,4 à +0,4V. Puis, l'électrode est placée à différents potentiels chimiques (de +0,4V à -0,4V par pas de 0,05V puis de -0,4V à +0,4V) et sa résistance est mesurée. A chaque potentiel électrochimique, la mesure de résistance est effectuée 3 fois de suite après une stabilisation de 30s au potentiel.

Globalement, la variation de la résistance du matériau en fonction de son potentiel redox suit la même allure que sur le matériau plan du le Chapitre 3 : la résistance baisse continument lorsque le potentiel appliqué au matériau augmente (Figure 4-42). Toutefois, les résistances obtenues en balayant les potentiels dans le sens positif à négatif (de +0,4V à -0,4V), ne sont pas les mêmes que celles obtenues en balayant les potentiels dans le sens négatif à positif (de -0,4V à +0,4V) (Figure 4-42). Un cycle d'hystérésis d'une largeur d'une dizaine d'Ohm est obtenu. La résistance du matériau (et donc son état d'oxydation) est ainsi très dépendante du passé du matériau. Bien que plusieurs minutes soit passées à chaque potentiel, son évolution est lente. La résistance du matériau doit donc peu changer lorsqu'une mesure est réalisée en CV, cette mesure étant beaucoup plus rapide que les mesures réalisées ici.



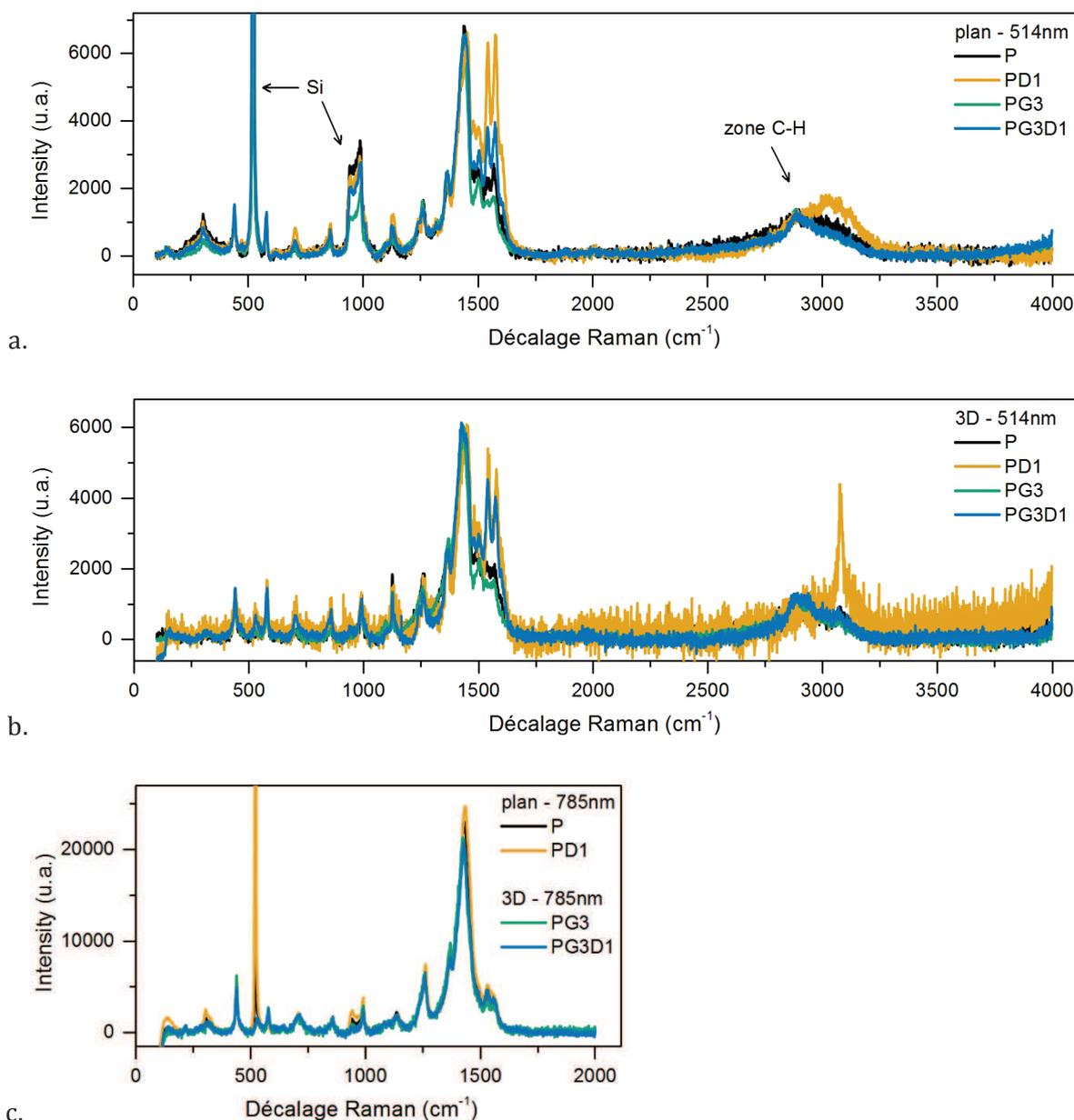
**Figure 4-42 : Résistance du PG3.5D0.75 entre les pistes 1 et 4 de la puce TLM en fonction du potentiel électrochimique imposé.**

#### 4.5.5.4. Caractérisation spectroscopique Raman

La conductivité de la structure 3D augmente de 6 ordres de grandeurs lors de l'ajout de DBSA. Pour essayer de mieux comprendre cet accroissement, nous avons réalisé quelques analyses préliminaires Raman. Cette méthode de caractérisation a été choisie car la littérature tend à montrer un lien entre l'allure des spectres Raman et la conductivité des matériaux.

Nous nous sommes intéressés aux compositions P, PD1, PG3 et PG3D1 mises en forme en 2D ou 3D et avec 2 longueurs d'ondes différentes d'excitation : 514 et 785nm. Ces 4 compositions ont été utilisées pour permettre de mieux séparer les effets des différents additifs sur l'allure des spectres Raman. L'analyse a été réalisée tout d'abord sur un matériau plan pour obtenir des spectres avec un bon niveau de signal. En effet, les échantillons 3D n'ayant pas une surface plane, ceux-ci dispersent la lumière de manière plus importante dans les différentes directions de l'espace, ce qui conduit à un signal plus faible. Pour finir, 2 longueurs d'ondes ont été utilisées car la littérature rapporte que l'allure des spectres Raman dépend beaucoup de la longueur d'onde, les faibles longueurs étant en résonance avec la forme neutre du PEDOT, et les fortes avec la forme oxydée [166].

La Figure 4-43 regroupe les spectres Raman obtenus. Pour les échantillons 2D, 2 pics correspondant au substrat (spectres du 1<sup>er</sup> et 2<sup>e</sup> ordre du silicium) sont observés en plus des pics correspondant au matériau à base de PEDOT. A part ces 2 pics, tous les spectres Raman ont la même allure globale. Toutefois, ils diffèrent sur la zone des C-H ( $2750-3250\text{ cm}^{-1}$ ) et sur celle, mieux résolue, entre  $1450$  et  $1650\text{ cm}^{-1}$ . Pour une même composition (échantillon plan et 3D), les spectres ne dépendent que très peu de la mise en forme des matériaux. De plus, les spectres obtenus à 785nm diffèrent peu en fonction de la composition dans la zone  $1520-1600\text{ cm}^{-1}$  contrairement à ceux obtenus à 514nm.



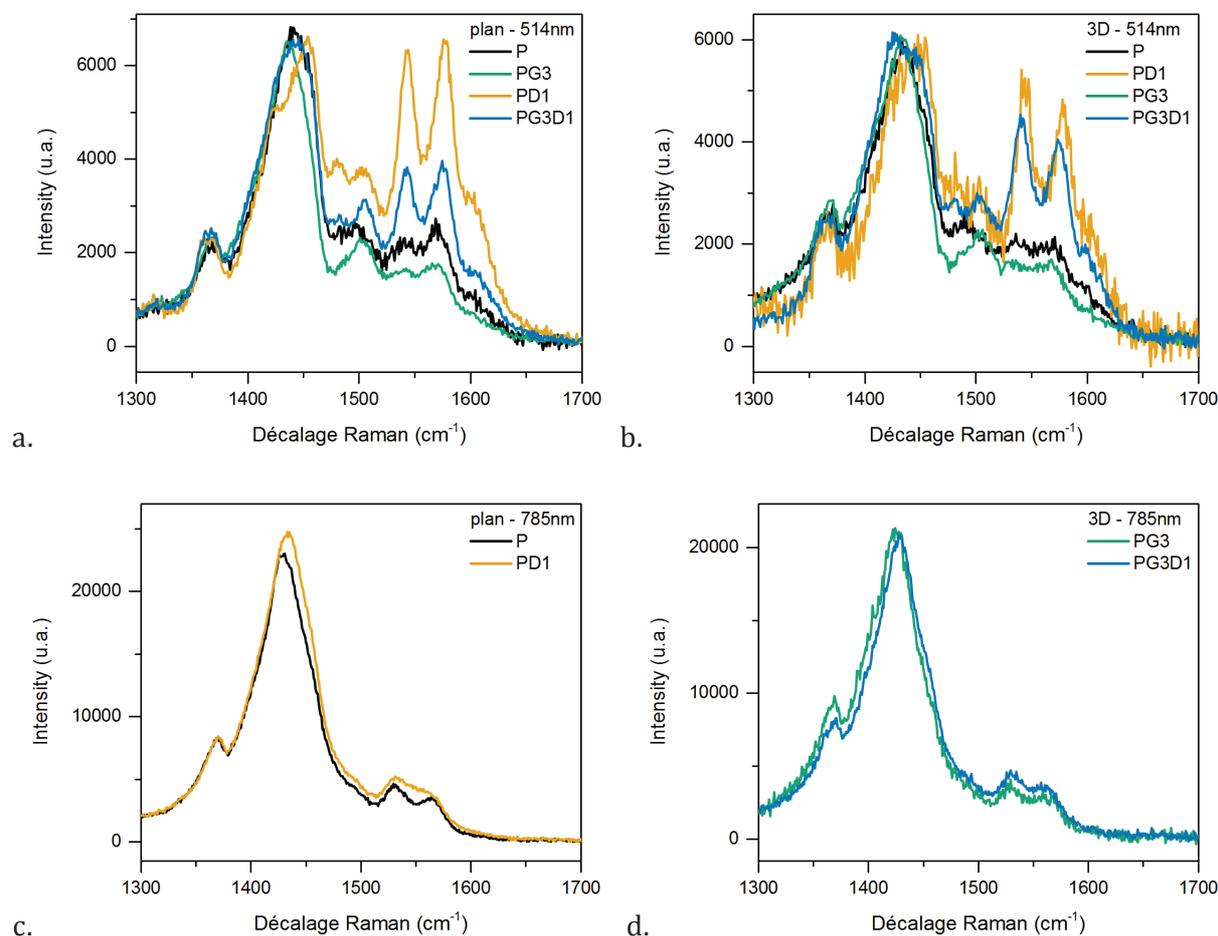
**Figure 4-43 : Spectres Raman pour des structures de formulation : a. P, PD1, PG3 et PG3D1 2D à 514nm ; b. P, PD1, PG3 et PG3D1 3D à 514nm ; c. P et PD1 2D et PG3 et PG3D1 3D à 785nm.**

L'amas de pics entre 1450 et 1650  $\text{cm}^{-1}$  diffère sur plusieurs points en fonction de la composition analysée (Figure 4-44). La différence la plus importante est la présence de pics intenses vers 1542 et 1575  $\text{cm}^{-1}$  pour les analyses à 514 nm lorsque la formulation contient de la DBSA (Figure 4-44a et b). Mais, la littérature ne semble pas confirmer que ces pics sont bien la signature de la DBSA. En effet, Xu et al. [167] rapportent la présence d'un pic intense vers 1596  $\text{cm}^{-1}$  attribué à l'élongation du cycle benzénique de la DBSA, (qui pourrait correspondre au 2<sup>nd</sup> pic observé dans nos échantillons). Aucune autre littérature ne rapporte de pic dans cette zone. Quelle que soit la formulation, les spectres Raman réalisés à 785nm présentent seulement des pics peu intenses dans cette zone.

Lorsque la formulation ne contient pas de DBSA, les 2 pics semblent aussi présents mais ils sont moins intenses. Ce dernier résultat est cohérent avec les spectres Raman de PEDOT :PSS

rapportés dans la littérature qui montrent la présence de 2 pics peu intenses aux mêmes fréquences [127], mais leur attribution n'a pas été donnée. Néanmoins, ces pics n'apparaissent pas dans les simulations effectuées pour calculer le spectre Raman théorique du PEDOT [166], ce qui suggère qu'ils sont reliés au PSS ou à un additif de la formulation commerciale.

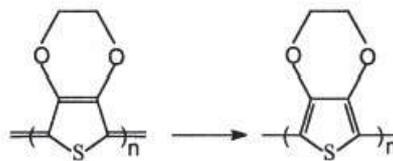
Les publications qui s'intéressent à l'évolution des pics Raman pour essayer de mieux comprendre la conductivité de matériaux à base de PEDOT se focalisent sur les pics de la zone 1400-1470  $\text{cm}^{-1}$ . Cette zone correspond à l'élongation symétrique des atomes de carbone du cycle du PEDOT [166]. Mais, cette zone correspond aussi à un pic intense de la DBSA vers 1433  $\text{cm}^{-1}$  [167], ce qui rend les choses plus difficiles à analyser dans notre cas. L'apparition d'un nouveau pic dans l'amas est clairement visible sur la Figure 4-44a et b : les matériaux contenant de la DBSA présentent soit un épaulement marqué (comme la formulation PD1 2D) ou bien une plus grande largeur du pic à son sommet (comme la formulation PG3D1 3D). Aucun élargissement clair n'est visible lorsque les analyses sont effectuées à 785nm. Comme si la présence de la DBSA (ou ses effets) passait inaperçue à cette longueur d'onde.



**Figure 4-44 : Spectres Raman pour 4 compositions de mélange à base de PEDOT (P, PD1, PG3, PG3D1), 2 mises en forme (plan et 3D) et 2 longueurs d'ondes (514 et 785nm) – Zoom sur la partie 1300-1700 $\text{cm}^{-1}$ .**

Les premières équipes qui se sont intéressées à cette zone du spectre Raman ont réalisé des expériences *in situ* au cours de l'oxydation électrochimique du PEDOT. Ils ont remarqué qu'une augmentation du potentiel du matériau (et donc de son degré d'oxydation) conduit à un

décalage des pics vers les hauts nombres d'onde [166], [132]. Ce décalage est interprété comme la conséquence de changements d'intensité de 3 pics [132] : l'un correspondant au PEDOT neutre vers  $1415\text{cm}^{-1}$ , le 2<sup>nd</sup> au PEDOT dopé vers  $1449\text{cm}^{-1}$ , et le dernier au PEDOT suroxydé vers  $1478\text{cm}^{-1}$ . De plus, les auteurs ont remarqués que le pic correspondant au PEDOT dopé se décale lui aussi vers les hauts nombres d'onde au cours de l'augmentation du potentiel [132]. Sur cette base, ces deux publications interprètent l'oxydation du PEDOT comme provoquant un changement de conformation des chaînes, passant d'une forme quinoïde à une forme aromatique (Figure 4-45). Par la suite, de nombreuses autres publications ont relié les décalages des pics Raman à la conductivité du matériau obtenu après ajout d'additif ou bien après différents post-traitements. La majeure partie de ces publications (voir par exemple [127], [168], [169]), trouvent que leur traitement entraîne l'effet inverse : l'amas de pic se décale vers les basses fréquences, ce qui signifie (en tenant le raisonnement inverse des premiers travaux) qu'une partie des chaînes passent de conformations aromatique à quinoïde. Ils attribuent à ce changement de conformation une plus grande conductivité du matériau : les chaînes en conformation quinoïde sont plus planes (cf. Chapitre 3 paragraphe 3.2.1.2.2.), ce qui faciliterait le passage des charges. Il est intéressant de noter que ces 2 résultats d'apparence contradictoire (augmentation de la conductivité avec décalage vers les hauts ou vers les bas nombres d'onde) sont la conséquence de 2 phénomènes différents. Dans le 1<sup>er</sup> cas, l'état d'oxydation du polymère est modifié : le nombre de porteurs de charge est augmenté (« dopage primaire »), alors que dans le 2<sup>nd</sup> cas le nombre de porteurs de charge reste constant et seule leur vitesse de déplacement est augmentée (« dopage secondaire »).



**Figure 4-45 : PEDOT en conformation quinoïde et aromatique, extrait de [132].**

A cause de la présence d'un grand nombre de pics dans l'amas (les 3 pics du PEDOT plus celui de la DBSA pour certains échantillons), nous n'avons pas déconvolué les spectres Raman, mais seulement étudié le maximum de l'amas. Lorsque l'on mesure le maxima de l'amas de pics pour chacun de nos spectres, nous trouvons, pour une même longueur d'onde et une même mise en forme, un maximum à plus hauts décalages Raman lorsqu'il y a de la DBSA dans la composition que sans (Tableau 4-4, par exemple  $1437\text{cm}^{-1}$  pour PG3 2D contre  $1445\text{cm}^{-1}$  pour PG3D1 2D à  $514\text{nm}$ ). La seule exception est pour le spectre de PG3D1 3D où le maximum est à  $1430\text{cm}^{-1}$ . Toutefois cette longueur d'onde correspond parfaitement à celle du pic de la DBSA et l'amas de pic est tout de même visuellement décalé vers les hauts nombres d'onde. En prenant le 2<sup>nd</sup> maximum, on trouve  $1446\text{cm}^{-1}$  ce qui est bien plus grand que  $1434\text{cm}^{-1}$  trouvé pour la formulation PG3. Nos expériences montrent donc que l'ajout de DBSA décale l'amas de pic vers les hauts décalages Raman, comme dans les travaux mesurant les spectres Raman du PEDOT à différent potentiel électrochimique [166], [132]. Le pic du PEDOT dopé vers  $1449\text{cm}^{-1}$  est donc plus prépondérant avec la DBSA que sans. On a donc un mode d'action type « dopage primaire » ce qui confirme notre hypothèse que la DBSA a un rôle similaire à celui du PSS.

**Tableau 4-4 : Maximum entre 1400-1470  $\text{cm}^{-1}$  pour toutes les conditions testées.**

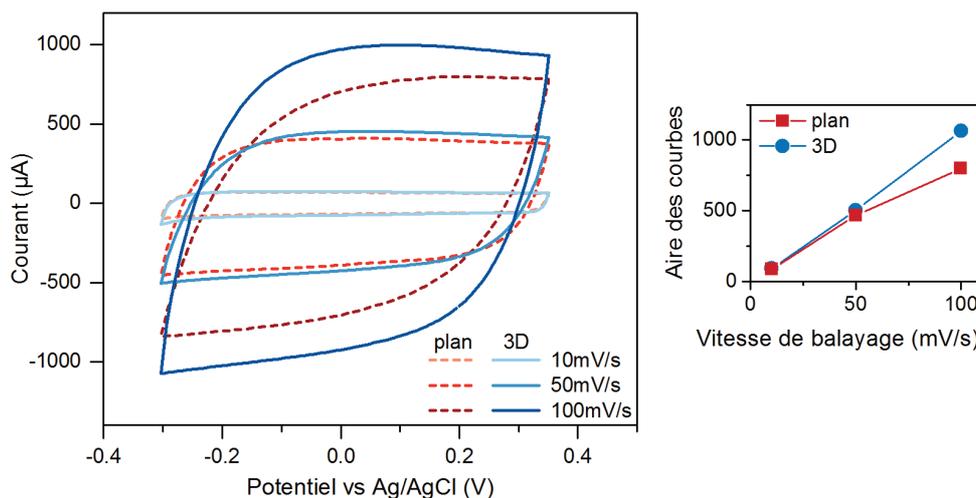
|       |      |       | Maxima 1400-1470 $\text{cm}^{-1}$ ( $\text{cm}^{-1}$ ) |
|-------|------|-------|--|
| 514nm | plan | P     | 1440   |
|       |      | PD1   | 1453   |
|       |      | PG3   | 1437   |
|       |      | PG3D1 | 1445   |
|       | 3D   | P     | 1435   |
|       |      | PD1   | 1451   |
|       |      | PG3   | 1434   |
|       |      | PG3D1 | 1430 (2 <sup>nd</sup> à 1446)                          |
| 785nm | plan | P     | 1428   |
|       |      | PD1   | 1433   |
|       | 3D   | PG3   | 1424   |
|       |      | PG3D1 | 1429   |

#### 4.5.5.5. Caractérisations électrochimiques

Les caractérisations électrochimiques ont été menées en 3 étapes : CV, impédancemétrie puis détection du ferricyanure et de PYO et PQS comme pour les électrodes du Chapitre 3.

##### 4.5.5.5.1. Comparaison 3D et plan

Pour commencer, des comparaisons en CV et impédancemétrie ont été réalisées pour des matériaux plans ou 3D de même formulation et de même volume. Les CV (Figure 4-46) obtenues pour les matériaux plan et 3D se ressemblent et ressemblent à celles du Chapitre 3 : elles sont très capacitives. Les voltampérogrammes obtenus sont plus capacitifs pour les électrodes 3D que pour les électrodes planes, à volume égal. Cette différence est amplifiée avec l'augmentation de la vitesse de balayage. La charge correspondante à ces voltampérogrammes évolue linéairement avec la vitesse de balayage pour le PEDOT 3D, mais ce n'est pas le cas pour l'électrode plane. En effet, pour le matériau plan, les fortes vitesses de balayage conduisent à une charge moins importante qu'attendue. Ce résultat suggère que pour le PEDOT sous forme plane, le volume entier ne participe pas à la capacitance à toutes les vitesses de balayage mais seulement une partie. Ce phénomène est probablement dû à la diffusion des ions dans le volume du matériau qui est lente et devient un facteur limitant pour la charge à vitesse de balayage élevée. Pour le PEDOT sous forme 3D, tout le volume est réellement accessible à l'électrolyte du fait de la porosité importante, la diffusion des ions dans le PEDOT s'effectue donc sur une longueur plus petite et la charge reste linéaire sur l'ensemble des vitesses de balayage testée.



**Figure 4-46 : 3<sup>e</sup> cycle de CV à différentes vitesses de balayage dans du PBS pour du PG3D1 plan et 3D, et aires correspondantes.**

Les courbes obtenues en impédance pour ces deux mêmes électrodes (Figure 4-47a) ont la même allure globale : résistivité à hautes fréquences et capacité à basses fréquences, comme pour les électrodes du Chapitre 3. Néanmoins, le matériau 3D présente un comportement différent du matériau plan entre  $10^{-1}$  et  $10^0$  Hz.

La théorie de l'impédance pour des électrodes 3D a été développée par de Levie [138]. Elle est basée sur 4 hypothèses fortes :

- Les pores sont cylindriques de rayon constant et de longueur infinie, non connectés entre eux,
- L'électrolyte est homogène, présent en grande quantité et remplit parfaitement les pores,
- Le matériau n'a pas de résistance, sa conductivité est infinie,
- Les courbes équipotentielles ne sont pas perturbées par les pores.

Ces hypothèses ne sont pas toutes réalistes (l'hypothèse de la conductivité infinie par exemple). De plus, l'hypothèse sur la géométrie des pores et leurs connexions n'est pas vérifiée pour notre matériau. Néanmoins, elles permettent de simplifier la mise en équation de système et conduisent à une modélisation simple qui est utile pour accéder à des valeurs approximatives.

