



HAL
open science

Modification de l'Isatine pour la fabrication de biocapteurs

Cécile Soullignac

► **To cite this version:**

Cécile Soullignac. Modification de l'Isatine pour la fabrication de biocapteurs. Chimie organique. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMR027 . tel-01836312

HAL Id: tel-01836312

<https://theses.hal.science/tel-01836312>

Submitted on 12 Jul 2018

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Chimie

Préparée au sein de « Université de Rouen Normandie »

Modification de l'Isatine pour la fabrication de Biocapteurs

**Présentée et soutenue par
Cécile SOULIGNAC**

**Thèse soutenue publiquement le 24/04/2018
devant le jury composé de**

M Mohamed CHEHIMI	DR, Université Paris-Est Créteil	Rapporteur
M Benoît PIRO	PR, Université Paris Diderot	Rapporteur
Mme Françoise CONAN	PR, Université de Brest Occidentale	Examinateur
M Pascal VIEL	IGR, Commissariat à l'Energie Atomique	Examinateur
M François ESTOUR	PR, Université de Rouen Normandie	Examinateur
M Julien VIEILLARD	MCF, Université de Rouen Normandie	Co-encadrant
M Franck LE DERF	PR, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Franck LE DERF, laboratoire Chimie Organique et Bioorganique : Réactivité et Analyse, UMR 6014 COBRA

À Nathan, l'homme de ma vie qui rêvait de faire une thèse.

Sommaire :

Sommaire :	4
Introduction générale	8
Chapitre 1 : L'isatine comme bioélément d'un biocapteur pour mieux lutter contre <i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	10
1 L'isatine, une molécule aux multiples propriétés	12
1.1 Synthèse et réactivité de l'isatine et de ses dérivés	13
1.1.1 Synthèses de l'isatine	13
1.1.2 Réactivité de l'isatine.....	23
1.2 Applications de l'isatine et de ses dérivés.....	27
1.2.1 Effets biologiques et pharmacologiques	27
2 Les biocapteurs, un outil innovant	32
2.1 Généralités sur les biocapteurs	32
2.2 Structure et mode de fonctionnement	33
2.2.1 Les différents types de transduction	35
2.2.2 Les éléments biologiques immobilisés	48
2.2.3 Méthodes d'immobilisation du bioélément.....	55
3 Conclusion.....	60
Chapitre 2 : Développement d'une méthode de fonctionnalisation du COC	62
4 Introduction	64
5 Le copolymère d'oléfine cyclique comme matériau de support.....	65
5.1 Présentation du COC.....	65
5.2 Fonctionnalisation du COC	66
5.2.1 Dépôt non-covalent de couches fonctionnelles (<i>coating</i>).....	67
5.2.2 Activation par plasma de la surface	68
5.2.3 Formation d'une « sous-couche » active.....	69

5.3	Les sels d'aryldiazoniums	71
5.4	Préparation d'aryldiazoniums.....	73
5.4.1	Sels utilisés pour les greffages de surfaces	73
5.4.2	Autres sels de diazoniums préparés	77
5.5	Méthodes de greffage utilisées	79
5.5.1	Électrochimie sur surface d'Or.....	79
5.5.2	Greffages chimiques sur le COC par activation UV de la surface	92
5.6	Mise au point de techniques de couplage en surface	96
5.6.1	Couplages sur des surfaces COC-COOH.....	97
5.6.2	Couplages sur des surfaces COC-NH ₂	102
6	Conclusion.....	106
Chapitre 3 : Modification de l'isatine et couplage en surface		108
7	Introduction	111
8	Modification de l'isatine par couplages pallado-catalysés.....	112
8.1	Introduction d'une fonction alcool	114
8.1.1	Utilisation du couplage de Sonogashira.....	114
8.2	Introduction d'une fonction amine	118
8.2.1	Utilisation du couplage de Sonogashira.....	118
8.2.2	Utilisation du couplage de Suzuki	123
8.3	Tentatives d'introduction de la fonction acide	127
8.3.1	Par couplage de Sonogashira.....	127
8.3.2	Par couplage de Suzuki.....	128
9	Effets biologiques des isatines modifiées.....	129
9.1	Mesure de la concentration minimale d'inhibition de croissance bactérienne.....	130
9.1.1	Étendue des molécules étudiées	130
9.1.2	Technique de mesure et résultats comparés à l'isatine native.....	131

9.2	Simulation informatique du <i>docking</i> des molécules dérivées de l'isatine sur la protéine Ami-C	133
9.2.1	Étude du <i>Docking</i> étape par étape	134
9.2.2	Résultats obtenus pour le <i>Docking</i> sur AmiC	137
10	Installation des dérivés d'isatines en surface	142
10.1	Par transformation d'une fonction amine en diazonium	142
10.1.1	Greffage électrochimique sur lame d'or.....	142
10.1.2	Formation de la fonction diazonium et greffage chimique <i>in-situ</i> sur lame de COC	144
10.2	Par couplage avec des surfaces fonctionnalisées	146
10.2.1	Estérification avec TBTU.....	146
10.2.2	Couplage peptidique avec EDC/NHS	151
10.2.3	Couplage peptidique avec CDI.....	154
10.2.4	Couplage de Sonogashira en surface.....	156
11	Conclusion.....	167
	Bilan et perspectives	168
	Annexes	172
1	Abbreviations.....	172
2	Materials and methods	174
3	Synthesis.....	176
3.1	Diazonium formation	176
3.1.1	4-Carboxymethylbenzene diazonium (2).....	176
3.1.2	4-Aminobenzene diazonium (4)	176
3.1.3	4-Ethynylbenzene diazonium (6).....	177
3.2	General procedure for the Sonogashira reaction type.....	178
3.2.1	Precursor synthesis	178

3.2.2	5-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)indoline-2,3-dione (30).....	179
3.2.3	5-(4-hydroxybut-1-yn-1-yl)indoline-2,3-dione (37).....	180
3.2.4	tert-butyl (3-(2,3-dioxoindolin-5-yl)prop-2-yn-1-yl)carbamate (41)	181
3.2.5	4-(2,3-dioxoindolin-5-ethynyl)aniline (51).....	182
3.3	General procedure for the Suzuki reaction type	183
3.3.1	5'-Iodospiro[[1,3]dioxolane-2,3'-indolin]-2'-one (54)	183
3.3.2	Spiro[1,3-dioxolane-2,3'-indol]-2'(1' <i>H</i>)-one, 5'-(4-aminophenyl) (57a)	184
3.3.3	Spiro[1,3-dioxolane-2,3'-indol]-2'(1' <i>H</i>)-one, 5'-(3-aminophenyl) (57b)	185
4	¹ H NMR spectrum	186
	Références bibliographiques.....	194

Introduction générale

De nos jours, les microorganismes pathogènes deviennent de plus en plus résistants aux antibiotiques. La recherche pour mieux connaître les microbes est d'une importance capitale. Le prix Nobel de Chimie de 2017 qui récompense trois chercheurs physiciens pour leur mise au point d'une technique de cryomicroscopie électronique permettant d'observer les biomolécules à de très hautes-résolutions en est bien la preuve. L'interdisciplinarité entre physique, biologie et chimie est devenue notre meilleure arme pour améliorer nos défenses face à des bactéries pathogènes.

Le projet de recherche que nous avons mené pendant 3 années est un exemple d'interdisciplinarité mise au service de la connaissance d'une bactérie en particulier : *Pseudomonas Aeruginosa*. Ce microorganisme peut s'avérer dangereux pour les personnes immunodéficientes et est responsable de 10% des infections nosocomiales. Les microbiologistes du laboratoire de Microbiologie, Signaux et Microenvironnement (LMSM) ont déterminé que *Pseudomonas Aeruginosa* est capable d'adapter son comportement lorsqu'elle détecte certaines hormones humaines dans son environnement. Ils ont également découvert que certaines molécules telles que l'isatine pouvaient bloquer l'action de ces hormones. Le but de ma thèse a été de concevoir un outil nommé biocapteur permettant de mieux comprendre comment l'isatine interagissait avec la bactérie *Pseudomonas Aeruginosa*.

Dans le premier chapitre, nous présenterons tout d'abord l'intérêt actuel du motif isatine dans le domaine médical, en explicitant notamment des voies de synthèses de dérivés et différentes applications. Puis dans une deuxième partie, nous expliquerons comment les biocapteurs peuvent s'intégrer dans nos investigations scientifiques, de manière à mieux appréhender notre approche méthodologique.

Le second chapitre portera sur le développement d'une technique d'accroche sur le matériau choisi comme support du biocapteur : le COC ou copolymère d'oléfines cycliques. Cette méthode fait intervenir des sels d'aryldiazonium que nous avons synthétisés pour fonctionnaliser la surface de ce polymère inerte. Nous présenterons également la mise au point de conditions de couplages peptidiques en surface permettant d'immobiliser de façon covalente à la surface du COC différents synthons portant des fonctions chimiques susceptibles de se lier au motif devant servir d'élément de reconnaissance biologique.

A partir du troisième chapitre, nous expliciterons l'aménagement fonctionnel réalisé sur l'isatine pour l'immobiliser à la surface des lames de COC modifiées. Différentes stratégies de couplage ont été explorées. Une évaluation biologique des dérivés d'isatine obtenus a été mise en œuvre. Les lames fonctionnalisées avec l'isatine ont par la suite été soumises à des tests d'inhibition de croissance et d'adhésion bactérienne. L'ensemble de ces données a été complété par une simulation de *docking* moléculaire.

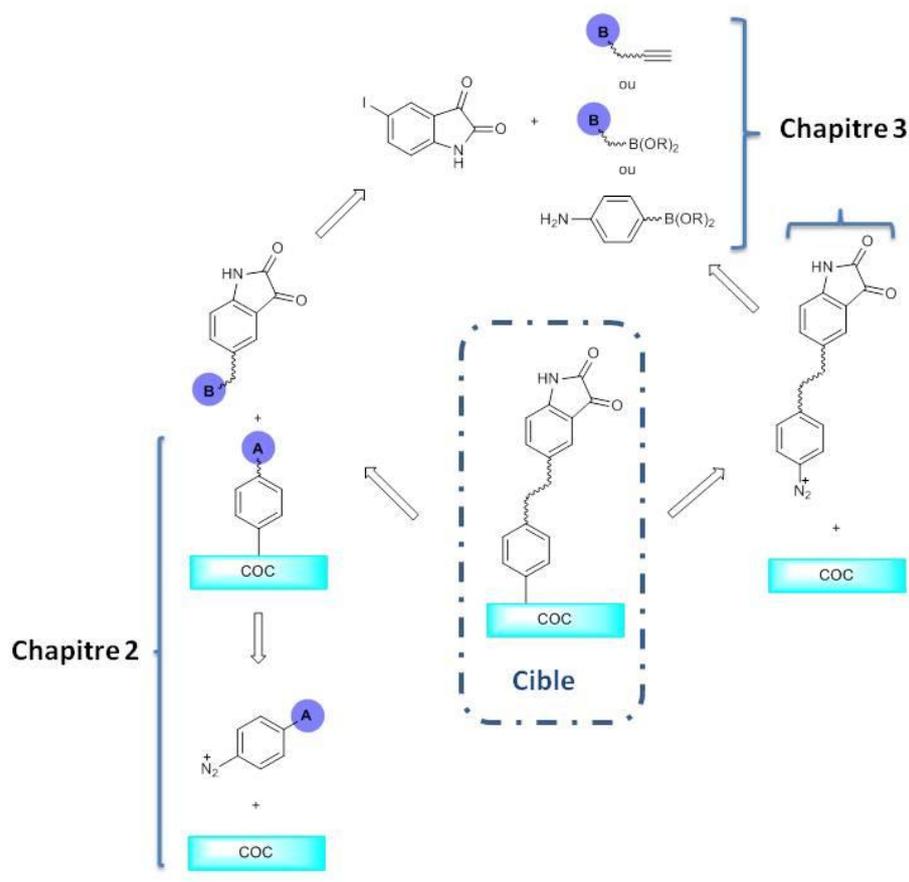


Figure 1 Stratégies d'immobilisation du motif isatine (A et B étant des fonctions chimiques pouvant être couplées)

Chapitre 1 : L'isatine comme bioélément d'un biocapteur pour mieux lutter contre *Pseudomonas Aeruginosa*.

Table des matières

1	L'isatine, une molécule aux multiples propriétés.....	12
1.1	Synthèse et réactivité de l'isatine et de ses dérivés.....	13
1.1.1	Synthèses de l'isatine	13
1.1.1.1	Méthode de Sandmeyer	13
1.1.1.2	Méthode de Stollé	16
1.1.1.3	Méthode de Martinet	17
1.1.1.4	Utilisation des acétanilides	17
1.1.1.5	Méthode de Gassman	18
1.1.1.6	Méallation des dérivés d'anilide	18
1.1.1.7	Autres méthodes.....	19
1.1.2	Réactivité de l'isatine	23
1.1.2.1	Alkylation et arylation hétérocycliques.....	23
1.1.2.2	Réactivité du noyau aromatique.....	25
1.2	Applications de l'isatine et de ses dérivés.....	27
1.2.1	Effets biologiques et pharmacologiques.....	27
1.2.1.1	Activité anti-convulsion	28
1.2.1.2	Activité antivirale, anti-VIH et anticancéreuse.....	30
1.2.1.3	Activités antimicrobiennes	31

2	Les biocapteurs, un outil innovant.....	32
2.1	Généralités sur les biocapteurs	32
2.2	Structure et mode de fonctionnement	33
2.2.1	Les différents types de transduction.....	35
2.2.1.1	Électrochimique.....	35
2.2.1.1.1	Ampérométrie	37
2.2.1.1.2	Potentiométrie	38
2.2.1.1.3	Conductimétrie.....	41
2.2.1.2	Optique	42
2.2.1.2.1	Mesure d'émission lumineuse	42
2.2.1.2.2	Mesure de modification du rayon lumineux.....	44
2.2.1.3	Ondes vibrationnelles	46
2.2.1.4	Thermométrie.....	47
2.2.2	Les éléments biologiques immobilisés.....	48
2.2.2.1	Les enzymes.....	48
2.2.2.2	Les anticorps ou fragments d'anticorps.....	50
2.2.2.3	Cellule ou bio organisme entier	53
2.2.2.4	Acide nucléique et ses dérivés (peptides et aptamères)	53
2.2.2.5	MIPs (polymères à empreinte moléculaire).....	54
2.2.3	Méthodes d'immobilisation du bioélément	55
2.2.3.1	Inclusion dans une matrice polymère.....	56
2.2.3.2	Méthodes de confinement (micro-encapsulation).....	57
2.2.3.3	Adsorption	58
2.2.3.4	Réticulation.....	58
2.2.3.5	Liaison covalente	59
3	Conclusion.....	60

1 L'isatine, une molécule aux multiples propriétés

Faisant partie de la famille des indoles (Figure 2), l'isatine **1** est un composé hétérocyclique présent dans les tissus et les fluides physiologiques des mammifères y compris chez l'homme comme métabolite de l'adrénaline.¹ On la retrouve également dans des plantes issues du genre *Isatis* qui sont utilisées en médecine chinoise et aussi dans les fruits de l'arbre Boulet de canon (*Couroupita guianensis* Aubl.).² L'isatine possède elle-même une large gamme d'activités biologiques qui seront présentées dans le paragraphe sur ses applications.

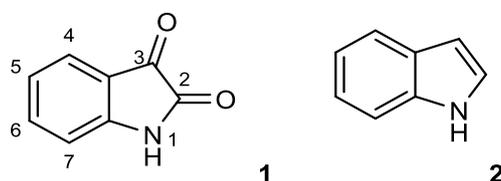


Figure 2 Structure de l'isatine 1 et de l'indole 2

Quelques aspects structuraux peuvent être notés sur cette molécule. L'analyse cristallographique indique que la molécule est plane, avec la liaison entre les deux carbonyles qui est de l'ordre de 1,55 Å (contre 1,48 Å espéré pour une liaison C(sp²)-C(sp²) classique), ce qui est couramment observé dans les *cis*-dicétones et qui peut être expliqué par la répulsion entre les doublets non-liants portés par les oxygènes.³ En spectroscopie infrarouge, l'isatine montre deux bandes à 1730 et 1620 cm⁻¹ correspondant aux vibrations d'étirement des carbonyles. Une large bande à 3190 cm⁻¹ est aussi observable et correspond à l'étirement de la liaison N-H.⁴ Le spectre RMN ¹H (réalisé dans le DMSO-d₆) de l'isatine présente en zone aromatique quatre signaux comprenant un doublet à 6.86 ppm, un triplet à 7.00 ppm, un doublet à 7.47 ppm et un triplet à 7.53 ppm, et correspondant respectivement aux protons présents en position 7, 5, 4 et 6. En spectrométrie de masse, le pic de l'ion moléculaire est généralement intense ; un pic correspondant à la perte d'un CO (ion A) peut être observé. L'ion perd également le groupement HCN, menant à un ion fulvène (ion B). Il arrive qu'un pic correspondant à la perte du second C=O formant un arène aziridine (ion C) soit aussi observé (Figure 3).⁵

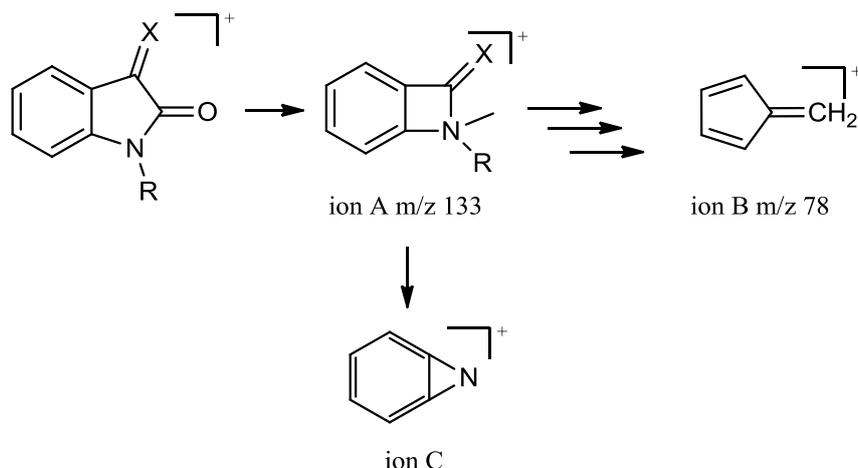


Figure 3 Séquence des pertes de molécules neutres lors d'une analyse en spectrométrie de masse de l'isatine ⁶

1.1 Synthèse et réactivité de l'isatine et de ses dérivés

1.1.1 Synthèses de l'isatine

L'isatine **1** fut obtenue la première fois en 1840 par Erdmann et Laurent par oxydation de l'indigo **3** par l'acide nitrique et l'acide chromique (Schéma 1).^{7, 8} Différentes voies de synthèse ont par la suite été développées.

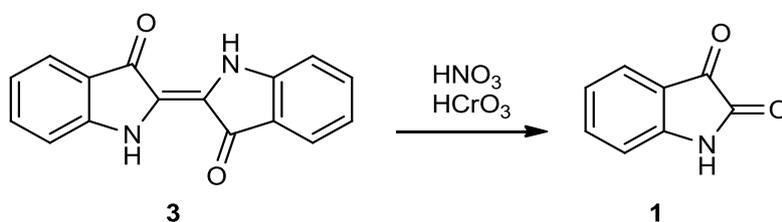


Schéma 1 Obtention de l'isatine par traitement acide de l'indigo

1.1.1.1 Méthode de Sandmeyer

Sandmeyer synthétisa l'isatine **1** en 1919 ⁹ par condensation d'une aniline **4** avec du 2,2,2-trichloro-1,1-éthanediol en présence de chlorure d'hydroxylammonium pour former l'isonitrosoacétanilide **5**. Cette première étape est alors suivie d'une cyclisation en présence d'un acide de Brønsted (acide sulfurique) permettant d'obtenir l'isatine **1** avec des rendements souvent supérieurs à 75% (Schéma 2).

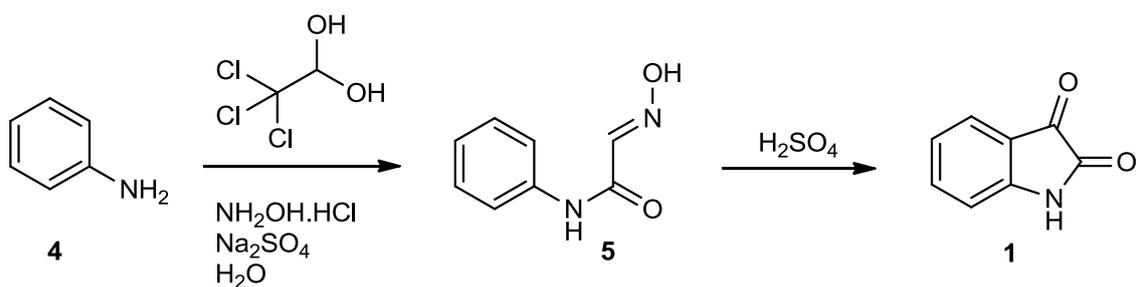


Schéma 2 Synthèse de l'isatine selon la méthodologie de Sandmeyer

Cette technique peut être appliquée à des anilines portant des substituants électro-attracteurs telle que la 2-fluoroaniline,¹⁰ mais également à des amines hétérocycliques telle que la 2-aminophénoxathine, comme l'ont fait Loloïu *et coll.*¹¹

Malgré son efficacité établie et l'avantage économique dû à l'utilisation de réactifs bon marché et disponibles aisément, cette synthèse présente plusieurs inconvénients. En effet, selon Jnaneshwara *et coll.*¹², les conditions expérimentales sont dures (utilisation d'acide sulfurique concentré) et la réaction n'est pas efficace lorsqu'un groupement électro-donneur se trouve sur le cycle aromatique ou lors de l'utilisation de *N*-alkylanilines comme précurseur. On observe également la formation d'un mélange de régioisomères avec l'utilisation d'anilines di-substituées tels que le composé **6** (Schéma 3). Néanmoins, après ouverture de l'isatine en milieu basique (NaOH), ces régioisomères peuvent être séparés par l'acidification contrôlée du milieu générant les isatines correspondantes par précipitation à un pH donné.¹³ Un dernier inconvénient de cette méthode est la production, lors de la première étape de synthèse, de cyanure d'hydrogène, un composé extrêmement toxique voir mortel pour des niveaux compris entre 100 et 200 ppm.¹⁴ Silva *et coll.* proposent trois mécanismes possibles pour la formation de HCN lors de la synthèse de Sandmeyer de l'isonitrosoacétanilide ; celui-ci proviendrait de l'intermédiaire dichloronitrosoéthène donc c'est le précurseur 2,2,2-trichloro-1,1-éthanediol qui est la source de ce problème.

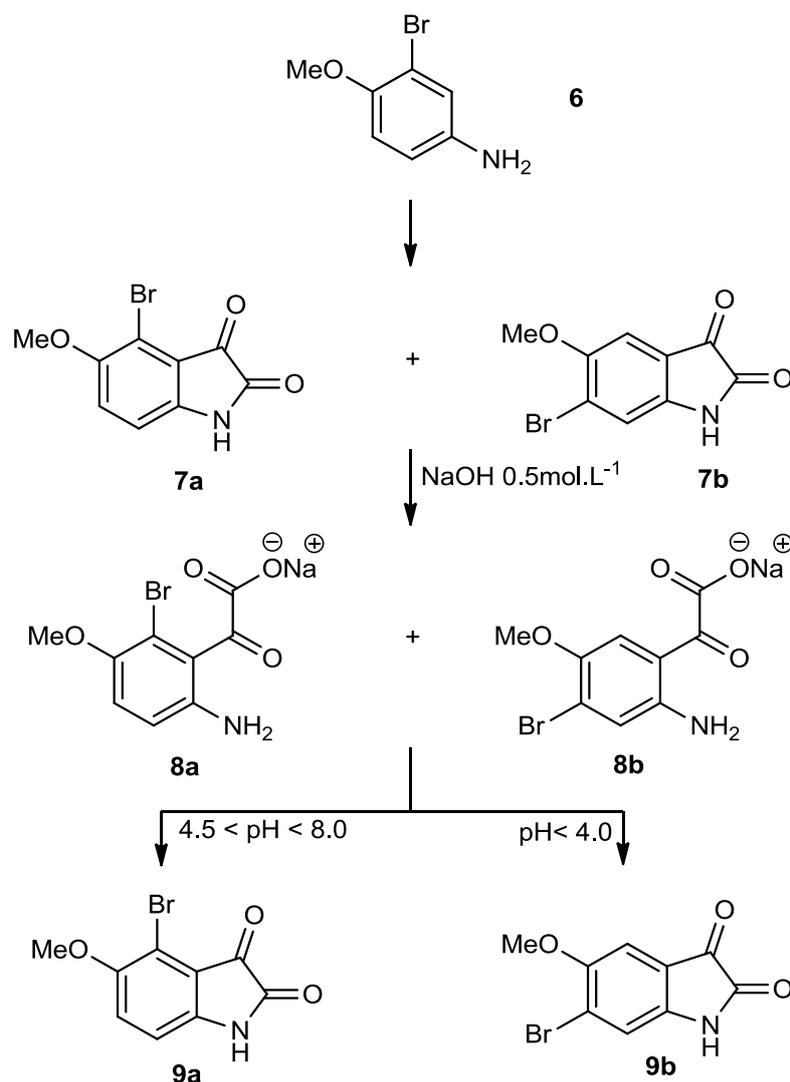


Schéma 3 Séparation d'un mélange de régioisomères par contrôle du pH

En 2012, Klein et Tufano suggèrent de former l'intermédiaire **12** par réaction de couplage entre l'acide alkyloximinoacétique **10a** et un dérivé d'aniline **11**. Comme la réaction avec l'acide hydroxyiminoacétique (H à la place de Bn) ne fonctionne pas, ils ont développé des précurseurs avec l'acide benzyloximinoacétique **10a**, celui-ci pouvant être obtenu facilement, et également avec le chlorure de benzyloximinoacétyle **10b**, ces intermédiaires sont ensuite traités avec de l'acide sulfurique ou de l'acide méthylsulfonique, lorsque leur solubilité est trop faible dans l'acide sulfurique, pour obtenir l'isatine **13** attendue avec des rendements allant de 40% jusqu'à 85% (Schéma 4).¹⁵

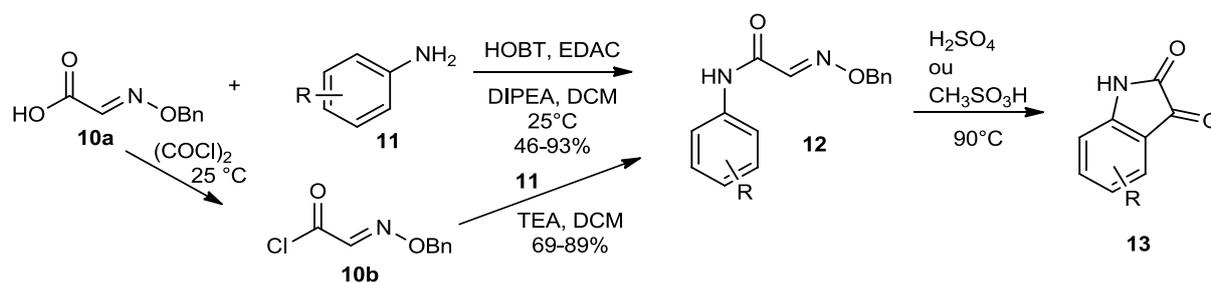


Schéma 4 Synthèse de l'isatine via l'intermédiaire benzyloximinoacétanilide ($R = \text{alkyl, phényle, amino, oxy, etc.}$)

1.1.1.2 Méthode de Stollé

Sur le même principe, Stollé condensa l'aniline **4** avec du chlorure d'oxalyle pour former un intermédiaire chloro-oxalylanilide **14** qui se cyclise, en présence d'un acide de Lewis, traditionnellement AlCl_3 ou du $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ¹⁶ et même dans certains cas TiCl_4 ,¹⁷ pour donner l'isatine **1** correspondante (Schéma 5).¹⁸

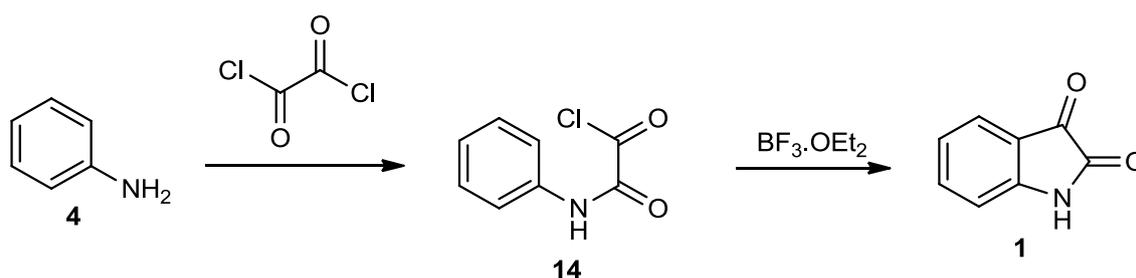


Schéma 5 Synthèse de l'isatine selon la procédure de Stollé

Raj *et coll.*¹⁹ ont mis au point une méthode alternative, dans des conditions de catalyse hétérogène. En présence de zéolite H- β en tant que catalyseur, ils ont formé divers dérivés d'isatine **15** par chauffage à 80°C d'anilines *para*-substituées **11-p** en présence de chlorure d'oxalyle (Schéma 6). Cette technique a permis d'obtenir les dérivés d'isatine en une seule étape, après simple filtration du catalyseur et évaporation du solvant, dans des rendements situés entre 48 et 79%.

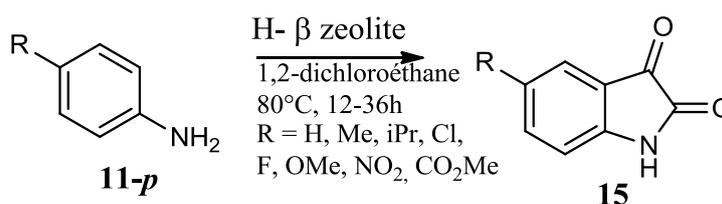


Schéma 6 Synthèse hétérogène de l'isatine

1.1.1.3 Méthode de Martinet

La méthode de Martinet implique l'utilisation de l'ester d'oxomalonate **16** en milieu acide avec l'aniline **4** pour obtenir l'acide 3-(3-hydroxy-2-oxindole) carboxylique **17** comme intermédiaire qui après décarboxylation permet d'obtenir l'isatine.²⁰ (Schéma 7)

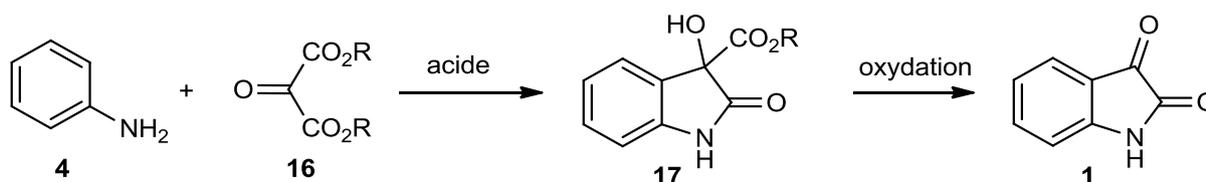


Schéma 7 Synthèse de l'isatine selon la méthodologie de Martinet

1.1.1.4 Utilisation des acétanilides

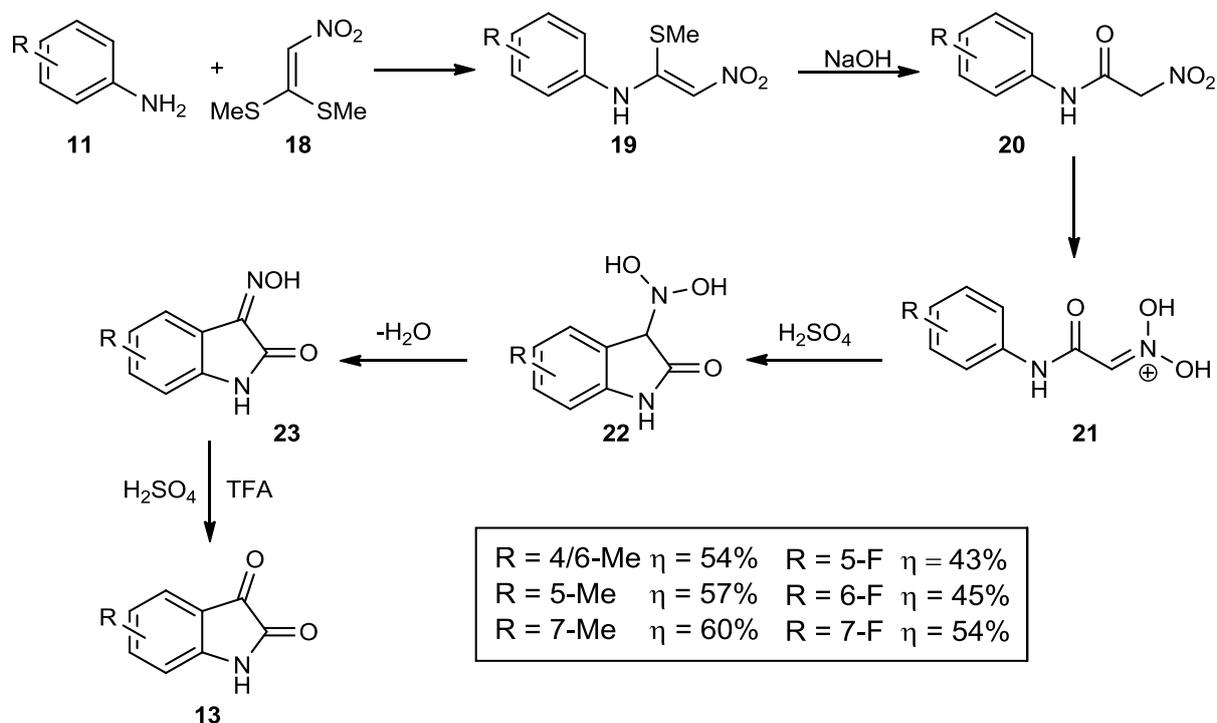


Schéma 8 Synthèse de l'isatine via l'utilisation de nitroacétanilides

L'utilisation de nitroacétanilides comme précurseurs de l'isatine est une technique relativement proche de la méthodologie de Sandmeyer mais elle présente l'avantage de permettre l'introduction d'un substituant sur le cycle aromatique. Le nitroacétanilide **20** est obtenu par hydrolyse alcaline du 1-arylamino-1-méthylsulfanylo-2-nitroéthène **19**, qui par la suite peut être aisément cyclisé par traitement acide avec de l'acide sulfurique ou trifluorométhane sulfurique, ce dernier donnant un meilleur rendement.²¹ (Schéma 8)

1.1.1.5 Méthode de Gassman

Une méthode alternative a été développée par Gassman. Elle consiste en la synthèse d'un intermédiaire 3-méthylsulfanyl-2-oxindole **25** via deux routes différentes choisies selon la nature des effets électroniques des substituants présents sur le cycle aromatique. Avec X un groupement électro-attracteur sur le composé **24**, le dérivé d'oxindole **25** est obtenu en faisant réagir une *N*-chloroaniline (obtenue en étape 1)) avec du (méthylsulfanyl)acétate pour fournir un sel d'azasulfonium (en étape 2)) (méthode 1, Schéma 9). Dans le cas où X est un groupement électro-donneur, la *N*-chloroaniline est déstabilisée réduisant ainsi le rendement pour le sel d'azasulfonium. L'alternative consiste à faire réagir une aniline appropriée avec un sel de chlorosulfonium (méthode 2, étape 1, Schéma 9) pour conduire au dérivé d'oxindole **25**. En présence de N-chlorosuccinimide (NCS), il conduit au 3-chloro-3-méthylsulfanyl-2-oxindole **26** instable qui par hydrolyse en présence d'un oxyde de mercure et de BF₃.Et₂O, ou bien dans un mélange eau/THF, donne l'isatine **27** avec des rendements compris entre 40 et 81%.^{22, 23}

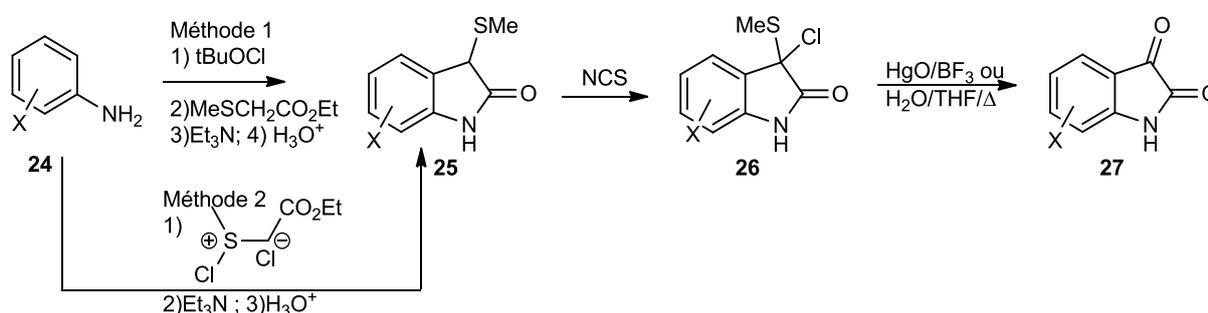


Schéma 9 Synthèse de l'isatine selon la méthodologie de Gassman

1.1.1.6 Métallation des dérivés d'anilide

Une méthode régiosélective, décrite en Schéma 10, permet la synthèse d'isatines substituées en position 4, par ortho-métallation d'une aniline protégée avec de l'oxalate de diéthyle **28** pour obtenir un α -cétoester. La déprotection hydrolytique de l'amine **29** est accompagnée d'une cyclisation qui permet d'obtenir l'isatine **27** avec des rendements de 79% à 89%.²⁴ Le groupement protecteur sur l'amine dirige la métallation en position ortho de l'aniline, ce qui permet d'obtenir spécifiquement la forme 4-substituée de l'isatine. Cette approche synthétique se distingue des précédentes où l'on obtenait un mélange de régioisomères 4 et 6-substitués à partir d'anilines *mé*ta-substituées comme précurseur (*cf.* Schéma 4). Cette

méthode a été appliquée avec succès au *t*-butylcarbamate de 4-aminopyridine et a permis d'obtenir la 5-azaisatine.²⁵

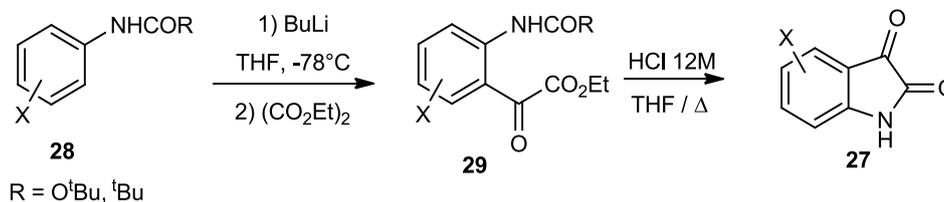


Schéma 10 Métallation des dérivés de l'aniline²⁶

Une autre technique de métallation, reposant sur un échange halogène-métal a été développée par Smith *et coll.*²⁷ Il s'agit de la lithiation de la *N*-(2-bromaryle)-*N,N*-diméthylurée **30** par le méthyllithium et le tertio-butyllithium sous atmosphère inerte dans du THF anhydre à 0°C pour conduire à des dérivés d'arylurée **31**. La carbonylation de ces dérivés, suivie d'une cyclisation intramoléculaire mène à l'obtention de l'isatine **15** avec des rendements situés entre 71 et 79% (Schéma 11).

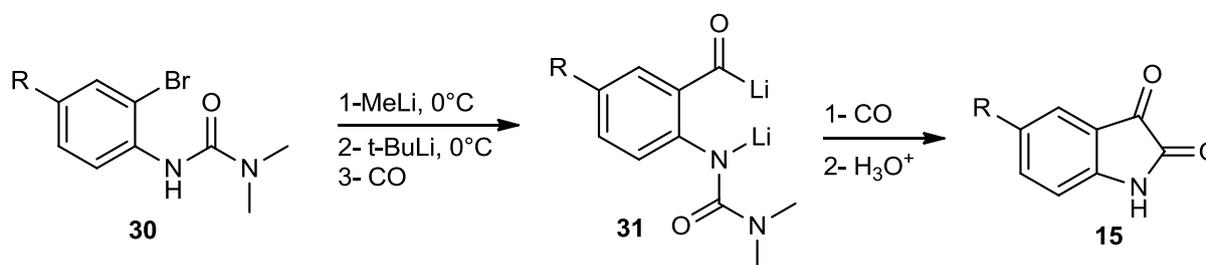


Schéma 11 Synthèse de l'isatine par Smith *et coll.*

1.1.1.7 Autres méthodes

Ces synthèses qui viennent d'être présentées sont celles qui sont principalement utilisées pour obtenir l'isatine substituée ou non. D'autres méthodes synthétiques existent, mais elles sont cependant d'un usage moins courant.²⁸ On recense par exemple la méthode de Parrick *et coll.* qui permet d'obtenir l'isatine **1** via une bromation de l'indole **2** puis une oxydation du composé **32** (Schéma 12).²⁹

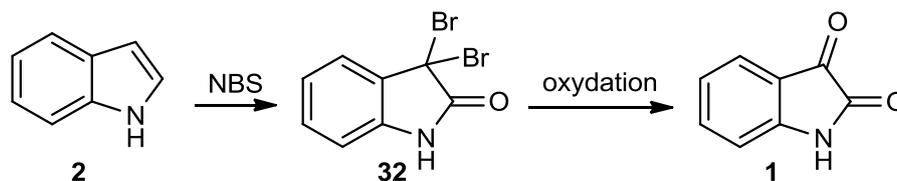


Schéma 12 Synthèse de l'isatine par Parrick et coll.

La *N*-méthyl-4-méthylisatine **35** peut être obtenue par oxydation à l'air de l'aryliminoacylhydrazone **33** en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ pour donner l'intermédiaire 2-(2-phénylhydrazono)indolin-3-one **34** qui s'hydrolyse en isatine avec un bon rendement de 76%.³⁰ (Schéma 13)

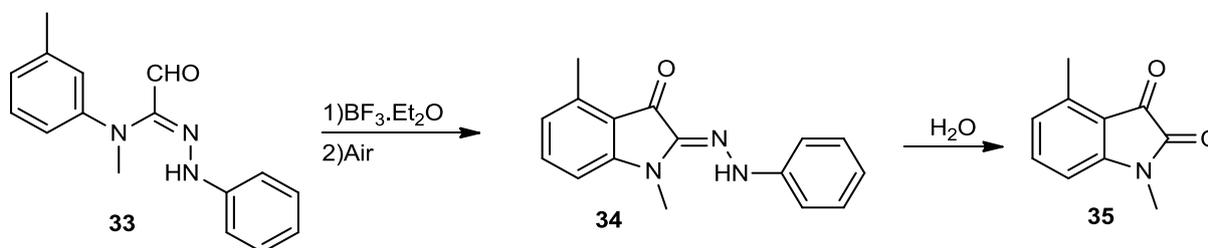


Schéma 13 Formation de la *N*-méthyl-4-méthylisatine

L'isatine peut également être obtenue par la synthèse monotopie¹ mise au point par Meth-Cohn *et coll.*³¹ En faisant réagir une formanilide *N*-substituée **36** avec du chlorure d'oxalyle, on obtient un réactif de Vilsmeier **37** qui, traité par une base de Hünig, forme un carbène nucléophile. Ce carbène **39** ayant un temps de vie limité, il forme un dimère **40** qui réagit immédiatement avec des électrophiles tels que le brome, et par cyclisation et hydrolyse permet d'obtenir l'isatine souhaitée. (Schéma 14)

¹ Synthèse *one-pot*

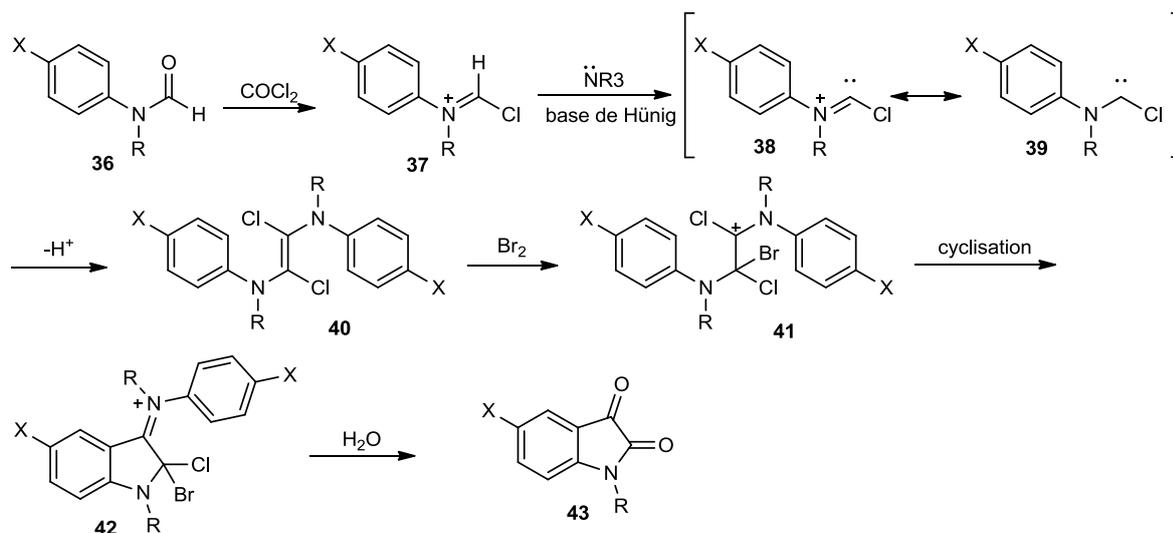
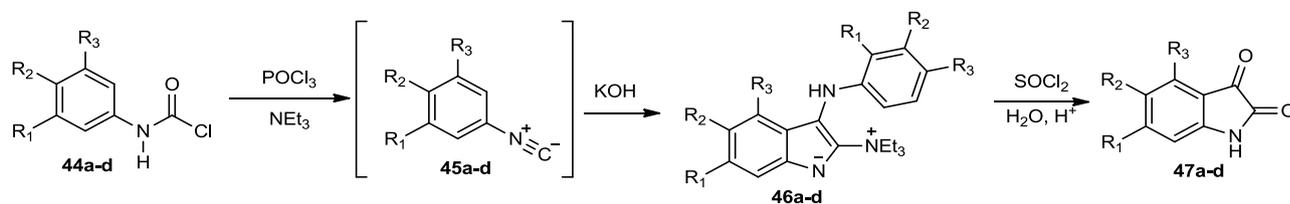


Schéma 14 Synthèse one-pot d'un dérivé de l'isatine par Meth-Cohn et coll.

En 2001, Mironov *et coll.* proposent une synthèse d'isatines ayant des groupements électro-attracteurs.³² Cette synthèse en deux étapes est basée sur la réaction entre un isocyanide aromatique **45**, intermédiaire obtenu *via* le formamide aromatique **44** correspondant, et une amine tertiaire. Le chauffage du composé 2-triéthylammonio-3-arylaminoindolate **46** dans un excès de chlorure de thionyle, suivie d'une hydrolyse, mène à l'isatine désirée. (Schéma 15)



a: $R_1=R_3=H$, $R_2=NO_2$; b: $R_1=R_3=CF_3$, $R_2=H$; c: $R_1=CF_3$, $R_2=Cl$, $R_3=H$; d: $R_1=R_2=R_3=Cl$

Schéma 15 Synthèse de l'isatine par Mironov

La synthèse d'une isatine substituée en C5 telle que la 5-(benzyloxy)indoline-2,3-dione **50** (Schéma 16) ou en C6 comme la (E)-6-styrylindoline-2,3-dione **52** (Schéma 17), a été développée par Manley-King *et coll.*³³ Le traitement d'une aniline *para*-substituée **49** ou *mé*-substituée **51** par de l'oxomalonate de diéthyle **49** et chauffé en présence d'acide acétique, permet d'isoler un produit unique, respectivement **50** et **52**, avec des rendements modérés.

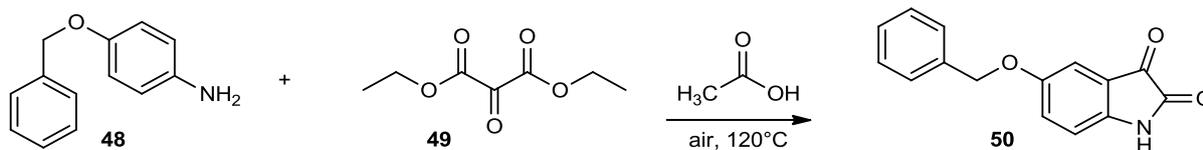


Schéma 16 Préparation d'une isatine substituée en C5

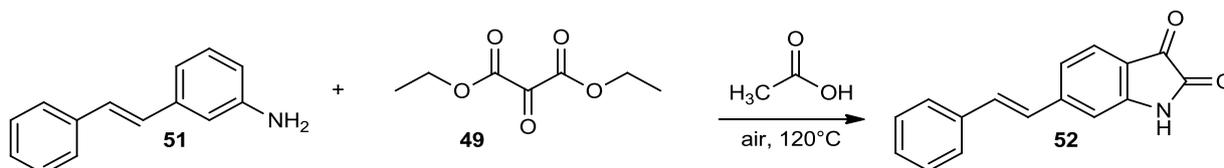


Schéma 17 Préparation d'une isatine substituée en C6

Récemment, une méthode a été développée par Satish et son équipe pour synthétiser l'isatine à partir de 2-aminophénylacétylènes, de 2-aminostyrènes et de 2-amino- β -cétoesters *via* une réaction domino faisant intervenir une iodation, une oxydation de Kornblum et une amidation intramoléculaire.³⁴ Cette synthèse se fait dans des conditions douces tout en évitant l'utilisation de métaux, de bases ou de peroxydes, elle respecte le principe d'économie d'atomes et donne de bons, voire d'excellents rendements, ce qui pourrait se révéler être la méthode d'avenir pour la production d'isatines (Schéma 18).

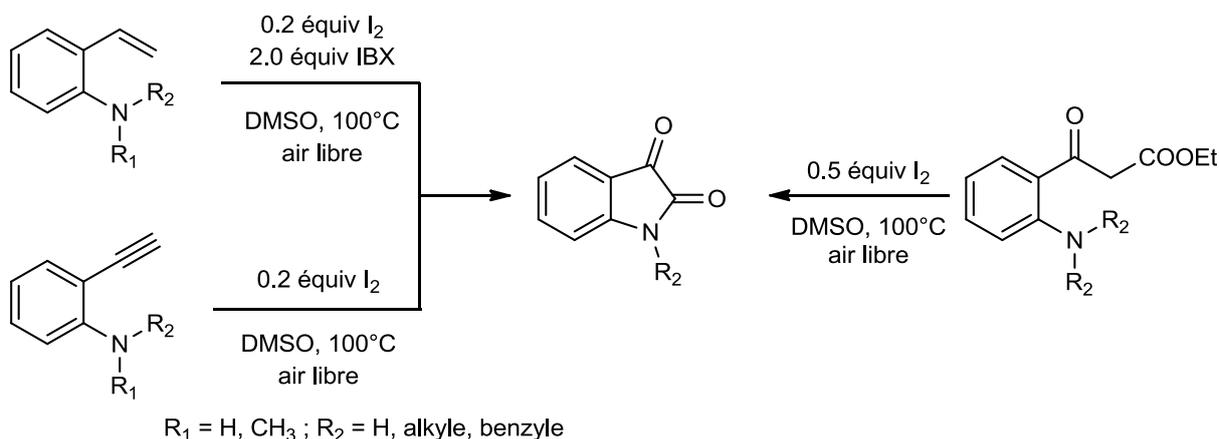


Schéma 18 Synthèse de l'isatine selon Satish et coll. (IBX = acide 2-iodoxybenzoïque)

Basée sur des réactions de couplage pallado-catalysé, Söderberg et son équipe ont mis au point une synthèse de l'isatine en faisant réagir un 1-haloéthynyl-2-nitrobenzène **53** avec du palladium en quantité catalytique.³⁵ Les rendements varient en fonction du catalyseur utilisé, du solvant et de la présence d'additif ou non. Trois exemples sont illustrés dans le Schéma 19.

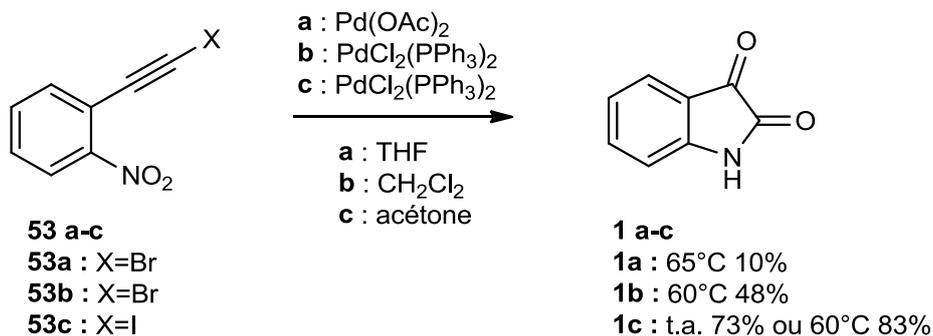


Schéma 19 Synthèse pallado-catalysée de l'isatine

Pour introduire des fonctionnalités complémentaires sur la structure de l'isatine, soit les précurseurs à sa synthèse sont choisis en conséquence, soit quand ce n'est pas possible, l'isatine elle-même peut être modifiée ultérieurement.

1.1.2 Réactivité de l'isatine

Deux principaux types de réactions peuvent être réalisés sur l'isatine. Premièrement les réactions d'alkylation ou d'arylation peuvent avoir lieu sur la fonction amine ainsi que des réactions de Michael ou de Mannich. L'alkylation peut également se produire sur la cétone en position 3. Deuxièmement, la réactivité du cycle aromatique permet d'envisager des substitutions électrophiles aromatiques.

1.1.2.1 Alkylation et arylation hétérocycliques

Les isatines *N*-substituées sont très souvent utilisées comme précurseurs de synthèse pour préparer des molécules hétérocycles. Les dérivés *N*-alkylés sont obtenus par réaction de substitution en faisant réagir des sels de sodium de l'isatine formés par réaction d'hydrocarbures halogénés en présence de NaH dans le DMF (Schéma 20).³⁶ L'inconvénient de cette technique est l'utilisation de solvants et de réactifs anhydres du fait de la présence de NaH.³⁷

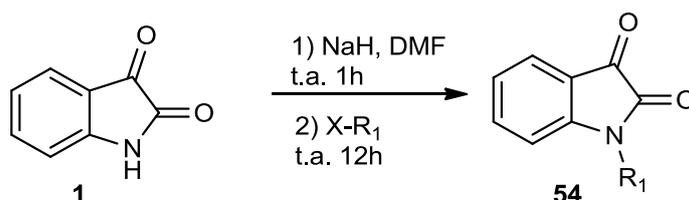


Schéma 20 *N*-alkylation de l'isatine

Chen *et coll.* ont donc étudié une alternative à l'utilisation de NaH en testant différentes bases et solvants. Ils ont déterminé que le couple DMF/K₂CO₃ présentait le meilleur rendement car la polarité du solvant permettait un meilleur transfert électronique, tandis que la base de force modérée permettait d'éviter une réaction de substitution de l'halogénure d'alkyle par les ions hydroxydes.³⁸ M. Coppola en 1987 estimait que pour introduire un substituant aryle, le carbonate de potassium n'était pas nécessaire et que la réaction était très efficace en présence d'oxyde de cuivre.³⁹

D'autres substitutions de l'amine telles que l'acylation, la sulfonylation ou par des substituants halogénés, ou encore la méthylène-amine sont décrites par Da Silva dans sa revue sur la chimie de l'isatine entre 1975 et 1999.²⁸

La formation de dérivés d'isatine dites « base de Schiff » **55** a lieu lors de la condensation du groupement cétone de l'isatine avec des amines aromatiques primaires (Schéma 21).⁴⁰ La réaction pour former les bases de Mannich **56** intervient en condensant l'amine de l'isatine avec une amine secondaire en présence de formaldéhyde (Schéma 22). Ces deux types de dérivés d'isatine sont des briques importantes dans la formation de molécules plus complexes à but thérapeutique.⁴¹

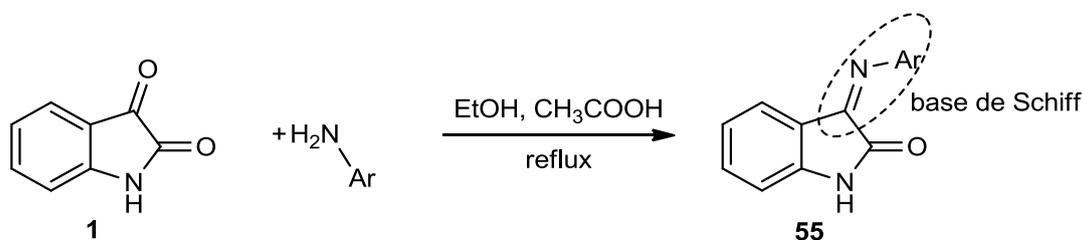


Schéma 21 Réaction de Schiff

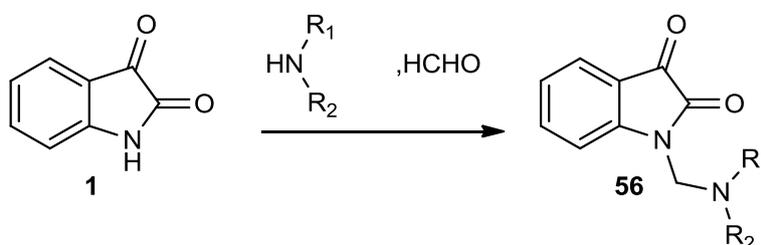


Schéma 22 Réaction de Mannich

1.1.2.2 Réactivité du noyau aromatique

Les isatines au noyau aromatique substitué sont le plus souvent obtenues à partir d'anilines substituées, mais elles peuvent être également préparées par substitution électrophile aromatique. Par exemple, Sumpter et Jones arrivèrent à la conclusion qu'en faisant réagir soit de l'acide nitrique soit du nitrate de potassium sur une solution d'isatine dans l'acide sulfurique, la 5-nitroisatine pouvait être obtenue avec 85% de rendement.