Dans ses conditions, le circuit équivalent du matériau a la forme d'une ligne de transmission infinie (Figure 4-48a), composée de résistances élémentaires  $r$  représentant la résistance de l'électrolyte à l'intérieur d'un pore et de capacités élémentaires  $c$  représentant la capacité de double couche de l'interface d'un pore. Cette ligne de transmission est équivalente à l'élément mathématique tangente hyperbolique  $T$ , paramétré de la manière suivante :

$$T = \frac{R_p^{1/2}}{(j\omega C_p)^{1/2}} * \coth(j\omega R_p C_p)^{1/2}$$

avec  $R_p$  la résistance totale de l'électrolyte dans les pores,  $C_p$  la capacité totale des parois pores,  $j$  la racine de -1 et  $\omega$  la fréquence angulaire.

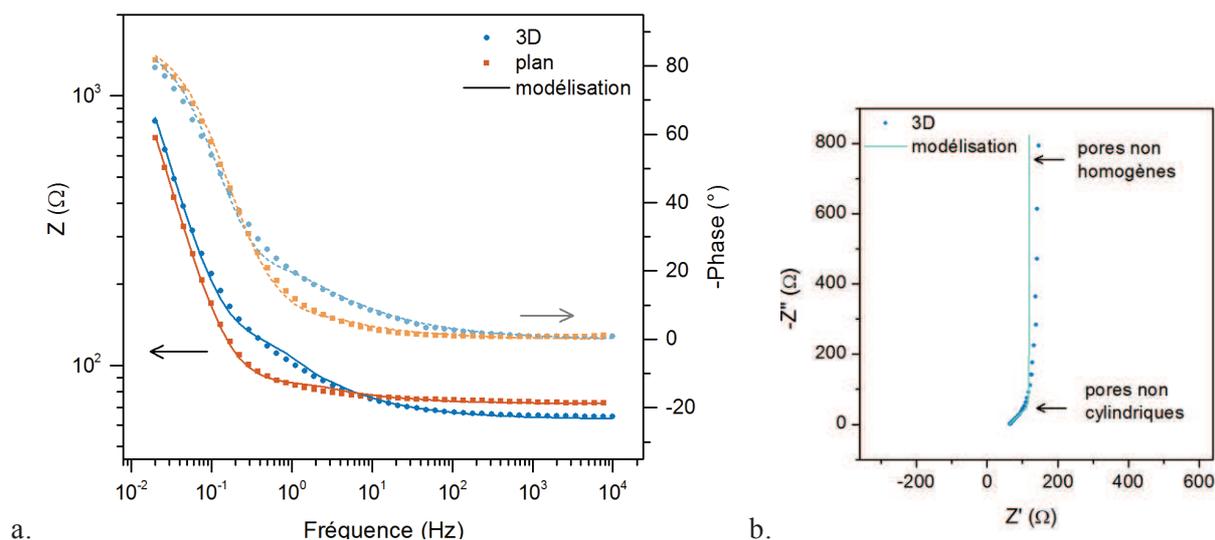
Le circuit électrique complet en impédance est le circuit  $RT$  (Figure 4-48b),  $R$  étant la résistance de l'électrolyte en dehors du matériau poreux. Ce circuit  $RT$  est mathématiquement identique à celui utilisé pour modéliser l'impédance des polymères conducteurs [170] dans le Chapitre 3, bien que leur physique soit différente. Les deux courbes de la Figure 4-47a ont donc

été modélisées avec ce même circuit électrique. Concernant la modélisation du spectre d'impédance du matériau 3D (Figure 4-46b), 2 zones ne sont pas parfaitement simulées.

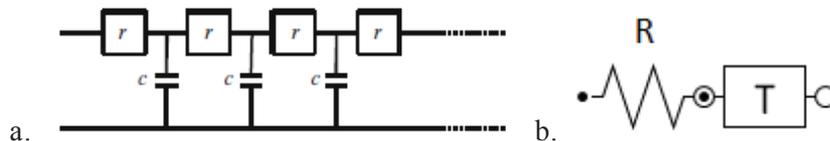
La première est la partie coudée en représentation Nyquist (Figure 4-47) : les données expérimentales sont au-dessus de la courbe de simulation. Cette zone du spectre d'impédance a été rapportée par Keiser et al. [171] comme très dépendante de la géométrie des pores (Figure 4-49a). Dans notre cas, le type de courbe obtenue se rapproche plus de celui obtenu pour des pores coniques Figure 4-49b.

Le deuxième défaut est visible sur la droite à basse fréquence qui est moins vertical dans notre cas que dans le modèle. Ce fait a été rapporté par Song et al. [172] qui interprète ce défaut comme inhérent à l'hypothèse de pores homogènes, qui n'est jamais complètement vérifiée en pratique. Ce type de résultat (courbe à basse fréquence inclinée) est aussi très souvent rapporté pour les spectres d'impédance d'électrodes planes. Dans ce cas, l'interprétation donnée est que la capacitance de l'électrode n'est pas parfaite et que des défauts donnent lieu à une fuite de courant.

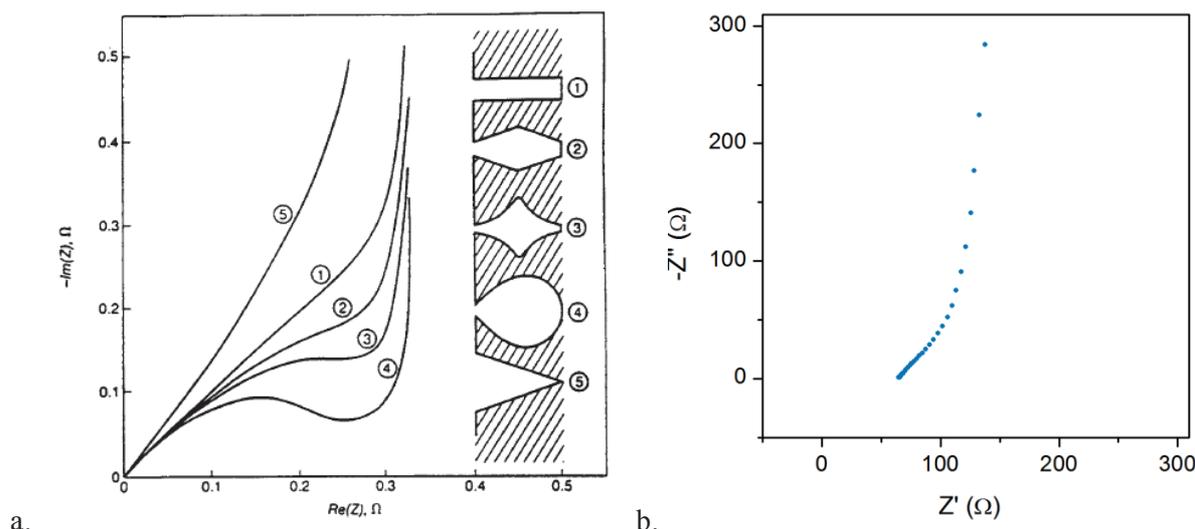
Malgré ces défauts, la modélisation est correcte et nous avons décidé de ne pas utiliser de modèles plus complexes. Il existe beaucoup de modèles dont les hypothèses sont plus proches de notre cas de figure mais ces modèles sont multiples et aucun ne fait pour l'instant complètement consensus.



**Figure 4-47 : a. Spectres d'impédances et modélisation pour des électrodes de PG3D1 plan et 3D en représentation de Bode ; b. Spectre d'impédance et modélisation pour l'électrode de PG3D1 3D en représentation de Nyquist.**



**Figure 4-48 : a. Line de transmission RC, représentant un matériau poreux selon le modèle de de Levie [138], extrait de [173] ; b. Circuit électrique équivalent à la ligne de transmission du a., utilisé pour modéliser les courbes.**



**Figure 4-49 : a. Impédance en représentation Nyquist de matériaux présentant différentes géométries de pores, extrait de [174] d'après [171] ; b. Zoom sur la zone du spectre d'impédance correspondante de la Figure 4-47b.**

Les résultats des modélisations sont regroupés dans le Tableau 4-5. La résistance  $R$  est comparable pour les 2 électrodes. Concernant les capacités, une confirmation de ce que la CV laissait déjà paraître est obtenue : le matériau 3D a une capacité légèrement plus grande que celle du matériau plan  $C_D$  (+12%).

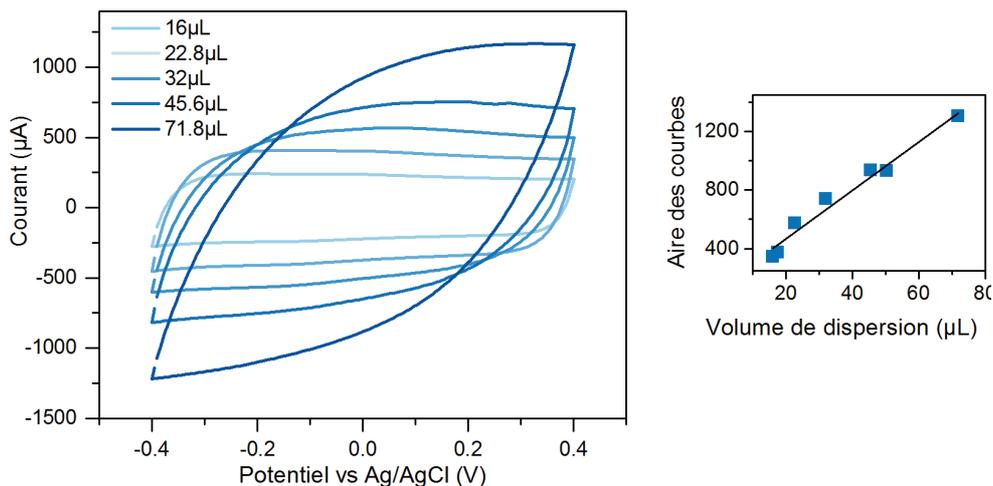
**Tableau 4-5 : Paramètres de l'impédance pour des électrodes de PG3D1 plan et 3D.**

|                     | plan            | 3D              |
|---------------------|-----------------|-----------------|
| $R$ ( $\Omega$ )    | $72,1 \pm 0,4$  | $63,2 \pm 0,5$  |
| $C_D$ ou $C_p$ (mF) | $8,63 \pm 0,51$ | $9,66 \pm 0,35$ |

#### 4.5.5.5.2. Influence du volume de l'électrode

De la même manière que dans le Chapitre 3, nous avons comparé les CV et spectres d'impédances obtenus pour des électrodes 3D de différents volumes. Pour obtenir ces électrodes de différents volumes, de nouvelles puces ont été fabriquées avec des profondeurs et tailles de puits différentes.

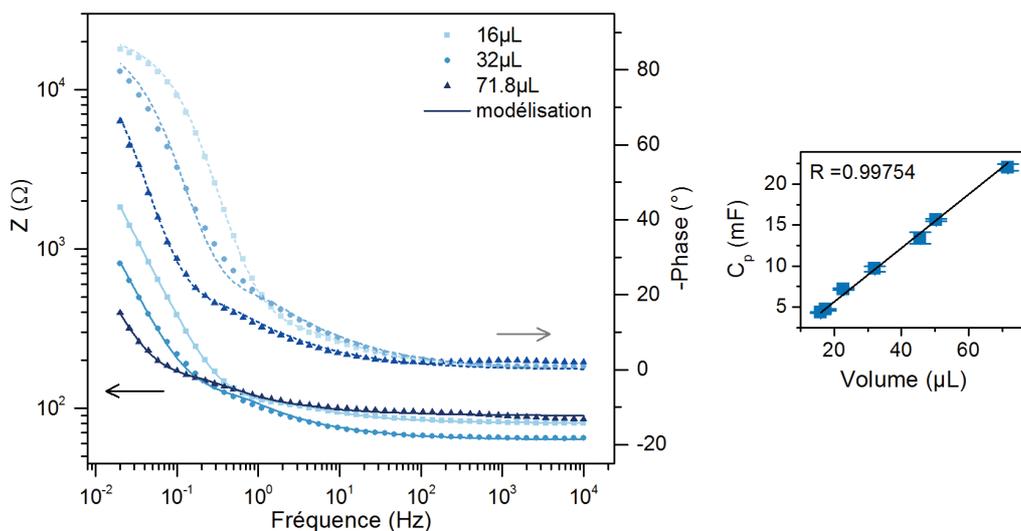
Plus l'électrode est massive, plus la CV obtenue est capacitive et lente (Figure 4-50). Lorsqu'on trace la charge du cycle de CV en fonction du volume de dispersion de PEDOT lyophilisé, un comportement linéaire est obtenu. Comme pour les matériaux du Chapitre 3, la charge est volumique pour les électrodes 3D.



**Figure 4-50 : 3<sup>e</sup> cycle de CV (50mV/s) pour des électrodes obtenues à partir de différents volumes de PG3D0.75.**

Concernant les spectres d'impédance, comme dans le Chapitre 3, la partie capacitive est parallèle pour toutes les courbes mais décalée vers les basses fréquences pour les électrodes de plus grands volumes. Lorsque la capacitance totale des parois des pores  $C_p$  est tracé en fonction du volume des électrodes, une droite est obtenue ce qui confirme que la capacitance du matériau 3D est aussi volumique. Une valeur de  $0,327 \pm 0.010$  F/mL de dispersion initiale est trouvée. Cette valeur est plus élevée de 27% que la capacitance volumique trouvée dans le Chapitre 3. Cette différence est imputable à 2 paramètres :

- la mise en forme. Les mesures d'impédance du paragraphe 4.5.5.1 précédent montrent une différence de capacitance de 12% entre les matériaux plans et 3D.
- la formulation. Les électrodes du Chapitre 3 n'ont pas la même formulation. Cela impacte probablement la diffusion des ions dans le matériau et donc sa capacitance.



**Figure 4-51 : Spectres d'impédances et modélisation pour des électrodes 3D de différents volumes de PG3D0.75.**

## 4.5.5.5.3. Détection du ferricyanure de potassium

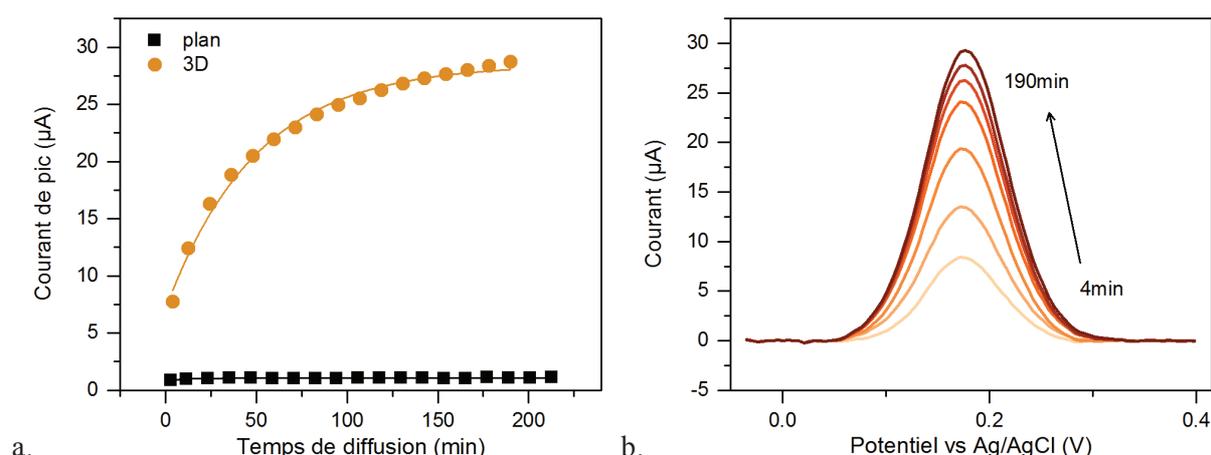
## ➤ Détection comparative en SWV entre électrode 3D et film plan

Le ferricyanure de potassium  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  est détecté comparativement entre des électrodes plane et 3D de même formulation et de même volume. Pour cela, des SWV sont réalisées de manière régulièrement espacée pendant 3h après avoir introduit dans du PBS  $150\mu\text{M}$  de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ . Les paramètres utilisés sont ceux qui avaient été optimisés dans le Chapitre 3 (pas 5mV, amplitude 20mV, fréquence 0,5Hz).

Pour l'électrode plane (Figure 4-52), le pic est de faible intensité ( $\sim 1\mu\text{A}$ ) et n'évolue pas au cours de la mesure. Ce résultat est cohérent avec les résultats du Chapitre 3 qui montrait que le ferricyanure ne s'adsorbait pas au PEDOT et ne s'accumulait donc pas dans le matériau.

Pour l'électrode 3D, le pic est beaucoup plus intense et sa taille augmente au cours du temps (Figure 4-52). La stabilisation du pic est très longue et ne semble pas encore tout à fait atteinte à la fin de notre expérience. Après stabilisation, il a été vérifié en CV que l'intensité des pics d'oxydation et de réduction dépend de la racine carrée de la vitesse de balayage ce qui signifie que l'espèce est libre en solution. L'augmentation n'est donc pas due à l'adsorption du ferricyanure sur le PEDOT. Nous l'attribuons entièrement à la diffusion des molécules de ferricyanure dans le réseau poreux. Lorsqu'on vient d'ajouter le ferricyanure à la solution de PBS, seule la partie supérieure de l'électrode est en contact avec les molécules et participe à la détection. Après 3h de diffusion, presque toute la surface de l'électrode est en contact avec les molécules ce qui donne un pic plus intense.

Cette expérience permet d'avoir une idée des longueurs de diffusion dans le réseau poreux. En effet, le coefficient de diffusion de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  dans un milieu salin est d'environ  $7,2 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$  [175]. Donc un signal maximal obtenu au bout de 190min, correspond à un chemin parcouru d'environ 2,8mm. Cette valeur est cohérente avec la profondeur macroscopique de l'électrode qui est de 2mm, sachant que le coefficient de diffusion utilisé n'est pas celui du PBS et que le réseau poreux présente une certaine tortuosité.

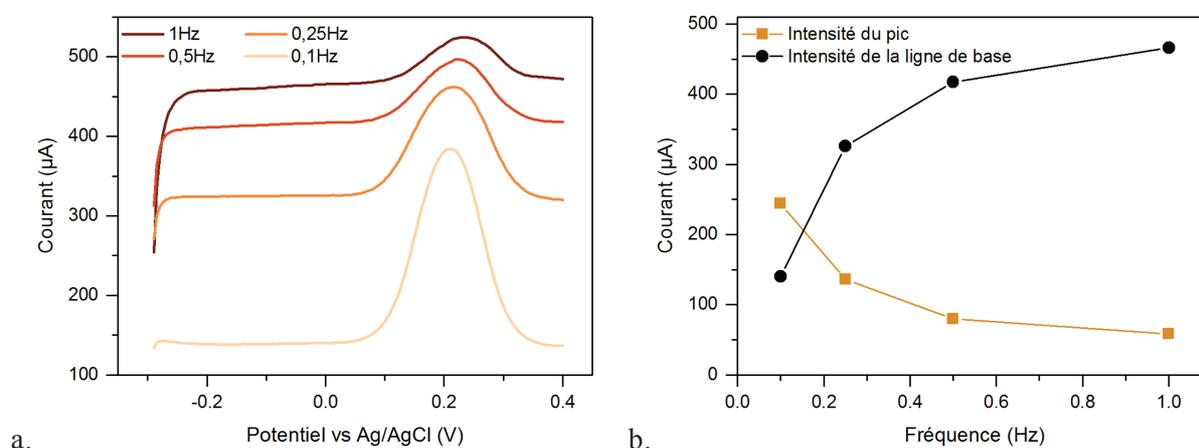


**Figure 4-52 : a. Courant du pic de SWV (pas 5mV, amplitude 20mV, fréquence 0,5Hz) en fonction du temps de diffusions de  $150\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  dans du PBS pour des électrodes**

de PG3D0.75 plane et 3D de 32 $\mu$ L ; b. SWV de 150 $\mu$ M de Fe(CN) $_6^{3-}$  dans du PBS au cours du temps pour l'électrode 3D de PG3D0.75 de 32 $\mu$ L.

➤ Optimisation des paramètres de la SWV

Une fois le pic stabilisé, nous avons cherché à optimiser les paramètres de la SWV. Pour cela différentes fréquences de balayage ont été testées (Figure 4-53). Comme pour le Chapitre 3, le pic redox est plus intense à faible fréquence de balayage. Les courants des impulsions positives ont une allure normale pour de la SWV : augmentation de la ligne de base et de la taille du pic avec la fréquence. Ce qui n'est pas le cas pour les courants retours. Le pic est négatif que pour la mesure à 0,1Hz. Le signal obtenu à 0,1Hz est particulièrement net : l'intensité du pic est de presque 350 $\mu$ A et la ligne de base à 140 $\mu$ A. Toutefois, réaliser une SWV à 0,1Hz est très long (23min). Dans un contexte de suivi de culture, cette durée de mesure n'est pas réaliste. La SWV à 0,5Hz dure 5 min, ce qui est une durée au correct car l'augmentation des concentrations au cours de la culture est plutôt lente.



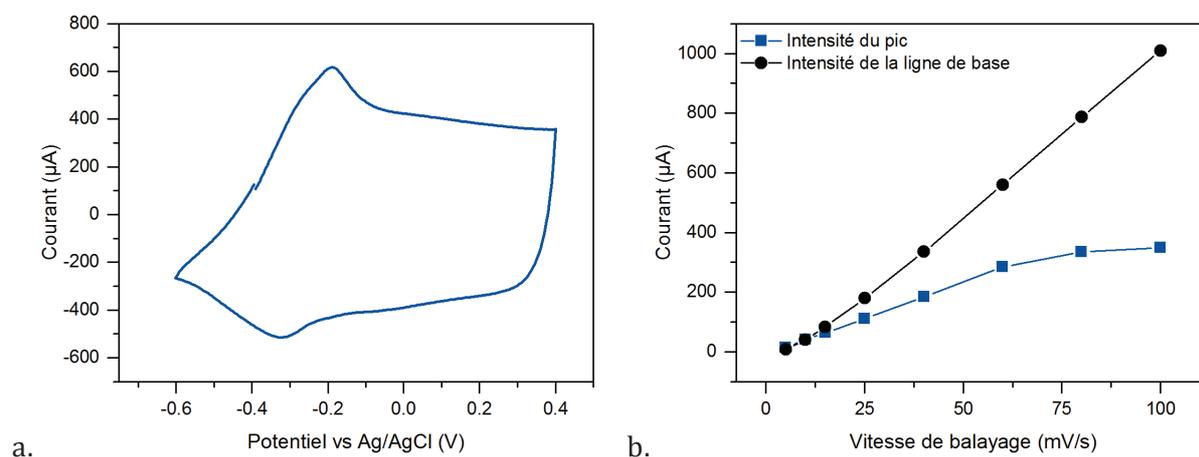
**Figure 4-53 : a. SWV (pas 5mV, amplitude 20mV) à différentes fréquences de Fe(CN) $_6^{3-}$  1mM dans du PBS sur l'électrode 3D de PG3D1 de 32 $\mu$ L ; b. Intensité des pics et de la ligne de base aux différentes fréquences.**

La SWV ne permettant pas d'amplifier le signal sur un temps de mesure raisonnable, toutes les méthodes pulsées devraient conduire au même résultat. Nous nous sommes donc intéressés à une méthode de mesure plus classique la CV, la CV a été optimisée pour la détection de PYO et va être présentée dans le paragraphe suivant.

#### 4.5.5.5.4. Détection de PYO

Une solution de PBS à 50 $\mu$ M de PYO est mise en contact avec une électrode 3D de PG3D0.75. Des CV sont réalisées 3h après l'introduction de PYO (pour laisser le temps aux molécules de diffuser dans la structure). Le pic de PYO apparaît clairement en CV 50mV/s (Figure 4-54a). Le potentiel de demi-vague est -257mV ce qui est cohérent avec les résultats obtenus précédemment sur PEDOT plan (-261mV) et GC (-263mV). Le potentiel pic à pic à 50mV/s est de 126mV, ce qui est élevé pour une espèce échangeant 2 électrons mais normal en considérant la lenteur du matériau. En traçant l'intensité du pic et de la ligne de base en fonction de vitesse de balayage (Figure 4-54b), on remarque que l'intensité du pic est proportionnelle à la vitesse de

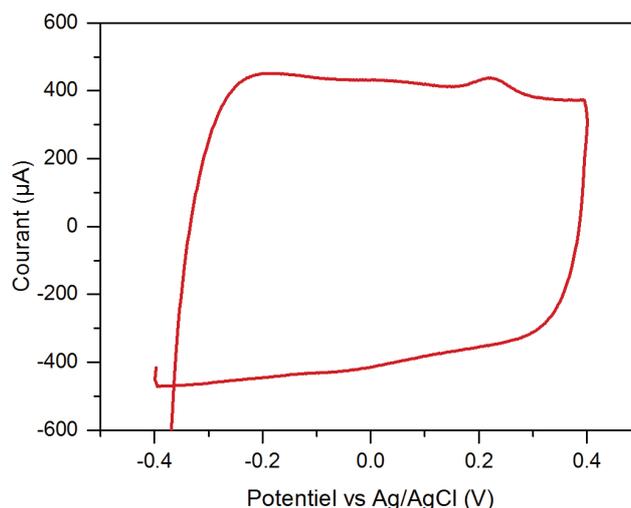
balayage jusqu'à environ 60mV/s (comportement en puissance  $1,09 \pm 0,02$ ). PYO est donc adsorbé à la surface de l'électrode. Au-dessus de 60mV/s, le courant non faradique trop important limite le courant faradique, et cette proportionnalité est rompue. L'intensité de la ligne de base reste elle proportionnelle à la vitesse de balayage pour toute la gamme testée. Réaliser une détection à plus de 60mV/s n'est donc pas judicieux. Les meilleurs rapports intensité du pic sur intensité de la ligne de base sont obtenus pour les plus faibles vitesses de balayage. Une détection à 10mV est un bon compromis entre intensité du pic et intensité du signal capacitif. Cette vitesse de balayage a donc été choisie pour la suite.



**Figure 4-54 : a. CV (50mV/s) de PYO 50µM dans du PBS sur une électrode 3D de PG3D0.75 de 32µL ; b. Intensité du pic d'oxydation de PYO ainsi que de la ligne de base pour différentes vitesses de balayage dans les mêmes conditions que le a.**

#### 4.5.5.5. Détection de PQS

Des détections de PQS ont été réalisées dans la même configuration que pour PYO : en CV 50mV/s, pour 50µM de PQS dans du PBS et après 3h d'immersion dans la solution. Le pic d'oxydation de PQS est détecté vers +223mV. A cette vitesse de balayage le pic de réduction de PQS est presque invisible, comme ce qui a été rapporté dans le Chapitre 3 sur le PEDOT plan. Malheureusement, l'optimisation réalisée sur PYO n'a pas pu être effectuée sur PQS. En effet, on a montré dans le Chapitre 3 qu'il faut attendre une dizaine de minutes pour obtenir de nouveau un pic intense PQS, le temps que d'autres molécules diffusent et viennent s'adsorber à la surface de l'électrode, l'oxydation étant en grande partie irréversible. Hors 10 minutes ne suffisent plus dans le cas d'un matériau 3D, il faudrait attendre de nouveau plusieurs heures avant chaque cycle. Nous avons donc choisi de nous contenter de l'optimisation en CV sur PYO (10mV/s) pour réaliser les détections avec aussi PQS.



**Figure 4-55 : CV (50mV/s) de PQS 50µM dans du PBS sur une électrode 3D de PG3D0.75 de 32µL.**

#### 4.5.6. Conclusions

Une électrode 3D de PEDOT:PSS a été fabriquée avec succès grâce à la lyophilisation. Elle est réalisée à partir de solutions commerciales, ce qui rend sa préparation facile. Elle possède une macroporosité d'environ 40µm de diamètre ce qui est dans le cahier des charges pour notre application. Ses pores sont répartis de manière homogène et sont bien interconnectés. La conductivité du matériau est bonne ainsi que sa réponse électrochimique. Le matériau obtenu semble tout à fait approprié pour être utilisé en tant qu'électrode pour l'analyse de surnageants microbiens.

## 4.6. Protocoles des caractérisations du Chapitre 4

### 4.6.1. Caractérisations morphologies

Plusieurs types de d'instruments ont été utilisés pour déterminer la morphologie des échantillons de PEDOT 3D :

- Binoculaire : observation à la binoculaire de l'aspect macroscopique des dépôts et prises de photographies.
- Microscope optique.
- Microscopie à balayage (MEB) : observation des échantillons sans préparation préalable spécifique. Un MEB Hitachi S-4100 a été utilisé avec une tension d'extraction de 10keV. Des grossissements allant de 40 à 15000 ont été utilisés. Le diamètre des pores est évalué en mesurant le plus petit et le plus grand diamètre d'environ 60 pores sous le logiciel ImageJ.
- Tomographie au rayons X : Nanotom 180 kV/15W de phoenixX-ray. L'analyse a été réalisée sur un échantillon de grande taille : 2mm\*10mm fabriqués dans un bécher de 5mL.
- Porosimétrie au mercure : la taille de pores a été mesurée plus précisément grâce à un porosimètre au mercure AutoPore IV 9500 de Micromeritics Instrument Corporation de 0,003 à 5,5 MPa. L'échantillon utilisé a les mêmes dimensions que pour la

tomographie aux rayons X. Pour plus d'information sur la technique, voir le document [176] fourni par le fabricant.

---

#### 4.6.2. Caractérisations mécaniques

Deux types d'approches ont été utilisés. Une approche qualitative où des expériences simples ont permis d'évaluer la résistance des matériaux fabriqués à leurs conditions d'utilisation, et une approche quantitative grâce à des tests mécaniques en compression.

Pour l'approche qualitative, deux types de tests ont été réalisés :

- Des tests d'immersion : le matériau est immergé dans du PBS pour une longue durée. Des observations à la binoculaire permettent d'évaluer qualitativement l'éventuelle redispersion du matériau.
- Des cycles d'immersion /séchage : des cycles d'au moins 10 jours d'immersion dans du PBS et d'au moins 3 jours de séchage sont répétés plusieurs fois sur les matériaux. Des observations à la binoculaire ainsi qu'au MEB sont réalisées. La contraction des matériaux est évaluée par la surface occupée par le matériau après chaque séchage par rapport à sa surface initiale.

Pour l'approche quantitative, des tests de compression uni-axiale ont été effectués en triplicata avec une machine d'essais mécanique EZ-X 5N de SHIMADZU. Le matériau mouillé est placé entre 2 plateaux et une force initiale de 0,005 N est appliquée. La compression est ensuite effectuée à la vitesse de 10 $\mu$ m/s. La courbe contrainte-déformation permet de déterminer le module de Young en compression du matériau, grâce à la tangente à la partie élastique de la courbe.

---

#### 4.6.3. Caractérisation spectroscopique Raman

Les mesures Raman ont été effectuées avec un spectromètre Renishaw InVia. Deux sources laser ont été utilisées : un laser Ar<sup>+</sup> donnant une excitation à 541 nm, et une diode laser donnant une excitation à 785 nm. Les mesures ont été réalisées sous microscope, au travers d'un objectif de grandissement x50, d'ouverture numérique égale à 0,75. Du fait de cette forte ouverture numérique, cette optique permet une collection efficace de la lumière diffusée.

Avant toute mesure, nous avons fait varier la puissance incidente sur l'échantillon de manière importante, pour s'assurer de ne pas chauffer ou détruire les matériaux. Typiquement, la puissance incidente au niveau de l'échantillon aura été de quelques mW.

Dans ces conditions, la zone analysée est de quelques  $\mu$ m<sup>3</sup>. Elle dépend toutefois des propriétés optiques des matériaux, leur coefficient d'absorption à la longueur d'onde d'analyse en particulier.

---

#### 4.6.4. Caractérisations électrochimiques

Les caractérisations électrochimiques utilisées sont les mêmes que celles des matériaux du Chapitre 3 : impédance, CV, voltampérométrie à signaux carrés de potentiel (SWV) et détection du Fe(CN)<sub>6</sub>. La même préparation des électrodes est effectuée : un cyclage de 50 cycles de -0,4 à +0,4V à 50mV/s.

## CHAPITRE 5

# Culture et détection de *P. aeruginosa* avec l'électrode 3D de PEDOT:PSS

# Chapitre 5 Culture et détection de *P. aeruginosa* avec l'électrode 3D de PEDOT:PSS

|          |   |     |
|----------|---|-----|
| 5.1.     | Contextes de l'étude microbiologique.....                                     | 176 |
| 5.2.     | Caractérisations physiologiques de l'électrode .....                          | 177 |
| 5.2.1.   | Préparation et stérilisation.....   | 177 |
| 5.2.2.   | Bactério-compatibilité .....  | 178 |
| 5.2.2.1. | Tests sur boîte .....   | 178 |
| 5.2.2.2. | Tests en liquide .....  | 179 |
| 5.2.3.   | Croissance bactérienne au sein des électrodes .....                           | 181 |
| 5.2.3.1. | Evaluation de la croissance bactérienne dans le matériau.....                 | 181 |
| 5.2.3.2. | Bactéries en contact avec le PEDOT:PSS .....                                  | 183 |
| 5.3.     | Adaptation de la puce pour les mesures en laboratoire de microbiologie.....   | 184 |
| 5.3.1.   | Structure de la puce.....   | 184 |
| 5.3.2.   | Contre-électrode .....  | 184 |
| 5.3.3.   | Electrode de référence .....  | 184 |
| 5.4.     | Analyse <i>in situ</i> de surnageant .....                                    | 185 |
| 5.4.1.   | Expérience « test » sur <i>Pseudomonas putida</i> .....                       | 185 |
| 5.4.2.   | Analyse de surnageants de PAO1 et PAO1 $\Delta$ pqxA .....                    | 186 |
| 5.5.     | Conclusions.....  | 191 |
| 5.6.     | Protocoles de microbiologie du Chapitre 5.....                                | 191 |
| 5.6.1.   | Tests de bactério-compatibilité sur boîtes .....                              | 191 |
| 5.6.2.   | Tests de bactério-compatibilité en liquide .....                              | 191 |
| 5.6.3.   | Evaluation de la croissance bactérienne dans la phase liquide intrapore ..... | 192 |
| 5.6.4.   | Analyse de surnageants <i>in situ</i> .....                                   | 192 |

## 5.1. Contextes de l'étude microbiologique

Les chapitres précédents ont permis de caractériser d'un point de vue redox le surnageant de culture bactérienne, ainsi que de mettre au point des électrodes permettant d'amplifier le signal. Ce chapitre est consacré aux expériences utilisant l'électrode 3D de PEDOT:PSS pour la caractérisation *in situ* de surnageants de culture bactérienne via la croissance de bactéries dans la structure. Il présente tout d'abord des caractérisations réalisées pour répondre au volet physiologique du cahier des charges du Chapitre 4 et la mise au point de la culture dans le PEDOT:PSS. Puis, suivront les adaptations réalisées sur la puce pour permettre une utilisation en microbiologie ainsi que les premiers résultats d'analyse de surnageant *in situ*.

Toutes les expériences présentées ici ont été réalisées en premier lieu sur des microorganismes de classe 1. La classe 1 regroupe les micro-organismes qui n'ont jamais été décrits comme pathogènes pour l'homme et qui ne présentent pas de menace pour l'environnement. Ils sont manipulés dans des laboratoires de niveau L1. *Pseudomonas aeruginosa* (PA) appartient à

la classe 2, en tant que bactérie pathogène mais pour laquelle des traitements efficaces sont connus. Elle doit être manipulée dans des laboratoires de niveau L2, dans lequel est mis en œuvre un confinement de niveau 2 pour protéger le personnel ainsi que prévenir une dissémination dans l'environnement. Il est d'usage de tester de nouveaux protocoles expérimentaux dans des laboratoires L1 avant de les transposer en L2.

## 5.2. Caractérisations physiologiques de l'électrode

Le volet physiologique du cahier des charges du Chapitre 4 concernait la stérilisation, la biocompatibilité et la porosité du matériau. Ce paragraphe passe en revue ces différentes caractéristiques testées avec des bactéries de classe 1.

### 5.2.1. Préparation et stérilisation

Avant la stérilisation des électrodes, une étape d'immersion pendant 24h dans de l'eau déionisée (DI) est effectuée. Son but est d'éliminer les molécules provenant de la dispersion commerciale initiale ou des additifs qui seraient mal immobilisés dans la structure. Cette étape a été introduite après des retours d'expériences de culture de cellules eucaryotes sur des films de PEDOT:PSS (formulation du Chapitre 3) dans le laboratoire de Bioélectronique de l'Ecole des Mines de Saint-Etienne. Son influence est étudiée dans le paragraphe 5.2.2.2.

Pour la stérilisation des électrodes 3D, nous avons choisi d'utiliser une stérilisation à la vapeur réalisée avec un autoclave. Elle peut être accomplie sur des électrodes soit séchées, soit immergées (dans l'eau DI ou un milieu de culture). Dans un premier temps, la stérilisation à sec (donc après séchage de la structure immergée 24h dans l'eau DI) a été choisie, dans le but d'hydrater les électrodes directement avec le milieu de culture inoculé et d'ainsi permettre une colonisation de l'intérieure de la mousse plus facilement.

D'un point de vue morphologique, ces 2 étapes de préparation et stérilisation ne modifient pas l'électrode. Concernant la conductivité, des mesures ont été effectuées après chaque étape pour la composition PG3.5D0.5. Les résultats (Tableau 5-1) montrent que la résistivité de contact reste constante au cours du processus. Pour sa part, la conductivité s'améliore légèrement mais les changements dépassent peu ceux de l'erreur de mesure du Chapitre 4. La stérilisation par autoclave est donc considérée comme adaptée à notre matériau sur la base des résultats morphologiques et électriques. Toutefois, une différence de mouillabilité des électrodes a été remarquée après l'étape d'immersion dans l'eau DI : l'électrode devient plus hydrophobe et la réhydratation est compliquée. Cela est probablement une conséquence du relargage partielle de la DBSA en solution pointé par la diminution de la conductivité dans le Chapitre 4, paragraphe 4.5.5.3. Pour contourner ce problème, la stérilisation est depuis réalisée sur des électrodes immergées. Le matériau n'est donc plus séché avant utilisation. La colonisation devra donc se faire par diffusion des bactéries dans un matériau déjà mouillé.

**Tableau 5-1 : Evolution de la conductivité et de la résistivité de contact au cours de la préparation et stérilisation de l'échantillon.**

| Mesures après l'étape de :    | Conductivité (S/cm) | Résistivité de contact ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) |
|-------------------------------|---------------------|---|
| Recuit initial                | 1,17                | 0,52  |
| 24h en eau DI puis séchage    | 1,34                | 0,50  |
| Autoclave sur électrode sèche | 1,44                | 0,51  |

## 5.2.2. Bactério-compatibilité

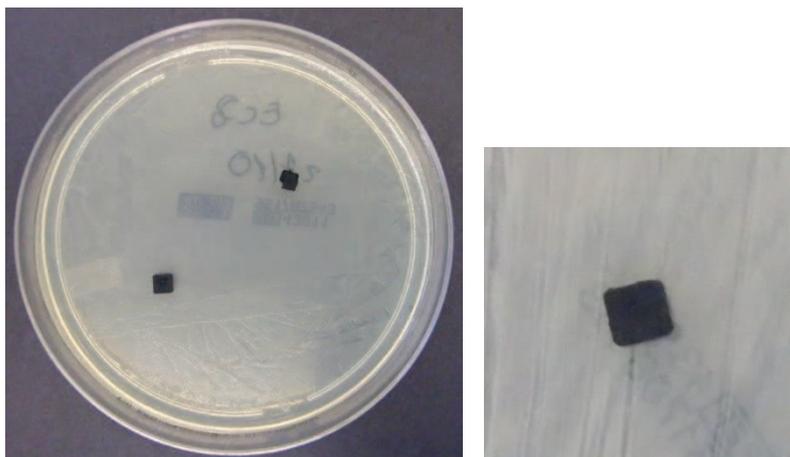
Deux types de tests de bactério-compatibilité ont été effectués : le premier sur boîte de Petri pour évaluer la toxicité du matériau par contact direct avec des colonies, et le second en milieu liquide pour évaluer l'impact du relargage de molécules par le matériau sur les bactéries.

### 5.2.2.1. Tests sur boîte

Tout d'abord, des tests similaires à l'antibiogramme de Kirby-Bauer [177] (*i.e.* par diffusion en milieu gélosé) ont été effectués sur un panel de microorganismes de classe 1, pour s'assurer de l'absence de toxicité directe du matériau. Plusieurs microorganismes très différents les uns des autres ont été testés pour vérifier la biocompatibilité de nos structures à base de PEDOT sur des espèces présentant des caractéristiques (et notamment la composition de leur membrane) variées. Ces tests consistent à ensemercer de manière homogène la surface de boîtes de Petri (réalisation d'un tapis bactérien) et à observer si la croissance des microorganismes est inhibée, ou non, à proximité du matériau à tester, ce dernier étant simplement posé sur le tapis microbien. L'observation d'un disque d'inhibition serait la conséquence du relargage de substance(s) toxique(s) par le matériau. Le protocole du test est présenté en détails dans le paragraphe 5.6.1. Les microorganismes testés dans cette expérience sont les suivants :

- Des bactéries Gram -, comme la bactérie d'intérêt PA :
  - *Citrobacter freundii* ATCC 8090
  - *Enterobacter cloacae* ATCC 13047
  - *Escherichia coli* ATCC 25922
- Des bactéries Gram + :
  - *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990
  - *Staphylococcus xylosus* ATCC 700404
- Une levure (eucaryote unicellulaire) :
  - *Candida albicans* ATCC 14053

Aucun disque d'inhibition n'est visible au cours de la culture pour les 9 microorganismes testés. Ce résultat est très positif et atteste de l'absence de relargage massif de substances toxiques par les structures 3D. Toutefois, ce test facile à mettre en place, ne permet pas de s'assurer de l'absence complète de ralentissement de la croissance bactérienne, notamment dans les premières heures de la culture.



**Figure 5-1 : Exemple de résultat du test de type Kirby-Bauer après 72h d'incubation.**

#### 5.2.2.2. Tests en liquide

Pour évaluer plus complètement la bactériocompatibilité des électrodes de PEDOT:PSS, et mettre en évidence un éventuel ralentissement de croissance bactérienne, un second test a été réalisé en phase liquide. Il a été effectué avec la souche de classe 1 *Pseudomonas Putida* (PP) ATCC 31483. Cette souche a été choisie plutôt que les autres souches de classe 1 utilisées dans le paragraphe précédent car elle est du genre *Pseudomonas* comme PA, et donc de nature proche.

Ce test vise à comparer la croissance bactérienne pour 4 cultures. Son protocole détaillé est donné dans le paragraphe 5.6.2. Les 4 cultures sont :

- Culture témoin : les bactéries sont simplement inoculées dans du milieu de culture LB. La croissance des bactéries dans cette culture sera la croissance de référence dans cette expérience.
- Culture « 3D autoclave » : les bactéries sont inoculées dans du milieu de culture LB, dans lequel est ajouté une structure de PG3D0.75 qui n'a pas connu l'étape de dégorgement dans l'eau DI, et qui a été stérilisée à sec. Cette culture permet d'évaluer l'influence de notre protocole de préparation/stérilisation sur la croissance bactérienne.
- Culture « 3D immersion eau DI + autoclave » : les bactéries sont inoculées dans du milieu de culture LB, dans lequel est ajouté une structure de PG3D0.75 qui a été immergée pendant 14 jours dans de l'eau DI, et qui a été stérilisée dedans. Cette culture permet d'évaluer l'impact de notre protocole de préparation/stérilisation sur la croissance bactérienne.
- Culture « 3D immersion LB + autoclave » : les bactéries sont inoculées dans du milieu de culture LB, dans lequel est ajouté une structure de PG3D0.75 qui a été immergée pendant 14 jours dans du LB, et qui a été stérilisée dedans. Cette culture permet d'évaluer si l'immersion dans du LB peut permettre de dégorger le matériau de la même façon que dans de l'eau DI. Pour des questions pratiques, il est plus simple d'avoir déjà du milieu de culture LB dans les pores, que de l'eau DI qui doit ensuite être remplacée par le LB avant le début de la culture.

La croissance bactérienne a été suivie par mesure de la densité optique à 580nm ( $DO_{580}$ ) avec un spectrophotomètre Cary-300. Pour cela, 1mL de milieu de culture est placé dans une cuve

de spectrophotomètre. Du milieu LB non inoculé du même lot est utilisé comme référence pour déterminer la densité optique. Cette référence est renouvelée toutes les heures et le zéro est effectué avant chaque série de mesures.

La population bactérienne suit la loi suivante lors de la phase de croissance exponentielle :

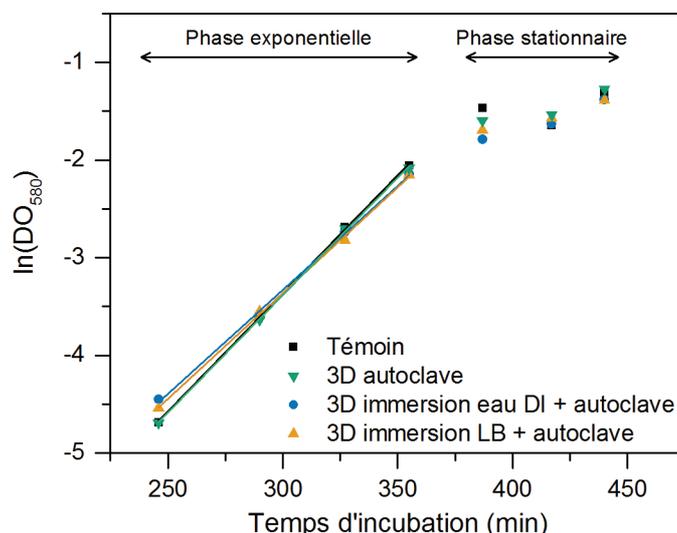
$$N(t) = N_0 2^{t/\tau}$$

avec  $N(t)$  le nombre de bactéries à l'instant  $t$ ,  $N_0$  le nombre de bactéries lors de l'inoculation et  $\tau$  le temps nécessaire pour le doublement de la population bactérienne (appelé temps de génération).

En traçant le logarithme de la  $DO_{580}$  en fonction du temps de culture, une droite est obtenue lors de la phase exponentielle dont la pente  $a$  est reliée à  $\tau$  selon la formule suivante :

$$a = \frac{\ln(2)}{\tau}$$

La  $DO_{580}$  mesurée est très proche sur l'ensemble de l'expérience pour les 4 flacons (Figure 5-2). La phase exponentielle est atteinte entre les mesures à 246 et 355min. Une régression linéaire a été effectuée entre ces valeurs afin de déterminer le temps de génération  $\tau$ .