La 5-nitroisatine **57** sera utilisée plus tard par Jnaneshwara et Deshpande comme précurseur à la 4,6-dibromoisatine **62**.⁴² Une étape supplémentaire permet la condensation de l'acétone sur la 4,6-dibromoisatine (Schéma 23) formant ainsi la convolutamydine A **63**, une molécule permettant de lutter contre la leucémie.

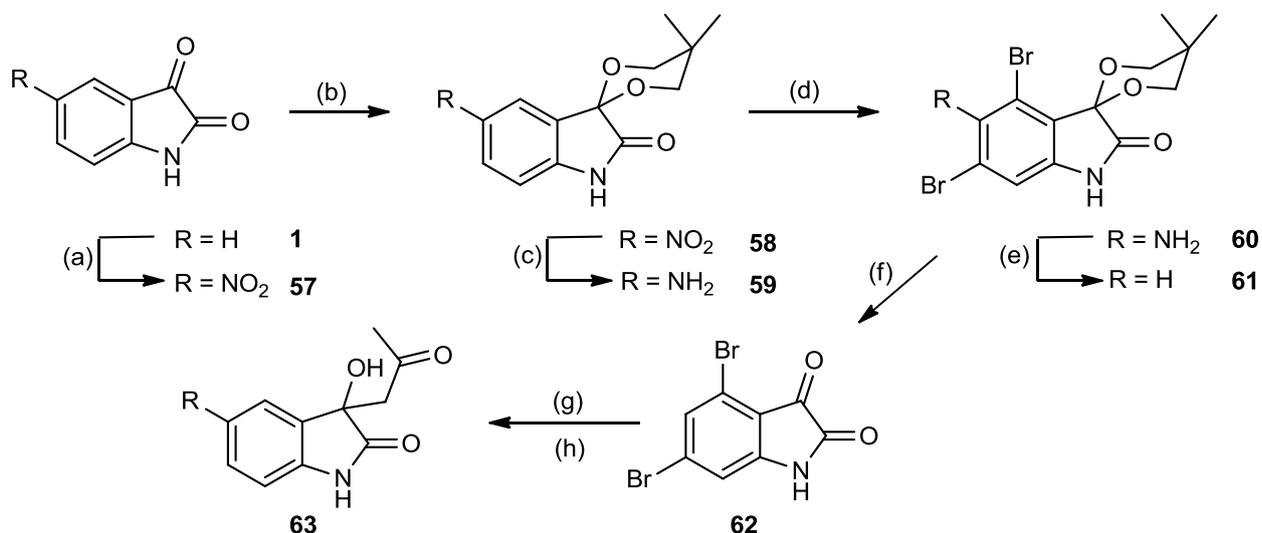


Schéma 23 Synthèse de la convolutamydine A. Réactifs et conditions : (a) KNO_3 , H_2SO_4 , $0^\circ C$; (b) 2,2-diméthylepropane-1,3-diol, *p*-TSA, cyclohexane; (c) Pd/C (10%), H_2 , MeOH; (d) Br_2 , EtOH; (e) *t*BuONO, DMF, $65^\circ C$; (f) aqueux acide oxalique, $60^\circ C$; (g) acétone, sol

Sur le même principe, Magiatis *et coll.* sont partis de la 5-nitroisatine qu'ils ont monosubstitué par un brome en position C6. En réduisant le groupe nitro en amine ils ont formé l'indirubine correspondante en faisant réagir la 5-amino-6-bromoisatine avec la 3-acétoxyindole.⁴³

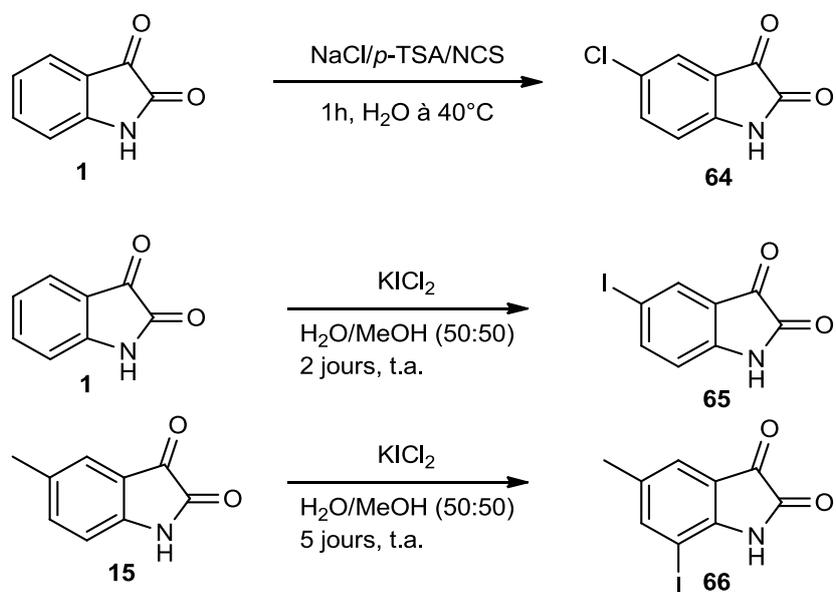


Schéma 24 Halogénéation aromatique de l'isatine en milieu aqueux

L'introduction de groupements halogénés sur le cycle aromatique présente un intérêt car ce sont des groupements très réactifs pouvant être impliqués dans des réactions de substitution, d'élimination ou bien encore de couplage. Deux équipes ont mis au point des halogénations de cycles aromatiques en milieu aqueux. La première méthode permet d'introduire un atome de chlore en position C5 dans des conditions de réaction douces en présence de chlorure de sodium, de *p*-TSA (acide *p*-toluène sulfonique) et de NCS (*N*-chlorosuccinimide).⁴⁴ La seconde permet d'accéder à un dérivé d'iodoisatine monosubstituée en faisant réagir l'isatine ou la 5-méthylisatine avec du potassium dichloroiodate en milieu aqueux additionné de méthanol.⁴⁵ (Schéma 24)

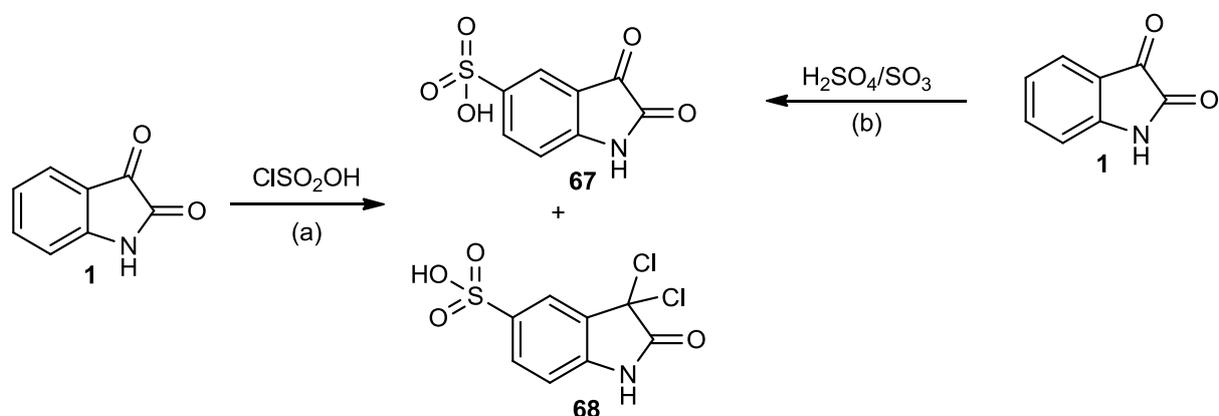


Schéma 25 Sulfonation de l'isatine (a) ratio rendement entre 67 et 68 = 1:9 (b) rendement 83%

La sulfonation de l'isatine est aussi souvent décrite. D'abord développée par Somaskhara *et coll.* en 1965, la synthèse consiste à faire réagir l'isatine avec de l'acide sulfurochlorhydrique à 70°C.⁴⁶ Mais cette méthode est critiquée dans des articles plus récents qui évoquent la formation du dérivé *gem*-dichloro **68** en très large proportion par rapport à la 5-sulfoisatine attendue.⁴⁷⁻⁴⁹ Finalement Kopka *et coll.* ont défini que faire réagir l'isatine dans l'acide sulfurique en présence de trioxyde de soufre à basse température permettait d'obtenir l'acide d'isatine-5-sulfonique **67** neutralisé sous forme de sel de sodium.⁵⁰ (Schéma 25)

L'isatine est donc une molécule qui a fait l'objet de nombreuses modifications chimiques. Ceci a donné lieu à l'utilisation de ces dérivés pour différentes applications.

1.2 Applications de l'isatine et de ses dérivés

1.2.1 Effets biologiques et pharmacologiques

Comme dit en introduction, l'isatine est produite de manière endogène par les mammifères. La plus forte concentration en isatine (47-79 μM) a été relevée dans les vésicules séminales et les canaux déférents. Dans le cœur elle peut atteindre 3 μM et dans le cerveau, plus précisément dans l'hippocampe, le cervelet et dans le striatum, on mesure des concentrations en isatine entre 1 et 1,3 μM .⁵¹ Comme elle est produite par le système nerveux central (SNC), elle est considérée comme ayant un rôle sur l'activité cérébrale, elle agit sur le cerveau en augmentant la vigilance par exemple.⁵²

Outre ses sites de production, l'isatine a également plusieurs types de site d'accroche/d'interaction répartis dans le cerveau, le cœur, le foie et les reins. L'isatine est un inhibiteur de la monoamine-oxydase (MAO), un régulateur de l'activité neuronale en agissant sur les neurotransmetteurs de la classe des monoamines, au sein du SNC.⁵³ Testée en présence d'un autre inhibiteur de MAO, la pargyline, il a été déterminé que l'isatine agit également sur d'autres sites d'actions.⁵⁴ Il a ainsi été identifié que l'isatine cible également les récepteurs à peptides natriurétiques (en anglais : NPR-A : Atrial natriuretic peptide (ANP) receptor, NPR-B : brain natriuretic peptide (BNP) receptor and NPR-C : C-type natriuretic peptide (CNP) receptor). Ces peptides sont responsables de la natriurésie, de la diurèse et de la vasodilatation.⁵⁵ Le Tableau 1 liste toutes les cibles moléculaires sensibles à l'isatine.

Tableau 1 Exemples de cibles moléculaires sensibles à des concentrations physiologiques d'isatine ⁵⁶



inhibition <20% avec 10μM d'isatine	<ul style="list-style-type: none"> • Adénosine 1 et 2 • dopamine 1 et 2 • GABA A et B • histamine 1,2 et 3 • 5-HT-1, 2 et 3
inhibition 20-40% avec 10μM d'isatine	<ul style="list-style-type: none"> • Inositol triphosphate • Protéine Kinase C • Dopamine D4 • MAO A
inhibition ≥50% avec 10μM d'isatine	<ul style="list-style-type: none"> • MAO B • guanylate cyclase de forme membranaire
inhibition ≥50% avec 1μM d'isatine	<ul style="list-style-type: none"> • récepteur ANP • guanylate cyclase de forme cytosolique

1.2.1.1 Activité anti-convulsion

Une crise d'épilepsie est causée par un dysfonctionnement neuronal qui se traduit généralement par une perte de connaissance et des contractions et convulsions de l'ensemble des muscles du corps lorsque la crise est généralisée. Les traitements classiques de l'épilepsie sont l'administration d'inhibiteurs des canaux sodiques tels que la phénytoïne ou la carbamazépine ; l'acide valproïque (dépakine) agit également sur ces canaux mais aussi sur des récepteurs cérébraux. Plusieurs types d'expérimentation permettent de déterminer le potentiel anticonvulsivant d'un composé : lors de crises provoquées par électrochoc (MES) ou par administration de pentylènetétrazole (PTZ). Un grand nombre de dérivés d'isatine ont été rapportés comme présentant une activité anti-convulsivante ⁵⁷ tels que les dérivés hydrazide étudiés par Popp.⁵⁸ Pandeya *et coll.* ont étudié l'activité d'isatines semicarbazones **69** (Figure 4) sur les crises de convulsion et affirment que la non-toxicité de certains de ces dérivés en ferait de bons candidats au traitement de l'épilepsie.^{59, 60} Dans une étude parallèle publiée la

même année, ils ont également évalué le potentiel anticonvulsivant de dérivés hydrazones, bases de Mannich et de Schiff d'isatine **70** et **71** (Figure 4) et ont ainsi déterminé l'importance de respecter certaines particularités structurales telles que le domaine de liaison hydrogène en ne substituant pas l'hydrogène sur l'azote, ou le caractère hydrophobe du cycle aromatique en n'installant pas de groupement trop attracteur en position 5.

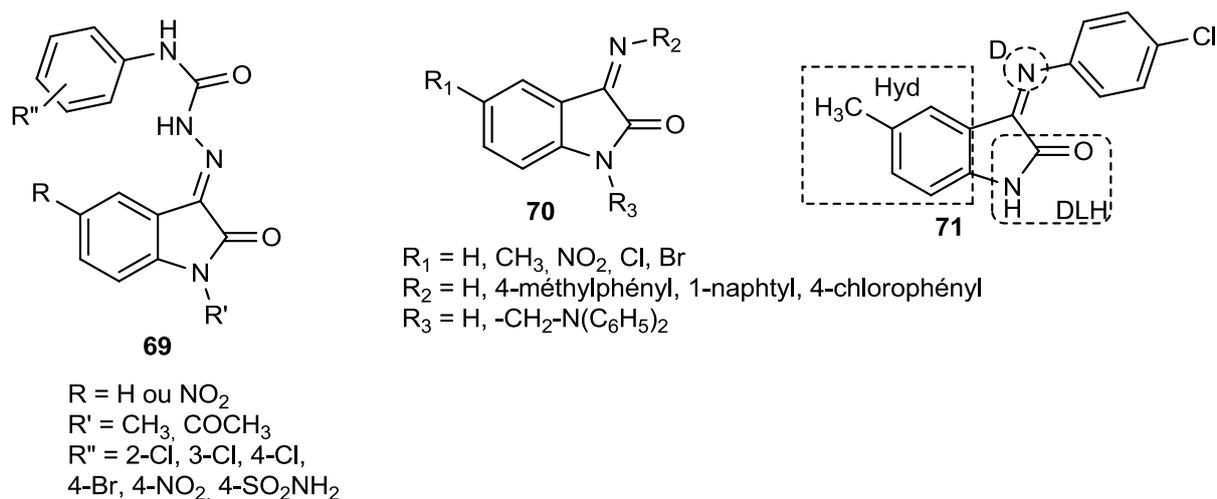


Figure 4 Présentation des dérivés de l'isatine pour lesquels les propriétés convulsivantes ont été étudiées (Hyd = hydrophobe, D = électro-donneur et DLH = domaine de liaison hydrogène)

D'autres anticonvulsivants prometteurs, dérivés de l'isatine mais ne suivant pas nécessairement les particularités structurales présentées juste avant, ont été synthétisés et évalués ces dernières années comme le diamide de *N*-(1-benzyle substitué-2,3-dioxindolin-5-yl)-*N'*-aryldicarbonimidothioïque **72** (Figure 5)⁶¹ ou comme la 1-[5-(2-thiénylméthoxy-1H-indol-3-yl)]propan-2-amine **73** (Figure 5).⁶²

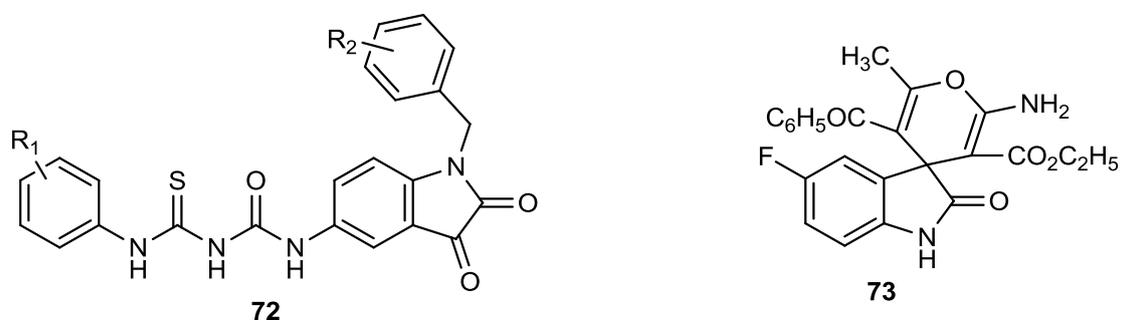


Figure 5 Dérivés d'isatine présentant des pouvoirs anticonvulsivants

L'isatin- β -thiosemicarbazone **74** (Figure 6), dont certains dérivés ont montrés une activité anticonvulsivant,⁶³ fait également partie des dérivés de l'isatine ayant un pouvoir antiviral⁶⁴ et comme pouvant lutter contre des micro-organismes multi-résistants.⁶⁵

1.2.1.2 Activité antivirale, anti-VIH et anticancéreuse

Etudiés par plusieurs groupes, les dérivés de l'isatin- β -thiosemicarbazone présentent des pouvoirs antiviraux selon les positions sur lesquelles les groupements chimiques sont modifiés. Kang *et coll.* ont développé des dérivés pouvant lutter contre le virus de l'herpès⁶⁶ quand Pirrung *et coll.* ont eux mis au point des dérivés agissant sur les virus pox (famille de la variole).⁶⁷

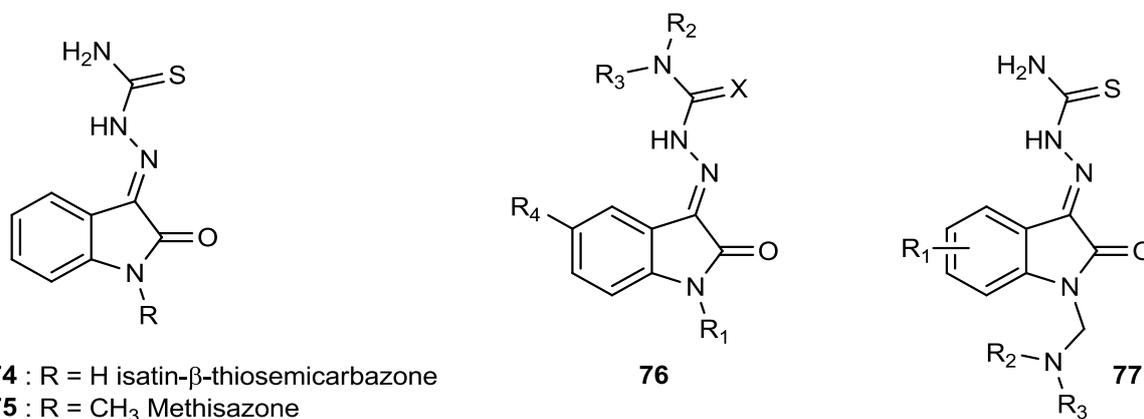


Figure 6 Structure de l'isatine thiosemicarbazone et modèles de recherche utilisés par Kang 76 et Pirrung 77

Les dérivés d'isatines substitués en positions 1, 3 et 5 (voir Figure 2) sont actifs contre l'enzyme protéase 3CL du coronavirus SRAS². Les valeurs IC₅₀³ se trouve dans la fourchette de concentration entre 0,95 et 17,50 μ M.⁶⁸ Le composé le plus efficace est également le plus spécifique à cette enzyme, il faut atteindre de beaucoup plus grandes concentrations (jusqu'à 1mM) pour observer des effets sur d'autres protéases.

Teitz *et coll.* ont déterminé que la *N*-méthylisatin- β -4':4'-diéthylthiosemicarbazone et la *N*-allylisatin- β -4':4'-diallylthiosemicarbazone ont un pouvoir d'inhibition du VIH à des concentrations entre 0,17 μ M et 17,4 μ M.⁶⁹ L'activité anti-VIH de dérivés d'isatine a donc souvent été investiguée sans pour autant de résultats plus intéressants.^{70, 71}

² Syndrome respiratoire aigu sévère

³ Concentration inhibitrice médiane

Concernant l'activité anticancéreuse des dérivés d'isatine, Popp et Pajouhesh ont synthétisé la 3-*o*-nitrophényl hydrazone d'isatine en condensant celle-ci avec l'*ortho*-nitrophényl hydrazine ; ce composé s'est avéré actif contre le carcinome (*Walker 256* ; type de cancer de la peau).⁷² Un brevet de 2014 présente un dérivé d'isatine inhibant la protéine tyrosine phosphatase (PTP) Shp2 impliquée dans la régulation de la prolifération de cellules et donc le développement de cancers.⁷³

1.2.1.3 Activités antimicrobiennes

Lorsqu'un groupe de recherche étudie l'activité antimicrobienne d'une nouvelle molécule, ils indiquent une zone d'inhibition de la molécule sur une culture bactérienne et une concentration minimale d'inhibition (MIC). L'efficacité de ces molécules est comparée à des antibiotiques déjà connus qui servent de standards. De manière générale, l'introduction de groupements électro-attracteurs en position 5, 6 et 7 sur le cycle aromatique de l'indole augmente grandement le pouvoir antimicrobien de l'isatine, le changement en position 5 étant le plus favorable.⁷⁴ Les bases de Mannich et de Schiff comme les composés **78** et **81** (Figure 7)⁷⁵⁻⁷⁷ et les dérivés 3-hydrazines tels que les molécules **79** et **80** (Figure 7)^{78, 79} sont également souvent étudiées pour leur pouvoir antimicrobien.

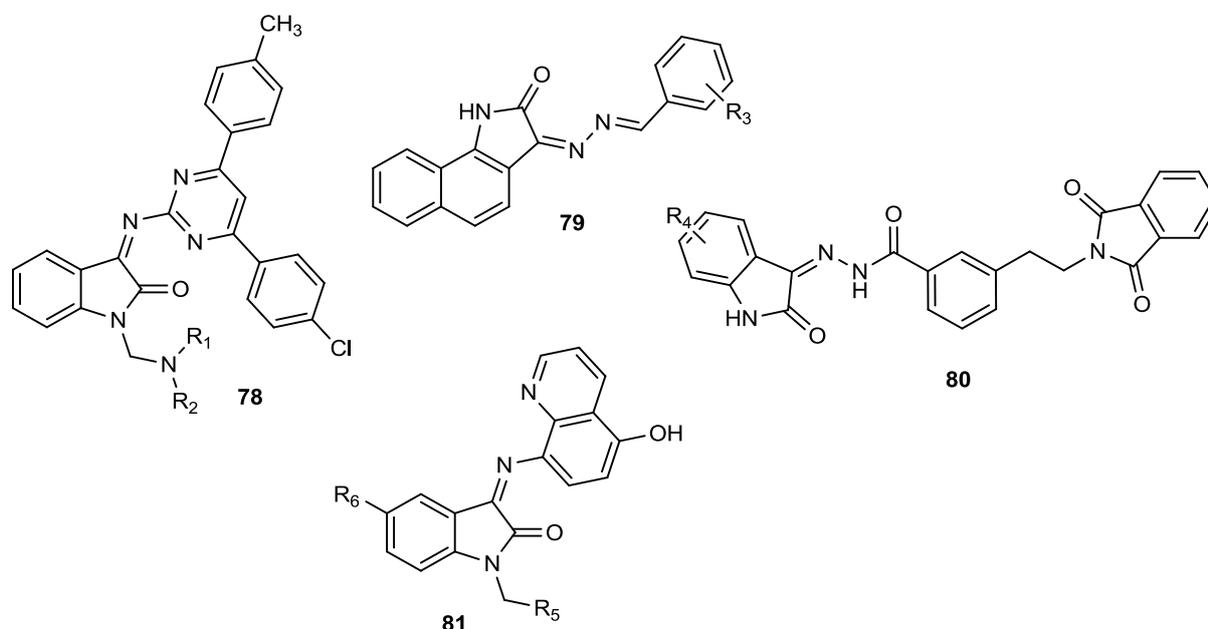


Figure 7 Dérivés d'isatine présentant un pouvoir antibactérien

En combinant l'isatine **83** avec un antibiotique à large spectre comme la ciprofloxacine **84**, on améliore son efficacité sur les bactéries.^{80, 81} (Schéma 26)

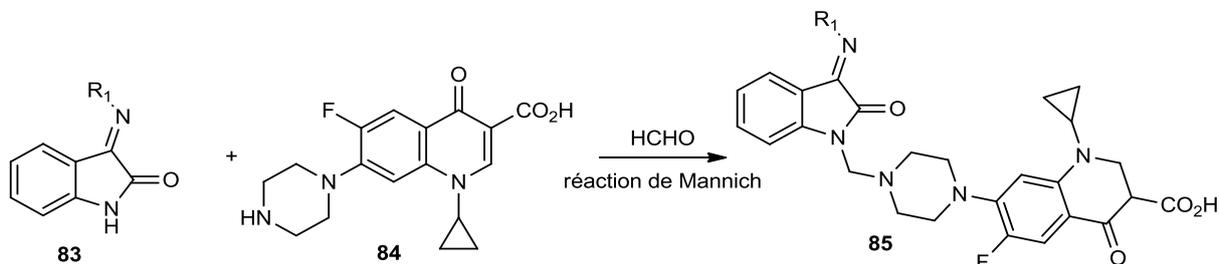


Schéma 26 Préparation d'un dérivé d'isatine et de ciprofloxacine

Etudiée sous sa forme *Isatis tinctoria L*, plante faisant partie de la pharmacopée chinoise, l'isatine a été déterminée comme un traitement efficace des infections pulmonaires provoquées par *Pseudomonas Aeruginosa*.⁸² L'isatine et ses dérivés agissent en bloquant la production de vésicules membranaires,⁸³ les molécules produites par le quorum sensing de la bactérie ainsi que les toxines⁸⁴ et également la synthèse des lipopolysaccharides.⁸⁵ Tout ceci limite la formation de biofilm par Ps. A et donc sa virulence.⁸⁶

Pour déterminer quelle protéine membranaire de Ps. A est impliquée dans la réception des peptides natriurétiques, un outil comportant l'isatine, qui est donc un antagoniste de ces peptides chez Ps. A, permettrait de capter cette protéine. Il s'agit du biocapteur que nous souhaitons développer.

2 Les biocapteurs, un outil innovant

2.1 Généralités sur les biocapteurs

Les biocapteurs sont par définition des « dispositifs de détection comprenant des entités de reconnaissance d'origine biologique couplés à un transducteur permettant de traduire la formation d'un complexe biologique en signal physique ». Ils trouvent des applications dans divers domaines, comme le médical (analyse du taux de glucose dans le sang), l'environnement (mesure de la pollution) ou dans la défense militaire (détection d'agent d'attaque biologique (anthrax)). Ils peuvent être classés dans deux catégories, les premiers étant des machines sophistiquées à haut débit permettant des analyses pointues d'interactions biologiques complexes en laboratoire, les seconds étant des dispositifs portables, faciles à

utiliser par des utilisateurs non-experts pour des utilisations externalisées. Le premier biocapteur fut conçu par Leland C. Clark en 1962 pour suivre en temps réel la composition du sang des patients opérés à cœur ouvert.⁸⁷

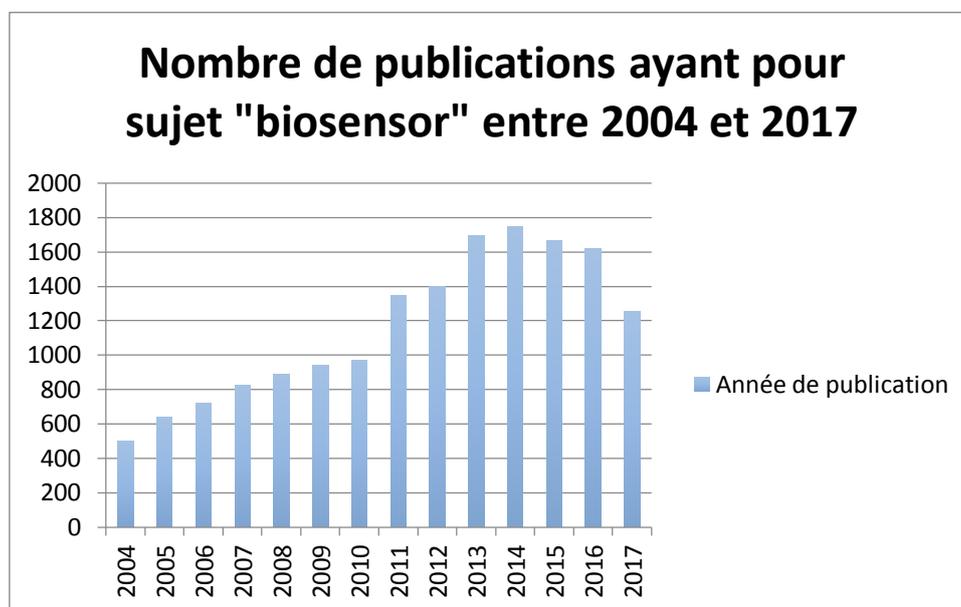


Figure 8. Évolution des publications d'article ayant pour sujet "biosensor" entre 2004 et 2017 (source Scifinder)

Le nombre d'articles publiés ayant pour sujet les biocapteurs dans le domaine de la chimie a augmenté régulièrement entre 2004 et 2014 avant de connaître une légère baisse depuis lors (Figure 8). Ceci montre le dynamisme de la recherche sur les biocapteurs. Les applications cliniques et médicales représentaient 99% du marché des biocapteurs en 2010, mais l'environnement et la gestion des pollutions étaient en demande de biocapteurs adaptés à leurs besoins. Scognamiglio *et coll.* expliquent dans leur revue de 2010⁸⁸ les raisons pour lesquelles peu de biocapteurs sont commercialisés. Ainsi, la stabilité et la spécificité des éléments de reconnaissance, la reproductibilité des processus de fabrication et les limites de détections des capteurs sont les paramètres à maîtriser avant une mise sur le marché.