**Figure 5-2 : Evolution de logarithme de la densité optique en fonction du temps de culture pour l'expérience de bactério-compatibilité en phase liquide.**

Les temps de génération  $\tau$  sont proches de celui du témoin (28,6min) pour les 3 expériences avec la structure 3D (Tableau 5-2) : entre 28,8 et 32,5 min. Il n'y a donc pas de différences significatives entre tous ces temps de génération. Cela signifie que la présence de structure 3D dans le liquide ne semble pas ralentir la croissance, que la structure ait subi ou non l'étape d'immersion avant stérilisation et que cette étape soit réalisée dans de l'eau DI ou dans du LB. A la vue de ces résultats, il semble que l'immersion dans de l'eau DI ou dans du LB ne soit pas utile pour préserver la croissance bactérienne. Cette étape pourrait a priori être supprimée et la structure 3D pourrait être utilisée après simple stérilisation à sec à l'autoclave. Toutefois, nous avons choisi de garder l'étape d'immersion dans notre protocole par prudence, ne pouvant être sûr que ce résultat réalisé sur PP soit bien aussi valable sur PA.

**Tableau 5-2 : Temps de génération de l'expérience de bactério-compatibilité en phase liquide.**

| Flacon                          | Temps de génération en phase exponentielle (min) |
|---------------------------------|--|
| Témoin                          | 28,6   |
| 3D autoclave                    | 32,5   |
| 3D immersion eau DI + autoclave | 32,0   |
| 3D immersion LB + autoclave     | 28,8   |

### 5.2.3. Croissance bactérienne au sein des électrodes

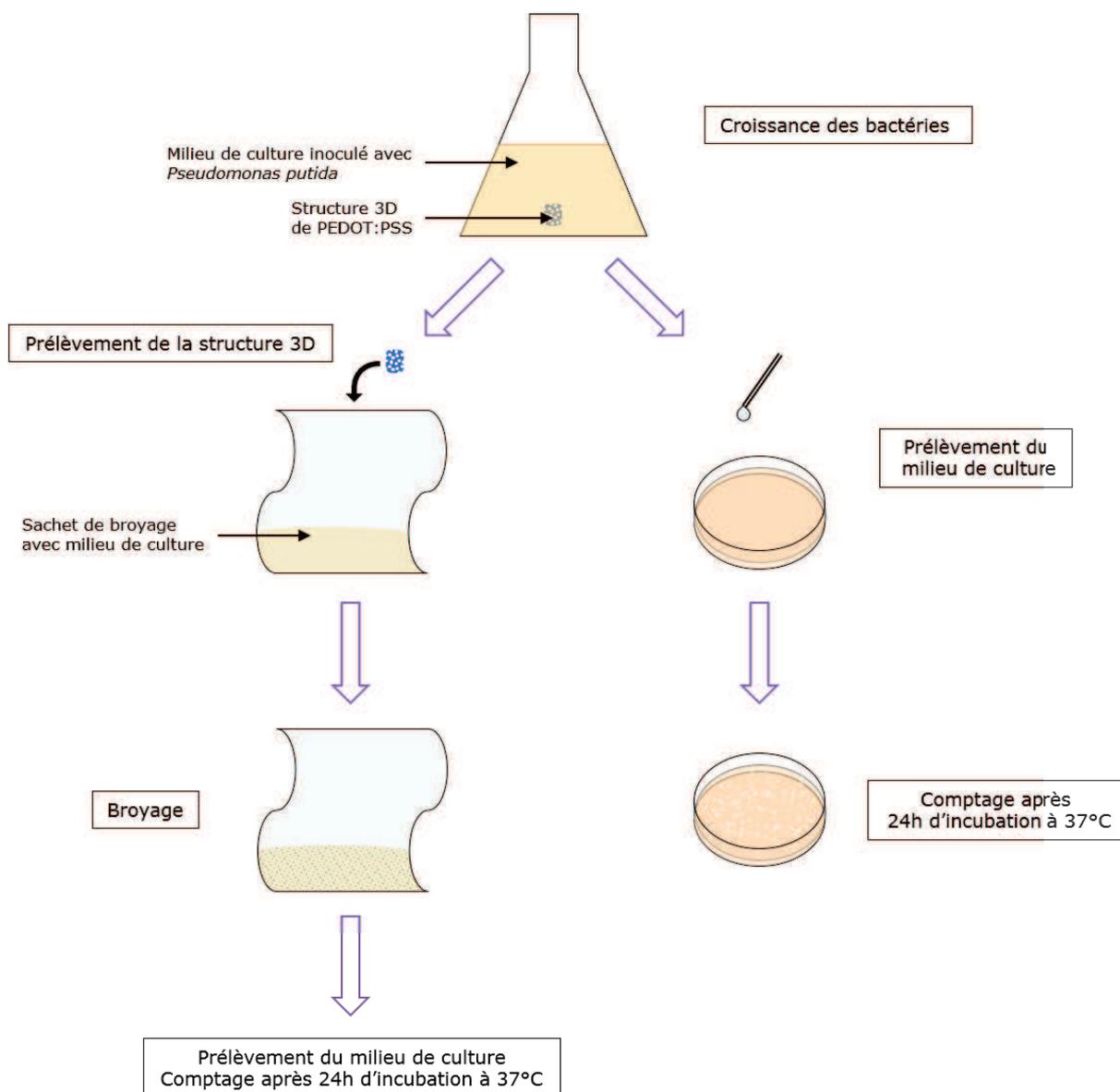
L'étape suivante est la caractérisation de la croissance bactérienne au sein des structures 3D. Deux méthodes ont été mises en place, l'une permet d'accéder aux bactéries présentes dans l'ensemble du matériau et l'autre aux bactéries à la surface des pores.

#### 5.2.3.1. Evaluation de la croissance bactérienne dans le matériau

Peu de méthodes existent dans la littérature pour évaluer la croissance bactérienne à l'intérieur d'une matrice. Nous avons donc dû développer notre propre méthode. Cette méthode est adaptée des tests bactériens de l'industrie agroalimentaire. Ces tests consistent à placer un échantillon de nourriture dans un sachet auquel est ajouté du milieu de culture. Le sachet est ensuite introduit dans un broyeur homogénéisateur (appelé « stomacher ») dans lequel il est périodiquement frapper par des pales pour réduire en bouillie l'échantillon. Ainsi, les bactéries se détachent de la matrice alimentaire et passent dans le milieu de culture. Ce dernier est ensuite analysé par des méthodes classiques.

Dans notre cas, nous avons procédé de la même façon en utilisant comme échantillon une structure 3D immergée pendant différentes durées dans une culture liquide de PP ATCC 31483. La Figure 5-3 schématise cette expérience. Après broyage de la structure 3D, une fraction du milieu de culture du sachet est étalée à la surface des boîtes de Pétri. Chaque bactérie vivante va devenir une colonie. Ces colonies sont ensuite comptées après 24h d'incubation à 37°C. Le résultat du comptage est donné en unité formant colonie (CFU pour *colony-forming unit*). Il permet de remonter à la concentration de bactéries dans la structure 3D au moment du prélèvement. Pour remonter à cette concentration, il a été considéré que le volume accessible aux bactéries dans la structure 3D est le même volume que celui accessible à l'eau DI dans le Chapitre 4 lors de l'expérience de pesage (1034µL de milieu de culture par mL de dispersion lyophilisée). Nous faisons donc l'approximation qu'il n'y a pas de pores trop petits pour les bactéries, et qu'elles colonisent l'ensemble de la structure 3D.

A chaque prélèvement de structure 3D dans le milieu de culture de PP, une partie du milieu de culture est aussi prélevée pour effectuer un comptage des bactéries hors de la structure (Figure 5-3). Le détail du protocole est disponible dans le paragraphe 5.6.3.



**Figure 5-3 : Représentation schématique des étapes de l'expérience de mesure de la croissance bactérienne intra-pore.**

Le même ordre de grandeur est trouvé concernant le nombre de bactéries dans la structure et dans le milieu de culture : plus de  $10^7$  CFU/mL pour les 4 durées de culture testées (Tableau 5-3). La culture dans la structure est donc possible à un rythme comparable à celui dans le liquide. Toutefois, pour chaque temps de culture, moins de bactéries sont comptées dans la structure 3D que dans le liquide (par exemple, après 473min de culture, il y a  $4,60 \cdot 10^7$  CFU/mL dans le liquide contre  $3,25 \cdot 10^7$  CFU/mL dans la structure). Mais, nos valeurs sont probablement entachées d'une grande erreur de mesure comme l'atteste les valeurs identiques trouvées à 394 et 436min concernant la concentration bactérienne dans la structure 3D. Cette grande erreur peut venir du fait que le broyage de la structure n'extrait probablement pas toutes les bactéries de l'échantillon solide, cette technique étant initialement utilisée sur des aliments et non des matrices polymériques artificielles. On ne peut pas conclure de manière quantitative sur cette expérience mais seulement de manière qualitative. La croissance bactérienne a bien lieu dans la structure 3D à un rythme peu différent de celui observé dans la phase liquide.

**Tableau 5-3 : Nombre de bactéries dans le liquide à l'extérieur et à l'intérieur de la structure 3D.**

| Temps de culture (min) | Bactéries dans le milieu ( $10^7$ CFU/mL) | Bactéries dans la structure 3D ( $10^7$ CFU/mL) |
|------------------------|---|---|
| 330                    | 2,44                                      | 1,91  |
| 394                    | 4,15                                      | 2,73  |
| 436                    | 4,42                                      | 2,73  |
| 473                    | 4,60                                      | 3,25  |

### 5.2.3.2. Bactéries en contact avec le PEDOT:PSS

Une structure 3D ayant été placée dans un milieu de culture de PP de la même manière que pour l'expérience précédente, est retirée du milieu après 18h de culture (1080 min). Le protocole de fixation/déshydratation ci-dessous lui est appliqué dans le but d'effectuer des observations MEB de la surface des pores. Ce protocole est adapté de celui communément utilisé pour l'observation MEB d'échantillons biologiques [178], [179]. Il consiste en une étape de fixation visant à tuer les bactéries, et en plusieurs étapes de déshydratation visant à éliminer l'eau pour éviter une explosion des bactéries lors de la mise sous vide du MEB.

- Fixation des bactéries dans du glutaraldéhyde 2,5% dilué dans du PBS pendant 15min à température ambiante,
- Rinçage 3 fois avec du PBS froid,
- Immersion dans des mélanges éthanol/eau DI à divers ratios pendant 15-20min pour chacune de teneurs en éthanol suivante : 50, 60, 70, 80, 90, 100 et 100%,
- Immersion dans de l'acétone pendant 20-30min,
- Séchage à l'air libre puis découpe au scalpel.

Pour obtenir de meilleures images MEB, une métallisation au platine est effectuée avant observation. Quelques bactéries sont observées sur les parois de la structure de PG3.5D0.5 (Figure 5-4). L'aspect extérieur des bactéries n'est pas identique pour toutes les observations : parfois les membranes observées semblent intactes (Figure 5-4a), parfois elles ne sont pas lisses et les bactéries sont contractées (Figure 5-4b). Cela est probablement dû au protocole de fixation qui n'est pas optimisé et qui peut abîmer les membranes. Pour les bactéries intactes, leur morphologie est celle attendue pour des bactéries se développant normalement, ce qui est positif.

Il est intéressant de noter que les parois du matériau ne sont pas recouvertes de bactéries : seulement quelques-unes sont observées. Ce résultat montre que la majorité des bactéries restent en phase liquide dans le surnageant au cours de la culture, les bactéries ne présentent pas une affinité forte avec notre électrode de PEDOT. Ce résultat est cohérent avec le résultat des travaux de Bouguelia [180] qui montrent que très peu de bactéries s'attachent à un autre polymère conducteur (le polypyrrole). Toutefois, il est probable qu'une partie des bactéries adsorbées mais n'ayant pas créés de liaisons assez fortes avec le matériau se décollent au cours du processus de fixation.

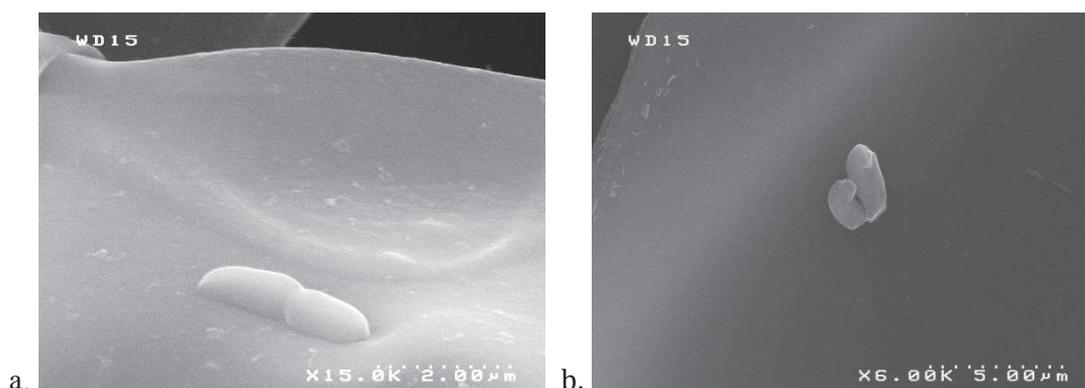


Figure 5-4 : Image MEB de *Pseudomonas putida* à la surface de PG3.5D0.5.

### 5.3. Adaptation de la puce pour les mesures en laboratoire de microbiologie

#### 5.3.1. Structure de la puce

Les modèles de puces développées dans le Chapitre 4 ne conviennent pas pour les mesures *in situ*. En effet, une électrode de référence et une contre électrode sont immergées dans la cuve de la puce qui est donc ouverte. Les mesures *in situ* auront lieu à 37°C, pendant plusieurs heures et sous agitation. Il faut donc avoir une puce qui puisse être fermée pendant la culture. J'ai donc imaginé une puce possédant 3 puits (Figure 5-5) : l'un pour l'électrode de travail, le 2<sup>e</sup> pour la référence et le 3<sup>e</sup> pour la contre-électrode. De plus, la cuve de l'électrolyte est dimensionnée pour être compatible avec un cadre collant double face couramment utilisé pour définir une cuve entre lame de verre et lamelle en biologie. Ce cadre autocollant est étanche et neutre biologiquement, il permettra donc de fermer la cuve après inoculation.

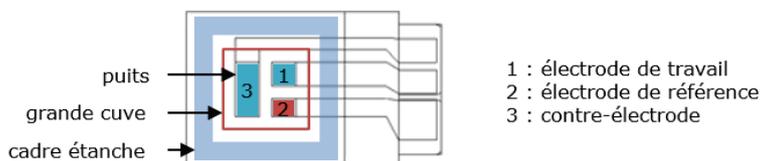


Figure 5-5 : Puce pour les mesures électrochimiques *in situ*.

#### 5.3.2. Contre-électrode

La contre-électrode utilisée habituellement est un carré de platine. Pour l'intégrer dans la puce, une autre stratégie a été choisie : réaliser une contre électrode du même matériau que l'électrode de travail. Ainsi, pour s'assurer que la contre électrode ne sera pas limitante pour le passage du courant, il suffit de choisir un volume plus grand que celui de l'électrode de travail.

#### 5.3.3. Electrode de référence

L'électrode de référence utilisée jusqu'à présent est une électrode Ag/AgCl combinant une partie solide et un électrolyte. Pour miniaturiser ce type d'électrode, il est plus facile de ne pas utiliser d'électrolyte. En effet, son utilisation nécessite de mettre en place une membrane retenant les ions pour éviter leur diffusion dans la solution. Dans le cas d'une électrode Ag/AgCl,

une alternative souvent choisie pour intégrer l'électrode de référence est de chlorer une surface d'argent. Toutefois, les ions  $\text{Ag}^+$  sont connus pour être bactériostatiques.

Nous avons utilisé la même méthode d'évaluation de la bactério-compatibilité que celle utilisée sur les structures 3D dans le paragraphe 5.2.2.1 : les tests de diffusion sur milieu gélosé (analogues à l'antibiogramme de Kirby-Bauer). Pour les électrodes d'Ag/AgCl, un disque d'inhibition très distinct est visible pour la plupart des 9 micro-organismes testés (Figure 5-6). Cette électrode ne peut donc pas être utilisée pour notre mesure.



**Figure 5-6 : Test de type Kirby-Bauer après 72h d'incubation sur une électrode d'Ag/AgCl déposée sur une lamelle de verre.**

Par la suite, d'autres voies ont été explorées et une a réussi les tests type « antibiogramme ». C'est cette électrode qui a été conservée pour les mesures *in situ*.

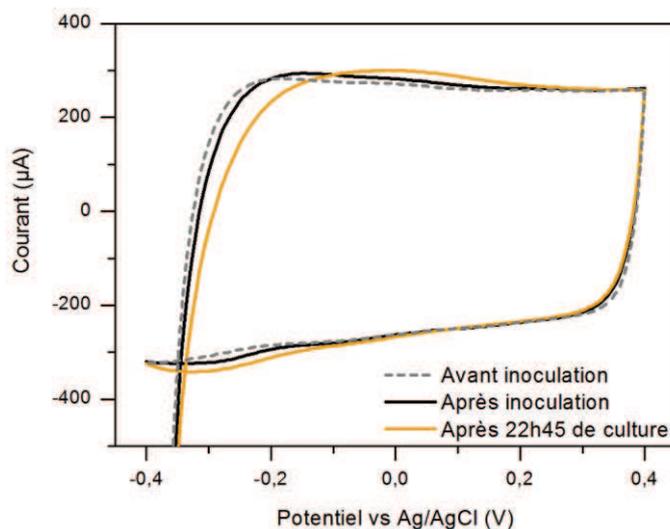
#### **5.4. Analyse *in situ* de surnageant**

La puce fonctionnelle présentée Figure 5-5 a été utilisée pour réaliser des premiers tests d'analyse de surnageants *in situ* au cours de la culture. L'expérience a été réalisée tout d'abord sur PP, puis sur plusieurs souches de PA dont PAO1 et PAO1  $\Delta pqsA$ . Le protocole détaillé de ces expériences est donné dans le paragraphe 5.6.4.

##### **5.4.1. Expérience « test » sur *Pseudomonas putida***

Cette expérience a été réalisée dans un double but : tester le protocole avant de l'appliquer en laboratoire L2 et fournir une courbe de référence d'analyse de surnageant pour une bactérie n'étant pas rapportée comme électro-active.

La bactérie a été inoculée dans du milieu LB directement dans la puce, qui a ensuite été fermée et incubée à 36°C, sous agitation à 30rpm. Des CV ont été réalisées avant inoculation, après inoculation et au bout de 22h45 de culture (Figure 5-7). L'allure des 3 courbes obtenues est similaire et aucun pic n'est détecté. Toutefois, la courbe obtenue après 22h45 de culture est légèrement déformée sur les bas potentiels. L'électrode évolue donc un peu au contact du milieu de culture ou des bactéries. Les mesures obtenues sous agitation sont propres. Ce test en L1 démontre l'applicabilité de la mesure.

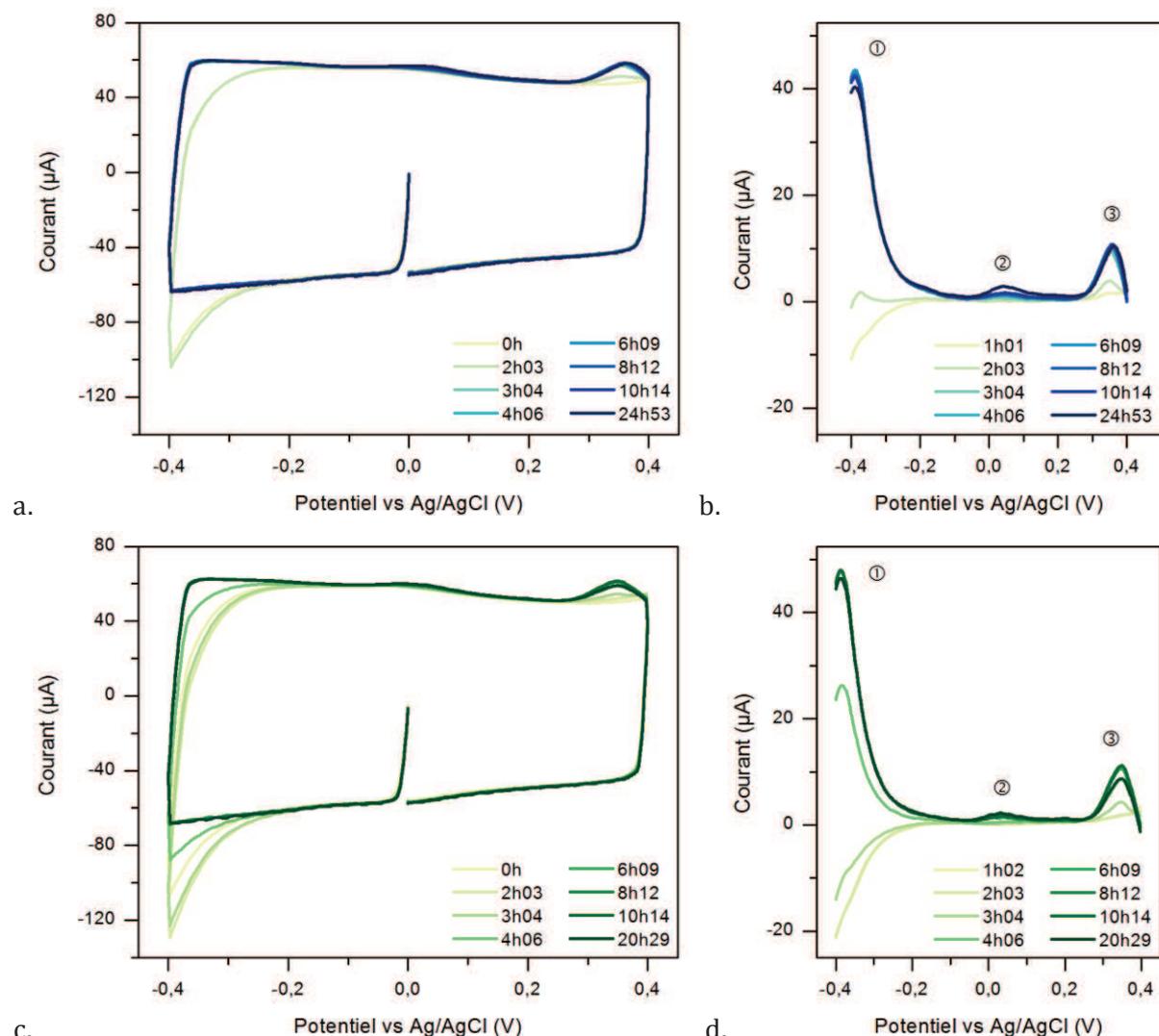


**Figure 5-7 : CV (50mV/s) *in situ* du surnageant de *Pseudomonas putida* dans du LB sur une électrode 3D de PG3D0.75 de 16µL.**

#### 5.4.2. Analyse de surnageants de PAO1 et PAO1Δ*pqsA*

Pour la preuve de concept d'analyse de surnageant *in situ* avec PA, 2 souches qui ont déjà été utilisées dans le Chapitre 2 (et 3 pour la première d'entre elles) ont été choisies. Il s'agit de PAO1 et PAO1Δ*pqsA*. L'enregistrement des voltampérogrammes est programmé pour effectuer automatiquement une mesure toutes les heures. Pour ces expériences, le LB utilisé pour la culture est tamponné par 50mM d'acide morpholino-3-propanesulfonique (MOPS). Ce tampon est utilisé classiquement en biologie, ainsi que pour la culture de PA [71]. Il a été introduit dans cette expérience par crainte que la grande acidité du PEDOT ait une influence sur la prolifération bactérienne au sein de l'électrode, la croissance de PA étant optimale entre pH 6,6 et 7 [181].

Les CV obtenues au cours de la croissance des 2 souches sur la plage de potentiel -0,4/+0,4V sont tracées Figure 5-8a et c. Elles présentent 2 différences majeures par rapport à celles obtenues dans le paragraphe précédent pour PP : en dessous de -0,2V la courbe s'aplatit au cours de la culture, et un pic est présent vers +0,35V. En effectuant la soustraction de la partie oxydation de la CV obtenue juste après inoculation (0h) aux suivantes (Figure 5-8b et d), on met en avant « 3 pics » présents pour les 2 souches.