2.2 Structure et mode de fonctionnement

Les biocapteurs sont composés de deux parties, un élément de reconnaissance biochimique et un élément de détection. L'élément de reconnaissance peut être une enzyme, un anticorps, etc.... tandis que l'élément de détection peut consister en une électrode, une sonde de température ou encore une fibre optique ; tous les différents éléments sont représentés dans la Figure 9. Quand l'élément biologique (biorécepteur) se trouve en présence d'un analyte

auquel il est spécifique, cela va entraîner un changement chimique (tel que la production d'une nouvelle espèce chimique, un dégagement de chaleur, un transfert d'électrons ou un changement de pH ou de masse) qui sera détectable par le transducteur, qui à son tour transformera la réponse obtenue en signal électrique.⁸⁹ Ce signal est ensuite amplifié, transmis au microprocesseur, puis transcrit par affichage digital (sur un écran) ou imprimé (sur papier).

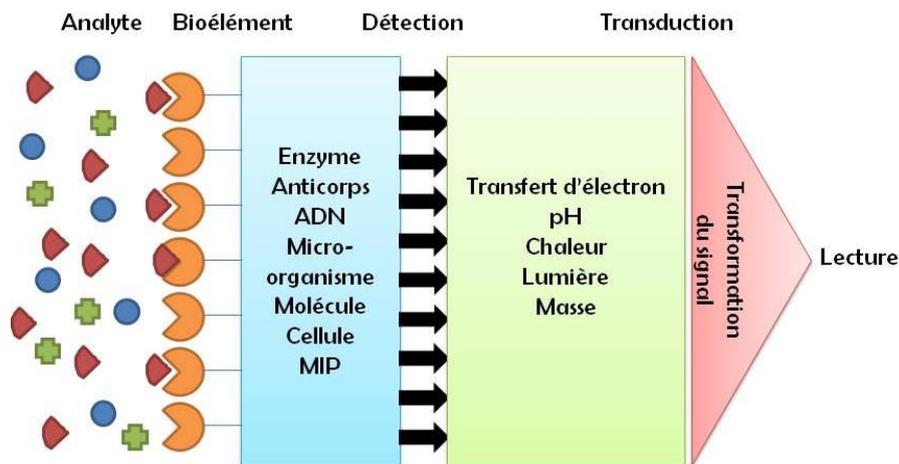


Figure 9 Structure et éléments d'un biocapteur.

Chaque couple biorécepteur/transducteur va déterminer le type de biocapteur, chaque type de transduction et chaque type d'élément de reconnaissance, ainsi que les méthodes d'immobilisation vont être détaillés dans le chapitre suivant. Ils sont classés comme suit (Figure 10):

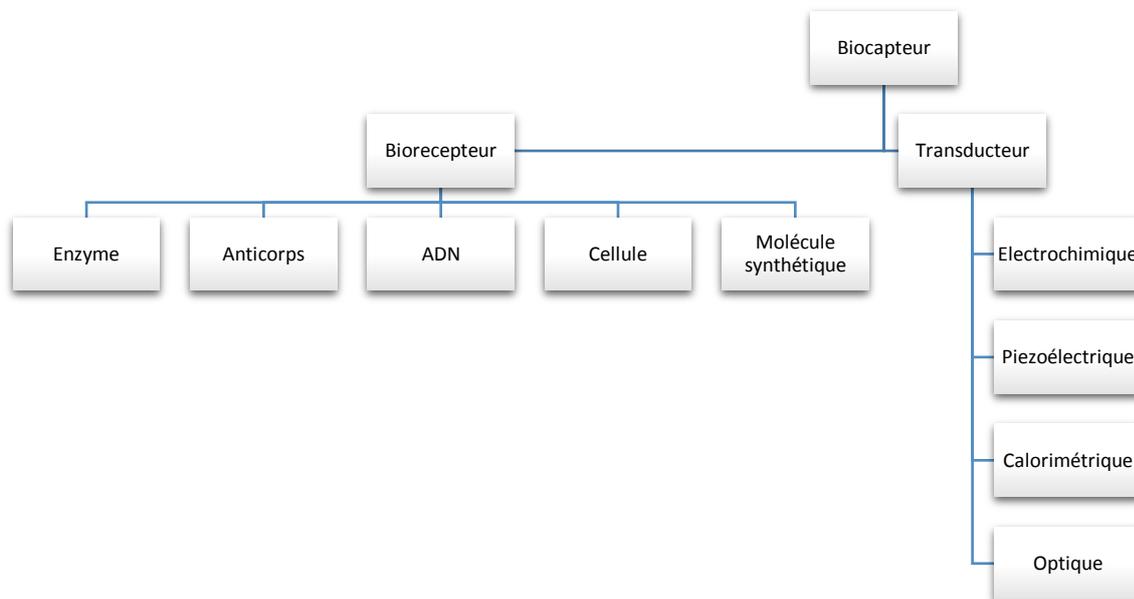


Figure 10 Classement des familles de biocapteurs

2.2.1 Les différents types de transduction

On distinguera les biocapteurs électrochimiques qui mesurent des changements de niveau électronique engendrés par des réactions biochimiques ; les biocapteurs optiques qui mesurent le changement d'intensité lumineuse sur des sondes colorimétriques ; les biocapteurs calorimétriques enregistrant une variation de chaleur et les biocapteurs massiques qui enregistrent une variation de masse suite à la formation d'un complexe analyte/biorecepteur.⁹⁰ Pour une étude plus approfondie de tous les types de capteurs existant, on peut se reporter à l'ouvrage de Janata.⁹¹

2.2.1.1 Électrochimique

Les capteurs électrochimiques sont le groupe le plus ancien et le plus important des biocapteurs.⁹² L'électrochimie implique le transfert de charge entre une électrode et une autre phase (solide ou liquide). Durant ce processus, des changements chimiques interviennent à l'électrode et la charge électrique est conduite à travers l'échantillon. Ces deux phénomènes peuvent être modulés chimiquement et être à la base du processus de détection. Tout capteur électrochimique répond à trois règles énoncées par Janata⁹¹ : premièrement, être en circuit fermé, ce qui signifie d'avoir au minimum deux électrodes par cellule. D'un point de vue purement électrique, cela veut dire qu'une électrode sert de capteur (électrode de travail) et l'autre permet d'avoir un retour de signal (électrode auxiliaire). Deuxièmement, la cellule doit

être dans des conditions d'électroneutralité. Le dernier point à considérer est la nature elle-même du transport de la charge électrique. Si dans la partie transducteur du biocapteur il est de nature électronique, dans la partie biorécepteur il peut être de nature électronique mais également ionique ou même parfois mixte. Dans les deux derniers cas, le transfert d'électron à l'interface électrode/biorécepteur et son mécanisme deviennent un aspect critique de la performance du biocapteur. Selon la première loi de Faraday (1), la charge Q passant à travers l'interface transducteur/bioélément est proportionnelle à la quantité de matière m présente à la surface de l'électrode. Pour une réaction du type (1) où O représente les espèces oxydées, R celles réduites et ne^- le nombre d'électrons :



On peut écrire cette loi de cette façon :

$$m = \frac{QM}{ne^-F} \quad (2)$$

Où m est la masse de substance présente à la surface de l'électrode, M sa masse molaire et F la constante de Faraday ($96485 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$). Comme les espèces O et R diffèrent seulement de n électrons ; ils forment un couple rédox. Les constantes cinétiques k_a et k_c décrivent respectivement la nature dynamique des processus d'oxydation (à l'anode) et de réduction (à la cathode). Quand le passage du courant résulte en un changement de concentration, il est plus pratique d'exprimer la loi de Faraday en termes de concentration molaire et de volume de la cellule (C et V_{cell} respectivement).

$$C = \frac{Q}{nFV_{\text{cell}}} \quad (3)$$

Il est possible d'extraire des informations d'un système biologique en étudiant ses propriétés électriques, on fera donc une analyse électrochimique de la réaction, soit en mesurant le courant généré (ampérométrie), soit en mesurant une accumulation de charge ou de potentiel électrique (potentiométrie) ou en altérant les propriétés conductrices du média entre les électrodes (conductimétrie) (Figure 11). Comme les réactions électrochimiques sont généralement détectées seulement à courte distance de la surface de l'électrode, le choix des électrodes est crucial pour assurer la performance du biocapteur. Il faudra donc prendre en compte le matériau de l'électrode, sa modification de surface ou ses dimensions qui peuvent

tous influencer la sensibilité de détection de l'électrode. Une cellule électrochimique peut être composée de deux ou trois électrodes : une référence (exemple : Ag/AgCl en milieu aqueux) maintenue à distance de la réaction pour garder un potentiel stable et connu ; une électrode de travail qui sert de transducteur et une contre-électrode (ou électrode auxiliaire) pour permettre d'avoir un circuit fermé.⁹³ Ces dernières doivent donc être conductrices et chimiquement stables, c'est pour cela que les matériaux utilisés sont le plus souvent le platine, l'or, le noir de carbone (graphite) et le silicium.⁹⁴

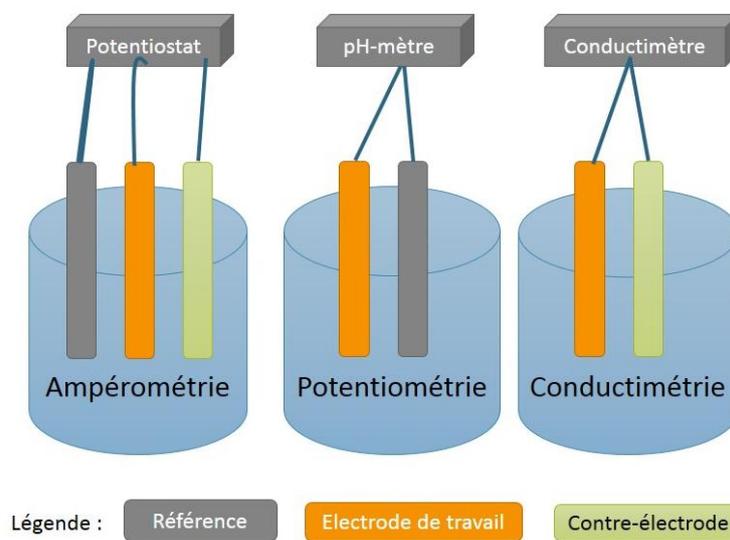


Figure 11 Les trois types de cellules électrochimiques

2.2.1.1.1 Ampérométrie

En ampérométrie, le courant résultant de l'oxydation ou de la réduction de l'espèce électroactive est mesuré en continu à un potentiel constant, si le potentiel varie durant la mesure on parlera de voltammétrie. La concentration en analyte est directement proportionnelle au pic de courant mesuré sur une plage linéaire de potentiels. Cependant le transfert d'électrons entre le site actif où a lieu la réaction biologique et l'électrode n'est pas toujours possible directement. C'est pour cela que la majorité des biocapteurs ampérométriques font appel à un médiateur rédox. C'est une entité chimique qui présente un potentiel rédox bas, avec une stabilité des formes oxydées ou réduites suffisante pour permettre un taux de transfert d'électrons rapide entre le site actif et l'électrode de travail.⁹⁵ L'ampérométrie est malgré cela la technique électrochimique la plus souvent utilisée du fait qu'elle présente une sensibilité supérieure aux autres techniques. Un biocapteur ampérométrique peut fonctionner en configuration di- ou tri-

électrodes. Le principal désavantage de l'utilisation de seulement deux électrodes est de ne pas pouvoir contrôler le potentiel appliqué à l'électrode de travail à courant élevé, ce qui se traduit souvent par un intervalle de balayage en potentiel plus réduit. C'est pour résoudre ce problème que la contre-électrode a été introduite dans les montages ampérométriques, comme cela le voltage est appliqué entre l'électrode de travail et de référence tandis que le courant passe lui entre l'électrode de travail et la contre-électrode.^{96, 97} La technique ampérométrique est le plus souvent associée à l'utilisation d'enzyme comme biorécepteur ce qui sera décrit plus loin ; elle est également bien adaptée à la détection à l'échelle industrielle pour identifier ou quantifier des analytes tels que le glucose, les lactates⁹⁸ ou l'acide sialique.⁹⁹ C'est une technologie déjà bien aboutie car plusieurs biocapteurs ampérométriques sont disponibles commercialement, principalement pour le contrôle du diabète par détection du taux de glucose (ex : Accu-Check, Roche).¹⁰⁰

2.2.1.1.2 Potentiométrie

Dans un montage en potentiométrie, l'électrode de travail est spécifique à un type d'ions et mesure la quantité d'ions à son interface comparée à l'électrode de référence lorsque le courant est nul ou proche de zéro. On peut relier le potentiel à la concentration en ion grâce à l'équation de Nernst :

$$E_{cell} = E_{cell}^0 - \frac{RT}{nF} \ln Q \quad (4)$$

avec E_{cell} le potentiel, R la constante universelle des gaz parfaits, T la température en Kelvin, n le nombre de charge à l'électrode, F la constante de Faraday et Q le ratio entre la concentration en ion à l'anode par rapport à la concentration en ion à la cathode.¹⁰¹ Par le passé, l'électrode en verre d'un pH-mètre était utilisée comme transducteur physicochimique,¹⁰² mais de nos jours ce sont plus souvent des transistor à effet de champ (FET) sensible aux ions (Ion Sensitive Field Effect Transistor, ISFET) ou des capteurs photopotentimétrique (Light Addressable potentiometric sensor, LAPS).¹⁰³ Un schéma explicatif de la structure d'un JFET (J pour jonction) est présenté dans la figure suivante (Figure 12) :

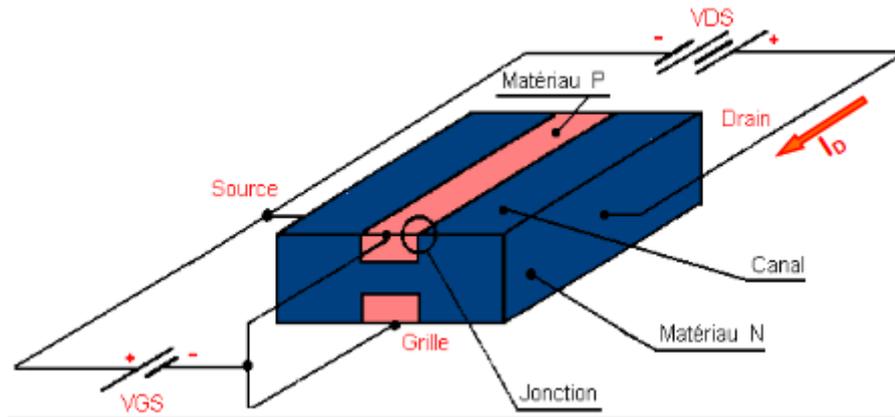


Figure 12 Schéma général d'un FET

Ce type de transducteur est souvent composé d'un matériel semi-conducteur dont le fonctionnement est lié au déplacement d'un seul type de porteur de charge (trou ou électron). Un substrat de type P très fortement dopé (P^+) formera la Grille. Le matériau faiblement dopé N constituera le canal pris en sandwich par la grille. Deux îlots très fortement dopés N^+ seront la source S et le drain D. Dans cette configuration on obtient un JFET de type Canal N, si le dopage des matériaux utilisés est inversé, on aura un JFET de type Canal P. La mise en contact de deux matériaux dopés différemment crée une zone de déplétion à leur jonction car les électrons présents dans N vont être attirés par P et inversement les trous dans P vont être attirés par N ; réduisant ainsi la zone de diffusion disponible dans le canal. Si une tension est appliquée entre la source et le drain (V_{DS}) cette zone de déplétion va augmenter, le courant va augmenter proportionnellement à V_{DS} ($U = R \times I$) et le transistor va se comporter comme une résistance. A une certaine tension $V_{DS} = V_P$ (P pour pincement), le courant ne varie plus, c'est le courant de saturation I_{DSS} . Lors de l'application d'une tension à la Grille (V_{GS}), le courant de saturation est atteint plus rapidement ce qui aura pour effet de diminuer la valeur de V_P , la nouvelle tension $V_{P'}$ est égale à :

$$V_{P'} = V_P - V_{GS} \quad (5)$$

Ces phénomènes peuvent être représentés dans le graphique suivant (Figure 13):

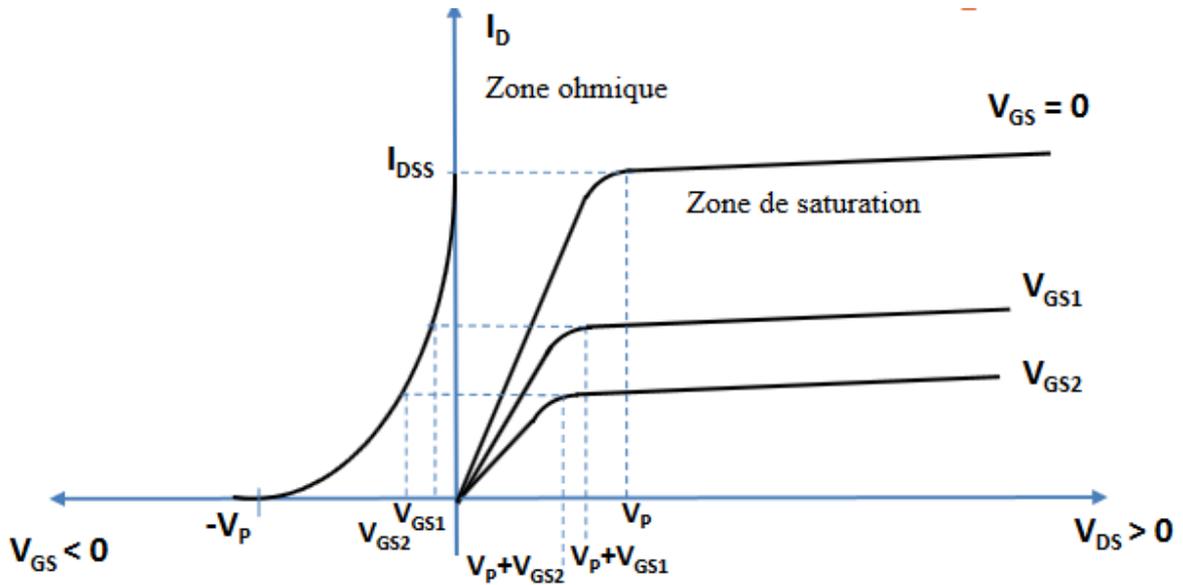


Figure 13 Courbes caractéristique obtenues avec un JFET (à droite V_{DS} en fonction de V_{GS} , à gauche I_{DSS} en fonction de V_{GS}).

Pour adapter ce système à un biocapteur, il suffit de modifier la grille avec des récepteurs moléculaires ou une membrane sélective d'ion en fonction de l'analyte ciblé. L'accroche de biomolécules chargées résultera dans une accumulation ou un épuisement en porteurs de charges causé par le changement de charges électriques à la grille. Comme la conductivité du canal est dépendante de la tension à la grille, l'utilisation de FETs comme transducteur est intéressante car on peut assimiler le champ électrique généré par l'accroche de biomolécules à la grille comme étant similaire à celui généré par une tension à la grille. Lorsqu'un courant V_{DS} de valeur inférieure à $(V_{GS} - V_P)$ est appliqué entre la source et le drain, une distribution graduelle des charges se forme dans le canal. De ce fait le FET suit un régime linéaire qui suit l'équation (6) :

$$I_{DS} = \frac{W}{L} \times \mu C_i (V_{GS} - V_P) \times V_{DS} \quad (6)$$

avec μ la mobilité des électrons dans le canal ; W et L sont respectivement la profondeur et la longueur du canal ; C_i est la capacitance de la grille par unité d'aire. A V_{DS} supérieur à $V_{GS} - V_P$, le FET se trouve en zone de saturation et I_{DS} s'exprimera comme dans l'équation (7).¹⁰⁴

$$I_{DS} = \frac{W}{2L} \times \mu C_i (V_{GS} - V_P)^2 \quad (7)$$

Schöning et Poghossian ont publié une revue des biocapteurs utilisant des FETs comme transducteurs.¹⁰⁵

Egalement utilisé comme transducteur, un LAPS (Figure 14) est un capteur photo-électrochimique qui associe une structure proche des EIS (électrolyte-isolant-semi-conducteur) et une source de lumière et dont la mesure repose sur la fonctionnalité photovoltaïque du substrat.¹⁰⁶ Lorsqu'un rayon lumineux illumine la surface du LAPS, le semi-conducteur absorbe l'énergie et produit des paires trou-électron ce qui génère un photo-courant. Maintenant, si on applique une tension au dispositif, le photo-courant va être modifié et on obtiendra une courbe intensité-potentiel (I-V). Si des ions sont adsorbés dans les zones sensibles, la tension entre l'isolant et le semi-conducteur va s'en trouver modifiée ; donc la concentration en ions pourra être obtenue en mesurant la différence de courant entre les courbes I-V obtenues. L'avantage principal des LAPS est son utilisation multi-paramètres et multipoint. Différents analytes peuvent être détectés simultanément en modifiant les zones spécifiques sur la couche isolante. En positionnant le rayon lumineux sur la zone souhaitée, on peut obtenir la valeur de tension localement et donc correspondant à l'analyte spécifique de cette région. Ces types de biocapteurs sont décrits plus précisément par Siqueira *et coll.*¹⁰⁷

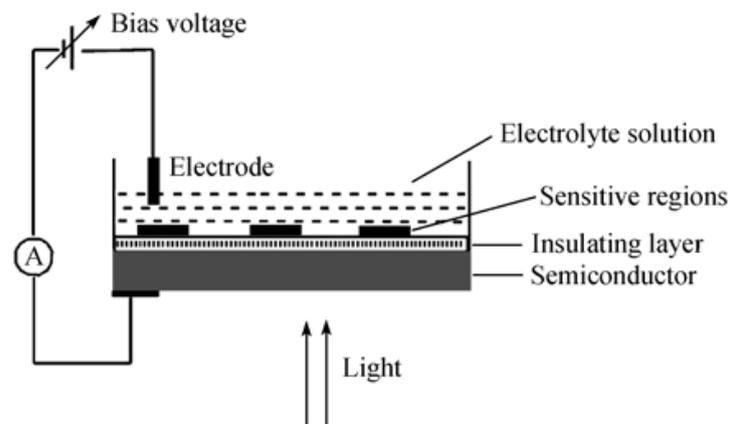


Figure 14 Schéma d'un LAPS

2.2.1.1.3 Conductimétrie

La conductimétrie est quant à elle encore très peu utilisée, cette technique est basée sur la mesure de conductivité du courant entre deux électrodes. Ce courant résulte de la dissociation de l'électrolyte en ions et de la migration de ceux-ci vers les électrodes sous l'effet d'un champ électrique. Les avantages de cette technique sont leur coût de production faible, l'absence d'électrode de référence et le mode de mesure différentiel qui permet de diminuer considérablement les interférences. Jaffrezic-Renault et Dzyadevych présentent une revue de

cette technique dans le cadre du suivi de polluants environnementaux (pesticides, herbicides, etc.).¹⁰⁸

2.2.1.2 Optique

Le développement de capteurs optiques a été d'une grande importance pour les domaines touchant au diagnostic et au suivi des maladies, à la découverte de potentiels médicaments, pour la protéomique (l'étude des protéines) et pour la détection dans l'environnement de polluants ou d'agents biologiques.¹⁰⁹ Dans un capteur optique (Figure 15), le processus de reconnaissance induit soit un changement de réponse du transducteur à un signal lumineux soit c'est la réaction elle-même qui produit un signal optique qui sera détecté par le transducteur. La détection optique comporte différentes sous-classes qui seront détaillées plus loin. Elles se distinguent soit par la mesure de l'émission lumineuse soit par la détection d'un changement dans les ondes lumineuses émises (diffraction, réfraction). Ces sous-catégories peuvent être également divisées entre celles nécessitant un marquage et celle où la détection est directe. Cette dernière catégorie est plus attirante car nul besoin de produire des bioéléments marqués ou des intermédiaires de réaction détectables. Les capteurs optiques sont généralement sensibles et l'analyse non-destructrice pour l'échantillon.

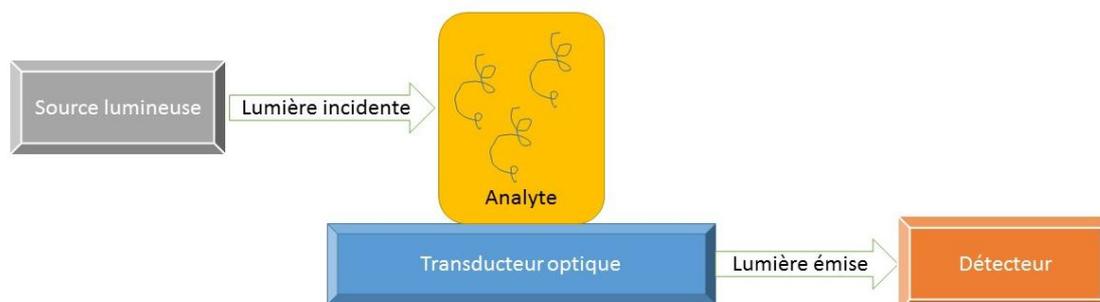


Figure 15 Schéma montrant les parties principales d'un biocapteur optique

2.2.1.2.1 Mesure d'émission lumineuse

2.2.1.2.1.1 Fluorescence

Parmi toutes les propriétés optiques exploitées pour le fonctionnement d'un biocapteur, la méthode la plus communément utilisée reste la fluorescence. Il s'agit de la propriété d'une molécule fluorescente (fluorophore ou fluorochrome) à émettre des ondes lumineuses fluorescentes après avoir absorbé l'énergie d'un photon. Depuis longtemps un des outils

favori du chimiste analytique, la fluorescence peut être utilisée pour la mesure de la présence de métaux en milieux aqueux ¹¹⁰ ou du pH dans des cellules vivantes. On peut également s'en servir pour détecter un type de cellule dans un mélange hétérogène ¹¹¹, pour étudier le métabolisme de bioorganisme ¹¹², ou pour simplement déterminer une concentration. Mais si cette technique est tellement utilisée dans le domaine des biocapteurs, c'est que la propriété fluorescente de la majorité des fluorophores organiques est sensible aux changements dans son environnement, ce qui est indispensable pour des applications de détection. La majorité des biocapteurs à fluorescence nécessite malgré tout l'utilisation de marqueurs fluorescents car cette propriété n'est pas disponible chez toutes les cibles analysées. La haute sensibilité de cette méthode permet la détection à l'échelle de la molécule seule et donc un seul capteur pourrait servir à la détection de plusieurs composés différents, on appelle ça le multiplexage. Un exemple de support unique pour détecter par fluorescence de multiples analytes a été mis au point par Chen *et coll.* ¹¹³ Une méthode d'immuno-essai a d'ailleurs été développée grâce à la fluorescence en temps résolu (time-resolved fluoroimmunoassay TR-FIA) ; calqué sur le système ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), il présente l'avantage de ne pas utiliser de substrats potentiellement toxiques ou mutagènes comme les tests ELISA et sont basés sur l'utilisation de complexes de lanthanide fluorescents, qui présentent l'avantage d'avoir une fluorescence à temps de vie plus long que celle typique des bruits de fond. ¹¹⁴

2.2.1.2.1.2 Chimiluminescence et bioluminescence

La chimiluminescence (CL) est une émission lumineuse produite par une réaction chimique. Dans le cadre des biocapteurs, le bioélément ou l'analyte sont marqués avec un composé chimiluminescent tel que le luminol ¹¹⁵ qui une fois activé produit une émission lumineuse à une intensité donnée. Cette lumière peut être mesurée grâce à un photomultiplicateur relié à un système électronique pour convertir et enregistrer le signal. Comparé à la fluorescence, l'utilisation de la CL présente plusieurs problèmes comme la faiblesse des signaux obtenus et les interférences venant des interactions entre analytes non-liés et biorécepteur. L'utilisation de peroxydase de raifort (HRP, horseradish peroxydase) catalyse la production de lumière du luminol et donc améliore le signal. Ainsi ont pu être réalisés des essais quantitatifs pour divers analytes via une mini-caméra ¹¹⁶ ou la mise au point de micro-réseau pour la détection de protéines ¹¹⁷ ou de bactéries pathogènes. ¹¹⁸

La bioluminescence (BL) provient naturellement d'organismes vivants dans lesquels une substance chimique est électroniquement excitée puis émet de la lumière en revenant à l'état non-excité ; on peut citer comme exemple les lucioles qui possèdent l'enzyme luciférase qui catalyse cette réaction.¹¹⁹ Ce type de transduction est souvent utilisé avec des biocapteurs à cellules entières ; par exemple Charrier a développé durant sa thèse un biocapteur en ligne contenant des bactéries bioluminescentes pour mesurer la pollution métallique des eaux.^{120, 121} Roda et Guardigli ont rédigé une revue de la littérature sur les techniques d'analyses utilisant la CL et la BL.¹²²

2.2.1.2.2 Mesure de modification du rayon lumineux

Un exemple de biocapteur où le signal obtenu repose sur la modification d'un rayon lumineux utilise la résonance plasmonique de surface (SPR). Les biocapteurs basés sur cette technologie SPR se servent des ondes électromagnétiques spéciales appelées plasmon de surface pour détecter les interactions qui ont lieu entre la surface et son milieu.

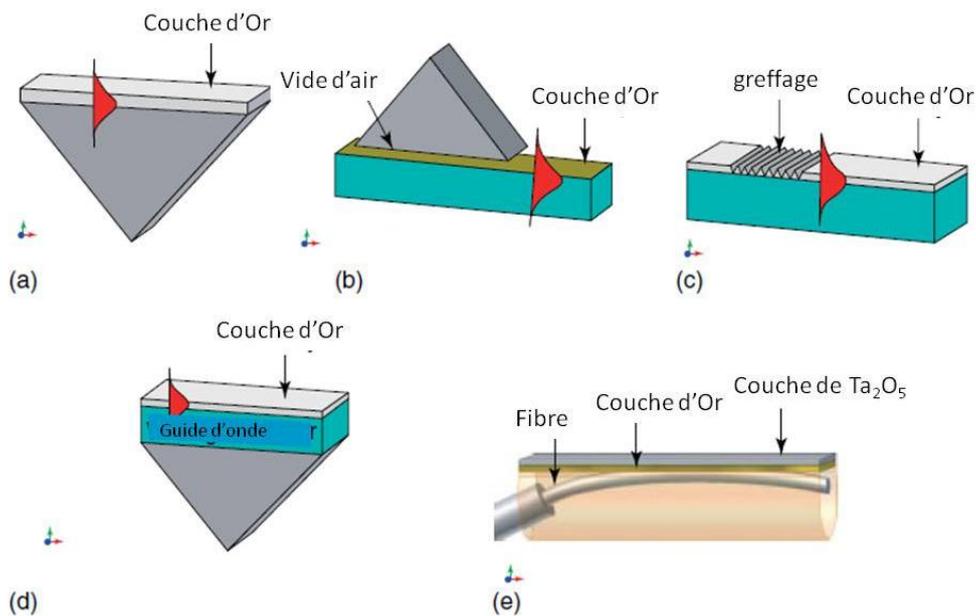


Figure 16 Différentes configurations de coupleur SPR : (a) configuration de Kretschmann à prisme, (b) configuration de Otto à prisme, (c) coupleur greffé, (d) coupleur à guide d'onde et (e) coupleur à fibre optique¹²³

La résonance plasmonique de surface est une oscillation charge-densité qui a lieu à l'interface entre deux milieux avec des constantes diélectriques opposées soit un métal et un isolant. La configuration la plus répandue utilise un coupleur à réflexion totale atténuée (ATR) mis au

point par Kretschmann et Raether en 1971¹²⁴ mais il en existe plusieurs autres types (Figure 16).

Dans cette configuration de Kretschmann et Raether (Figure 17), le rayon d'excitation passe à travers un milieu à haute densité (un prisme en verre) qui va modifier la vitesse et le vecteur de l'onde lumineuse incidente (k_{in}).

$$k_{in} = \frac{2\pi}{\lambda} \sin \theta \sqrt{\epsilon_p} \quad (8)$$

λ est la longueur d'onde de la lumière d'excitation, θ est l'angle d'incidence et ϵ_p est la constante diélectrique du prisme.^{125, 126} On peut décrire le vecteur d'onde (k_{sp}) du plasmon de surface se propageant à l'interface métal-prisme par l'équation suivante :

$$k_{sp} = \frac{\omega_{sp}}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_p}{\epsilon_m + \epsilon_p}} \quad (9)$$

avec ω_{sp} la fréquence angulaire du plasmon de surface, ϵ_m la constant diélectrique du film de métal et c la vitesse de la lumière. Pour que l'onde plasmique se propage à l'interface du métal et de l'isolant, il faut que k_{in} corresponde à k_{sp} pour qu'une partie de l'énergie de photon soit transféré au plasmon de surface.

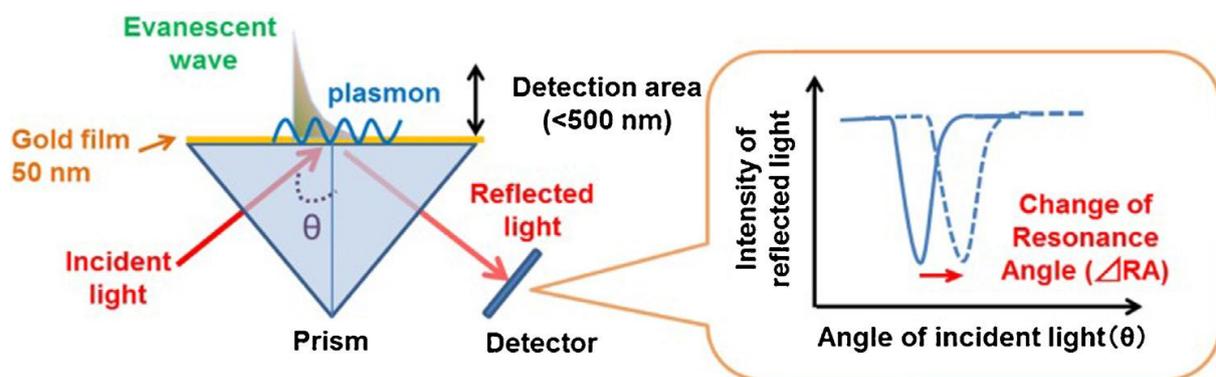


Figure 17 Schéma explicatif de l'utilisation d'un plasmon de surface¹²⁷

L'utilisation de la SPR à des buts de biocapteur a été proposée par Liedberg *et coll.* en 1983^{128, 129} car les changements de masse à la surface du capteur qui ont lieu lors l'association ou la dissociation du complexe biomoléculaire dans la zone de détection induisent une modification de l'angle de résonance de la lumière incidente, voir la Figure 17. Contrairement aux méthodes présentées dans le paragraphe précédent, la SPR ne nécessite pas

l'utilisation de marqueurs. Les capteurs SPR peuvent être couplés à des outils de capture d'image ce qui permet d'observer en temps réel les changements induits par les différences en surface ; on parle alors de SPRi (i pour imaging).¹³⁰ Avec le développement des nanomatériaux, on a pu observer l'émergence de la SPR dite localisée.^{131, 132} Les propriétés plasmoniques des nanoparticules de métaux comme l'or ou l'argent rendent les signaux optiques obtenus plus forts et mieux contrôlables.¹³³ Par exemple, un film métallique comprenant des nano-trous ne nécessite pas d'ATR pour activer la SPR, une source de lumière classique et un microscope sont suffisants pour analyser cette surface.¹³⁴ Toutes les dernières avancées des biocapteurs à SPR ont été revues récemment par Singh *et coll.*¹³⁵

2.2.1.3 Ondes vibrationnelles

Un détecteur sensible à la masse réagit au poids de soluté passant par unité de temps. Cette transduction mécanique est principalement basée sur la génération et la détection d'ondes mécaniques ou acoustiques. Les détecteurs de masse les plus communs utilisent les cristaux piézoélectriques, les microbalances à quartz (QCM) et les ondes acoustiques de surface (SAW).

La piézoélectricité est la charge électrique qui s'accumule dans certains matériaux solides – notamment les cristaux, les céramiques et parfois des tissus organiques comme les os, l'ADN ou certains types de protéines – en réponse à la pression. Les transducteurs à ondes acoustiques sont classés selon le mode de propagation des ondes : soit à la surface soit à travers les matériaux piézoélectriques. Durmus *et coll.* ont détaillé en 2014 les principes des différents types de biocapteurs à ondes acoustiques ainsi que les avantages et les inconvénients de ces systèmes.¹³⁶

Dans la catégorie de transducteurs à propagation d'ondes acoustiques à travers les matériaux ; les microbalances à quartz ou QCM sont composées d'un fin disque de quartz pris en sandwich entre deux électrodes. Ce sont de loin les biocapteurs à sensibilité de masse les plus populaires ; Cooper en fait l'observation dans 3 revues traitant de la QCM sur la période entre 2001 et 2010.¹³⁷⁻¹³⁹ La QCM est un outil de référence pour la détection sans marquage proposant ainsi une bonne alternative aux détecteurs optiques.¹⁴⁰ Leur mode d'oscillation dépend de la façon dont le cristal a été taillé. En mesurant la fréquence d'oscillation il est possible de déterminer un changement de masse, car lorsqu'un changement est appliqué à la

surface du quartz la fréquence d'oscillation se modifie. Sauerbrey a décrit la relation linéaire qui relie la fréquence d'oscillation au changement de masse par unité d'aire :

$$\Delta f_m = -\frac{f_0^2}{F_q \rho_q} m_s = -\frac{f_0^2}{F_q \rho_q} \frac{\Delta m_s}{A_{el}} \quad (10)$$

où f_0 est la fréquence de résonance du résonateur à quartz non-perturbé, F_q la constante de fréquence du cristal ($F_q = f_0 \times d_q$ avec d_q l'épaisseur du cristal), ρ_q la densité de masse et A_{el} la taille de l'électrode à résonateur à cristal.¹⁴¹ Cette équation est valable pour des couches fines et solides déposées sur le résonateur et pour des analyses en conditions sèches. Ce n'est que plus tard que les QCM furent utilisées pour des mesures dans des conditions liquides.¹⁴² Dans ces conditions, la viscosité et la densité changent également la fréquence d'oscillation du quartz, les QCM sont donc classées dans les capteurs d'onde acoustique de masse ou des résonateurs de cisaillement d'épaisseur (thickness-shear mode resonator).

Les capteurs d'onde acoustique de surface (SAW) utilisent également les propriétés piézoélectriques des cristaux mais seulement en surface et à des fréquences beaucoup plus élevées (entre 100 MHz et 1 GHz) ce qui apporte une plus grande sensibilité de ces capteurs par rapport aux QCM.¹⁴³

2.2.1.4 Thermométrie

La microcalorimétrie est la mesure par des thermocouples, des thermistors ou des thermopiles (montage de thermocouples en série) du changement de température induit par une réaction biochimique. Ces réactions peuvent soit générer de la chaleur (exothermique) soit en absorber (endothermique). L'énergie absorbée ou générée est proportionnelle au nombre de molécules produites par la réaction biochimique :

$$Q = -n_p(\Delta H) \quad (11)$$

avec Q la chaleur totale, n_p le nombre de mole du produit et ΔH le changement d'enthalpie molaire. On peut également l'exprimer en fonction de la capacité calorifique C_p du système, en comptant le solvant : $Q = C_p(\Delta T)$ ce qui permet en mesurant le changement de température de trouver le nombre de mole créée par la réaction : $\Delta T = -\Delta H n_p / C_p$.

Historiquement ces systèmes furent développés avec des thermocouples ; deux métaux de natures différentes reliés par deux jonctions aux températures T_1 et T_2 , c'est la différence de

température entre ces deux jonctions qui est mesurée. Le principal inconvénient de ces thermocouples est son manque de précision, il est en effet difficile d'obtenir des mesures avec une erreur inférieure à 0,1-0,2 °C. Les thermistors (oxydes de métaux principalement) présentent un coefficient de résistance à la température très négatif, de l'ordre de $-4\%/^{\circ}\text{C}$ ce qui permet de faire des mesures de changement de température à 10^{-5} degrés près. Les systèmes de mesure se présenteront le plus souvent sous forme de colonne.

Les capteurs thermiques sont la dernière catégorie de transducteurs présentée, les biocapteurs peuvent être classés également par le type de bioélément utilisé, par exemple pour les transducteurs thermiques, les bioéléments le plus couramment utilisés sont les enzymes, on parle alors d'enzyme thermistor (ET).^{144, 145} Le paragraphe suivant liste les grandes catégories de bioéléments disponibles pour les biocapteurs.

2.2.2 Les éléments biologiques immobilisés

L'élément biologique accroché à la surface sera responsable de la reconnaissance de l'analyte ciblé, et le choix de cet élément de reconnaissance peut grandement influencer sur les performances analytiques du biocapteur. Une récente revue met en comparaison les éléments de reconnaissance dit classiques comme les enzymes, les anticorps, les acides aminés ou les cellules complètes avec des éléments de reconnaissance plus récemment utilisés comme les phages, les aptamères ou des éléments issus de la chimie biomimétique.¹⁴⁶

2.2.2.1 Les enzymes

Les enzymes sont des biocatalyseurs très efficaces qui ont la capacité de reconnaître spécifiquement leurs substrats, même dans un mélange, et de catalyser leur transformation. Les biocapteurs enzymatiques associent une couche contenant ces biocatalyseurs et un transducteur. Leur principe de fonctionnement repose sur l'action catalytique et la capacité de liaison entre une enzyme et son substrat pour une détection spécifique. Deux mécanismes de détection peuvent être utilisés avec les enzymes : soit la capacité de l'enzyme à convertir catalytiquement un analyte d'une forme non détectable à une forme détectable (ou inversement) ; soit la capacité modératrice voir inhibitrice de l'analyte sur l'activité de

l'enzyme. Ce fort pouvoir catalytique fait que la limite de détection⁴ de ce type de biocapteur est beaucoup plus basse que pour les autres types.

Ainsi l'enzyme glucose oxydase (GOD) a été le premier élément biologique utilisé par Clark et Lyons pour leur électrode. Elle servait à mesurer le taux d'oxygène consommé lors de la réaction catalysée par l'enzyme avec le glucose :



L'enzyme étant piégée dans une membrane à dialyse autour d'une électrode à oxygène (cathode de platine et anode d'argent). Depuis l'électrode à glucose a connu un fort développement, via une « seconde-génération » d'électrode où la présence d'un médiateur assure un transfert d'électrons plus direct entre l'enzyme et l'électrode (et ne repose plus sur la mesure de peroxyde dans le milieu comme la « première-génération »). L'apparition d'une troisième génération de biocapteur à glucose impliquant un transfert direct d'électrons entre l'enzyme et l'électrode est discutée par Das *et coll.* ; celle-ci semble compromise à cause du lent transfert d'électron et de la dénaturation des enzymes.¹⁴⁷ Les mécanismes de réponse des trois générations de biocapteurs sont illustrés dans la Figure 18. Lorsque la technologie a été maîtrisée, la miniaturisation des instruments par impression, a permis une utilisation plus personnelle, rapide et économique du biocapteur permettant ainsi un meilleur contrôle de la glycémie chez les personnes diabétiques.^{100, 148}

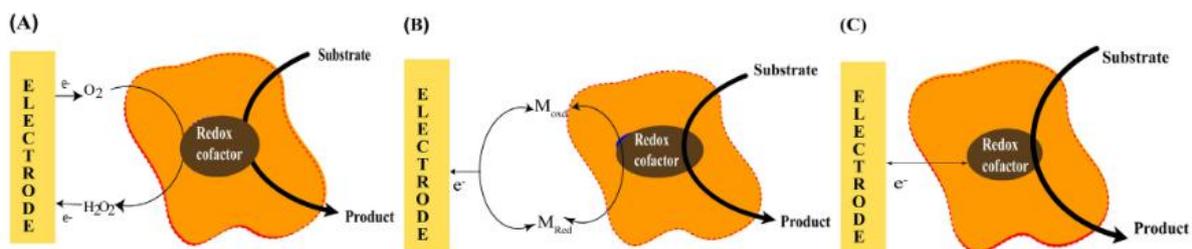


Figure 18 Différence de mécanisme de réponse entre les 3 générations de biocapteur ampérométrique à enzyme. (A) 1^{ère} génération où c'est la mesure du substrat/produit qui sert d'indicateur rédox ; (B) 2^{ème} génération avec la présence d'un médiateur synthétique pour relayer les électrons jusqu'à l'électrode et (C) 3^{ème} génération où un transfert direct d'électrons entre l'enzyme et l'électrode permet d'obtenir une réponse.¹⁴⁷

Un autre exemple d'enzyme utilisée comme biocapteur, l'urate oxydase a été immobilisée sur une électrode. Elle permet de catalyser l'oxydation de l'acide urique en allantoiné, peroxyde

⁴ la limite de détection est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être détectée, avec une incertitude acceptable, mais non quantifiée dans les conditions expérimentales décrites de la méthode.

d'hydrogène et dioxyde de carbone. On va donc mesurer soit la diminution en dioxygène dans le milieu soit la formation de peroxyde d'hydrogène.¹⁴⁹

Les biocapteurs à enzyme ne sont pas seulement utilisés dans le domaine biomédical, Kuswandi et Mascini ont publié un article référençant les biocapteurs enzymatiques utilisés dans le contrôle environnemental.¹⁵⁰ Ces capteurs sont basés sur l'inhibition de l'enzyme par le polluant, par exemple l'acétylcholinestérase est une enzyme qui est inhibée par les pesticides,¹⁵¹ et nécessite une analyse en plusieurs étapes, une première mesure de l'activité de l'enzyme avant exposition à l'analyte contenant les polluants, puis une seconde mesure de l'activité résiduelle de l'enzyme.¹⁵²

L'un des problèmes majeurs rencontrés lorsque les enzymes sont employées comme bio récepteurs est leur stabilité, que ce soit en stockage ou en opération. Les enzymes sont très sensibles à leur environnement, elles peuvent être désactivées, inhibées ou dépliées par adsorption ou par induction chimique ou thermique. Ce problème peut être minimisé en choisissant une méthode d'immobilisation adéquate, malgré tout le temps de vie d'un biocapteur enzymatique ne dépasse pas 10 semaines. Les enzymes sont tout de même largement utilisées comme marqueur comme par exemple dans les tests ELISA.

2.2.2.2 Les anticorps ou fragments d'anticorps

Les anticorps (Ac) sont des protéines générées par le système immunitaire pour identifier les menaces sur l'organisme (virus, bactérie ou parasite). On distingue les Ac polyclonaux (qui peuvent se lier à plusieurs épitopes) des monoclonaux (qui ne reconnaissent qu'un type d'épitope). Les anticorps sont largement employés dans les domaines d'analyses cliniques, environnementales ou agroalimentaires car ils présentent une grande affinité et spécificité envers leurs antigènes (Ag) avec lesquels ils forment un complexe très stable de nature non-covalente. Lorsque des anticorps sont utilisés comme élément de reconnaissance biologique sur un biocapteur, celui-ci portera le nom d'immunocapteur. Lorsqu'il n'est pas possible d'utiliser un anticorps complet comme bioélément celui-ci peut être fragmenté par clivage enzymatique. On distingue plusieurs types de fragments qu'on peut classer selon leur taille : le fragment Fc porteur des propriétés biologiques et des fragments constants des chaînes lourdes ; ce fragment n'est pas utilisé comme bioélément car il ne reconnaît pas l'antigène. Le fragment Fv est le plus petit fragment gardant les propriétés de reconnaissance de

l'anticorps car il contient les régions variables des chaînes lourdes et légères et donc fixe l'antigène de la même manière que l'anticorps complet. Le fragment Fab a également la même affinité pour l'antigène que l'anticorps complet ; il est formé de la chaîne légère complète et d'un bout de la chaîne lourde. Pour finir le fragment F(ab')₂ qui pourrait correspondre à l'anticorps complet ayant perdu le fragment Fc. La Figure 19 schématise les différents fragments.

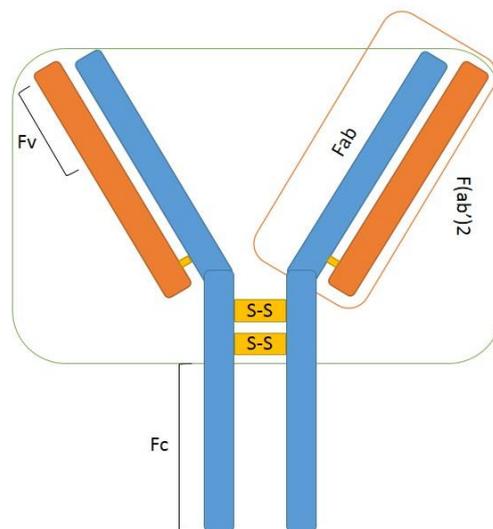


Figure 19 Anticorps : chaîne lourde en bleu, chaîne légère en orange et pont disulfure en jaune

L'étude et la comparaison de ces fragments comme élément de reconnaissance d'un biocapteur ont été faites récemment par Crivianu-Gaita et Thompson¹⁵³.

Le mode de fonctionnement de ces immunocapteurs est très semblable aux tests immunologiques effectués en solution de type ELISA. Les anticorps sont immobilisés sur une surface, en prenant garde à leur orientation, car dans l'exemple de l'Immunoglobuline (IgG) comprenant trois sites de liaison (1 Fc et 2 F(ab)'), si l'immobilisation se fait par les sites Fab', l'anticorps devient inactif.¹⁵⁴

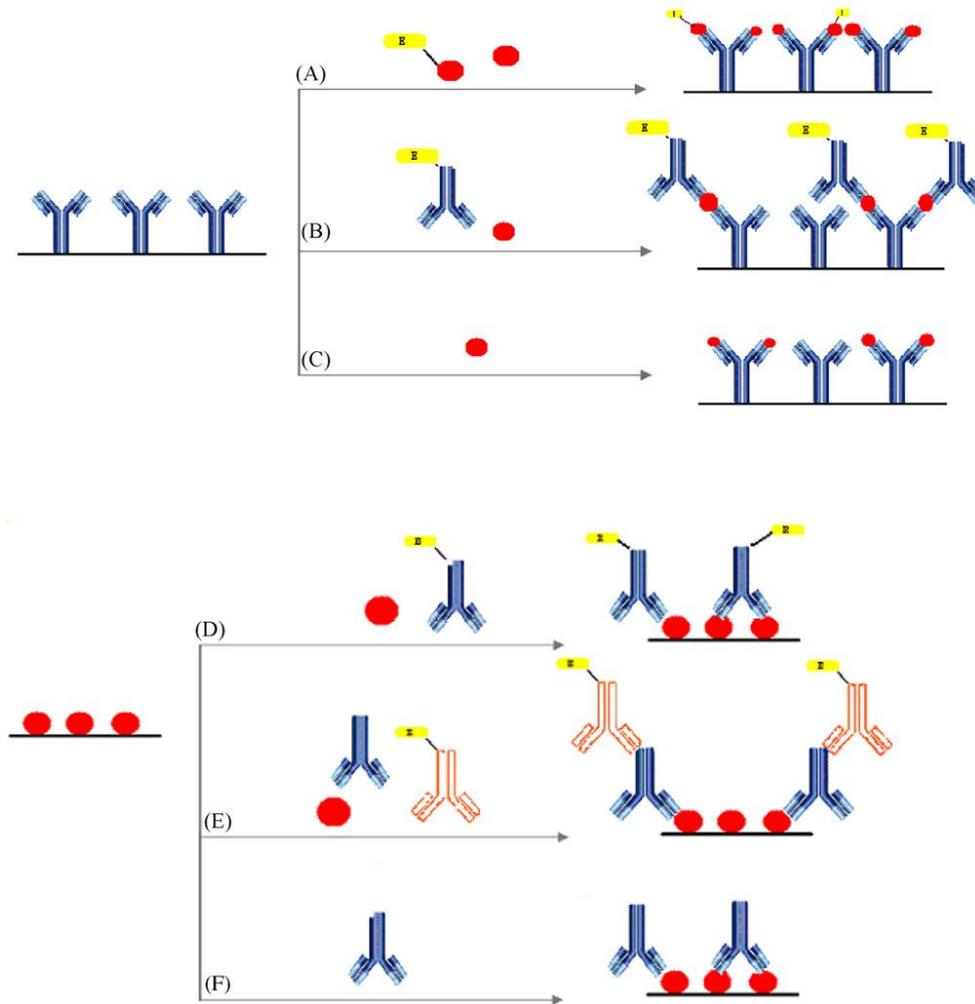


Figure 20 Différents formats d'immunocapteurs : en haut, immobilisation des anticorps (Y bleus) sur le support puis (A) essai compétitif avec des Ag* (jaune) et Ag (ronds rouge), (B) essai en sandwich avec les Ag et Ac* et (C) essai direct avec détection en SPR ou QCM ; en bas, immobilisation des antigènes sur le support puis (D) essai compétitif avec Ac* primaire, (E) essai compétitif indirect avec un Ac* secondaire (Y rouge) et (F) essai direct.¹⁵³

Selon le mode de détection choisi, le marquage d'un des deux partenaires du complexe Ac-Ag est nécessaire (Ac* ou Ag*), celui-ci pouvant être couplé à une enzyme, un radio-isotope ou un fluorophore. On parlera de détection indirecte quand un label est utilisé (A, B, D et E Figure 20) et de détection directe sans label (C et F Figure 20). Les différentes approches sont illustrées dans la Figure 20. Le second format de capteurs, où l'antigène est immobilisé sur la surface, est généralement préféré pour éviter les problèmes liés à l'immobilisation des anticorps (perte d'affinité et orientation correcte) ou lorsque l'antigène primaire marqué n'est pas disponible. Dans ce cas, l'utilisation d'un anticorps secondaire labellisé venant interagir avec le site Fc de l'anticorps primaire permettra la reconnaissance d'interaction Ac/Ag (E Figure 20).

Toujours par rapport à la Figure 20, dans les essais « sandwich », la concentration en analyte est proportionnelle à l'augmentation du signal envoyé par l'Ac marqué. Dans les essais « compétitifs » la concentration en analyte est proportionnelle à la diminution du signal émis par les Ac marqués qui sont remplacés par ceux de l'analyte. La détection du signal pour les immunocapteurs est le plus souvent soit optique soit électrochimique. L'association à des marqueurs radioactifs induisant un danger à la manipulation pour une sensibilité limitée a rendu l'utilisation des techniques radioactives controversées. A contrario, les immunocapteurs électrochimiques permettent une réponse rapide, simple et économique, sans présenter les inconvénients de l'autre méthode. Les immunocapteurs permettent une analyse au lit du patient avec des résultats immédiats contrairement aux tests de type ELISA qui doivent être effectués en laboratoire et nécessitent plusieurs étapes de préparation. Déjà en 1990, Binder listait les contraintes techniques à prendre en compte dans le développement d'immunocapteurs, telles que la sélectivité, la sensibilité, le temps de réponse, le seuil de réponse, la durée de vie et la régénération du capteur.¹⁵⁶ Les immunocapteurs sont non seulement utilisés pour le diagnostic médical, que ce soit de maladie type Hépatite C¹⁵⁷ ou bien dans la détection d'antigènes marqueurs du cancer¹⁵⁸ ; mais ils peuvent également servir dans la détection de pesticides dans l'environnement.¹⁵⁹

2.2.2.3 Cellule ou bio organisme entier

Il est également possible d'immobiliser des cellules microbiennes sur la surface d'un transducteur. C'est la réponse de la cellule entière qui est détectée par le transducteur. Les types de signaux à mesurer sont aussi variés que les différentes espèces de microorganismes utilisables. Deux revues de la littérature recensent toutes les paires bioorganisme/transducteur ainsi que leurs cibles et les présentent classées en fonction du type de transduction.^{160, 161} On les utilise pour le contrôle environnemental, par exemple Gab-Joo Chee a développé des biocapteurs pour mesurer la quantité d'oxygène requise par des microorganismes pour décomposer la matière organique présente dans un échantillon d'eau.¹⁶² Un article de D'Souza présente les biocapteurs microbiens en les classant par domaine d'application.¹⁶³

2.2.2.4 Acide nucléique et ses dérivés (peptides et aptamères)

Dans les génocapteurs, l'élément de reconnaissance est un brin unique d'ADN ou d'ARN ce qui permettra de détecter l'hybridation du brin complémentaire. Une revue de la littérature en 2008 par Lucarelli *et coll.* permet d'avoir une vue d'ensemble sur les génocapteurs ainsi que

sur les différents matériels utilisés pour les fabriquer.¹⁶⁴ Lorsque le brin d'ARN est obtenu de manière synthétique, on l'appelle aptamère et les biocapteurs l'utilisant comme élément de reconnaissance sont nommés aptasenseurs. Les aptamères sont des chaînes d'oligonucléotides ayant des séquences aux extrémités 5' et 3' connues et des séquences centrales aléatoires. Ils peuvent être générés contre des cibles de nature très diverses allant des petites molécules organiques jusqu'aux cellules intactes. En suivant la méthode SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment),¹⁶⁵ l'aptamère possédant la plus forte affinité avec la cible peut être sélectionné et amplifié par clonage ou par réaction en chaîne par polymérase (PCR). Les aptamères, ayant une grande sensibilité à leur cible et présentant une bonne stabilité, sont souvent présentés comme la meilleure alternative aux anticorps¹⁵³ et comme ces derniers ils peuvent fonctionner avec un label ou sans label. Les deux types de capteurs (génécapteur et aptasenseur) sont donc souvent liés à des transducteurs de type électro-photochimique.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ L'interaction cible/aptamère induit des changements de conformation ce qui facilite la détection.