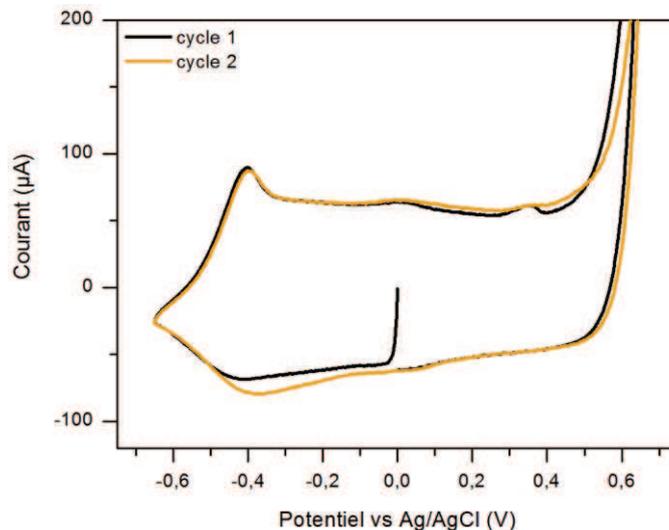
**Figure 5-8 : CV (10mV/s) *in situ* du surnageant de : a. PAO1 et c. PAO1ΔpqsA au cours de la croissance dans du LB tamponné avec 50mM de MOPS sur une électrode 3D de PG3D0.75 de 16µL. Les figures c. et d. présentent la partie obtenue en oxydation de la CV après soustraction des valeurs obtenues à 0h pour PAO1 et PAO1ΔpqsA respectivement.**

Le premier « pic » observé (Figure 5-8b et d, pic ①) est artificiel et vient de l'aplanissement de la courbe pour les potentiels en dessous de -0,2V. Cet aplanissement n'a pas été observé lors de l'expérience sur PP, il n'est donc pas lié intrinsèquement à la croissance de bactéries. Toutefois, 2 origines sont possibles : il peut être lié au tampon MOPS du LB ou bien à la croissance de PA par l'intermédiaire de molécules redox hors de la fenêtre de potentiel. Trois données supplémentaires ont été recueillies au cours d'expériences complémentaires pour circonscrire la réponse :

- Lorsqu'un tampon phosphate est utilisé à la place du tampon MOPS, le même aplanissement à bas potentiel est constaté,
- Lorsqu'on élargi la fenêtre de potentiel (Figure 5-9, après 22h20 de culture *in situ* de PAO1ΔpqsA), on observe un pic à bas potentiel qui n'est pas observé habituellement. L'aplanissement correspond donc bien à un pic.

- Lorsqu'on analyse le surnageant filtré pour enlever les bactéries avec un montage classique et sur une électrode de GC, on ne voit pas de pic vers ces potentiels.

Sur la base de ces résultats, nous pensons plutôt à une action du tampon sur l'état d'oxydation de l'électrode. Le pic à -0,4V correspondrait alors à l'oxydation de l'électrode.



**Figure 5-9 : CV (10mV/s) *in situ* du surnageant de PAO1 $\Delta$ pqsA après 22h20 de culture dans du LB tamponné avec 50mM de MOPS sur une électrode 3D de PG3D0.75 de 16 $\mu$ L**

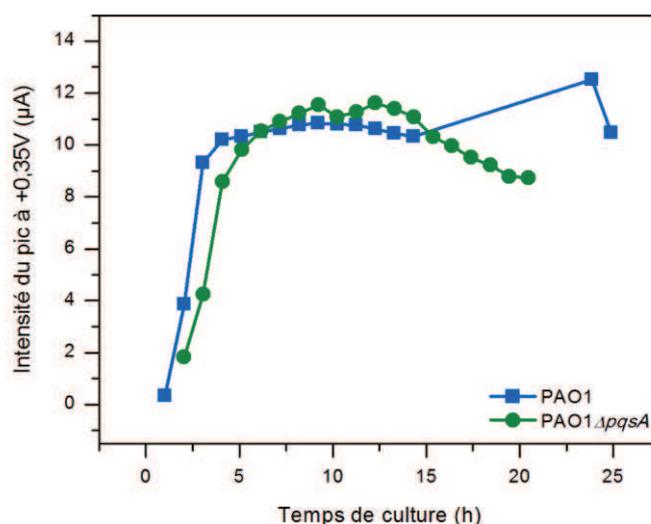
Le second « pic » (Figure 5-8b et d, pic ②) est un pic peu intense observé vers +0,04V. Il peut s'agir soit d'une réelle espèce redox, soit d'un pic lié à une modification de l'électrode au cours de la culture, l'électrode présentant déjà initialement un épaulement vers ces potentiels.

Le troisième pic (Figure 5-8b et d, pic ③) est lui indiscutablement un pic d'oxydation d'une espèce redox. Nous avons tracé l'intensité du pic à +0,35V en fonction du temps de culture pour les 2 souches (Figure 5-10). L'espèce est détectée avec un retard d'environ 1h pour PAO1 $\Delta$ pqsA par rapport à PAO1. Pour les 2 souches, l'intensité du pic de l'espèce augmente rapidement jusqu'à 4/5h de culture (probablement jusqu'à la fin de la phase de croissance exponentielle, si on se réfère à la croissance obtenue dans le Chapitre 2 pour ces mêmes souches). Ensuite l'augmentation de la concentration est plus faible. A partir de 10h de culture pour PAO1 et 12h pour PAO1 $\Delta$ pqsA, l'intensité du pic diminue. Cette diminution est légère mais se poursuit jusqu'à la fin de la culture pour PAO1 $\Delta$ pqsA. Pour PAO1, la diminution est observée jusqu'à 14h de culture. Après cette mesure, un problème informatique a stoppé la prise de mesure. Elle a été relancée le matin, ce qui correspond à une mesure à 24h de culture. La mesure à 24h, ainsi que la suivante à 25h, donnent des pics plus intenses que le pic à 14h. Nous pensons que cela n'est pas la conséquence d'une concentration plus grande de l'espèce dans le surnageant à ces temps de culture, mais la conséquence de l'augmentation du temps d'accumulation de l'espèce à la surface de l'électrode, qui a duré 10h pour le point à 24h au lieu d'1h habituellement.

Sans permettre une identification de l'espèce correspondant à ce 3<sup>e</sup> pic, nos expériences nous ont permis d'obtenir quelques informations :

- La molécule subit une réaction d'oxydation irréversible vers +0,35V sur PEDOT:PSS (absence de pics correspondant en réduction).

- L'espèce, ou son produit d'oxydation s'adsorbe à la surface de l'électrode (diminution drastique de l'intensité du pic lorsque 2 cycles de CV successifs sont réalisés (Figure 5-9)).
- La réaction d'oxydation de l'espèce implique des protons (décalage du pic vers les bas potentiels pour l'expérience réalisée avec le tampon phosphate et donc à pH plus élevé).
- L'espèce est produite à la fois par PAO1 et par PAO1 $\Delta pqsA$ , elle n'est donc pas dépendante du gène *pqsA*.
- L'espèce n'est pas un produit de dégradation (production massive en phase exponentielle, puis sa concentration stagne et diminue en phase stationnaire).



**Figure 5-10 : Intensité du pic à +0,35V en fonction du temps de culture pour l'analyse de surnageant *in situ* de PAO1 et PAO1 $\Delta pqsA$ .**

Aucun de ces « pics » ne correspond à PYO et à PQS en considérant à la fois leurs potentiels et le fait qu'ils sont détectés dans le surnageant des 2 souches de PA. Pour commencer à proposer des pistes d'explications, nous avons réalisé les 3 cultures de PAO1 suivantes :

- Culture témoin (2mL dans un tube de 15mL),
- Culture en présence de l'électrode de référence (2mL dans un tube de 15mL),
- Culture dans une puce non connectée (0,5mL dans la puce de 1mL).

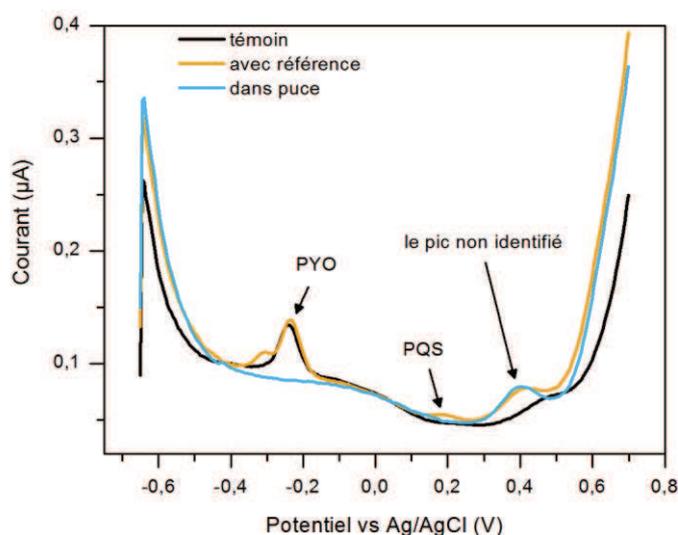
Après 15h d'incubation à 36°C et 30rpm dans du LB MOPS 50mM, les 3 cultures ont été filtrées pour enlever les bactéries puis le surnageant a été analysé sur électrode de GC en laboratoire d'électrochimie. Les courbes obtenues en SWV sont représentées sur la Figure 5-11.

La courbe obtenue pour la culture témoin (Figure 5-11, courbe « témoin ») correspond à nos attentes. Les pics de PQS et PYO sont présents. Cette analyse permet de confirmer que la non détection de PYO et de PQS dans l'expérience *in situ* n'est pas due à un problème lié de la souche.

La courbe obtenue lorsque la bactérie croit en présence de l'électrode référence est plutôt surprenante (Figure 5-11, courbe « avec référence »). Elle présente bien les pics de PYO et de PQS, ce qui montre que la présence de l'électrode de référence n'empêche pas la mise en place du système *pqs*. Mais, elle présente 2 pics supplémentaires non attendus : vers -0,32V et +0,4V. Ces 2 pics n'ayant pas été observés lors de nos tests avec l'électrode de référence mais sans

bactérie, ils doivent être liés à l'interaction électrode référence (ou élément relargué par celle-ci)/bactérie. Le microenvironnement de la bactérie doit être modifié ce qui conduit à la production par la bactérie d'autres espèces redox. Le pic à  $-0,32\text{V}$  pourrait être une autre phénazine : PCA ( $-0,31\text{V}$ ) [76], PCN ( $-0,34$ ) [76] ou Aeruginosin A ( $-0,34\text{V}$ ) [87], par exemple. Celui à  $+0,4\text{V}$  correspond au pic observé lors des mesures *in situ*, et n'a pas été attribué. Il est intéressant de noter qu'il est détecté sur GC à un potentiel légèrement supérieur que sur PEDOT:PSS ( $+0,4\text{V}$  contre  $+0,35\text{V}$ ).

La troisième courbe obtenue lors de la culture dans la puce (Figure 5-11, courbe « puce »), ne présente ni PYO, ni PQS, ni le pic vers  $-0,32\text{V}$ . On détecte seulement le pic non identifié présent aussi lors des mesures *in situ*. Sur cette base, on peut donc affirmer que ce n'est pas l'action de mesurer la culture qui est responsable de l'absence de PYO et de PQS mais bien la puce. L'électrode de référence ayant été mise hors de cause, seules 3 causes restent possibles : les produits relargués par l'électrode de travail et/ou les produits relargués par le plastique ou le collant et/ou la configuration de la culture ( $0,5\text{mL}$  de milieu de culture et  $0,5\text{mL}$  d'air au-dessus de la culture). Par manque de temps, nous n'avons pas pu effectuer d'autres expériences pour tester chacune de ces 3 hypothèses. Toutefois, il nous semble possible de trouver des solutions pour chacune (travail sur la composition de l'électrode, changement de matériau de la puce, création d'une cuve plus grande, introduction d' $\text{O}_2$  dans le système...).



**Figure 5-11 : SWV (pas 5mV, amplitude 20mV, fréquence 2Hz) du surnageant de PAO1 après 14h de culture dans du LB tamponné avec 50mM de MOPS sur une électrode de GC.**

Un travail d'optimisation est donc à réaliser pour trouver les bonnes conditions de culture permettant à la bactérie de communiquer comme si elle était cultivée dans des conditions classiques. Toutefois, ces expériences ont permis de montrer que réaliser une culture et des mesures automatisées au sein d'une puce combinant électrode de référence, électrode de travail et contre-électrode est possible. De plus, par le pic 3, nous avons déjà obtenu un marqueur de la croissance de PA qui s'exprime rapidement (détection au bout d'1 ou 2h de culture). La faisabilité du système a donc été démontrée.

---

## 5.5. Conclusions

Le travail réalisé dans ce Chapitre a permis d'aborder différents points liés à la culture de bactérie au sein de l'électrode 3D de PEDOT:PSS. Peu de tests étaient disponibles dans la littérature pour ce type de problématique et nous avons dû imaginer et mettre au point nos propres expériences. Pour développer ces protocoles sans les contraintes liées à la manipulation d'une bactérie pathogène, la majorité du travail présenté dans ce Chapitre a été réalisé en laboratoire de microbiologie de niveau 1 et donc sur d'autres bactéries que PA. Certaines des expériences nécessitent encore du travail de développement pour être robustes et quantitatives, mais nous avons pu évaluer au moins qualitativement les différents aspects voulus : la bactério-compatibilité du matériau ainsi que les caractéristiques de la croissance des bactéries en son sein. Les résultats obtenus sur ces 2 aspects sont plutôt positifs et encourageants pour la suite.

L'étape suivante a été de concevoir et de tester en condition réelle une puce permettant l'analyse *in situ* de surnageant. Cette étape a nécessité un effort important notamment en ce qui concerne l'électrode référence et sa bactério-compatibilité. Une fois ces problèmes résolus, de premières expériences de preuve de concept ont été réalisées sur *Pseudomonas putida* ainsi que sur *Pseudomonas aeruginosa*. Elles ont révélé que, bien que la puce et le système soit fonctionnel, une étape d'optimisation des conditions de culture est encore nécessaire.

---

## 5.6. Protocoles de microbiologie du Chapitre 5

---

### 5.6.1. Tests de bactério-compatibilité sur boîtes

L'expérience se déroule de la manière suivante :

- Préculture durant la nuit des micro-organismes sur des boîtes de Trypcase Soy Agar (TSA),
- Prélèvement de colonies des boîtes de préculture dans un tube de sérum physiologique de 3mL pour obtenir  $\sim 0,5$ McF avec un densimat,
- Ensemencement uniforme de nouvelles boîtes avec 200 $\mu$ L de la solution à l'aide d'un râteau,
- Positionnement de 2 structures macroporeuses de PEDOT:PSS à la surface de la gélose,
- Incubation à 36,5°C pendant 3 jours. Des photos des boîtes sont prises à 24, 48 et 72h.

---

### 5.6.2. Tests de bactério-compatibilité en liquide

Le protocole suivant est appliqué :

- Préculture durant la nuit de *Pseudomonas Putida* ATCC 31483 sur boîtes de TSA,
- Prélèvement de colonies de la boîte de préculture dans une tube bouillon tryptone sel de 9mL pour obtenir  $\sim 0,5$ McF avec un densimat,
- Dilution au 10<sup>e</sup>,
- Inoculation au 100<sup>e</sup> dans 200mL de milieu LB. Ces 200mL sont ensuite réparti dans 4 flacons de 200mL. On ajoute ou non des structures de PG3D0.75 de 200 $\mu$ L selon le schéma suivant :

- Culture témoin,
- Culture avec PG3D0.75 autoclavé à sec,
- Culture avec PG3D0.75 immergé 14 jours dans l'eau DI puis autoclavé dans l'eau DI,
- Culture avec PG3D0.75 immergé 14 jours dans du milieu LB puis autoclavé dans ce milieu,
- Inoculation au 100<sup>e</sup> de 50mL du même milieu LB qui a servi pour l'immersion de la structure de PG3D0.75 pendant 14 jours.
- Incubation à 37°C sous agitation à 80rpm.

---

### 5.6.3. Evaluation de la croissance bactérienne dans la phase liquide intrapore

Pour notre expérience, on effectue les étapes suivantes :

- Préculture durant la nuit de *Pseudomonas Putida* ATCC 31483 sur boîtes de TSA,
- Prélèvement de colonies de la boîte de préculture dans un sérum physiologique de 9mL pour obtenir ~0,5McF avec un densimat,
- Dilution au 10<sup>e</sup>,
- Inoculation au 100<sup>e</sup> dans 100mL de milieu LB dans un flacon de 200mL,
- 4 structures 3D de PG3D0.75 de 200μL de dispersions initiales sont ajoutées dans le flacon,
- Incubation à 37°C sous agitation à 80rpm.

Après différentes durées de culture, une structure 3D est prélevée dans le milieu de culture en suivant le protocole suivant :

- Prélèvement avec une pince et dépôt quelques secondes sur un papier de salle blanche pour enlever le liquide en excès,
- Placement de la structure dans un sachet pour broyeur homogénéisateur avec 100mL de LB,
- Broyage pendant 10min,
- Extraction du milieu de culture,
- Etalement sur boîte pour effectuer un comptage après incubation des boîtes pendant 24h à 37°C

---

### 5.6.4. Analyse de surnageants *in situ*

L'expérience est effectuée selon le protocole suivant :

- Introduction de 0,5mL de LB dans la puce stérilisée :
  - 24h avant le début de l'expérience pour l'expérience sur PP,
  - 84h avant le début pour celle sur PA,
- Remplacement du LB de la puce, le jour de l'expérience, par 0,5mL de LB frais et tamponné par 50mM d'acide morpholino-3-propanesulfonique (MOPS) pour les expériences PAO1 et PAO1  $\Delta pqsA$ ,
- Placer la puce dans l'incubateur à 36°C,
- Réalisation d'une CV,

- Réalisation d'une suspension de  $\sim 0,5$ McF avec un densimat à partir d'une boîte de culture de moins de 24h de :
  - *Pseudomonas Putida* ATCC 31483,
  - PAO1,
  - PAO1 $\Delta pqsA$ ,
- Inoculation au 10<sup>e</sup> du LB de la puce,
- Incubation à 36°C et 30rpm,
- Réalisation de CV *in situ* au sein de l'incubateur grâce à un mini potentiostat PG581 de Bio-logic contrôlé par un ordinateur à intervalle de temps régulier.



# CONCLUSION GENERALE

## Conclusion générale

Le travail de cette thèse a été découpé en 2 grands volets. Le premier présenté dans le Chapitre 2 a eu pour but d'évaluer l'intérêt de la détection de *Pseudomonas aeruginosa* (PA) par l'intermédiaire de ses métabolites redox. Le second volet, qui a été présenté dans les Chapitres 3, 4 et 5, s'est consacré à l'amélioration de la détection électrochimique des molécules redox composant le surnageant de la bactérie par l'utilisation d'une électrode de PEDOT:PSS.

Le premier volet a été abordé en 3 phases.

Tout d'abord, une identification dans la littérature de molécules redox appartenant au secrétôme de la bactérie a été menée. Quatre molécules ont été sélectionnées : la 2-heptyl-4-quinolone (HHQ), Pseudomonas Quinolone Signal (PQS), pyocyanine (PYO) et la 2'-aminoacétophénone (2-AA). Ces 4 molécules ont été sélectionnées car elles appartiennent à des familles chimiques différentes (les quinolones pour HHQ et PQS, les phénazines pour PYO, et les composés aromatiques pour 2-AA), et car elles ont des rôles physiologiques différents (messagers chimiques pour HHQ et PQS et métabolites secondaires pour PYO et 2-AA). De plus, elles sont toutes les 4 produites en grandes quantités par la bactérie et disponibles commercialement.

A l'exception de PYO, l'électrochimie de ces molécules a peu été étudiée dans la littérature. Je me suis donc ensuite consacrée à leurs études complètes en solution modèles, à la fois aprotique (acétonitrile) et aqueuse (PBS), sur électrode de carbone vitreux. Leurs comportements en CV et en SWV ont été analysés en faisant notamment varier le pH de la solution ainsi que la vitesse de balayage. De plus des courbes de calibrations ont été réalisées pour chacune des 4 molécules sur une gamme de concentrations physiologiques. Cela a permis de mieux connaître chacun des composés ainsi que de proposer les mécanismes des réactions redox de HHQ et PQS.

Suite à ces caractérisations, du surnageant bactérien de plusieurs souches de PA a été analysé en électrochimie au cours de la croissance des bactéries dans un milieu de culture classiquement utilisé en microbiologie (le LB). Les voltampérogrammes obtenus étaient composés de nombreux pics correspondant à de nombreuses espèces redox, parmi celles-ci PYO et PQS ont été détectés (pour les souches produisant ces molécules). Ces voltampérogrammes constituent une signature électrochimique résolue en temps pour les souches analysées. Ces résultats sont très positifs et ces travaux sont les premiers à mettre en évidence cette signature électrochimique complexe, ce qui a permis de répondre de manière positive à notre première problématique. Une petite limitation a été mise en évidence concernant la fenêtre d'analyse permise dans les milieux de culture bactériens : en oxydation, à partir de +0,6V, un pic intense lié aux peptones empêche la détection d'autres espèces électrochimiques. Il n'est ainsi pas possible de détecter HHQ et la 2-AA dans ces conditions. Pour contourner ce problème, l'équipe de Buzid et al. [92] effectue une double extraction (liquide-liquide et liquide-solide) du milieu de culture pour transférer les molécules d'intérêt dans un milieu propre et optimisé notamment en termes de pH et de polarité (ajout de solvant organique pour mieux solubiliser PQS et HHQ). Cette solution, bien que permettant d'avoir des voltampérogrammes très propres, n'a pas été retenue dans ce travail car elle ne permet plus une détection *in situ*, en temps réel et sans préparations des molécules ce qui sont les principaux avantages de l'électrochimie. Une autre piste pour résoudre ce problème de fenêtre électrochimique a été partiellement abordée dans cette thèse : changer la composition du milieu de culture. Il a été montré dans le Chapitre 2 que pour diminuer les interférents, il faut utiliser un milieu de culture non riche. Toutefois, ce type de milieu ne permet pas la production de nos molécules d'intérêt aussi rapidement et dans les mêmes quantités qu'avec un milieu riche [84].

Mais, une optimisation de sa composition est possible, et un bon compromis en terme d'interférents et de niveau de production des espèces pourra peut-être être obtenu. Toutefois, il est important de noter qu'il s'agit de milieu de culture artificiel et non de fluides biologiques. Certains sont plus complexes (comme le sang), mais d'autres plus simples (comme l'urine). Cette limitation de fenêtre de mesure sera donc à évaluer pour chacun des fluides biologiques ciblés.