2.2.2.5 MIPs (*polymères à empreinte moléculaire*)

Comme les aptamères, les MIPs sont des biorécepteurs de synthèse. Ces éléments de reconnaissance artificiels présentent comme avantage d'être bon marché, stables dans le temps et de mieux résister aux conditions environnementales. Scognamiglio *et coll.* a écrit récemment une revue de la littérature sur l'utilisation de la biomimétique pour la mise au point de biocapteurs.¹⁶⁹

Les MIPs sont des polymères formés autour d'une molécule qui a le profil de la cible recherchée. En principe les MIP peuvent être fabriqués autour de n'importe quelle molécule.¹⁷⁰ Plusieurs microcavités sont créées au sein du MIP et certaines possèdent les sites d'accroches spécifiques à l'analyte recherché. La formation de ces cavités se fait en trois étapes (Figure 21) : (i) les monomères portant des fonctions sélectives sont arrangés autour de la molécule profile en solution ; (ii) la polymérisation du complexe en présence d'autres monomères faisant la liaison et d'un solvant adapté et pour finir (iii) la molécule profile est retirée du polymère résultant, libérant ainsi les cavités.¹⁷¹ Le mode de reconnaissance initial était basé sur la taille et la forme de l'analyte ce qui était plus compatible avec des molécules de grande taille comme les protéines. Mais l'introduction de sites de reconnaissance dédiés au sein des cavités a, non seulement, amélioré l'affinité entre la cavité et l'analyte mais aussi la

sélectivité grâce à des interactions de type non-covalentes comme les liaisons hydrogènes ou par des liaisons covalentes réversibles (c'est-à-dire clivable chimiquement). Les MIPs peuvent être fabriqués directement sur leurs transducteurs comme expliquer dans l'article de Gui *et coll.* sur les électrodes de capteurs électrochimiques.¹⁷²

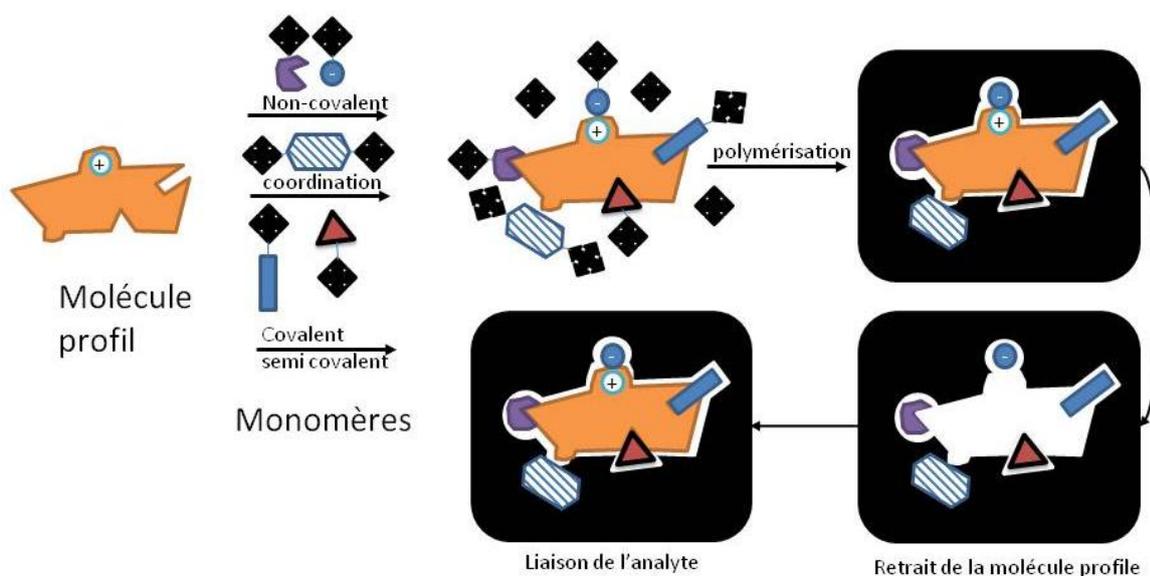


Figure 21 Etapes de fabrication d'un polymère à empreinte moléculaire

Une autre revue de la littérature sur les MIPs aborde le type de monomères utilisés en fonction du transducteur choisi, par exemple pour l'électrochimie le polymère doit être conducteur, et les différents bioéléments utilisés comme profil, des enzymes aux bactéries.¹⁷³

2.2.3 Méthodes d'immobilisation du bioélément

Les bioéléments peuvent être immobilisés en surface de leur transducteur soit physiquement (confinement ou inclusion dans une matrice) soit chimiquement (par lien covalent ou interaction physique, ou par réticulation). Ces différentes méthodes peuvent être résumées comme dans le Tableau 2.

Tableau 2 Méthodes d'immobilisation

Immobilisation par rétention physique		Immobilisation par interaction physique ou liaison chimique	
Inclusion	Confinement	Fixation au support	Réticulation
Le bioélément est inclus dans une matrice formant un réseau tridimensionnel	Le bioélément peut se trouver piégé dans une microcapsule formée par une membrane semi-perméable	Le bioélément est relié à la surface soit par adsorption soit par liaison covalente	Le bioélément est maintenu à la surface par la création d'un réseau de liaisons covalentes intermoléculaires

Le bioélément doit être placé dans la position optimale vis-à-vis du transducteur pour permettre la détection du signal issu de la reconnaissance biochimique, c'est-à-dire soit au contact soit dans l'alignement du transducteur par le biais de bras espaceurs. La technique d'immobilisation qui sera choisie devra permettre de stabiliser le bioélément dans le temps et permettre à l'analyte, même en faible quantité, d'accéder au bioélément. Sassolas *et coll.* proposent une revue de la littérature sur les différentes stratégies d'immobilisation d'enzyme pour la fabrication de biocapteurs.¹⁷⁴ Talbert et Goddard présentent l'influence du type de surface et d'interface créée entre une enzyme et un substrat sur l'activité enzymatique¹⁷⁵ tandis que Mateo *et coll.* montrent comment cette activité peut être améliorée par la sélection d'une méthode d'immobilisation adéquate.¹⁷⁶

2.2.3.1 Inclusion dans une matrice polymère

Au moment de fabriquer le biocapteur, le bioélément est dispersé dans une solution de monomère homogène ou émulsionnée. La polymérisation du monomère formera une cage autour du bioélément et ces derniers seront répartis au sein de la matrice du polymère (Figure 22). Malgré sa simplicité, cette technique présente trois inconvénients principaux. Tout d'abord le réseau de polymère s'avère le plus souvent trop lâche et on peut observer une perte de bioélément. Ensuite, la matrice polymère peut compliquer la diffusion des substrats et des produits issus des réactions de reconnaissance. Et pour finir les polymères peuvent présenter des problèmes de stabilité et se solubiliser en présence d'agents complexants. Cette technique peut aussi être utilisée avec une matrice inorganique comme le silicone.¹⁷⁷ C'est une méthode

qui est adaptée à différents types de transduction comme l'électrochimie ¹⁷⁸ ou le piézoélectrique ¹⁷⁹ et à différentes sortes de bioélément ¹⁸⁰ même si ceux à faible poids moléculaire sont plus susceptibles de fuiter de la matrice.

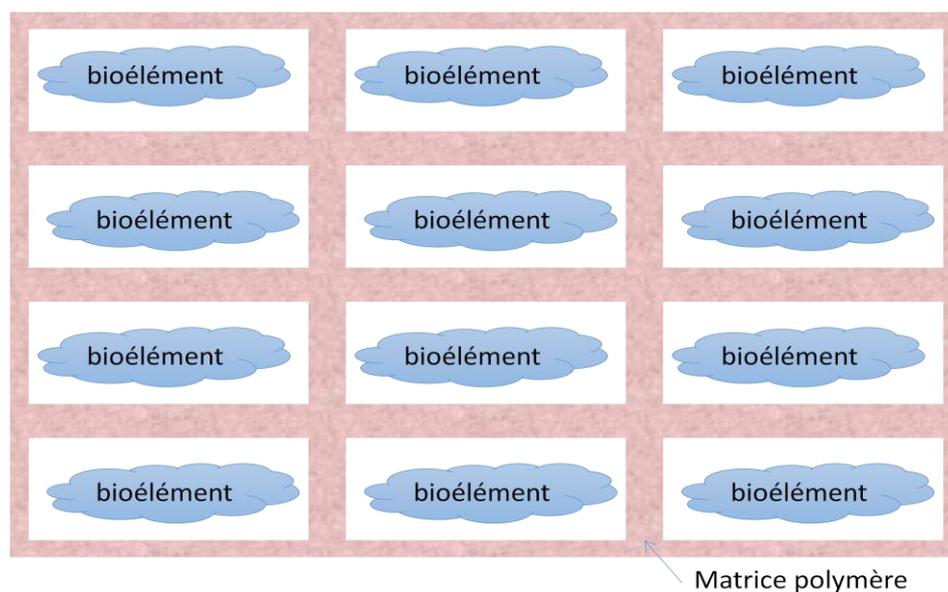


Figure 22 Immobilisation par « entrapment »

2.2.3.2 Méthodes de confinement (micro-encapsulation)

La micro-encapsulation consiste en l'inclusion du matériel biologique dans une sphère protectrice (Figure 23) semi-perméable puis la dispersion de celles-ci dans une matrice polymère. Cette sphère peut être du matériel biologique comme des globules rouges ¹⁸¹ ou bien des liposomes.¹⁸² Cette encapsulation permet au bioélément d'avoir une plus grande stabilité par rapport à l'inclusion directe dans une matrice et apporte également une meilleure compatibilité biologique.

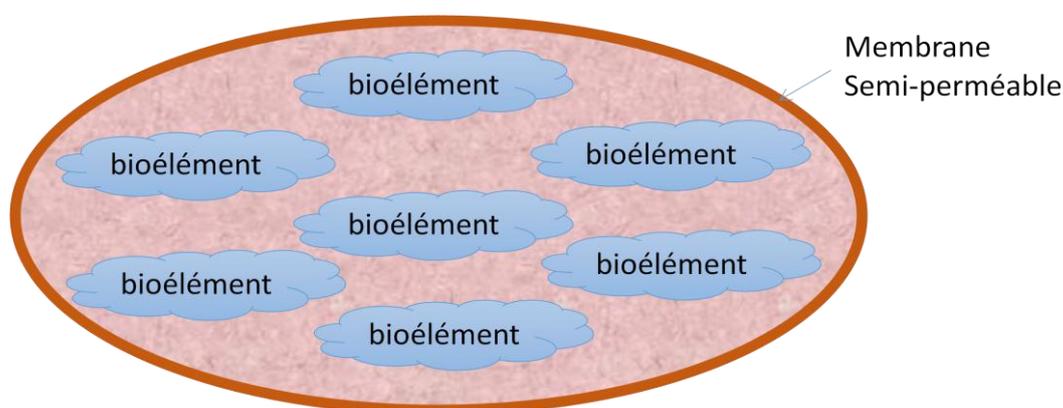


Figure 23 Immobilisation par micro-encapsulation

2.2.3.3 Adsorption

Lorsque le transducteur présente une surface active, il est possible d'utiliser l'adsorption comme technique d'immobilisation du bioélément (Figure 24). L'apparition d'interactions non liantes comme les échanges ioniques ou transfert de charges, les liaisons hydrogènes, les forces de Van der Waals ou bien les interactions hydrophobes permettent de maintenir le bioélément à la surface du support lorsque les conditions requises (pH, température, etc.) sont réunies. Si ces conditions ne sont pas respectées ou changent au cours du temps, il est possible que le bioélément se désorbe de la surface. Un autre inconvénient de cette technique est la proximité directe de la surface qui peut repousser les analytes et donc diminuer l'efficacité de la détection.

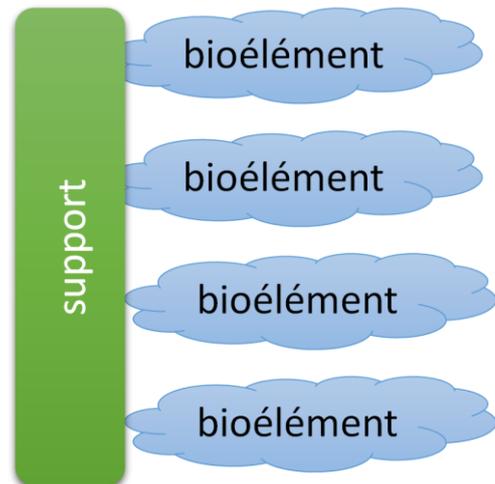


Figure 24 Immobilisation par adsorption

2.2.3.4 Réticulation

Pour obtenir une immobilisation par réticulation, l'ajout d'agents réticulants portant un ou plusieurs radicaux en extrémité permet de créer des liens entre les différents éléments du biocapteur (Figure 25). Le choix du liant repose sur la réactivité chimique des groupements présents sur le bioélément et à la surface. Ces ligands peuvent être classés en deux catégories : les homo-fonctionnels possédant des groupements réactifs aux deux extrémités qui vont réagir avec les mêmes molécules cibles ; les hétéro-bifonctionnels quant à eux possèdent deux groupements réactifs différents. L'inconvénient de cette technique est que les ligands se lient de manière aléatoire aux fonctions qui se trouvent sur le bioélément, pouvant entraîner une perte des sites de reconnaissance et donc avoir un effet négatif sur la sensibilité du biocapteur.¹⁸³ Il faut également prendre en compte le ratio de ligands car le degré de réticulation peut influencer sur l'activité biologique du bioélément.¹⁸⁴

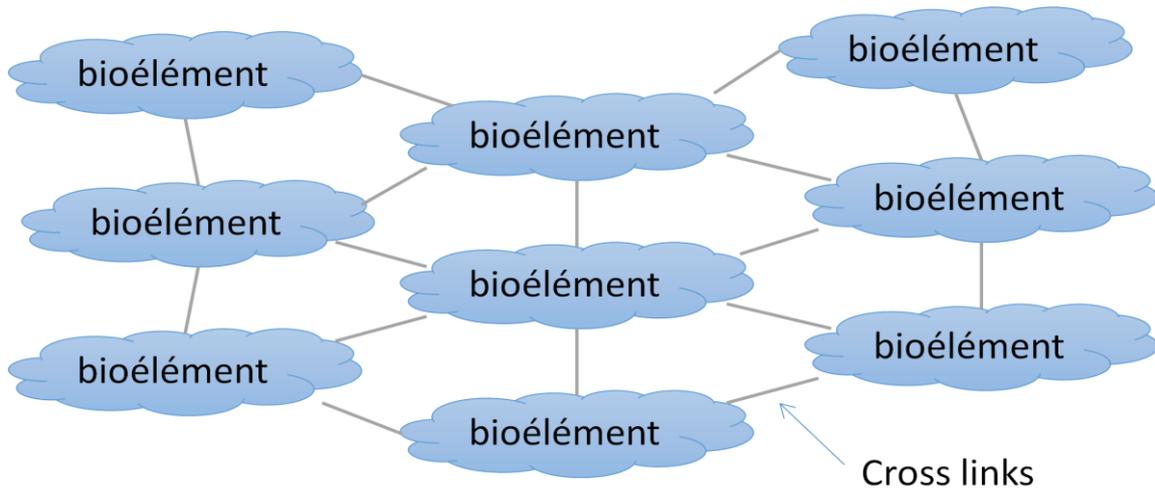


Figure 25 Immobilisation par réticulation

2.2.3.5 Liaison covalente

La formation de liaisons covalentes entre le bioélément et la surface du transducteur est intéressante (Figure 26) car elle empêche la fuite des bioéléments, point faible des méthodes décrites précédemment. On peut appliquer cette technique en utilisant des groupements fonctionnels, présents en surface et sur le bioélément. Ces groupements sont le plus souvent des amines, des acides carboxyliques, des thiols, des alcools. On les trouve sur les chaînes latérales des acides aminés qui forment les enzymes¹⁷⁴ ou les anticorps¹⁸⁵ mais il faut faire attention à cibler une partie non essentielle à l'activité biologique de ces bioéléments. Si la surface du transducteur choisi ne possède pas de groupements fonctionnels, celle-ci doit être modifiée ou activée avant le couplage. Ce couplage implique des conditions expérimentales plus complexes et rigoureuses que la simple adsorption ce qui parfois altère la structure du bioélément et donc résulte en une perte d'activité ou un changement de substrat cible.¹⁸⁶

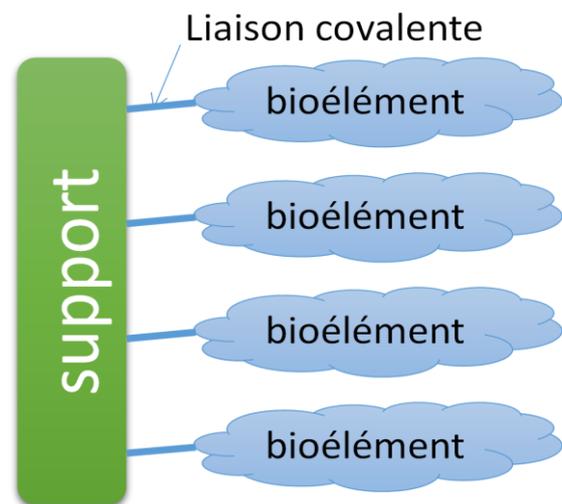


Figure 26 Immobilisation par liaisons covalentes

3 Conclusion

La construction d'un biocapteur est donc un travail interdisciplinaire qui comprend la biologie, la chimie, la physique, la médecine et l'électronique. Les éléments de reconnaissance sont la plupart du temps chimiquement immobilisés sur la surface du substrat, car les liaisons covalentes formées par réaction chimique sont plus stables que l'adsorption physique. La compréhension du processus de reconnaissance biologique (interaction entre substance biologique) est basée sur la biochimie spécifique des espèces utilisées. Le processus de détection porté par le transducteur est le plus souvent un phénomène physique comme l'absorption de lumière ou le transfert d'électrons.

Chapitre 2 : Développement d'une méthode de fonctionnalisation du COC

Table des matières

4	Introduction	64
5	Le copolymère d'oléfine cyclique comme matériau de support	65
5.1	Présentation du COC.....	65
5.2	Fonctionnalisation du COC	66
5.2.1	Dépôt non-covalent de couches fonctionnelles (<i>coating</i>).....	67
5.2.2	Activation par plasma de la surface	68
5.2.3	Formation d'une « sous-couche » active	69
5.3	Les sels d'aryldiazoniums	71
5.4	Préparation d'aryldiazoniums	73
5.4.1	Sels utilisés pour les greffages de surfaces.....	73
5.4.2	Autres sels de diazoniums préparés	77
5.4.2.1	Pour des post-fonctionnalisations différentes des couplages peptidiques...77	
5.4.2.2	Pour l'éloignement de la surface des fonctions actives.....	78
5.5	Méthodes de greffage utilisées	79
5.5.1	Électrochimie sur surface d'Or	79
5.5.1.1	Étude du greffage du CBD sur Or.....	81
5.5.1.1.1	Conditions initiales	81
5.5.1.1.2	Étude de la voltammétrie cyclique.....	84
5.5.1.1.3	Étude de la chrono-ampérométrie	86
5.5.1.2	Greffage électrochimique de l'éthynylbenzène diazonium (EBD) sur Or ..88	

5.5.1.3	Greffage électrochimique du 4-aminobenzène diazonium par (ABD)	89
5.5.2	Greffages chimiques sur le COC par activation UV de la surface.....	92
5.5.2.1	COC greffé avec CBD.....	93
5.5.2.2	COC greffé avec ABD	94
5.5.2.3	COC greffé avec EBD.....	95
5.6	Mise au point de techniques de couplage en surface	96
5.6.1	Couplages sur des surfaces COC-COOH	97
5.6.1.1	Test des conditions de couplage entre COC-COOH et une amine	97
5.6.1.2	Test des conditions de couplage entre COC-COOH et un alcool.....	99
5.6.2	Couplages sur des surfaces COC-NH ₂	102
5.6.2.1	Test des conditions de couplage entre COC-NH ₂ et un acide	103
5.6.2.2	Test des conditions de couplage entre COC-NH ₂ et un alcool.....	105
6	Conclusion.....	106

4 Introduction

On souhaite utiliser l'isatine comme bioélément d'un biocapteur basé sur un transducteur polymérique, le COC. Parmi les différentes techniques d'accroche de biomolécules sur surface (physisorption, coating, ...), l'immobilisation par liaison covalente est celle présentant le plus d'avantages en termes de stabilité du biocapteur. Précédemment au laboratoire, une méthode innovante a été développée pour introduire des fonctionnalités à la surface du COC de manière covalente par greffage de sels de diazonium.¹⁸⁷ Nous vous présenterons donc tout d'abord cette méthode et l'application que j'en ai faite dans le cadre de ma thèse.

Dans un premier temps, une présentation générale sur le copolymère d'oléfine cyclique sera développée, dans un second temps seront présentés les différents sels de diazonium synthétisés au cours de ma thèse et leur greffage en surface du COC, mais également sur lame d'or, et finalement nous développerons la mise au point des techniques de couplage peptidique en surface (Figure 27).

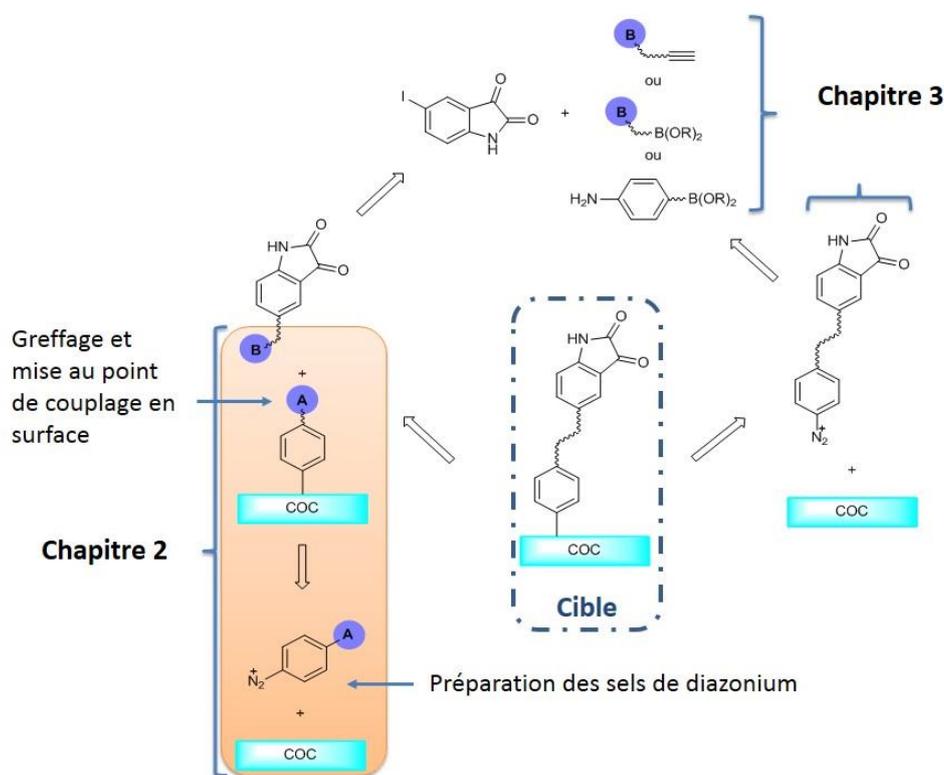


Figure 27 Schéma rétrosynthétique du déroulé de la thèse et détail sur le chapitre 2

5 Le copolymère d'oléfine cyclique comme matériau de support

Comme présenté dans le premier chapitre, le choix du transducteur est important par rapport à l'utilisation qui sera faite du biocapteur. Nous souhaitons concevoir un biocapteur qui soit bon marché ce qui implique d'utiliser un matériau qui ne coûte pas cher à fabriquer. Les polymères sont des matériaux faciles à se procurer. Comme les polymères sont rarement conducteurs, la technique de détection ne doit pas impliquer l'électrochimie, donc le polymère sélectionné devra permettre une détection optique en possédant une bonne transparence. Pour finir ce polymère devra être résistant à la chaleur et aux traitements chimiques pour pouvoir effectuer les fonctionnalisations nécessaires.

5.1 Présentation du COC

Notre choix s'est porté sur les copolymères d'oléfines cycliques (COC). À l'inverse d'autres polyoléfines comme le polyéthylène et le polypropylène qui sont partiellement cristallins, le COC est un polymère amorphe et transparent et cela grâce aux mélanges d'oléfines cycliques et linéaires qui le composent, les proportions de chaque types influençant ces propriétés. On utilise le COC dans le domaine de la construction et de l'éclairage pour le stockage de données optiques ou la fabrication de lentilles ou capteurs. Parmi les nombreuses caractéristiques intéressantes de ce matériau, on peut noter :

- Une faible densité, ce qui donne des dispositifs légers
- Une haute transparence, idéale pour l'utilisation de méthodes optiques
- Une faible teneur en eau et des propriétés hydrophobes
- Une bonne thermo-résistance ($75\text{ °C} < T_g < 178\text{ °C}$)
- Une haute rigidité, dureté apportant une bonne résistance mécanique
- Une biocompatibilité importante, donnant la possibilité de stériliser et d'utiliser les dispositifs avec des biomolécules
- Une résistance chimique aux acides, bases et solvants organiques nécessaires pour la transformation de surface
- Des propriétés d'isolations électriques utiles pour le développement de puces analytiques utilisant l'électro-migration.

Il existe différentes voies de synthèse des COC qui vont influencer la composition du polymère (Figure 28). Ces synthèses impliquent soit une polymérisation par métathèse à ouverture de cycle (ROMP pour Ring Opening Metathesis Polymerization) qui résulte plutôt dans un polymère cyclique d'oléfine (COP) soit une polymérisation en chaîne avec l'éthylène. Dans cette dernière technique, les proportions des différents monomères sont déterminantes pour obtenir les propriétés recherchées. En effet l'augmentation de la partie cyclique (le norbornène) rendra le polymère plus résistant à la chaleur tandis que l'augmentation de la part d'éthène améliorera les propriétés optiques du matériau.

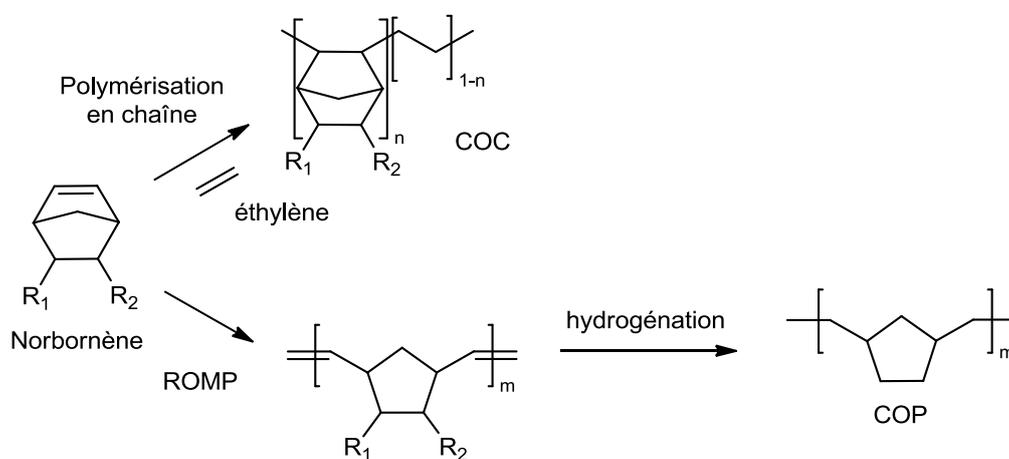


Figure 28 Différents types de polymérisation d'oléfines pour la synthèse du COC¹⁸⁸

Pour l'application du COC dans le domaine des bioanalyses seul son hydrophobicité est un frein car cela a une influence sur l'accessibilité du bioélément par la cible car celle-ci est le plus souvent hydrophile. La structure même du COC est aussi un inconvénient pour la fabrication de biocapteurs car elle ne présente aucun groupement fonctionnel qui pourrait être utilisé pour l'immobilisation des bioéléments. Des techniques d'activation de la surface du COC ont été développées pour pouvoir la fonctionnaliser ; différents exemples sont décrits dans la suite.

5.2 Fonctionnalisation du COC

Pour apporter des groupes fonctionnels à la surface du COC, on peut soit modifier la structure physico-chimique de la surface par activation par plasma ou ajout d'une « sous-couche » réactive, soit en intercalant une couche fonctionnelle à la surface du matériau inerte par dépôt non-covalent.

5.2.1 Dépôt non-covalent de couches fonctionnelles (*coating*)

Ce type de dépôt repose sur des interactions hydrophobes, par exemple Sung *et coll.* utilisèrent un copolymère amphiphile ayant un groupement alkyl ou benzyle pour interagir avec la surface du COC, une chaîne PEG (polyéthylène glycol) pour la partie hydrophile du polymère et des groupements esters réactifs pour les étapes d'accroches soit avec des nanoparticules¹⁸⁹ soit avec des anticorps¹⁹⁰ (Figure 29).

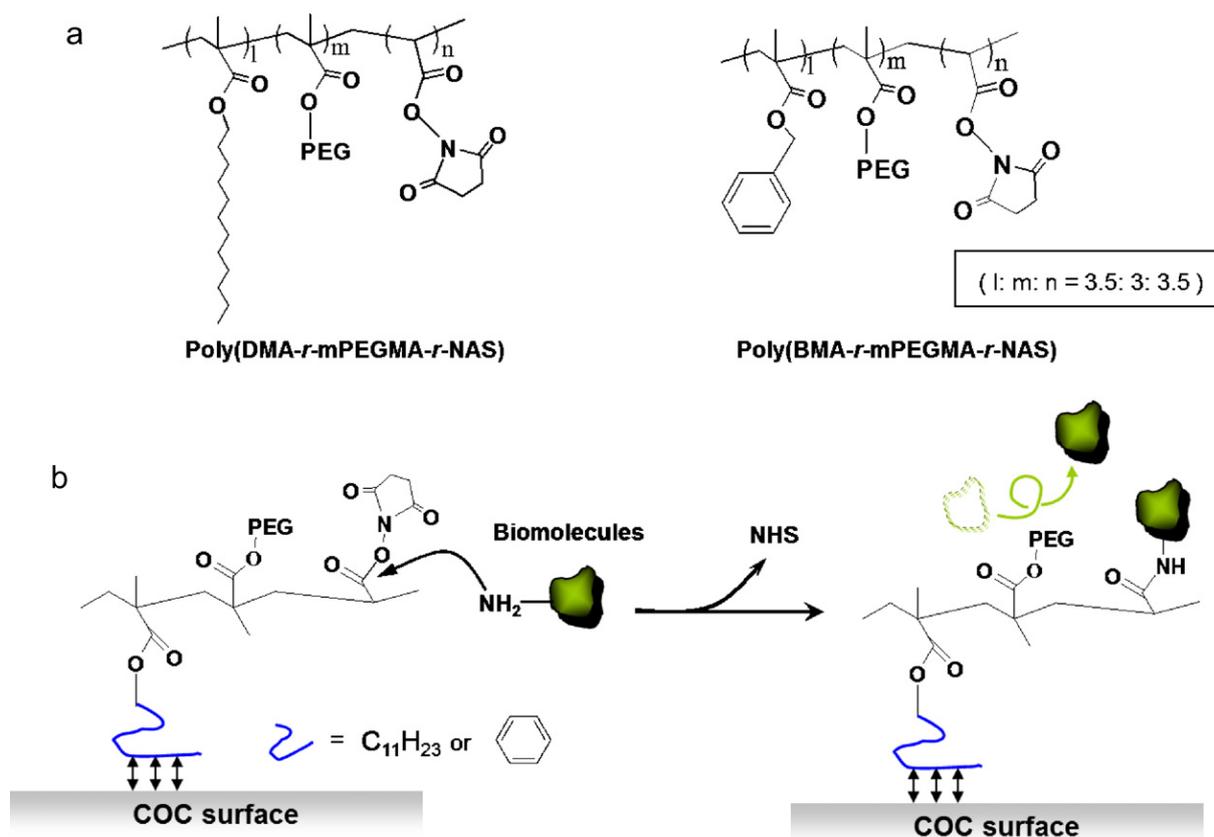


Figure 29 (a) Structure chimique des polymères amphiphiles utilisés par Sung *et coll.* (b) Schéma de la procédure d'immobilisation de biomolécules sur la surface du COC modifié par ajout d'une couche polymère¹⁹⁰

Autre exemple, le dépôt de couches fines contenant des atomes d'oxygène (SiO_2 ou TiO_2) pouvait être effectué par pulvérisation et ainsi permettre d'introduire des groupements fonctionnels en surface du COC. Le dioxyde de silicium a une chimie de surface qui est largement connue.¹⁹¹⁻¹⁹³ Sa principale propriété étant son hydrophilie, une couche fine de SiO_2 apporte des propriétés intéressantes pour la microfluidique par exemple où l'écoulement de fluide est perturbé par l'hydrophobicité du COC.¹⁹⁴ La présence de groupements hydroxyles à la surface de la couche SiO_2 permet d'attacher une grande variété de ligands. Ces remarques peuvent également être appliquées au dioxyde de titane qui a également des

groupements hydroxyles en surface. Cette propriété hydrophile a été utilisée dans un système microfluidique à base de COC (Figure 30) pour créer des doubles émulsions grâce à 2 canaux : 1 recouvert avec TiO_2 étant hydrophile et l'autre de COC nu étant hydrophobe.¹⁹⁵

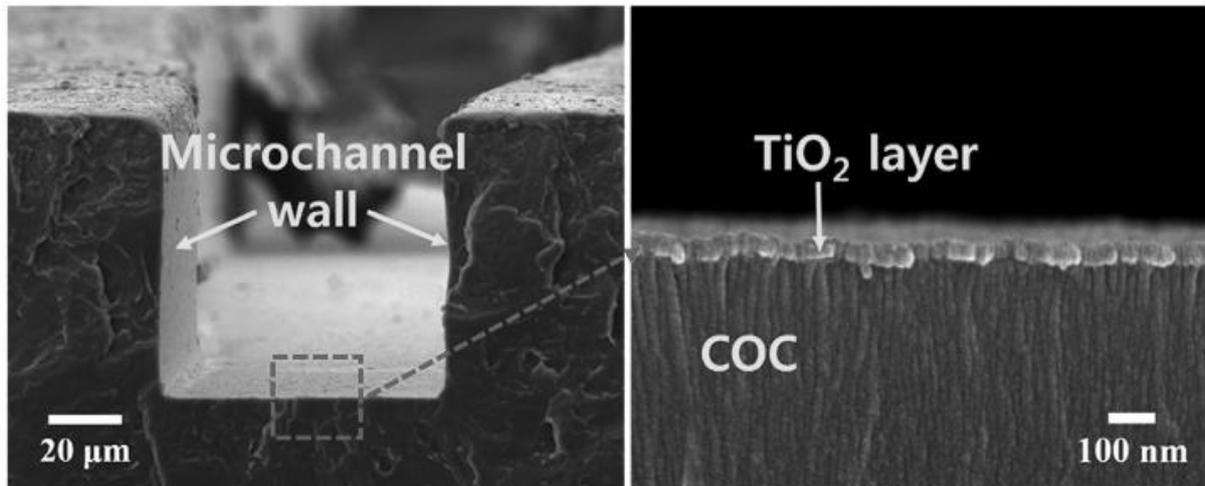


Figure 30 Images MEB des micro-canaux recouverts de TiO_2 en 5 couches¹⁹⁵

Dans cet article et dans un autre traitant du dépôt de TiO_2 sur le COC par PVD (Physical Vapor Deposition)¹⁹⁶, ils évoquent la bonne stabilité de la couche de TiO_2 soit au cours du temps avec la possibilité de réactiver la surface par irradiation UV¹⁹⁵, soit à différentes conditions chimiques.¹⁹⁶ Pour apporter des propriétés optiques et hydrophiles au COC, certains ont étudié la fabrication de nanocomposites de COC contenant des pourcentages entre 1 et 15% de nanomatériaux (SiO_2 , TiO_2)¹⁹⁷⁻²⁰⁰, généralement cela améliore les propriétés du COC (thermique et optique) mais aucun ne fait mention de post-fonctionnalisation de surface de leurs composites.

5.2.2 Activation par plasma de la surface

Le plasma est un gaz contenant des ions, des molécules ou atomes à l'état excité, des radicaux, des électrons et des photons, le tout étant électriquement neutre. En soumettant un gaz à l'action d'un champ électrique ou électromagnétique à basse pression (0,1 à 10^4 Pa), on obtient des milieux lumineux appelés plasmas froids basse pression. Dans ce champ électromagnétique, les particules sont accélérées et peuvent entrer en collision. Lorsqu'un électron percute une molécule ou un atome, il transfère une partie de son énergie et modifie ainsi l'énergie interne de l'atome ou de la molécule. On voit donc apparaître des espèces gazeuses réactives sous forme radicalaire ou moléculaire qui sont caractéristiques de la chimie

plasmatique. Le fait que le plasma soit de type froid, c'est-à-dire que la température macroscopique du gaz est voisine de la température ambiante, permet de ne faire réagir que la surface des matériaux sans détériorer les propriétés du polymère.

Selon les fonctionnalités que l'on souhaite introduire en surface, il suffit que le gaz contienne les molécules ou atomes contenant ces mêmes fonctions (N_2 ou NH_3 pour introduire des fonctions amines ²⁰¹, O_3 pour introduire des fonctions oxydées ²⁰²⁻²⁰⁴, CHX_3 pour introduire des fonctions halogènes ²⁰⁵), ces fonctionnalités pouvant être utilisées par la suite pour immobiliser des bioéléments.²⁰⁶

Concernant la modification du COC, Kai *et coll.* ont étudié l'adsorption de la γ -globuline sur du COC modifié par plasma avec différents groupements fonctionnels faisant varier l'angle de contact.²⁰⁷ Liu *et coll.* fabriquent des valves de contrôle pour la microfluidique en préparant un sandwich COC-PDMS-COC avec une activation de la surface du COC par décharge corona.²⁰⁸ Cette technique a été étudiée en détail par mon prédécesseur au laboratoire, Florian Brisset. Il a en effet fait varier des paramètres tels que la pression, la puissance ou le gaz utilisé pour modifier la surface du COC avant d'effectuer des greffages en surface. Nikolova *et coll.* font adhérer des métaux sur le COC activé par plasma²¹⁰ ce qui amènera dix ans plus tard Ooi *et coll.* à utiliser des complexes de coordination comme glue sur la surface du COC pour y fixer des anticorps, mais ils n'utiliseront pas le plasma et mettront simplement le COC en contact avec une solution métallique.²¹¹ Ce métal forme une « sous-couche » active.

5.2.3 Formation d'une « sous-couche » active

Une sous-couche active est le plus souvent formée d'un polymère possédant des fonctions chimiques différentes des liaisons C-C et C-H du COC qui permettront de venir conjuguer les bioéléments tout en camouflant la surface hydrophobe du COC.

La création de cette couche polymère s'effectue souvent en présence d'un photo-initiateur qui va venir arracher un proton aux chaînes carbonées à la surface du plastique. De ce fait des radicaux carbone vont apparaître en surface et vont initier la polymérisation des monomères présents dans la solution. En résultera la création d'un polymère ramifié présentant des fonctions chimiques réactives différentes selon le type de monomère utilisé.

Un photo-initiateur couramment utilisé est la benzophénone, à l'état normal S_0 , elle absorbe les irradiations dans l'UV lointain (≈ 250 nm) et passe à l'état excité $S_2 - \Pi, \Pi^*$ (110 kcal/mol). Cet état excité a un temps de vie très court (10^{-12} s), il va donc se transformer en un état « super-chaud » $S_1 - n, \Pi^*$ ($76 + \Delta$ kcal/mol) qui par collision avec la surface du polymère (PH) va transférer l'énergie en excès (Δ kcal/mol). Les états triplet de la benzophénone BPT_2 et BPT_1 ayant un temps de vie plus long ($\approx 10^{-3} - 10^{-2}$ s) se forment successivement à partir de S_1 qui est comme S_2 à vie courte ($\approx 10^{-9}$ s), et viennent réagir avec un hydrogène excité de la surface du polymère.²¹² Ce photo-initiateur fut utilisé sur le COC avec des monomères de type acryle²¹³, de type vinyle²¹⁴ (Figure 31) ou de type méthacrylate.²¹⁵ On peut noter que les monomères de type acryle ont pu être polymérisés sur une surface activée par plasma.²¹⁶

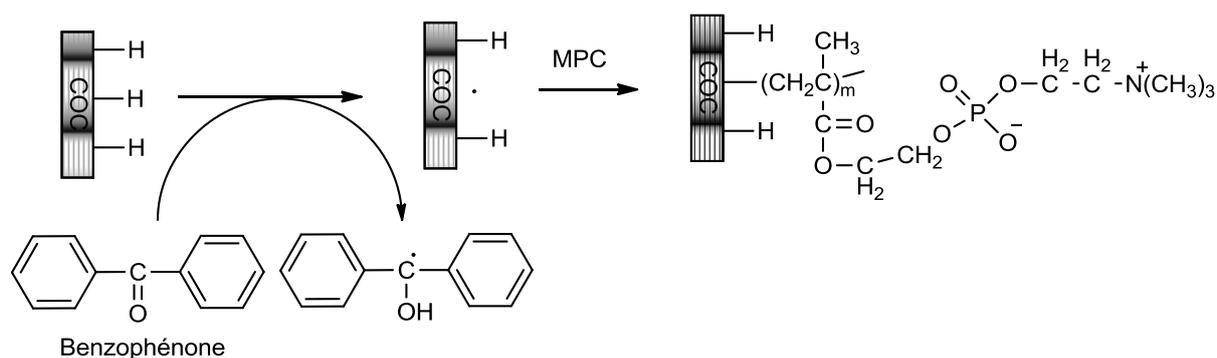


Figure 31 Activation de la surface du COC avec la benzophénone puis polymérisation du MPC (2-méthacryloyloxyéthylphosphorylcholine)²¹⁴

Une autre catégorie de photo-initiateurs a été étudiée ces dernières années. Il s'agit des dérivés de perfluorophénylazide (PFPA). La photochimie des aryles azides est variée et le composé réagira différemment selon les conditions expérimentales (température par exemple) (Figure 32). Le groupement azoture réagit sous l'action des UV et se transforme en nitrène qui est très réactif. L'ajout de groupement fluor sur le cycle permet d'éviter l'agrandissement de cycle (I). La réaction à basse température, elle, favorisera le croisement inter-système (intersystem crossing ISC) (III). Pour la fonctionnalisation de surface c'est d'une part l'insertion dans une liaison C-H qui est intéressante (II) et d'autre part la nature hétéro-bi fonctionnelle des PFPA qui permet de relier ensemble deux types de molécules ou matériaux via deux centres réactifs.²¹⁷ L'utilisation de ces composés PFPA sur le COC a été développée

par Mecomber *et coll.* qui ont fabriqué des biocapteurs enzymatiques ²¹⁸ et également par l'équipe du Pr. Choi qui ont introduit des « sous-couche » polymères *anti-biofouling*.^{219, 220}

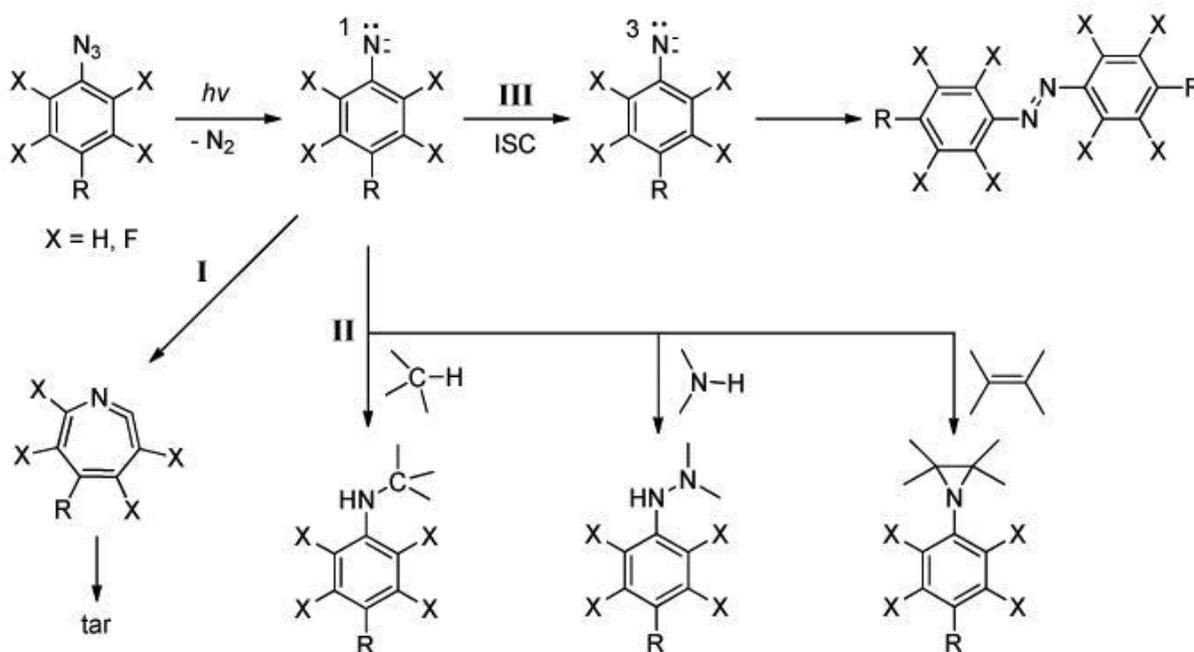


Figure 32 Description simplifiée de la photochimie des phénylazides : agrandissement de cycle (I), réactions d'addition ou d'insertion (II) et ISC (III) ²¹⁷ Former une liaison covalente sur le COC

Récemment, Carvalho *et coll.* ont développé une méthode d'oxydation dans des conditions douces (complexe cuivreux et eau oxygénée) pour l'introduction préférentielle de liaison C-OH en surface du COC dans un système microfluidique.²²¹ Cette technique étant très récente, nous avons suivi la méthode utilisée par Brisset *et coll.* qui impliquait la création de liaison covalente avec la surface du COC en utilisant les sels de diazonium ¹⁸⁷ pour développer la fonctionnalisation du COC. Je vais donc maintenant vous présenter la chimie des sels de diazonium, ceux que j'ai synthétisés et leur accroche en surface du COC ou de l'or.

5.3 Les sels d'aryldiazoniums

Découverts en 1858 par J. P. Griess lors de l'élaboration d'un test de détection des ions nitrites ²²², les sels de diazoniums sont des composés possédant une fonction N_2^+ formés à partir d'une amine. Ce sont des molécules peu stables qui se décomposent sous l'action de la chaleur (parfois de manière violente par explosion) ou par réduction chimique ou électrochimique qui libère le groupement diazote produisant ainsi un radical.

Dans le cadre de ma thèse nous nous sommes concentrés sur les sels d'aryldiazoniums synthétisés à partir d'aniline. Une grande variété de ces précurseurs sont disponibles commercialement. Ainsi l'offre commercialement limitée en sel de diazonium n'est pas un frein car la synthèse de ces sels à partir des anilines est assez simple ce qui nous permet de préparer des synthons portant diverses fonctions d'intérêt. La nature de ces groupements a une influence sur la synthèse du diazonium et sur la stabilité du produit formé car la charge positive du diazonium se retrouve plus ou moins délocalisée sur le cycle aromatique.

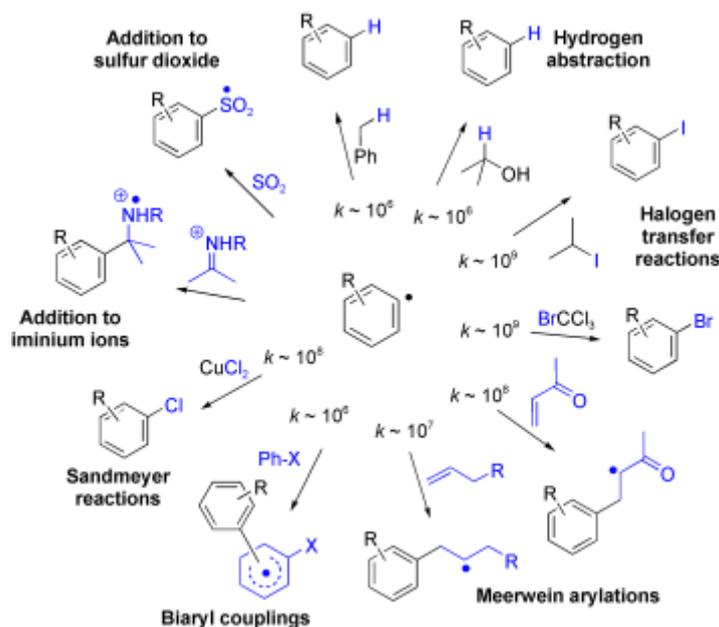


Figure 33 Réaction des radicaux issus de sels d'aryldiazoniums²²³

Lors de la perte du diazote, le radical formé peut servir soit à former de nouvelles molécules comme présenté par Heinrich²²³ (Figure 33) ; ou bien servir à fonctionnaliser la surface d'un matériau. Si le cycle aromatique est encombré, cela peut bloquer l'approche de la surface ou d'une autre espèce réactive vers le radical. C'est pour cela que nous avons concentré nos recherches sur des sels ayant le groupement d'intérêt en position para de la fonction N_2^+ pour limiter les contraintes stériques.

Récemment Jiang *et coll.* on fait une revue de la littérature sur les couches organiques créées sur des surfaces à partir de sels d'aryldiazoniums et leurs applications.²²⁴ Dans la suite de ce chapitre, je vais vous présenter les différents sels d'aryldiazoniums préparés et leur utilisation pour la fonctionnalisation de surface puis le développement des techniques de couplage sur ces surfaces modifiées.

5.4 Préparation d'aryldiazoniums

Nous avons décidé de suivre des voies de synthèse permettant d'isoler les sels de diazoniums car cela facilite les manipulations ultérieures. En choisissant un contre-ion tétrafluoroborate nous pouvons isoler les sels et les conserver à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nous faisons réagir l'aniline présentant la fonctionnalité souhaitée (COOH, NH_2 , alcyne ou autre) dans l'acide tétrafluoroborique en présence de nitrite de sodium dissous dans le minimum d'eau milliQ à une température entre $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$.²²⁵⁻²²⁹

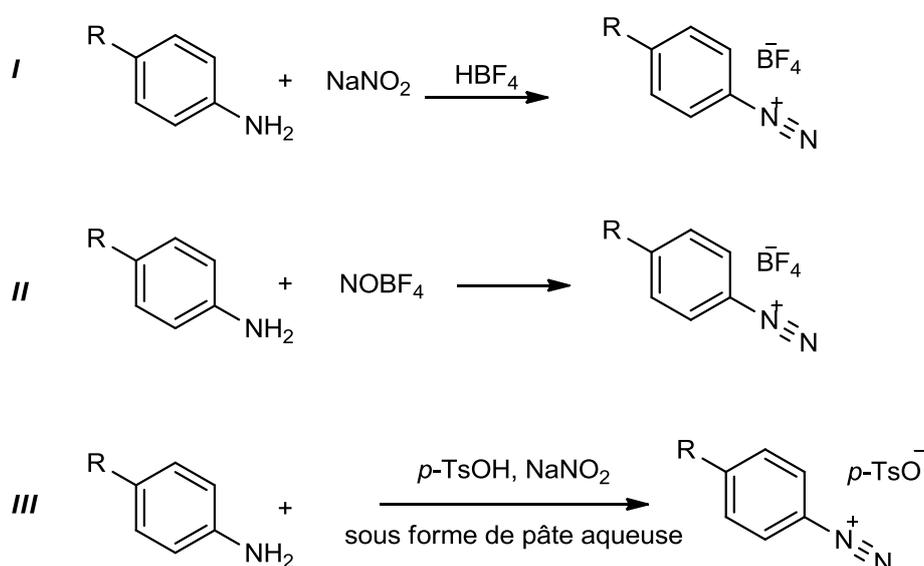


Figure 34 Différentes voies de synthèse des sels de diazoniums

Cette technique **I** présente plusieurs avantages par rapport à d'autres méthodes (Figure 34). Par exemple, la réaction **II** en milieu organique et en présence de tétrafluoroborate de nitrosonium nécessite une manipulation à $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans une boîte à gants^{230, 231}, conditions ne pouvant pas être mise en application au laboratoire. La technique **III** se fait à sec dans un mortier²³², ce qui peut présenter certains risques lorsque l'on sait que les sels de diazoniums peuvent être explosifs. Sur le même principe que la réaction **III**, diverses diazotations se font grâce à de l'acide sulfurique supporté.^{233, 234}

5.4.1 Sels utilisés pour les greffages de surfaces

Le premier type de sel que j'ai synthétisé a été le 4-carboxybenzène diazonium **2** (CBD) (Schéma 27). La fonction acide carboxylique est l'une des deux fonctions impliquées dans les

couplages peptidiques. Nous avons suivi le protocole expérimental utilisé par Florian Brisset ; les détails sont donnés en annexe. On obtient le CBD **2** avec un rendement de 84%.



Schéma 27 Synthèse du 4-carboxybenzène diazonium

En spectroscopie infrarouge, les bandes caractéristiques de ce sel sont une bande à 2287 cm^{-1} qui correspond à la vibration de la liaison $\text{N}^+\equiv\text{N}$ du diazonium et une bande à 1053 cm^{-1} qui est attribuée au contre-ion BF_4^- . On peut aussi noter un pic à 3110 cm^{-1} pour l'élongation de la liaison O-H de l'acide carboxylique et à 1705 cm^{-1} pour le C=O. On note enfin le couple 1600 cm^{-1} et 1400 cm^{-1} des C=C aromatiques. En RMN, comparé au spectre de l'acide 4-aminophénylacétique, on remarque un déblindage des signaux de protons aromatiques et du signal du $\text{CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$ causé par le $-\text{N}^+\equiv\text{N}$ est électro-attracteur.

Pour immobiliser une protéine ou un autre bioélément possédant une fonction acide carboxylique, il est intéressant de posséder une surface aminée pour pouvoir effectuer un couplage peptidique. C'est pourquoi le deuxième sel préparé a été le 4-aminobenzène diazonium **4** (ABD) (Schéma 28).

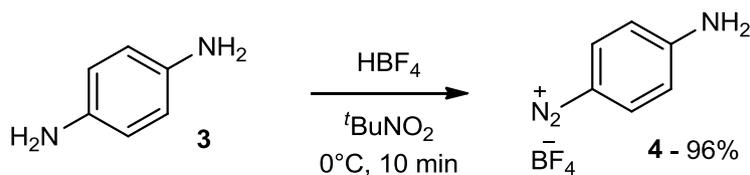


Schéma 28 Synthèse du 4-aminobenzène diazonium

Le protocole de Florian Brisset ne fonctionnant pas avec la 4-phénylènediamine **3**, nous avons utilisé une synthèse différente faisant intervenir un autre agent de nitrosation, le nitrite de tert-butyle.²³⁵ À la différence du CBD, l'ABD **4** est filtré directement et n'est pas rincé avant d'être mis au congélateur. Le rendement de cette réaction est de 96%. Nous avons analysé le produit par spectroscopie infrarouge et par RMN.

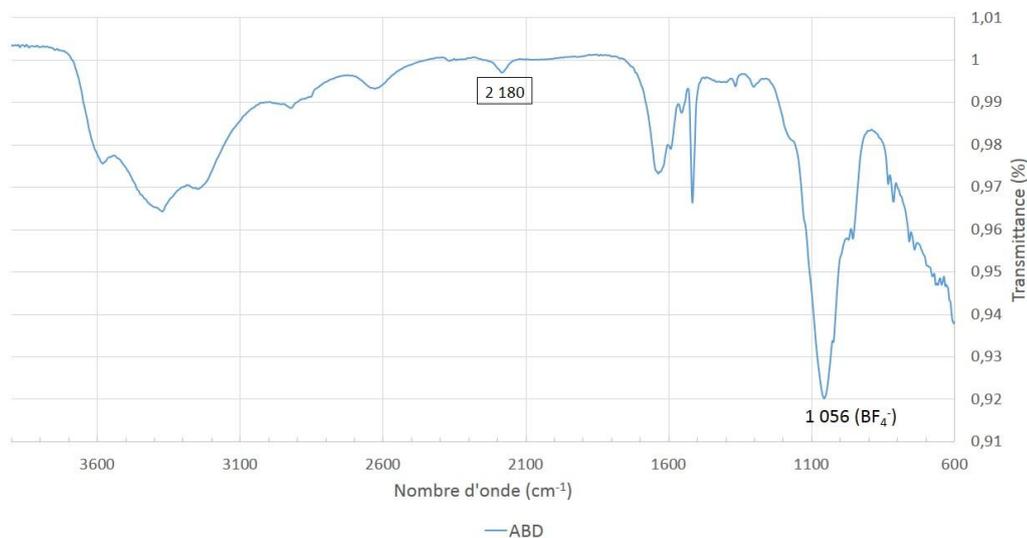


Figure 35 Spectre IR de l'aminobenzène diazonium

En IR (Figure 35), on peut voir comme pour le CBD le pic à 1056 cm^{-1} qui correspond au contre-ion BF_4^- , le pic de la liaison $-\text{N}^+\equiv\text{N}$ se trouve à 2180 cm^{-1} au lieu de 2285 cm^{-1} . Cette différence s'explique par le phénomène donné par Nuttal *et coll.*²³⁶ (Figure 36). Le transfert de charge dans la structure amène à une structure proche des quinones (II) qui a un spectre IR spécifique.