Concernant l'analyse électrochimique de surnageants bactériens, plusieurs points dignes d'intérêt pourront être abordés dans le futur :

- De nombreux pic redox des voltampérogrammes n'ont pas pu être attribués de manière certaine. Cette attribution pourra être réalisée en couplant des techniques d'analyses classiques (HPLC ou LC/MS) à l'analyse électrochimique. Ainsi, la signature électrochimique pourra être reliée complètement au secrétôme redox de la bactérie.
- La bactérie pouvant produire de nombreuses molécules différentes, une grande variabilité inter-souches de la signature a été mis en avant. Dans une visée d'identification de la bactérie grâce à sa signature électrochimique, il sera donc nécessaire de construire une base de données comprenant les signatures de nombreuses souches. Cette base de données pourra aussi permettre de dresser un profil des molécules sécrétées par la souche à identifier. Il sera notamment intéressant de voir si le secrétôme électro-actif est dépendant du lieu de l'infection. En effet, chaque tissu possédant son propre microenvironnement, il est susceptible d'orienter le développement d'un certain type de souches et donc de secrétôme.
- Seul des souches de PA ont été étudiées dans ce travail, toutefois, il existe d'autres bactéries (ainsi que certaines espèces de champignons) connues pour être électro-actives. Il pourrait être intéressant d'étendre les études à ces microorganismes, pour évaluer si ce type de détection est aussi pertinent pour ces espèces.
- Pour les microorganismes qui ne présenteraient pas de signature électrochimique, mais pouvant être présents dans les mêmes lieux d'infection cibles que PA d'autres stratégies électrochimiques pourront être utilisées. On peut notamment penser à introduire dans le milieu de culture des substrats enzymatiques pouvant être clivés spécifiquement par la bactérie à détecter. Ces substrats pourront être choisis pour libérer des espèces redox, ce qui permettra de réaliser tout de même une détection électrochimique de ces micro-organismes.

Le second volet a été abordé en 3 Chapitres.

Tout d'abord, le Chapitre 3 a permis de montrer que l'utilisation d'une électrode de PEDOT:PSS, à la place de l'électrode de carbone vitreux utilisée précédemment, permet d'obtenir une amplitude de signal plus grande pour la détection de PYO et de PQS ainsi pour les autres molécules non identifiées du surnageant. L'intensité de l'amplification dépend de l'espèce étudiée et notamment de sa charge, de sa taille ainsi que de son hydrophilie. Toutefois, cette amplification reste limitée pour nos molécules cibles comparée à certaines molécules modèles, raison pour laquelle une autre voie d'amplification de la réponse électrochimique a été abordée : l'augmentation de la surface spécifique de l'électrode de travail.

Une voie originale et peu explorée a été choisie pour la réalisation de cette électrode 3D de PEDOT:PSS dans le Chapitre 4 : la lyophilisation. La lyophilisation présente l'avantage d'être une voie biocompatible (pas d'utilisation de solvant) et simple. Un travail de formulation a été

mené à bien pour obtenir une électrode macroporeuse (pores de  $\sim 40\mu\text{m}$ ), ayant de la tenue mécanique en phase aqueuse et étant conductrice. Cette électrode permet d'obtenir un signal électrochimique bien plus intense qu'une électrode 2D. Toutefois, plusieurs limitations ont été mises en avant dans le Chapitre 4 :

- La technique de mesure SWV, qui était utilisée jusqu'alors, n'est pas la technique la plus adaptée pour l'électrode 3D de PEDOT:PSS à cause de la grande capacitance de l'électrode qui ne peut être extraite par cette technique. Nous avons donc choisi d'utiliser pour la suite des travaux, une technique de détection plus classique (la CV). Bien que cette technique n'amplifie pas la mesure intrinsèquement, il est possible de mettre en place une extraction de ligne de base pour tout de même obtenir une amplification par somme des signaux aller et retour.
- Pour éviter un travail de synthèse trop lourd et arriver plus rapidement à une preuve de concept, l'électrode 3D a été réalisée à partir de solutions commerciales. Mais ces dispersions aqueuses conduisent à des électrodes très peu conductrices, ce qui a nécessité l'emploi d'un additif (la DBSA) pour obtenir une bonne conductivité. Or la DBSA est une petite molécule qui peut se relarguer en solution ce qui limite dans le temps l'utilisation des électrodes 3D. Il serait opportun, dans la perspective d'une stabilisation long terme de l'électrode, de chercher à remplacer la DBSA par un autre additif. Ce remplacement pourra être réalisé en explorant à la fois des voies introduisant des surfactants et des dopants, la DBSA jouant ces 2 rôles. Une autre voie à explorer, plus radicale, mais probablement plus efficace, consiste à ne plus utiliser de dispersions commerciales (ces dispersions contenant toute du PSS en excès qui nécessite ensuite l'ajout d'additifs), mais de synthétiser notre propre dispersion. Celle-ci pourrait contenir des monomères d'EDOT modifiés pour jouer le rôle de surfactant et de dopant, comme par exemple dans le travail de Xu et al. [153].

Le Chapitre 5 s'est consacré à l'étude des électrodes 3D en milieu biologique. J'ai pu montrer sur des bactéries de classe L1 que l'électrode 3D ne relargue pas de composés toxiques pour la bactérie, ni ne ralentit significativement sa croissance. Toutefois, peu de bactéries colonisent la surface de l'électrode, la plupart reste dans le liquide intra-pore. Pour atteindre une plus forte colonisation de l'électrode, deux stratégies sont possibles : attacher à l'électrode un microorganisme spécifique par l'utilisation d'anticorps ou rendre l'électrode plus attractive pour tous les organismes vivants en plaçant (par exemple) des protéines sa surface. Ces différentes molécules pourront être introduite dans la dispersion initiale avant lyophilisation ou bien être greffées à la surface du PEDOT:PSS.

Outre la détection du sécrétôme bactérien, de nombreuses autres applications peuvent être envisagées pour cette électrode 3D de PEDOT:PSS. Par exemple, elle pourrait être utilisée comme matrice externe pour la croissance de cellules eucaryotes en ingénierie tissulaire. Ce choix pourrait être pertinent, notamment pour les cellules ayant besoin d'impulsion électriques pour se développer comme les neurones.

# ANNEXES

# Annexes

|   |            |
|---|------------|
| <i>Annexe 1. Electrochimie pour la détection</i> .....                        | 200        |
| <b>Annexe 1.1. Principe de l'électrochimie</b> .....                          | <b>200</b> |
| <b>Annexe 1.2. Les différentes méthodes utilisées pour la détection</b> ..... | <b>202</b> |
| Annexe 1.2.1. Ampérométrie .....  | 202        |
| Annexe 1.2.2. Voltampérométrie cyclique .....                                 | 202        |
| Annexe 1.2.3. Voltampérométrie à signaux carrés de potentiel .....            | 204        |
| Annexe 1.2.4. Voltampérométrie impulsionnelle différentielle .....            | 204        |
| <b>Annexe 1.3. Spectroscopie d'impédance électrochimique</b> .....            | <b>205</b> |
| <i>Annexe 2. La lyophilisation</i> .....                                      | 205        |
| <b>Annexe 2.1. Congélation</b> .....  | <b>206</b> |
| <b>Annexe 2.2. Lyophilisation primaire</b> .....                              | <b>207</b> |
| <b>Annexe 2.3. Lyophilisation secondaire</b> .....                            | <b>208</b> |
| <b>Annexe 2.4. Contrôler le matériau final</b> .....                          | <b>208</b> |
| <i>Annexe 3. Fabrication des puces</i> .....                                  | 208        |

## **Annexe 1. Electrochimie pour la détection**

L'électrochimie permet une détection de molécules ayant une activité redox en phase liquide. Les deux paragraphes suivants constituent une introduction à l'électrochimie et certaines de ses méthodes de détection.

### Annexe 1.1. Principe de l'électrochimie

L'électrochimie est la science qui décrit les phénomènes couplant réactions chimiques et électricité (c'est-à-dire échange d'électrons, voir échange d'ions). Elle s'intéresse plus particulièrement aux réactions se passant à l'interface entre un conducteur électrique solide (carbone, métal, oxyde métallique ou polymère conducteur principalement) que l'on appelle électrode, et une solution contenant des ions qu'on appelle électrolyte. Les ions, en général très concentrés, servent à fermer le circuit électrique hétérogène : conducteur solide, conducteur ionique, conducteur solide. On différencie deux grands types de systèmes électrochimiques :

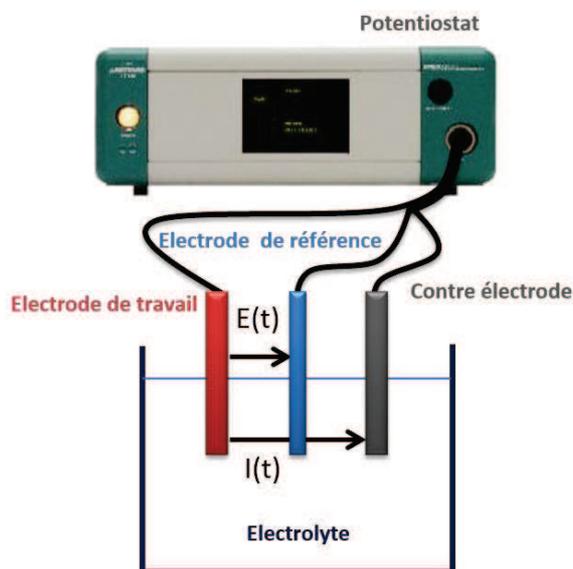
- Piles : l'énergie chimique est transformée en énergie électrique,
- Electrolyseurs : l'énergie électrique permet de réaliser des réactions chimiques.

Dans le cadre de cette thèse, on s'intéresse seulement au deuxième type de systèmes. La Figure A 1 présente le montage utilisé classiquement pour l'étude d'espèce en solution ou d'électrodes. Le potentiostat permet de contrôler la cellule électrochimique qui est composée de 3 électrodes, et d'un électrolyte :

- Potentiostat : c'est l'appareil qui permet d'imposer une différence de potentiel ou un courant et de mesurer respectivement un courant ou une différence de potentiel.
- Electrode de travail : c'est l'électrode d'intérêt. Les réactions qui ont lieu à son interface sont étudiées soit pour étudier et caractériser l'électrode, soit pour caracté-

riser l'espèce électrochimique en solution. De nombreux matériaux d'électrodes différents peuvent être utilisés (carbone, métaux, oxydes métallique, polymères conducteurs...).

- Electrode de référence : elle a un potentiel électrochimique fixe qui sert de référence pour appliquer ou mesurer un potentiel à l'électrode de travail. Elle est nécessaire car le potentiel électrochimique est une grandeur flottante : il n'est pas mesurable ou applicable en tant que tel, seules les différences de potentiel le sont.
- Contre-électrode : elle permet de fermer le circuit électrique. C'est le courant passant entre cette électrode et l'électrode de travail qui est mesuré pour quantifier les réactions redox ayant lieu à l'électrode travail.
- Electrolyte : c'est la solution dans laquelle baignent les trois électrodes. Elle contient des ions en grande quantité pour assurer le passage du courant et fermer le circuit électrique entre les différentes électrodes. Elle peut aussi contenir les espèces redox à étudier.



**Figure A 1 : Représentation schématique d'une cellule électrochimique.**

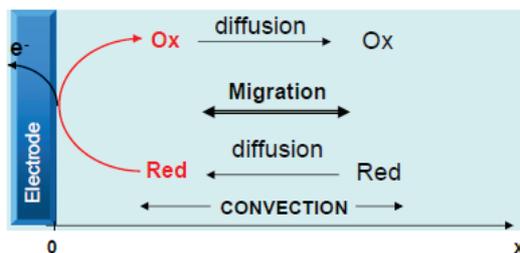
Le courant de la cellule électrochimique est composé de deux parties distinctes :

- Courant non-faradique : il est dû au mouvement des espèces ioniques de l'électrolyte qui se déplacent en réponse au potentiel des électrodes pour garder l'interface neutre (équilibre des charges). Il dépend des ions de l'électrolyte et des électrodes.
- Courant faradique : c'est le courant produit par l'oxydoréduction des espèces redox. Il apparaît lorsque le potentiel de l'électrode de travail devient plus grand ou plus petit que le potentiel d'oxydation ou de réduction des espèces dans l'électrolyte. C'est ce courant qui est important lorsqu'on étudie une réaction redox.

Le courant faradique mesuré peut-être complexe, car il dépend de la cinétique de la réaction électrochimique. Les étapes de la réaction sont les suivantes (Figure A 2) :

- Diffusion des réactifs jusqu'à l'électrode,
- Adsorption des réactifs sur l'électrode,
- Echange d'électron à l'interface électrode/électrolyte,

- Désorption des produits,
- Diffusion des produits de la surface de l'électrode vers la solution.



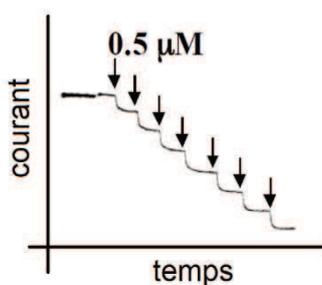
**Figure A 2 : Schéma des étapes d'une réaction électrochimique.**

Lorsque l'étape de transfert d'électron est rapide, l'étape limitante est celle de la diffusion des réactifs. On parle de système réversible (ou rapide). Lorsque l'étape limitante est celle du transfert d'électron, on parle de système irréversible (ou lent).

## Annexe 1.2. Les différentes méthodes utilisées pour la détection

### Annexe 1.2.1. Ampérométrie

C'est la technique la plus simple. L'électrode de travail est placée à un potentiel fixé (en général légèrement au-dessus du potentiel redox de la molécule que l'on veut détecter) et le courant au cours du temps est enregistré. L'expérience est réalisée en régime de diffusion stationnaire, mis en place par agitation continue de la solution ou bien par l'utilisation de microélectrodes comme électrodes de travail. À chaque ajout de la molécule à détecter dans la solution (Figure A 3), le courant change et se stabilise à une nouvelle valeur. Cette valeur est une valeur d'équilibre, fixée par le temps de diffusion de l'espèce chimique et le temps de réaction.

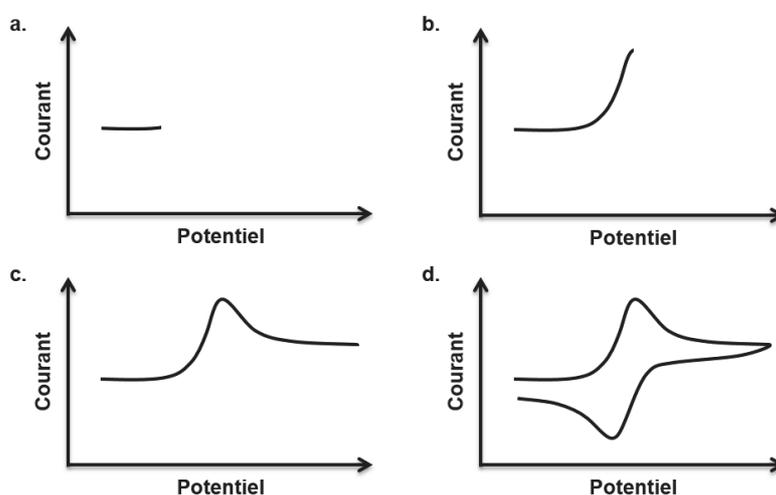


**Figure A 3 : Réponse ampérométrique à des ajouts successifs d'un analyte.**

### Annexe 1.2.2. Voltampérométrie cyclique

Pour cette technique abrégée CV pour *Cyclic Voltammetry*, le potentiel de l'électrode de travail varie entre une valeur haute et une valeur basse et le courant à chaque potentiel est mesuré. Contrairement à la technique précédente, la solution n'est pas agitée. On reste en régime de diffusion pure (on parle de diffusion linéaire semi-infinie) ou bien en régime combinant diffusion et adsorption. La Figure A 4 présente l'allure type du voltampérogramme obtenu. Le cycle de potentiel débute (par exemple) en partant d'une valeur basse de potentiel. Au début, le courant me-

suré est composé uniquement de courant non-faradique et d'éventuelles réactions électrochimiques de l'électrode (Figure A 4a). Ce courant est appelé courant de fond. Il n'est pas nécessairement constant sur toute la fenêtre de potentiel examinée. Lorsque le potentiel d'oxydation de l'espèce redox en solution est atteint, un courant faradique lié à l'oxydation de la molécule s'ajoute au courant non faradique. Le courant mesuré augmente (Figure A 4b). Les molécules réduites présentes au contact de l'électrode s'oxydent. De nouvelles molécules réduites diffusent depuis la solution et viennent s'oxyder à l'électrode mais ce processus de diffusion est lent. On observe donc une baisse du courant mesuré et puis une stabilisation à un niveau plus élevé que le niveau de base mais moins élevé que le courant de pic (Figure A 4c). Ce niveau de courant est un courant d'équilibre dont la valeur dépend de la vitesse de diffusion et/ou d'oxydation. Ce processus se répète de la même façon lorsque les potentiels sont balayés en sens inverse, mais avec une réduction à la place de l'oxydation (Figure A 4d). Le voltampérogramme obtenu permet de bien caractériser l'espèce en solution. En effet de nombreux paramètres influent sur sa forme : le potentiel redox de l'espèce, sa concentration, son temps de diffusion, sa réversibilité, son adsorption...



**Figure A 4 : Voltampérogramme d'une espèce redox en voltampérométrie cyclique.**

Pour une espèce réversible, le potentiel redox de l'espèce  $E_{1/2}$  (on parle aussi de potentiel de demi-vague) peut être déterminé grâce à la position des pics d'oxydation  $E_{ox}$  et de réduction  $E_{red}$  :

$$E_{1/2} = \frac{E_{ox} + E_{red}}{2}$$

La différence de potentiel entre les 2 pics  $\Delta E_p$  est relié au nombre d'électrons échangés  $n$  selon :

$$\Delta E_p = \frac{56,5}{n}$$

à 25°C, et pour  $\Delta E_p$  en mV.

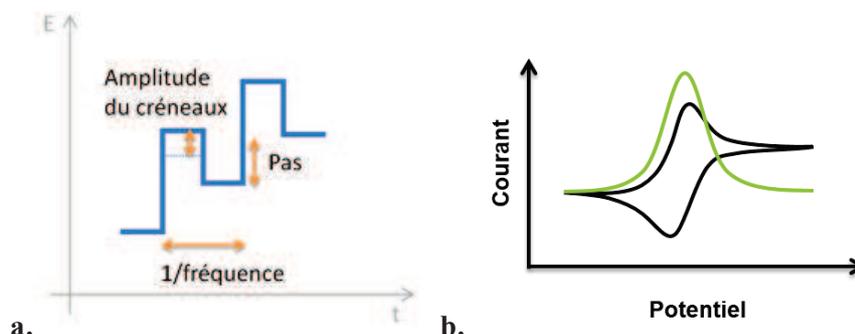
L'intensité du pic d'oxydation ou de réduction  $I_p$  dépend de nombreux paramètres :

$$I_p = 2,7 * 10^5 * n^{3/2} * A * C * (D * \nu)^{1/2}$$

A 25°C, avec  $A$  l'aire de l'électrode en  $\text{cm}^2$ ,  $C$  la concentration de l'espèce redox en  $\text{mol}/\text{cm}^3$ ,  $D$  le coefficient de diffusion en  $\text{cm}^2/\text{s}$ , et  $\nu$  la vitesse de balayage en potentiel.

### Annexe 1.2.3. Voltampérométrie à signaux carrés de potentiel

La voltampérométrie à signaux carrés de potentiel (SWV pour *Square Wave Voltammetry*) est une technique pour laquelle une modulation crêteaux est surimposée au balayage en potentiel (Figure A 5a). De cette manière, des impulsions positives et négatives sont alternées tout en augmentant progressivement le potentiel moyen. Le voltampérogramme est ensuite construit en soustrayant le courant obtenu à la fin de chaque pulse positif et négatif (Figure A 5b). Cette technique permet d'atteindre de grande vitesse de balayage contrairement à la CV classique. De plus, elle est utilisée pour amplifier le pic pour des espèces très réversibles, par « ajout » des pics d'oxydation et de réduction. Le bruit de fond est ainsi diminué.



**Figure A 5 : a. Variation du potentiel avec le temps pour la SWV ; b. allure du voltampérogramme obtenu en SWV.**

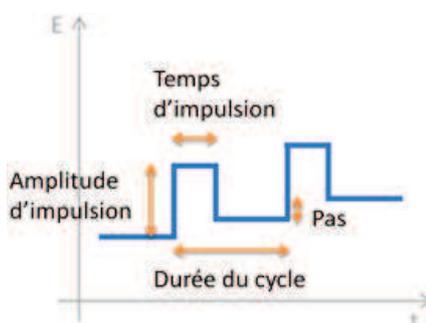
Le potentiel de demi-vague de l'espèce  $E_{1/2}$  est égal au potentiel de pic  $E_p$ . L'intensité du pic  $I_p$  a une formule beaucoup plus complexe qu'en CV. Sa proportionnalité à certains paramètres intéressants est la suivante :

$$I_p \propto n * A * f^{1/2}$$

avec  $f$  la fréquence de la SWV.

### Annexe 1.2.4. Voltampérométrie impulsionnelle différentielle

La voltampérométrie impulsionnelle différentielle (DPV pour *Differential Pulse Voltammetry*) ressemble à la SWV sauf que la durée de l'impulsion négative est beaucoup plus grande que celle de la positive (Figure A 6). Cette méthode est utilisée pour soustraire le courant de fond, et ainsi amplifier le signal, pour une espèce non ou peu réversible (le pic de réduction n'existe pas).



**Figure A 6 : Variation du potentiel avec le temps pour la DPV.**

### Annexe 1.3. Spectroscopie d'impédance électrochimique

Les méthodes exposées ci-dessus sont en général utilisées pour la détection d'un composé redox. Ce paragraphe s'intéresse à la spectroscopie d'impédance électrochimique, méthode utilisée pour caractériser la réponse fréquentielle d'un circuit électrique. L'impédance complexe  $Z$  est définie par la formule suivante :

$$Z = \frac{E}{I}$$

avec  $E$  le potentiel complexe appliqué au composant électrique et  $I$  l'intensité complexe dans le circuit.

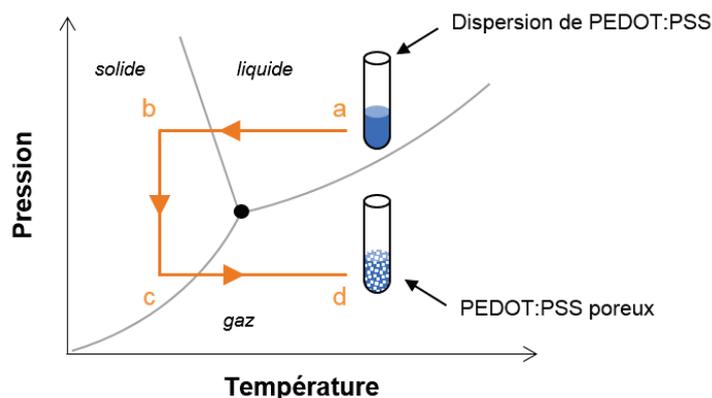
Pour mesurer l'impédance d'un composant, une perturbation sinusoïdale de potentiel de faible amplitude (afin de rester dans le domaine linéaire du composant) lui est appliquée. Le courant résultant dans le circuit est mesuré, ce qui permet d'obtenir l'impédance du composant pour chaque fréquence de perturbation. L'impédance est représentée soit dans le plan complexe en traçant l'opposée de sa partie imaginaire en fonction de sa partie réelle (représentation de Nyquist), soit dans le plan réel en représentant sa norme et sa phase en fonction de la fréquence imposée (représentation de Bode). Une fois le spectre d'impédance obtenu, des informations sur le circuit électrique (en particulier sur l'électrode de travail) peuvent être obtenues en modélisant le spectre à partir d'éléments électriques (résistance, capacitance...). Dans le cadre de cette thèse, cette analyse a été effectuée notamment pour extraire la capacitance de nos électrodes.

---

### Annexe 2. La lyophilisation

Le processus de lyophilisation est constitué de 2 ou 3 étapes (Figure A 7). A partir d'une dispersion aqueuse de la solution à lyophiliser, il se découpe en étapes de :

- Congélation : l'eau libre de la dispersion est transformée en cristaux de glace en baissant la température (Figure A 7 a-b),
- Lyophilisation primaire : la pression est diminuée pour passer sous le point triple de l'eau (Figure A 7 b-c) puis la température est progressivement augmentée pour sublimer les cristaux de glace en vapeur d'eau (Figure A 7 c-d),
- Lyophilisations secondaire (facultative) : dans cette étape, la température est augmentée au-delà de la température ambiante et la pression diminuée au minimum pour éliminer la fraction d'eau résiduelle qui n'a pas été transformée en glace (eau enchevêtrée dans les molécules ou absorbées à leur surface).



**Figure A 7 : Schéma du principe de la lyophilisation.**

Un lyophilisateur semi-industriel (Lyophilisateur pilote de paillasse de Cryotec) est disponible au Département des Technologies pour la Biologie et la Santé du CEA-LETI (Figure A 8). Il est composé d'une chambre de lyophilisation, d'un piège à froid et d'une pompe. La chambre de lyophilisation possède 3 plateaux contrôlables en température pour accueillir les échantillons à lyophiliser. Le piège à froid permet de recondenser l'eau sublimée au cours du processus. La pompe permet de contrôler la pression dans la chambre de lyophilisation.



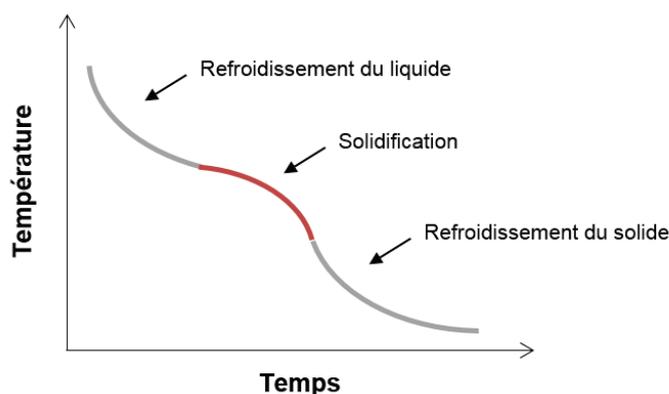
**Figure A 8 : Lyophilisateur pilote de paillasse de Cryotec,**  
<http://www.cryotec.fr/nos-produits/lyophilisateur/pilote-de-paillasse/>.

## Annexe 2.1. Congélation

La congélation est une étape importante du processus de lyophilisation car elle détermine la morphologie du produit final [182]. De plus, si une partie de la solution n'est pas congelée, elle va ensuite bouillir lors de la descente en pression, ce qui peut endommager le produit [182].

La température atteinte en fin d'étape de congélation est choisie pour être quelques degrés plus basse que la température de congélation de la solution initiale. Cette température est liée, pour un polymère, à sa température de transition vitreuse ( $T_g$ ) en présence de glace. Le but est que les molécules de la solution soient immobilisées pour la suite du processus.

L'évolution de la température lors de la congélation (ou solidification) d'un liquide contenant au moins 2 corps, comme c'est le cas dans cette thèse, est présentée dans la Figure A 9. Le liquide commence par se refroidir, puis la courbe de la température connaît une inflexion lors de la solidification de l'eau contenu dans notre mélange, puis un refroidissement du solide obtenu. L'obtention de cette courbe permet de fixer la température de congélation utilisée pour le processus de lyophilisation.



**Figure A 9 : Schéma de l'évolution de la température au cours de la solidification d'un mélange.**

## Annexe 2.2. Lyophilisation primaire

L'étape de lyophilisation primaire débute par la descente en pression de la chambre du lyophilisateur. La pression est choisie pour que la remontée en température se fasse sous le point triple de l'eau et ainsi s'assurer de sa sublimation et non d'une liquéfaction. Néanmoins, une pression trop faible n'est pas favorable. En effet, la convection est le moyen le plus rapide pour propager les changements de température de consigne, et elle est très ralentie sous faibles pressions [183].

Après la baisse de pression, vient l'étape de sublimation de la glace. Cette sublimation commence lorsque la ligne de changement d'état solide/gaz de l'échantillon est franchie, via l'augmentation de la température. Lorsque la glace se sublime, la température du matériau baisse car la sublimation est endothermique. Il est donc nécessaire de lui apporter de l'énergie pour que la sublimation puisse se poursuivre. Cet apport est réalisé par l'augmentation de la température des plateaux. La chaleur des plateaux est ensuite transmise au matériau par conduction et radiation, et sous faible convection selon la pression choisie. Pour les matériaux ayant une  $T_g$  compatible, la température est augmentée jusqu'à être en dessous de 2 à 5°C de la  $T_g$  en présence de glace. Le but est de prévenir un effondrement de la structure lié à la création de vide suite à la sublimation de l'eau.

Le processus de sublimation se propage depuis la face supérieure du matériau. Cela signifie que plus le front de sublimation va descendre à l'intérieur du matériau, plus l'eau sublimée

devra traverser de matière pour sortir et plus le processus sera lent et difficile. De fait, il est déconseillé de lyophiliser des matériaux de plus de 12 à 15mm d'épaisseur [182].

L'eau sublimée est condensée sur le piège qui est maintenu à une température plus froide que l'échantillon. La vitesse de sublimation augmente avec la différence entre la pression de vapeur sur le piège et sur l'échantillon. Pour gagner en vitesse, il est préférable d'élever la température de l'échantillon plutôt que de baisser celle du piège [182]. Il faut toutefois faire attention à ce que la vapeur ne soit pas créée plus vite que la vitesse à laquelle le piège peut la recondenser sinon elle s'échappe dans la pompe ce qui peut l'endommager.

---

### Annexe 2.3. Lyophilisation secondaire

Dans cette étape facultative d'évaporation de l'eau résiduelle, la température est fixée, si possible, quelques degrés en dessous de la  $T_g$  du matériau anhydre pour éviter un effondrement de la structure liée au vide poussé.

---

### Annexe 2.4. Contrôler le matériau final

Les paramètres les plus importants pour la morphologie du matériau obtenu sont à classer en 2 catégories [184] :

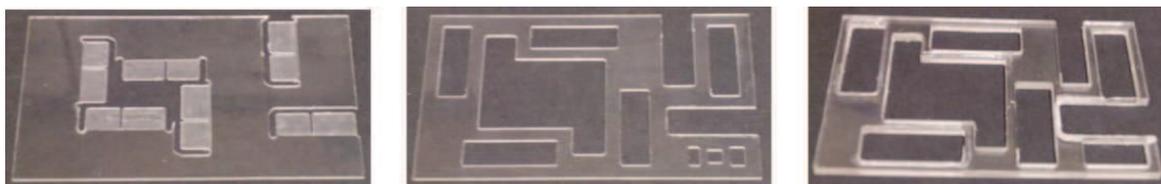
- Liés au processus :
  - La température de congélation atteinte,
  - La vitesse de la rampe de congélation,
  - Le gradient de température dans le matériau lors de la congélation,
  - L'application d'un champ électromagnétique : l'eau est dipolaire, il est donc possible d'influencer la cristallisation de cette manière,
- Liée à la dispersion :
  - L'utilisation d'additifs,
  - La proportion de solvant par rapport au matériau,
  - La nature du solvant.

---

## Annexe 3. Fabrication des puces

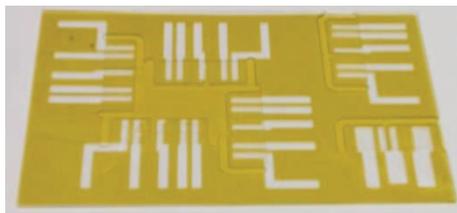
La réalisation des dispositifs comprend 6 étapes :

- Usinage des différentes plaques (Figure A 10) grâce à une fraiseuse Charly4U, à partir de plaques de COC de 3 épaisseurs : 1, 2 et 3,14mm.



**Figure A 10 : Les 3 plaques utilisées pour les dispositifs de mesures de conductivité, après usinage.**

- Nettoyage des cartes : rinçage avec de l'eau DI et de l'éthanol, puis trempage 10min dans une solution Piranha (eau oxygéné 45% 1 : 3 acide sulfurique 96%), pour finir, rinçage abondant sous l'eau DI. Cette stratégie de nettoyage est adaptée des travaux de Lee et al. [185].
- Evaporation des pistes d'or : dépôt d'épaisseur 150nm à la vitesse de 0,5nm/s avec un évaporateur PLASSYS à travers un masque découpé avec une Craft ROBO dans un film plastique (Figure A 11).



**Figure A 11 : Positionnement du film plastique servant de masque pour l'évaporation d'or sur la 1<sup>ère</sup> plaque de COC utilisées pour les dispositifs de mesures de conductivité.**

- Scellement thermique des différentes couches à 127°C pendant 120min sous pression mécanique.
- Reprise d'usinage pour séparer les différentes puces réalisées dans une même plaque de COC (Figure A 12).

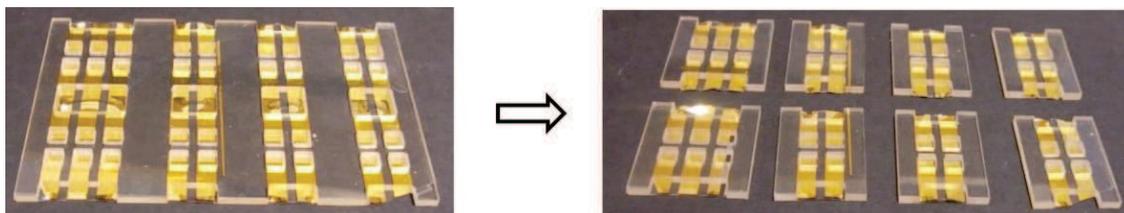


Figure A 12 : Plaque de COC scellée avant et après reprise d'usinage pour les dispositifs à puits classiques.

- Nettoyage des puces : rinçage avec de l'eau DI et de l'éthanol, puis trempage pendant 10min dans l'acétone bouillant puis 10min dans un mélange eau oxygéné 1 : 3 KOH 50mM, pour finir rinçage abondant sous l'eau DI. Cette stratégie de nettoyage est adaptée des travaux de Heiskanen et al [186].



# Bibliographie

# Bibliographie

1. Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales, *Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2012*, 2013. p. 181.
2. European Centre for Disease Prevention and Control, *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. 2015.
3. O'Neill, J., *Rapid diagnostics: stopping unnecessary use of antibiotics*. Review on antimicrobial resistance, 2015.
4. European Centre for Disease Prevention and Control, *SURVEILLANCE REPORT - Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals*. 2011-2012.
5. Cystic Fibrosis Foundation, *Patient Registry - Annual Data Report to the Center Directors 2013*, 2013.
6. Mark, E.J.W. and G.-S. Sonya, *Host Range and Emerging and Reemerging Pathogens*. Emerging Infectious Disease journal, 2005. 11(12): p. 1842.
7. Wayne, L.G., et al., *Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1987. 37(4): p. 463-464.
8. Madigan, M.T., J.M. Martinko, and T.D. Brock, *Brock biology of microorganisms* 2006, Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall.
9. Kumar, A., et al., *Initiation of Inappropriate Antimicrobial Therapy Results in a Fivefold Reduction of Survival in Human Septic Shock*. Chest, 2009. 136(5): p. 1237-1248.
10. Edwards, B. and I.M. Gould, *Antimicrobial stewardship: lessons from human healthcare*. Rev Sci Tech, 2012. 31(1): p. 135-44.
11. Janda, J.M. and S.L. Abbott, *Bacterial identification for publication: When is enough enough?* Journal of Clinical Microbiology, 2002. 40(6): p. 1887-1891.
12. Sauer, S. and M. Kliem, *Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria*. Nature Reviews Microbiology, 2010. 8(1): p. 74-82.
13. Carbonnelle, E., et al., *MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory*. Clinical Biochemistry, 2011. 44(1): p. 104-109.
14. Notomi, T., et al., *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*. Nucleic acids research, 2000. 28(12).
15. Piepenburg, O., et al., *DNA detection using recombination proteins*. PLoS Biology, 2006. 4(7): p. 1115-1121.
16. Pahlow, S., et al., *Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2015. 89: p. 105-120.
17. Strola, S.A., et al. *Differentiating the growth phases of single bacteria using Raman spectroscopy*. in *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE*. 2014.
18. Baritoux, J.C., et al. *Fast and robust identification of single bacteria in environmental matrices by Raman spectroscopy*. in *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE*. 2015.
19. Marcoux, P.R., et al., *Optical forward-scattering for identification of bacteria within microcolonies*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014. 98(5): p. 2243-2254.
20. Genuer, V., et al. *Optical elastic scattering for early label-free identification of clinical pathogens*. in *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE*. 2016.
21. Wehmhöner, D., et al., *Inter- and intracolonial diversity of the Pseudomonas aeruginosa proteome manifests within the secretome*. Journal of Bacteriology, 2003. 185(19): p. 5807-5814.
22. Bos, L.D.J., P.J. Sterk, and M.J. Schultz, *Volatile Metabolites of Pathogens: A Systematic Review*. PLoS Pathog, 2013. 9(5): p. e1003311.
23. Turner, A.P.F. and N. Magan, *Electronic noses and disease diagnostics*. Nature Reviews Microbiology, 2004. 2(2): p. 160-166.
24. Guillemot, L.H., et al., *Facile and fast detection of bacteria via the detection of exogenous volatile metabolites released by enzymatic hydrolysis*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2013. 15(38): p. 15840-15844.

25. Vrignaud, M., et al. *Functionalized nanoporous materials for volatile metabolites monitoring with direct optical transduction*. in *Proceedings of IEEE Sensors*. 2014.
26. Sibbald, M.J.J.B., et al., *Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006. 70(3): p. 755-788.
27. Miller, M.B. and B.L. Bassler, *Quorum sensing in bacteria*, in *Annual Review of Microbiology* 2001. p. 165-199.
28. European Centre for Disease Prevention and Control, *SURVEILLANCE REPORT - Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European long-term care facilities*, 2013.
29. England, P.H. and N.H. Service, *UK Standards for Microbiology Investigations: Identification of Pseudomonas species and other Non-Glucose Fermenters*, 2015.
30. McKnight, S.L., B.H. Iglewski, and E.C. Pesci, *The Pseudomonas Quinolone Signal Regulates rhl Quorum Sensing in Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 2000. 182(10): p. 2702-2708.
31. Lépine, F., et al., *A stable isotope dilution assay for the quantification of the Pseudomonas quinolone signal in Pseudomonas aeruginosa cultures*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2003. 1622(1): p. 36-41.
32. Diggle, S.P., et al., *Functional Genetic Analysis Reveals a 2-Alkyl-4-Quinolone Signaling System in the Human Pathogen Burkholderia pseudomallei and Related Bacteria*. *Chemistry & Biology*, 2006. 13(7): p. 701-710.
33. Dong, Y.-H., L.-H. Wang, and L.-H. Zhang, *Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2007. 362(1483): p. 1201-1211.
34. Pustelny, C., et al., *Dioxygenase-Mediated Quenching of Quinolone-Dependent Quorum Sensing in Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & Biology*, 2009. 16(12): p. 1259-1267.
35. Déziel, E., et al., *The contribution of MvfR to Pseudomonas aeruginosa pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhlRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones*. *Molecular Microbiology*, 2005. 55(4): p. 998-1114.
36. Kesarwani, M., et al., *A Quorum Sensing Regulated Small Volatile Molecule Reduces Acute Virulence and Promotes Chronic Infection Phenotypes*. *PLoS Pathog*, 2011. 7(8): p. e1002192.
37. Bandyopadhyaya, A., et al., *The Quorum Sensing Volatile Molecule 2-Amino Acetophenone Modulates Host Immune Responses in a Manner that Promotes Life with Unwanted Guests*. *PLOS Pathogens*, 2012. 8(11).
38. Aendekerck, S., et al., *The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in Pseudomonas aeruginosa via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication*. *Microbiology*, 2005. 151(4): p. 1113-1125.
39. Lee, D.G., et al., *Genomic analysis reveals that Pseudomonas aeruginosa virulence is combinatorial*. *Genome Biology*, 2006. 7(10): p. 1-14.
40. Bezuidt, O.K., et al., *Intraclonal genome diversity of Pseudomonas aeruginosa clones CHA and TB*. *BMC Genomics*, 2013. 14(1): p. 1-15.
41. Yong, Y.-C., et al., *Bioelectricity enhancement via overexpression of quorum sensing system in Pseudomonas aeruginosa-inoculated microbial fuel cells*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011. 30(1): p. 87-92.
42. Qiao, Y., et al., *Real-time monitoring of phenazines excretion in Pseudomonas aeruginosa microbial fuel cell anode using cavity microelectrodes*. *Bioresource Technology*, 2015. 198: p. 1-6.
43. Das, K. and A.K. Mukherjee, *Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India*. *Bioresource Technology*, 2007. 98(7): p. 1339-1345.
44. Al-Tahhan, R.A., et al., *Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from Pseudomonas aeruginosa: Effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000. 66(8): p. 3262-3268.
45. Rahme, L., et al., *Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals*. *Science*, 1995. 268(5219): p. 1899-1902.
46. Bleves, S., et al., *Protein secretion systems in Pseudomonas aeruginosa: A wealth of pathogenic weapons*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2010. 300(8): p. 534-543.
47. Nadal Jimenez, P., et al., *The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2012. 76(1): p. 46-65.

48. Diggle, S.P., et al., *4-Quinolone signalling in Pseudomonas aeruginosa: Old molecules, new perspectives*. International Journal of Medical Microbiology, 2006. 296: p. 83-91.
49. Lépine, F., et al., *Electrospray/mass spectrometric identification and analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) produced by Pseudomonas aeruginosa*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2004. 15(6): p. 862-869.
50. Cao, H., et al., *A quorum sensing-associated virulence gene of Pseudomonas aeruginosa encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. 98(25): p. 14613-14618.
51. Diggle, S.P., et al., *The Pseudomonas aeruginosa quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR*. Molecular Microbiology, 2003. 50(1): p. 29-43.
52. Bredenbruch, F., et al., *The Pseudomonas aeruginosa quinolone signal (PQS) has an iron-chelating activity*. Environmental Microbiology, 2006. 8(8): p. 1318-1329.
53. Calfee, M.W., et al., *Solubility and Bioactivity of the Pseudomonas Quinolone Signal Are Increased by a Pseudomonas aeruginosa-Produced Surfactant*. Infection and Immunity, 2005. 73(2): p. 878-882.
54. Zhou, L., et al., *Analysis of pseudomonas quinolone signal and other bacterial signalling molecules using capillaries coated with highly charged polyelectrolyte monolayers and boron doped diamond electrode*. Journal of Chromatography A, 2012. 1251(0): p. 169-175.
55. Häussler, S. and T. Becker, *The Pseudomonas Quinolone Signal (PQS) Balances Life and Death in Pseudomonas aeruginosa Populations*. PLOS Pathogens, 2008. 4(9): p. e1000166.
56. Palmer, K.L., L.M. Aye, and M. Whiteley, *Nutritional Cues Control Pseudomonas aeruginosa Multicellular Behavior in Cystic Fibrosis Sputum*. Journal of Bacteriology, 2007. 189(22): p. 8079-8087.
57. Jensen, V., et al., *RhlR expression in Pseudomonas aeruginosa is modulated by the Pseudomonas quinolone signal via PhoB-dependent and -independent pathways*. Journal of Bacteriology, 2006. 188(24): p. 8601-8606.
58. Zhou, L., et al., *Detection of the Pseudomonas Quinolone Signal (PQS) by cyclic voltammetry and amperometry using a boron doped diamond electrode*. Chemical Communications, 2011. 47(37): p. 10347-10349.
59. Seviour, T., et al., *Voltammetric profiling of redox-active metabolites expressed by Pseudomonas aeruginosa for diagnostic purposes*. Chemical Communications, 2015. 51(18): p. 3789-3792.
60. Ortori, C.A., et al., *Simultaneous quantitative profiling of N-acyl-L-homoserine lactone and 2-alkyl-4(1H)-quinolone families of quorum-sensing signaling molecules using LC-MS/MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. 399(2): p. 839-850.
61. Friedheim, E. and L. Michaelis, *POTENTIOMETRIC STUDY OF PYOCYANINE*. Journal of Biological Chemistry, 1931. 91(1): p. 355-368.
62. Morrison, M.M., et al., *Flavin model systems. 1. The electrochemistry of 1-hydroxyphenazine and pyocyanine in aprotic solvents*. Journal of the American Chemical Society, 1978. 100(1): p. 207-211.
63. Mavrodi, D.V., et al., *Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from Pseudomonas aeruginosa PAO1*. Journal of Bacteriology, 2001. 183(21): p. 6454-6465.
64. Ohfuji, K., et al., *Construction of a glucose sensor based on a screen-printed electrode and a novel mediator pyocyanin from Pseudomonas aeruginosa*. Biosensors and Bioelectronics, 2004. 19(10): p. 1237-1244.
65. Pierson, L., III and E. Pierson, *Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010. 86(6): p. 1659-1670.
66. Price-Whelan, A., L.E.P. Dietrich, and D.K. Newman, *Rethinking 'secondary' metabolism: Physiological roles for phenazine antibiotics*. Nature Chemical Biology, 2006. 2(2): p. 71-78.
67. Lau, G.W., et al., *The role of pyocyanin in Pseudomonas aeruginosa infection*. Trends in Molecular Medicine, 2004. 10(12): p. 599-606.
68. Liu, G.Y. and V. Nizet, *Color me bad: microbial pigments as virulence factors*. Trends in Microbiology, 2009. 17(9): p. 406-413.
69. Kim, E., et al., *Amplified and in Situ Detection of Redox-Active Metabolite Using a Biobased Redox Capacitor*. Analytical Chemistry, 2013. 85(4): p. 2102-2108.

70. Dekimpe, V. and E. Déziel, *Revisiting the quorum-sensing hierarchy in Pseudomonas aeruginosa: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors*. *Microbiology*, 2009. 155(3): p. 712-723.
71. Dietrich, L.E.P., et al., *The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 2006. 61(5): p. 1308-1321.
72. Lundgren, B.R., et al., *Gene PA2449 is essential for glycine metabolism and pyocyanin biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa PAO1*. *Journal of Bacteriology*, 2013. 195(9): p. 2087-2100.
73. Das, T. and M. Manefield, *Pyocyanin Promotes Extracellular DNA Release in Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 2012. 7(10): p. e46718.
74. Déziel, E., et al., *Analysis of Pseudomonas aeruginosa 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. 101(5): p. 1339-1344.
75. Vukomanovic, D.V., et al., *Analysis of pyocyanin from Pseudomonas aeruginosa by adsorptive stripping voltammetry*. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 1996. 36(2): p. 97-102.
76. Wang, Y. and D.K. Newman, *Redox Reactions of Phenazine Antibiotics with Ferric (Hydr)oxides and Molecular Oxygen*. *Environmental Science & Technology*, 2008. 42(7): p. 2380-2386.
77. Bukelman, O., et al., *Electrochemical analysis of quorum sensing inhibition*. *Chemical Communications*, 2009(20): p. 2836-2838.
78. Sharp, D., et al., *Approaching intelligent infection diagnostics: Carbon fibre sensor for electrochemical pyocyanin detection*. *Bioelectrochemistry*, 2010. 77(2): p. 114-119.
79. Koley, D., et al., *Discovery of a biofilm electrocline using real-time 3D metabolite analysis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011. 108(50): p. 19996-20001.
80. Connell, J.L., et al., *Real-time monitoring of quorum sensing in 3D-printed bacterial aggregates using scanning electrochemical microscopy*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014. 111(51): p. 18255-18260.
81. Bellin, D.L., et al., *Integrated circuit-based electrochemical sensor for spatially resolved detection of redox-active metabolites in biofilms*. *Nature Communications*, 2014. 5.
82. Bellin, D.L., et al., *Electrochemical camera chip for simultaneous imaging of multiple metabolites in biofilms*. *Nature Communications*, 2016. 7.
83. Webster, T.A., et al., *Electrochemical detection of Pseudomonas aeruginosa in human fluid samples via pyocyanin*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014. 60(0): p. 265-270.
84. Sismaet, H.J., T.A. Webster, and E.D. Goluch, *Up-regulating pyocyanin production by amino acid addition for early electrochemical identification of Pseudomonas aeruginosa*. *Analyst*, 2014. 139(17): p. 4241-4246.
85. Sismaet, H.J., et al., *Electrochemical detection of Pseudomonas in wound exudate samples from patients with chronic wounds*. *Wound Repair and Regeneration*, 2016.
86. Hansford, G.S., F.G. Holliman, and R.B. Herbert, *Pigments of Pseudomonas species. Part IV. in vitro and in vivo Conversion of 5-methylphenazinium-1-carboxylate into aeruginosin A*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1972(0): p. 103-105.
87. Abu, E.A., et al., *Cyclic voltammetric, fluorescence and biological analysis of purified aeruginosin A, a secreted red pigment of Pseudomonas aeruginosa PAO*. *Microbiology (United Kingdom)*, 2013. 159(8): p. 1736-1747.
88. Scott-Thomas, A.J., et al., *2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for Pseudomonas aeruginosa in the cystic fibrosis lung*. *BMC Pulmonary Medicine*, 2010. 10(56).
89. Cox, C.D. and J. Parker, *Use of 2-aminoacetophenone production in identification of Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1979. 9(4): p. 479-484.
90. Stratan, N.V., E.P. Koval'chuk, and J. Blazejowski, *Synthesis, structure, and properties of isomeric polyaminoacetophenones*. *Russian Journal of General Chemistry*, 2004. 74(12): p. 1900-1906.
91. Metters, J.P., D.K. Kampouris, and C.E. Banks, *Electrochemistry provides a point-of-care approach for the marker indicative of Pseudomonas aeruginosa infection of cystic fibrosis patients*. *Analyst*, 2014. 139(16): p. 3999-4004.
92. Buzid, A., et al., *Molecular Signature of Pseudomonas aeruginosa with Simultaneous Nanomolar Detection of Quorum Sensing Signaling Molecules at a Boron-Doped Diamond Electrode*. *Scientific reports*, 2016. 6: p. 30001.

93. Váradi, L., et al.,  *$\beta$ -Alanyl aminopeptidase-activated fluorogenic probes for the rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples*. RSC Advances, 2016. 6(64): p. 58884-58889.
94. Lentini, G., et al., *Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* by phage-capture system coupled with micro-Raman spectroscopy*. Vibrational Spectroscopy, 2016. 86: p. 1-7.
95. Reyes, E.A., et al., *Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by pyocyanin production on Tech agar*. Journal of Clinical Microbiology, 1981. 13(3): p. 456-458.
96. Ingram, J.M. and A.C. Blackwood, *Microbial Production of Phenazines*, in *Advances in Applied Microbiology*, D. Perlman, Editor 1970, Academic Press. p. 267-282.
97. Rutherford, S.T. and B.L. Bassler, *Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2012. 2(11).
98. Shang, F., et al., *One step preparation and electrochemical analysis of IQS, a cell-cell communication signal in the nosocomial pathogen *Pseudomonas aeruginosa**. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2014. 24(19): p. 4703-4707.
99. Oziat, J., et al. *Electrochemistry provides a simple way to monitor *Pseudomonas aeruginosa* metabolites*. in *Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2015 37th Annual International Conference of the IEEE*. 2015.
100. Fortin, E., et al., *Nucleosides and ODN electrochemical detection onto boron doped diamond electrodes*. Bioelectrochemistry, 2004. 63(1-2): p. 303-306.
101. Toussaint, B., I. Delicattree, and P.M. Vignais, **Pseudomonas aeruginosa* Contains an IHF-like Protein That Binds to the *algD* Promoter*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993. 196(1): p. 416-421.
102. Coleman, J.P., et al., **Pseudomonas aeruginosa* PqsA is an anthranilate-coenzyme A ligase*. Journal of Bacteriology, 2008. 190(4): p. 1247-1255.
103. Bala, A., et al., *Detection and quantification of quinolone signalling molecule: A third quorum sensing molecule of *Pseudomonas aeruginosa* by high performance-thin layer chromatography*. Journal of Chromatography B, 2013. 930(0): p. 30-35.
104. Boes, N., K. Schreiber, and M. Schobert, **SpoT*-Triggered Stringent Response Controls *usp* Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa**. Journal of Bacteriology, 2008. 190(21): p. 7189-7199.
105. Sall, K.M., et al., *A *gacS* deletion in *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate CHA shapes its virulence*. PLoS ONE, 2014. 9(4).
106. Elschner, A., et al., *PEDOT: Principles and Applications of an Intrinsically Conductive Polymer* 2010: Taylor & Francis.
107. Asplund, M., et al., *Toxicity evaluation of PEDOT/biomolecular composites intended for neural communication electrodes*. Biomedical Materials, 2009. 4(4): p. 045009.
108. Kumar, S.S., et al., *Simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid on poly(3,4-ethylenedioxythiophene) modified glassy carbon electrode*. Journal of Solid State Electrochemistry, 2005. 10(11): p. 905-913.
109. Monge-Romero, I.C. and M.F. Suárez-Herrera, *Electrocatalysis of the hydroquinone/benzoquinone redox couple at platinum electrodes covered by a thin film of poly(3,4-ethylenedioxythiophene)*. Synthetic Metals, 2013. 175: p. 36-41.
110. Heras, M.A., et al., *A poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrene sulphonate) composite electrode coating in the electrooxidation of phenol*. Electrochimica Acta, 2005. 50(7-8): p. 1685-1691.
111. Khodagholy, D., et al., *In vivo recordings of brain activity using organic transistors*. Nature Communications, 2013. 4: p. 1575.
112. Jimison, L.H., et al., *Measurement of Barrier Tissue Integrity with an Organic Electrochemical Transistor*. Advanced Materials, 2012. 24(44): p. 5919-5923.
113. Huerta, M., et al., *Early Detection of Nephrotoxicity In Vitro Using a Transparent Conducting Polymer Device*. Applied In Vitro Toxicology, 2016. 2(1): p. 17-25.
114. Khodagholy, D., et al., *Organic electrochemical transistor incorporating an ionogel as a solid state electrolyte for lactate sensing*. Journal of Materials Chemistry, 2012. 22(10): p. 4440-4443.
115. Scheiblin, G., et al., *Screen-printed organic electrochemical transistors for metabolite sensing*. MRS Communications, 2015. 5(03): p. 507-511.
116. Takamatsu, S., et al., *Direct patterning of organic conductors on knitted textiles for long-term electrocardiography*. Scientific reports, 2015. 5: p. 15003.
117. Takamatsu, S., et al., *Wearable Keyboard Using Conducting Polymer Electrodes on Textiles*. Advanced Materials, 2016. 28(22): p. 4485-4488.

118. Tybrandt, K., S.B. Kollipara, and M. Berggren, *Organic electrochemical transistors for signal amplification in fast scan cyclic voltammetry*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2014. 195(0): p. 651-656.
119. Jiang, C., G. Chen, and X. Wang, *High-conversion synthesis of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) by chemical oxidative polymerization*. Synthetic Metals, 2012. 162(21–22): p. 1968-1971.
120. Skorenko, K.H., et al., *Vapor phase polymerization and mechanical testing of highly electrically conductive poly(3,4-ethylenedioxythiophene) for flexible devices*. Synthetic Metals, 2015. 209: p. 297-303.
121. Groenendaal, L., et al., *Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and its derivatives: past, present, and future*. Advanced Materials, 2000. 12(7): p. 481-494.
122. Martin, D.C., et al., *The Morphology of Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene)*. Polymer Reviews, 2010. 50(3): p. 340-384.
123. Bobacka, J., A. Lewenstam, and A. Ivaska, *Electrochemical impedance spectroscopy of oxidized poly(3,4-ethylenedioxythiophene) film electrodes in aqueous solutions*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2000. 489(1): p. 17-27.
124. Zhu, M., et al., *Simple approach for the fabrication of PEDOT-coated Si nanowires*. Beilstein Journal of Nanotechnology, 2015. 6: p. 640-650.
125. Kroon, R., et al., *Thermoelectric plastics: from design to synthesis, processing and structure-property relationships*. Chemical Society Reviews, 2016.
126. Nardes, A.M., et al., *Microscopic Understanding of the Anisotropic Conductivity of PEDOT:PSS Thin Films*. Advanced Materials, 2007. 19(9): p. 1196-1200.
127. Ouyang, J., et al., *On the mechanism of conductivity enhancement in poly(3,4-ethylenedioxythiophene):poly(styrene sulfonate) film through solvent treatment*. Polymer, 2004. 45(25): p. 8443-8450.
128. Strakosas, X., et al., *A facile biofunctionalisation route for solution processable conducting polymer devices*. Journal of Materials Chemistry B, 2014. 2(17): p. 2537-2545.
129. Stavrinidou, E., et al., *Direct Measurement of Ion Mobility in a Conducting Polymer*. Advanced Materials, 2013. 25(32): p. 4488-4493.
130. Zhang, S., et al., *Solvent-induced changes in PEDOT:PSS films for organic electrochemical transistors*. APL Materials, 2015. 3(1): p. 014911.
131. Yamato, H., M. Ohwa, and W. Wernet, *Stability of polypyrrole and poly(3,4-ethylenedioxythiophene) for biosensor application*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1995. 397(1–2): p. 163-170.
132. Łapkowski, M. and A. Proń, *Electrochemical oxidation of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) — “in situ” conductivity and spectroscopic investigations*. Synthetic Metals, 2000. 110(1): p. 79-83.
133. MacDiarmid, A.G., *“Synthetic metals”: A novel role for organic polymers (Nobel lecture)*. Angewandte Chemie - International Edition, 2001. 40(14): p. 2581-2590.
134. Michalska, A. and K. Maksymiuk, *All-plastic, disposable, low detection limit ion-selective electrodes*. Analytica Chimica Acta, 2004. 523(1): p. 97-105.
135. Tsakova, V., G. Ilieva, and D. Filjova, *Role of the anionic dopant of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) for the electroanalytical performance: electrooxidation of acetaminophen*. Electrochimica Acta, 2015. 179: p. 343-349.
136. Belaidi, F.S., et al., *PEDOT-modified integrated microelectrodes for the detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid*. Sensors and Actuators, B: Chemical, 2015. 214: p. 1-9.
137. Esrafilzadeh, D., et al., *Multifunctional conducting fibres with electrically controlled release of ciprofloxacin*. Journal of Controlled Release, 2013. 169(3): p. 313-320.
138. de Levie, R., *On porous electrodes in electrolyte solutions—IV*. Electrochimica Acta, 1964. 9(9): p. 1231-1245.
139. Proctor, C.M., J. Rivnay, and G.G. Malliaras, *Understanding volumetric capacitance in conducting polymers*. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 2016. 54(15): p. 1433-1436.
140. Rivnay, J., et al., *High-performance transistors for bioelectronics through tuning of channel thickness*. Science Advances, 2015. 1(4).
141. Lin, J.M., et al., *Strong adsorption characteristics of a novel overoxidized poly(3,4-ethylenedioxythiophene) film and application for dopamine sensing*. Electrochimica Acta, 2014. 149: p. 65-75.
142. McNaught, A.D. and A. Wilkinson, *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the “Gold Book”)1997*, Oxford: Blackwell Scientific Publications.

143. Yang, J., K. Lipkin, and D.C. Martin, *Electrochemical fabrication of conducting polymer poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) nanofibrils on microfabricated neural prosthetic devices*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2007. 18(8): p. 1075-1089.
144. Nambiar, S.R., P.K. Aneesh, and T.P. Rao, *Ultrasensitive voltammetric determination of catechol at a gold atomic cluster/poly(3,4-ethylenedioxythiophene) nanocomposite electrode*. Analyst, 2013. 138(17): p. 5031-5038.
145. Xu, F., et al., *Three dimensional macroporous poly(3,4-ethylenedioxythiophene) structure: Electrodeposited preparation and sensor application*. Electrochimica Acta, 2014. 150: p. 223-231.
146. Zhao, Q., et al., *Binder-free porous PEDOT electrodes for flexible supercapacitors*. Journal of Applied Polymer Science, 2015. 132(41): p. n/a-n/a.
147. Hsiao, Y.-S., et al., *3D Bioelectronic Interface: Capturing Circulating Tumor Cells onto Conducting Polymer-Based Micro/Nanorod Arrays with Chemical and Topographical Control*. Small, 2014. 10(15): p. 3012-3017.
148. Park, S.H., et al., *Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene) Inverse Opal Electrode Fabricated from Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene):Poly(Styrene Sulfonate)-Filled Polystyrene Template for Dye-Sensitized Solar Cells*. Electrochimica Acta, 2014. 137(0): p. 661-667.
149. Bolin, M.H., et al., *Nano-fiber scaffold electrodes based on PEDOT for cell stimulation*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2009. 142(2): p. 451-456.
150. Laforgue, A. and L. Robitaille, *Production of conductive PEDOT nanofibers by the combination of electrospinning and vapor-phase polymerization*. Macromolecules, 2010. 43(9): p. 4194-4200.
151. Choi, J., et al., *Electrospun PEDOT:PSS/PVP nanofibers as the chemiresistor in chemical vapour sensing*. Synthetic Metals, 2010. 160(13-14): p. 1415-1421.
152. Zhang, X., et al., *Conducting polymer aerogels from supercritical CO<sub>2</sub> drying PEDOT-PSS hydrogels*. Journal of Materials Chemistry, 2010. 20(24): p. 5080-5085.
153. Xu, Y., et al., *Emulsion template synthesis of all conducting polymer aerogels with superb adsorption capacity and enhanced electrochemical capacitance*. Journal of Materials Chemistry, 2012. 22(17): p. 8579-8584.
154. Zhang, X., C. Li, and Y. Luo, *Aligned/unaligned conducting polymer cryogels with three-dimensional macroporous architectures from ice-segregation-induced self-assembly of PEDOT-PSS*. Langmuir, 2011. 27(5): p. 1915-1923.
155. Ranjusha, R., et al., *Supercapacitors based on freeze dried MnO<sub>2</sub> embedded PEDOT: PSS hybrid sponges*. Microporous and Mesoporous Materials, 2014. 186(0): p. 30-36.
156. Wan, A.M.-D., et al., *3D conducting polymer platforms for electrical control of protein conformation and cellular functions*. Journal of Materials Chemistry B, 2015.
157. Zhao, Z., et al., *Compressible, electrically conductive, fibre-like, three-dimensional PEDOT-based composite aerogels towards energy storage applications*. Composites Science and Technology, 2016. 127: p. 36-46.
158. Skotheim, T.A. and J. Reynolds, *Conjugated Polymers: Theory, Synthesis, Properties, and Characterization*. Handbook of Conducting Polymers, Third Edition 2006: CRC Press
159. Tuttle, G., *Contact resistance and TLM measurements*, Department of Electrical and Computer Engineering, Iowa State University.
160. Kim, Y.H., et al., *Highly Conductive PEDOT:PSS Electrode with Optimized Solvent and Thermal Post-Treatment for ITO-Free Organic Solar Cells*. Advanced Functional Materials, 2011. 21(6): p. 1076-1081.
161. Alemu, D., et al., *Highly conductive PEDOT:PSS electrode by simple film treatment with methanol for ITO-free polymer solar cells*. Energy & Environmental Science, 2012. 5(11): p. 9662-9671.
162. Nguyen, T.P., et al., *Chemical and thermal treatment of PEDOT:PSS thin films for use in organic light emitting diodes*. Surface and Coatings Technology, 2004. 180-181(0): p. 646-649.
163. Dimitriev, O.P., et al., *PEDOT:PSS films—Effect of organic solvent additives and annealing on the film conductivity*. Synthetic Metals, 2009. 159(21-22): p. 2237-2239.
164. Kim, S., J.M. Ko, and I.J. Chung, *Electrical conductivity change of polyaniline-dodecyl benzene sulfonic acid complex with temperature*. Polymers for Advanced Technologies, 1996. 7(7): p. 599-603.
165. Nevrela, J., et al., *Secondary doping in poly(3,4-ethylenedioxythiophene): Poly(4-styrenesulfonate) thin films*. Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics, 2015.
166. Garreau, S., et al., *In Situ Spectroelectrochemical Raman Studies of Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDT)*. Macromolecules, 1999. 32(20): p. 6807-6812.

167. Xu, C.Y., P.X. Zhang, and L. Yan, *Blue shift of Raman peak from coated TiO<sub>2</sub> nanoparticles*. Journal of Raman Spectroscopy, 2001. 32(10): p. 862-865.
168. Jalili, R., et al., *One-Step Wet-Spinning Process of Poly(3,4-ethylenedioxythiophene):Poly(styrenesulfonate) Fibers and the Origin of Higher Electrical Conductivity*. Advanced Functional Materials, 2011. 21(17): p. 3363-3370.
169. Im, S.G. and K.K. Gleason, *Systematic Control of the Electrical Conductivity of Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) via Oxidative Chemical Vapor Deposition*. Macromolecules, 2007. 40(18): p. 6552-6556.
170. Gabrielli, C., O. Haas, and H. Takenouti, *Impedance analysis of electrodes modified with a reversible redox polymer film*. Journal of Applied Electrochemistry, 1987. 17(1): p. 82-90.
171. Keiser, H., K.D. Beccu, and M.A. Gutjahr, *Abschätzung der porenstruktur poröser elektroden aus impedanzmessungen*. Electrochimica Acta, 1976. 21(8): p. 539-543.
172. Song, H.-K., et al., *Electrochemical impedance spectroscopy of porous electrodes: the effect of pore size distribution*. Electrochimica Acta, 1999. 44(20): p. 3513-3519.
173. Lasia, A., *Modeling of Impedance of Porous Electrodes*, in *Modeling and Numerical Simulations* 2009, Springer New York. p. 67-137.
174. Lasia, A., in *Modern Aspects of Electrochemistry*, E.I.S.a.i. Applications, Editor 1999, Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York. p. p. 143-248.
175. Heinze, J., *Determination of Diffusion Coefficients by Electrochemical Current-Time Measurements*. Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie, 1980. 84(8): p. 785-789.
176. Micromeritics, *PoreSizer 9320, Autopore II 9220, Data collection, reduction and presentation*, 1993.
177. Jehl, F. and E. Twizeyimana, *Sensibilité des bactéries aux antibiotiques: les CMI sont complémentaires de l'antibiogramme*. Revue Francophone des Laboratoires, 2015. 2015(476): p. 47-61.
178. James Cook University *Biological Sample Preparation for the SEM*. [cited 2016; Available from: <https://research.jcu.edu.au/archive/enabling/aac/cairns-aac/biological-sample-preparation-for-the-sem>.
179. Higgins, S.R., et al., *Towards a hybrid anaerobic digester-microbial fuel cell integrated energy recovery system: An overview of the development of an electrogenic biofilm*. Enzyme and Microbial Technology, 2013. 52(6-7): p. 344-351.
180. Bouguelia, S., *Développement de biopuces dédiées à la détection et quantification de bactéries pathogènes à faibles taux*, 2012, UNIVERSITÉ DE GRENOBLE.
181. *Nutrition and Growth of Bacteria (page 4)* [cited 2016; Available from: [http://textbookofbacteriology.net/nutgro\\_4.html](http://textbookofbacteriology.net/nutgro_4.html).
182. Biopharma Proces Systems, *5 Common Misconceptions in Freze Drying*. 2012.
183. Biopharma Proces Systems, *5 More Misconceptions in Freze Drying*. 2013.
184. Deville, S., *Ice-templating, freeze casting: Beyond materials processing*. Journal of Materials Research, 2013. 28(17): p. 2202-2219.
185. Lee, D.S., et al., *Wafer-scale fabrication of polymer-based microdevices via injection molding and photolithographic micropatterning protocols*. Analytical Chemistry, 2005. 77(16): p. 5414-5420.
186. Heiskanen, A.R., et al., *Monitoring of Saccharomyces cerevisiae cell proliferation on thiol-modified planar gold microelectrodes using impedance spectroscopy*. Langmuir, 2008. 24(16): p. 9066-9073.



NNT : 2016LYSEM026

Julie OZIAT

PEDOT:PSS 3D electrodes for detection of *Pseudomonas aeruginosa*  
electroactive metabolites

Speciality : Microelectronics

Keywords : electrochemistry, bacteria, quorum sensing, conductive polymer, 3D electrode

Abstract :

During infections, microorganisms fast identification is critical to improve patient treatment and to better manage antibiotics use. Electrochemistry exhibits several advantages for rapid diagnostic: it enables easy, cheap and *in situ* analysis in most liquids. Its use for bacterial identification is recent and comes from the discovery of molecules giving strong redox signals in the bacterial supernatant of the *Pseudomonas* genus.

This thesis focuses on the supernatants analysis of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. This bacteria is the fourth cause of nosocomial infections in Europe. First, the interest of supernatants electrochemical analysis for identification was evaluated. For this, after the study of four redox biomarkers of this bacterium in model solutions, supernatant electrochemical analysis of several strains of *P. aeruginosa* was performed. The results are promising. They highlight a complex strain-dependant electrochemical signature of the supernatant.

Following, we focused in the amplification of the electrochemical detection through the use of the conductive polymer PEDOT: PSS. This polymer was chosen for its good electrochemical properties, its biocompatibility and its easy shaping. It was first used as a thin films to confirm its amplification power through biomarker adsorption. Then, a 3D electrode was made by freeze drying. The use of this type of electrode can further amplify the detection by increasing the exchange surface as well as confining the bacteria in the electrode.

NNT : 2016LYSEM026

Julie OZIAT

Electrode 3D de PEDOT:PSS pour la détection de métabolites électrochimiquement actifs de *Pseudomonas aeruginosa*

Spécialité: Microélectronique

Mots clefs : électrochimie, bactérie, quorum sensing, polymère conducteur, électrode 3D

Résumé :

Lors d'infections, l'identification rapide des micro-organismes est cruciale pour améliorer la prise en charge du patient et mieux contrôler l'usage des antibiotiques. L'électrochimie présente plusieurs avantages pour les tests rapides : elle permet des analyses *in situ*, faciles et peu chères dans la plupart des liquides. Son utilisation pour l'identification bactérienne est récente et provient de la découverte de molécules donnant de forts signaux redox dans le surnageant de bactéries du genre *Pseudomonas*.

Cette thèse s'intéresse à l'analyse de surnageants de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, 4<sup>e</sup> cause de maladies nosocomiales en Europe. Tout d'abord, l'intérêt de l'analyse électrochimique de surnageants de culture dans une visée d'identification a été évalué. Pour cela, après l'étude de 4 potentiels biomarqueurs de la présence de cette bactérie en solutions modèles, l'analyse électrochimiques de surnageant de plusieurs souches *P. aeruginosa* a été effectuée. Les résultats obtenus sont prometteurs. Ils mettent en évidence une signature électrochimique complexe et souche-dépendante du surnageant.

La suite de la thèse s'est intéressée à l'amplification de la détection électrochimique grâce à l'utilisation du polymère conducteur PEDOT:PSS. Il a été choisi pour ses bonnes propriétés électrochimiques, sa biocompatibilité et sa facilité de mise en forme. Il a tout d'abord été utilisé sous forme de films minces pour confirmer son pouvoir d'amplification. Une électrode 3D a ensuite été fabriquée par lyophilisation. L'utilisation de ce type d'électrode permet d'amplifier encore la détection en augmentant la surface d'échange mais aussi en confinant les bactéries dans l'électrode.