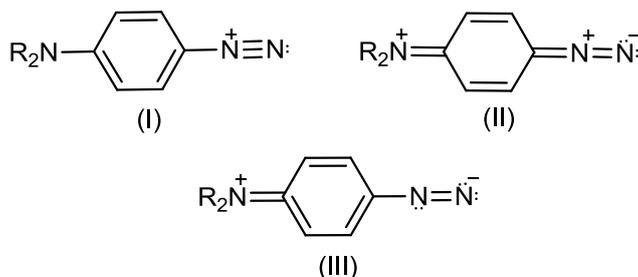


Figure 36 Structures des *p*-aminobenzène diazonium contribuant au spectre IR de l'ABD²³⁶

En RMN ^1H (voir spectre en annexe), l'apparition de doublet dans la zone des protons aromatiques montre bien que le composé n'est plus symétrique, symétrie qui était déterminée par l'unique pic à 6.4 ppm du spectre de la *p*-phénylènediamine **3**.

Plus récemment nous avons également préparé un sel d'éthynylbenzène diazonium **6** (EBD) (Schéma 29) car insérer une triple liaison sur la surface du COC présente deux avantages : premièrement la possibilité de faire des couplages de Sonogashira en surface comme Qu *et coll.*²³⁷ et deuxièmement l'utilisation de chimie Click comme Ladner *et coll.*²³⁸. À la

différence de ces deux références, nous immobiliserons la triple liaison en surface comme testé par Collins *et coll.*²³⁹ Pour préparer ce sel, nous avons suivi le protocole de Zhang *et coll.*²⁴⁰

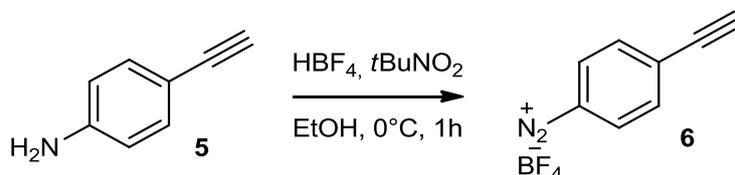


Schéma 29 Synthèse du 4-éthynylbenzène diazonium

La 4-éthynylaniline **5** est traitée avec du nitrite de ter-butyle comme dans le précédent protocole mais en fin de réaction la solution est diluée avec 20 mL d'Et₂O avant d'être mise au congélateur pour faciliter la précipitation des sels.

Le spectre IR de l'EBD présente bien les pics caractéristiques du sel de diazonium ; c'est-à-dire un pic à 2288 cm⁻¹ pour l'élongation de la liaison N⁺≡N et un pic à 1053 cm⁻¹ pour BF₄⁻. Sont également visibles : un pic à 3262 cm⁻¹ qui vient de l'élongation de la liaison ≡C-H, un pic à 2114 cm⁻¹ pour la liaison C≡C ; le couple de pics à 1580 cm⁻¹ et 1412 cm⁻¹ des C=C aromatiques ; à 1293 cm⁻¹ un pic pouvant provenir de l'élongation de la liaison C_{ar}-N et pour finir un pic à 843 cm⁻¹ des C-H aromatiques.

En RMN nous observons le même phénomène de déblindage des signaux de tous les protons et la disparition du signal correspondant au NH₂ (Figure 37). Les protons aromatiques de l'aniline à 7.2 ppm et 6.5 ppm passent à 8.5 et 8.0 ppm sur le diazonium, et le proton de l'alcyne à 3.1 ppm sort à 4.2 ppm.

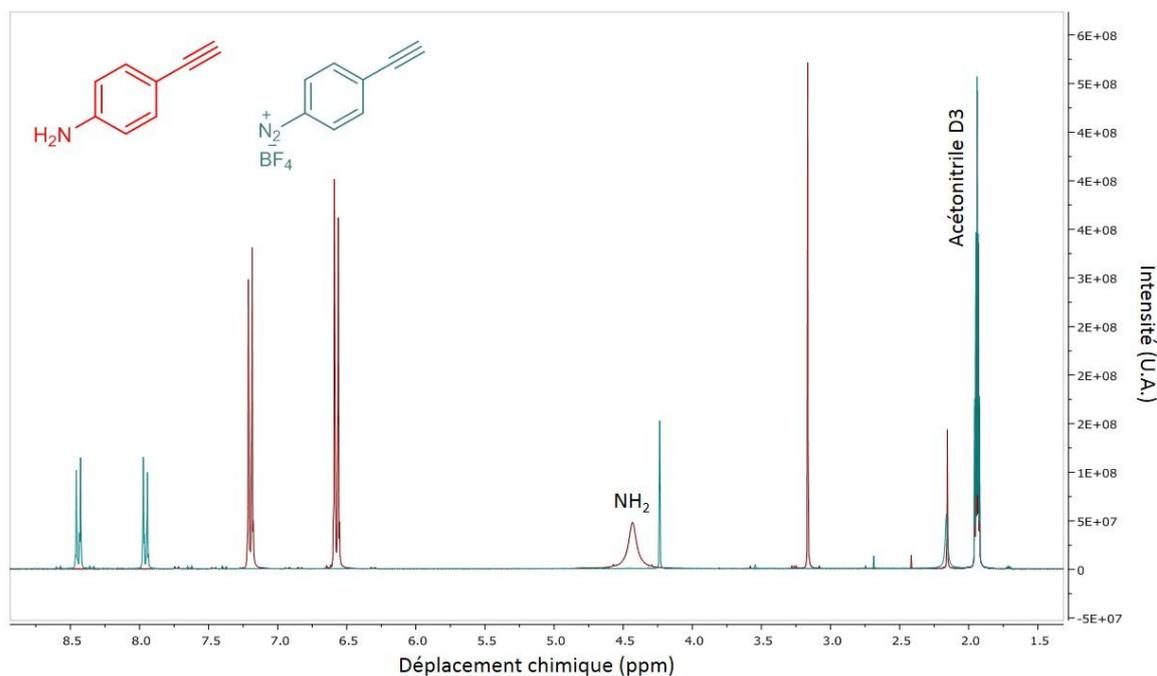


Figure 37 Comparaison des spectres RMN de l'éthynylaniline (rouge) et de l'EBD (bleu)

5.4.2 Autres sels de diazoniums préparés

D'autres diazotation ont été expérimentées sur différents composés sans pour autant avoir fait l'objet d'utilisations ultérieures dans le cadre de ce projet.

5.4.2.1 Pour des post-fonctionnalisations différentes des couplages peptidiques

La possibilité de substituer un groupement halogéné par un thiol en surface d'un polymère²⁴¹ permet d'introduire des bioéléments comme dans l'article de McGettrick *et coll.* qui décrit l'immobilisation d'ADN sur une surface bromée.²⁴² Nous avons donc préparé des sels de diazonium possédant un brome en *para* de l'amine. La 4-(2-bromoéthyl)aniline **8** n'est pas disponible commercialement, donc une étape de substitution nucléophile sur le 2-(4-aminophényl)éthanol **7** est nécessaire avant la formation du sel de diazonium **9** (Schéma 30).²⁴³ L'étape de substitution a un rendement de 73% tandis que la diazotation atteint les 84% de rendement. Le spectre IR confirme la présence du diazonium par une bande à 2290 cm^{-1} . Ce sel de diazonium avait été greffé sur le COC avec succès par mon prédécesseur.

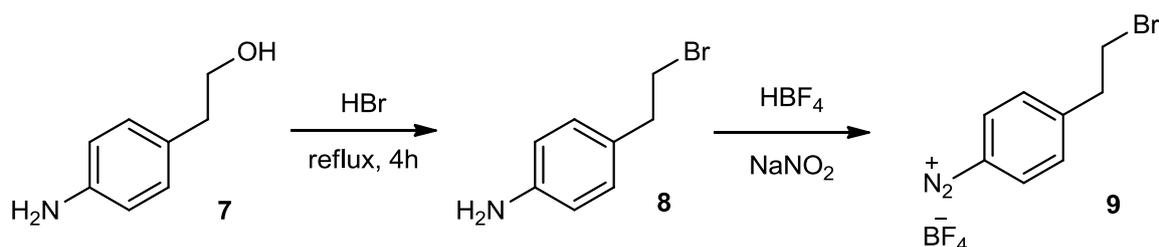


Schéma 30 Préparation du 4-bromoéthylbenzène diazonium

Les interactions électrostatiques sont une autre option pour déposer des molécules sur une surface. Vilà et Bélanger ont déposé un mélange de 4-sulfophényle et 4-aminophényle diazoniums sur la surface d'une électrode de carbone pour ensuite faire interagir la couche chargée avec des ions métalliques (Cu^{2+} , PtCl_6^{2-}).²⁴⁴ Nous avons préparé le 4-diazoniobenzènesulfonate **11** en dissolvant 1,73 g d'acide sulfanilique **10** dans 100 mL d'une solution d'acide chlorhydrique 1M (Schéma 31). Une fois le ballon placé dans un bain de glace, une solution à 10% d'excès de nitrite de sodium 1M (soit 0,011 mol- 0,758g dans 11 mL d'eau) est ajoutée goutte-à-goutte dans le mélange sous agitation vigoureuse. Après 45 minutes de réaction à 5 °C, le précipité est filtré sur Büchner, rincé avec de l'eau froide et séché sous pression réduite. Le produit a été obtenu avec 37% de rendement et stocké au réfrigérateur.

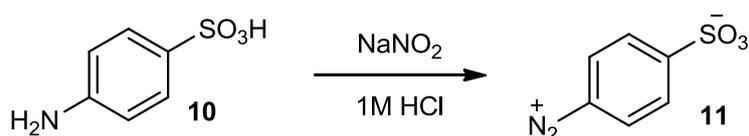


Schéma 31 Synthèse du 4-diazoniobenzènesulfonate

La présence des deux charges sur cette molécule pourrait faire penser qu'elle est plus stable que les autres, mais une explosion accidentelle lors de la manipulation de cette dernière prouve qu'il faut prendre des précautions avec tous les sels de diazoniums formés. Ce dernier sel a été greffé sur COC mais cela n'apparaîtra pas dans la discussion, vous pourrez trouver le spectre IR en annexe. Nous avons focalisé nos manipulations suivantes sur les trois sels présentés en premier le CBD, l'EBD et l'ABD.

5.4.2.2 Pour l'éloignement de la surface des fonctions actives

Le fait d'allonger les chaînes carbonées fixées sur la surface devrait améliorer la réactivité de la surface fonctionnalisée (car cela apporte de la flexibilité pour l'accroche du bioélément) et

également limiter la gêne stérique lors de l'approche de la cible du biocapteur. Basé sur la substitution nucléophile du brome par les thiols, nous avons fait réagir l'acide 12-mercaptododécanoïque **12** avec la 4-(2-bromoéthyl)aniline **8** pour former l'aniline **13** (Schéma 32). Le produit issu de cette synthèse était de forme huileuse de couleur jaune, rendant difficile l'établissement d'un rendement. L'étape de diazotation pour obtenir le sel de diazonium **14** n'a donné que 40 mg de produit (rendement de 10%), ce qui était insuffisant pour effectuer un essai de greffage. La répétition complète de cette réaction n'a pas donné de meilleur résultat.

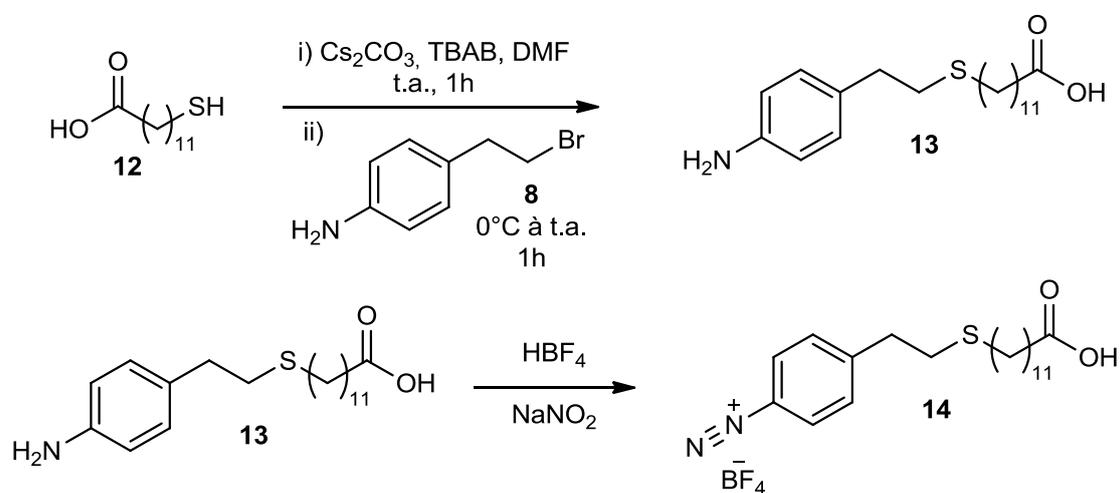


Schéma 32 Schéma réactionnel de la formation de l'acide (2-(4-diazonophénéthylthio)dodécanoïque)

5.5 Méthodes de greffage utilisées

Après la préparation des sels de diazonium, j'ai expérimenté leur greffage en surface en suivant les méthodes développées par Florian Brisset au cours de sa thèse.²⁰⁹ Je présenterai d'abord l'étude du greffage électrochimique sur Or du 4-carboxybenzène diazonium, où nous avons évalué l'influence de la technique utilisée (voltammétrie cyclique ou chronoampérométrie). Ensuite seront présentés les greffages chimiques et caractérisations associées des différents sels de diazoniums préparés sur le COC par activation UV de la surface.

5.5.1 Électrochimie sur surface d'Or

La fonctionnalisation de surface par réduction électrochimique des sels de diazonium est une technique classique et populaire, notamment sur les surfaces d'Or^{225-229, 231, 245-263} car les diazonium sont des composés électroactifs.²⁶⁴ Dans un montage d'électrochimie à 3 électrodes, la surface à fonctionnaliser est utilisée comme électrode de travail. Celle-ci est

plongée dans une solution conductrice d'aryldiazonium, soit aqueuse soit organique, et à proximité des électrodes de référence et contre-électrode de platine, ces trois électrodes étant reliées à un potentiostat. Pour un potentiel électrique spécifique, un radical aryle va se former et réagir rapidement avec la surface de l'électrode, mais, à la différence des espèces thiols qui forment des monocouches autoassemblées sur l'Or, les radicaux aryles vont continuer à attaquer la première couche formée et ainsi créer des multicouches plus ou moins épaisses. Ce phénomène se contrôle en choisissant la procédure électrochimique adéquate. Par exemple la voltammétrie cyclique où le potentiel est balayé entre 2 valeurs définies et ce de façon cyclique (>2 cycles), résulte en une couche épaisse et désordonnée.^{251, 265} Une solution si l'on désire une épaisseur contrôlée de la couche d'aryle, est d'appliquer un potentiel fixe durant une période définie, ce qui s'appelle la chrono-ampérométrie.^{225, 228, 251, 258} J'ai étudié ces deux méthodes pour déterminer si elles avaient une influence notable sur les propriétés de surface et plus particulièrement sur la densité de greffage évaluée par FTIR.

Si nous avons choisi de faire ces expériences sur Or, c'est que ce type de substrat nous a permis de faire des analyses en SPR⁵ qui ne sont pas possibles sur le COC ; celles-ci seront présentées dans le chapitre suivant.

Nous avons travaillé avec des lames d'Or fournis par Schott (Suisse) ; elles sont composées d'une lame de verre possédant une couche de chrome permettant l'adhérence d'une couche d'Or (Figure 38). Nous les avons utilisées sans traitement préalable.

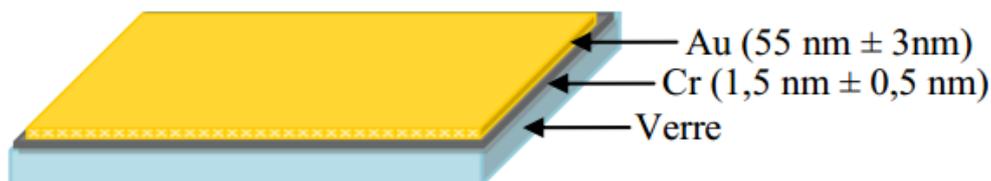


Figure 38 Schéma de la structure des lames d'Or utilisées

La procédure suivie pour les greffages en électroréduction des sels de diazonium est la suivante :

⁵ Surface Plasmon Resonance

1. Préparer 100 mL d'une solution d'électrolyte dans l'acétonitrile à 0,1 M. Nous avons utilisé soit du tétrafluoroborate de N,N,N-tributyl-1-butanaminium (Bu_4N^+ , BF_4^-) soit de l'hexafluorophosphate de N,N,N-tributyl-1-butanaminium (Bu_4N^+ , PF_6^-).
2. Préparer 25 mL d'une solution de ferrocène à 0,01 M dans l'électrolyte. Cette solution agit comme une sonde électrochimique réversible et nous permet de visualiser la passivation de la surface après dépôt.
3. Préparer 10 mL d'une solution de sels d'aryldiazonium à 0,05 M dans l'électrolyte. C'est dans cette solution que seront plongées les électrodes (lame d'Or = W, réf = Pt, contre = Pt).
4. La lame utilisée pour le greffage est analysée en IR avant et après l'expérience.
5. Une première analyse en voltammétrie cyclique est effectuée dans le sel de fond dégazé par bullage d'azote, avec 5 cycles de balayage entre -0,3 V et 1 V. Cette analyse permet de vérifier la conductivité de la surface et la propreté du sel de fond.
6. Une seconde analyse dans le ferrocène d'un cycle entre -0,3 V et 1 V par intervalle de $0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ permet de déterminer le E^0 de notre cellule. À noter que les électrodes sont rincées entre chaque analyse avec de l'acétonitrile.
7. L'expérience de réduction du sel de diazonium a lieu à cette étape, soit en voltammétrie cyclique soit en chrono-ampérométrie.
8. Une analyse dans le ferrocène de 5 cycles entre -0,3 V et 1 V permet de vérifier la passivation de la surface.

Il faut noter qu'à partir de l'étape 6, la lame est rincée avec de l'acétonitrile entre chaque étape pour minimiser les contaminations qui pourraient avoir lieu si des impuretés étaient présentes dans le sel de fond et pour retirer les dépôts de ferrocène.

5.5.1.1 Étude du greffage du CBD sur Or

5.5.1.1.1 Conditions initiales

Le 4-carboxybenzène diazonium **2** ayant été le premier sel que j'ai synthétisé, il fut également le premier que j'ai greffé en surface (Schéma 33). La réduction du CBD fut effectuée en voltammétrie cyclique avec l'étape 7 sur un intervalle entre 0,4 V et -0,8 V sur 10 cycles.

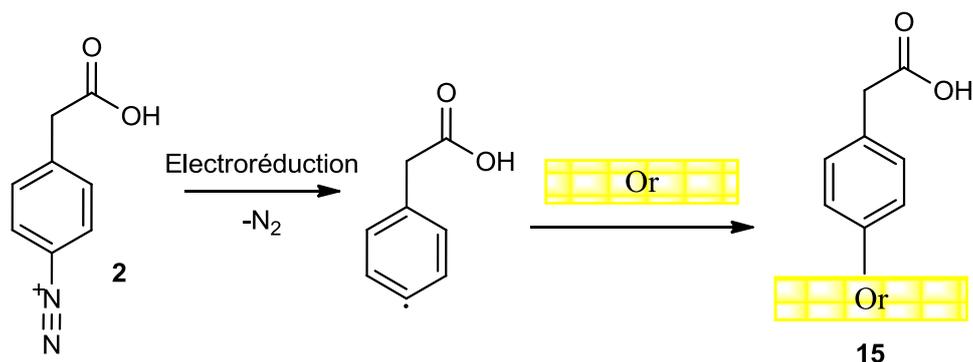


Schéma 33 Électrodéposition de CBD sur surface d'Or

Le diagramme suivant (Figure 39) nous indique que le pic de réduction de ce sel se situe à -0,25 V par rapport à l'électrode de Pt, cette valeur a été calibrée pour obtenir une valeur en fonction de la référence ECS (Electrode à Calomel Saturé).

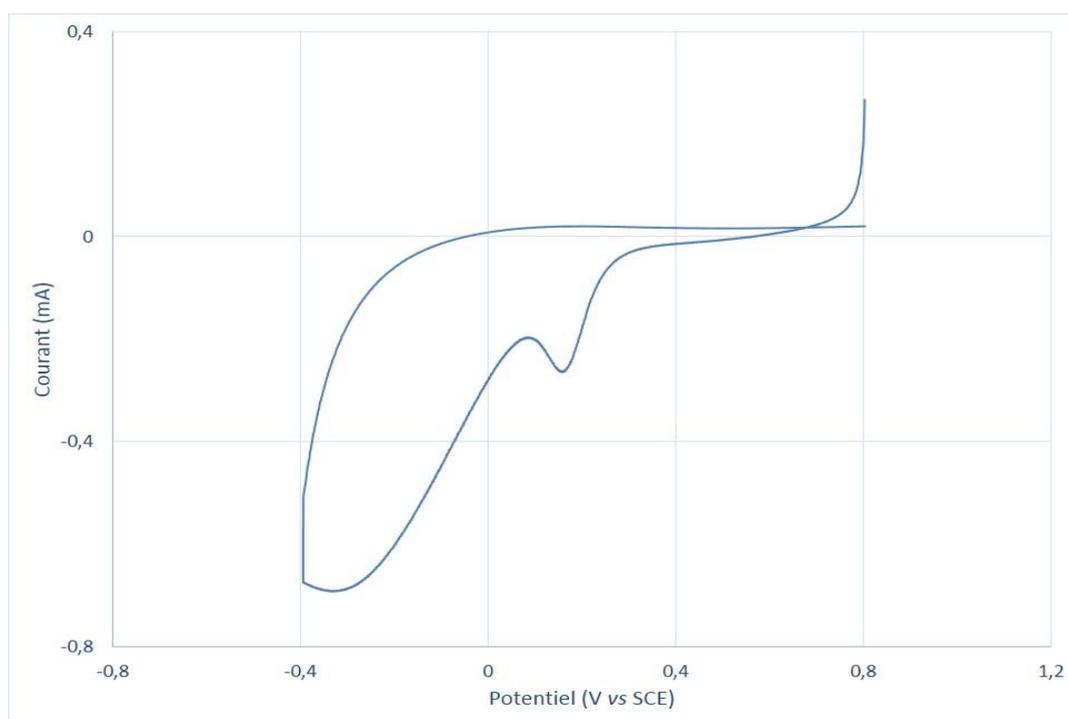


Figure 39 Profil d'électroréduction du CBD

L'analyse du ferrocène (Figure 40) prouve également que la surface a bien été recouverte avec le CBD car l'intensité du signal d'oxydation du ferrocène mesuré à 0,905 V/ECS est plus faible après électrodéposition qu'avant.

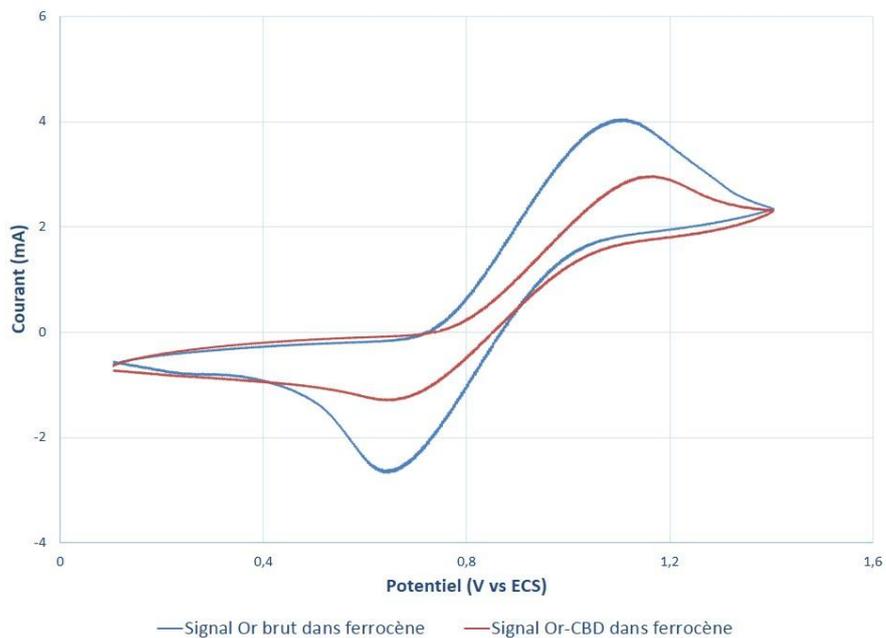


Figure 40 Diagramme du signal du ferrocène avant et après greffage du CBD

L'analyse IR des lames d'Or avant et après voltammétrie cyclique nous permet également d'avoir des informations sur la surface (Figure 41).

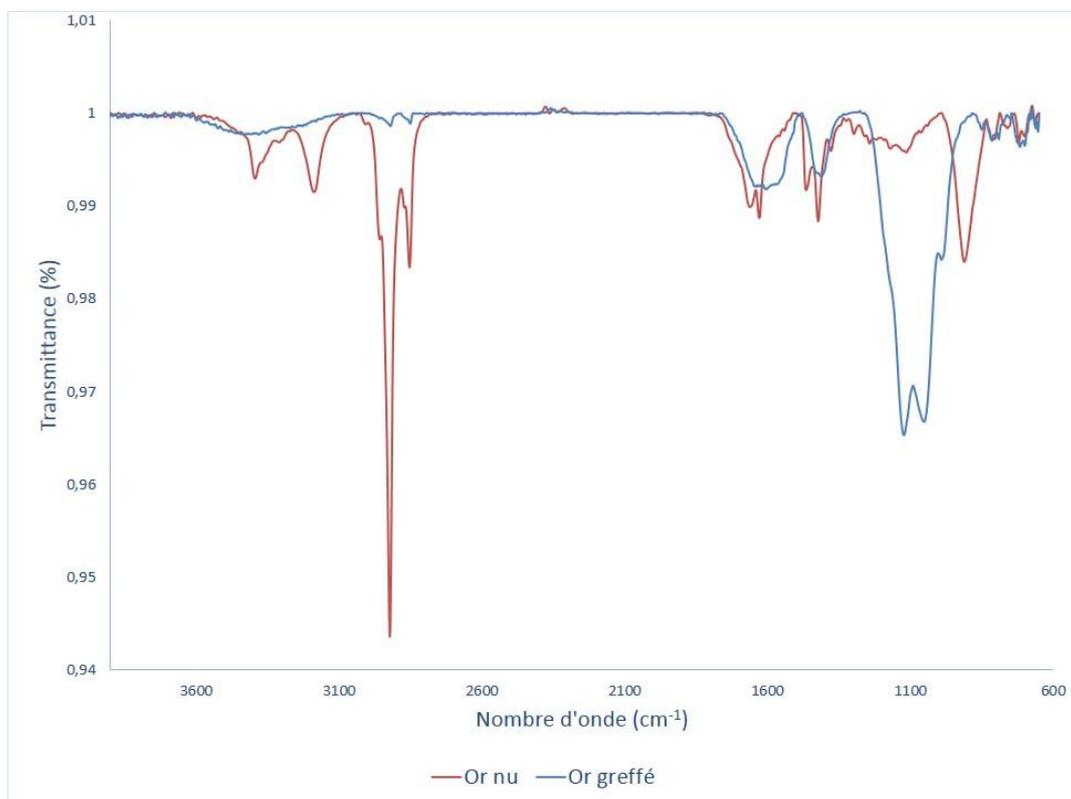


Figure 41 Analyse IR de la lame d'Or avant et après fonctionnalisation avec le CBD

On note que le spectre de l'Or nu présente des bandes qui montrent que la pollution organique est importante sur ce type de surface. Un prétraitement pour nettoyer la surface des lames d'Or serait à mettre en place.

On remarque sur ce spectre :

- une large bande à 1100 cm^{-1} qui peut être attribuée aux vibrations des liaisons $\text{C}_{\text{ar}}\text{-C}$ et C-O ,
- une bande à 1440 cm^{-1} qui correspond à la vibration des O-H d'acide carboxylique,
- une bande à 1630 cm^{-1} provenant des élongations des liaisons $\text{C}=\text{C}$ aromatiques,
- un signal à 3300 cm^{-1} venant de l'élongation des O-H d'acide carboxylique.

Tous ces signaux proviennent bien du CBD greffé en surface. On peut aussi remarquer que la bande correspondant au N_2^+ a disparu.

5.5.1.1.2 Étude de la voltammétrie cyclique

Nous avons voulu étudier l'influence du nombre de cycle lors d'un greffage en voltammétrie cyclique. Nous avons appliqué 1 à 10 cycles puis comparé les intensités électriques mesurées en présence du ferrocène et les signaux observés en IR.

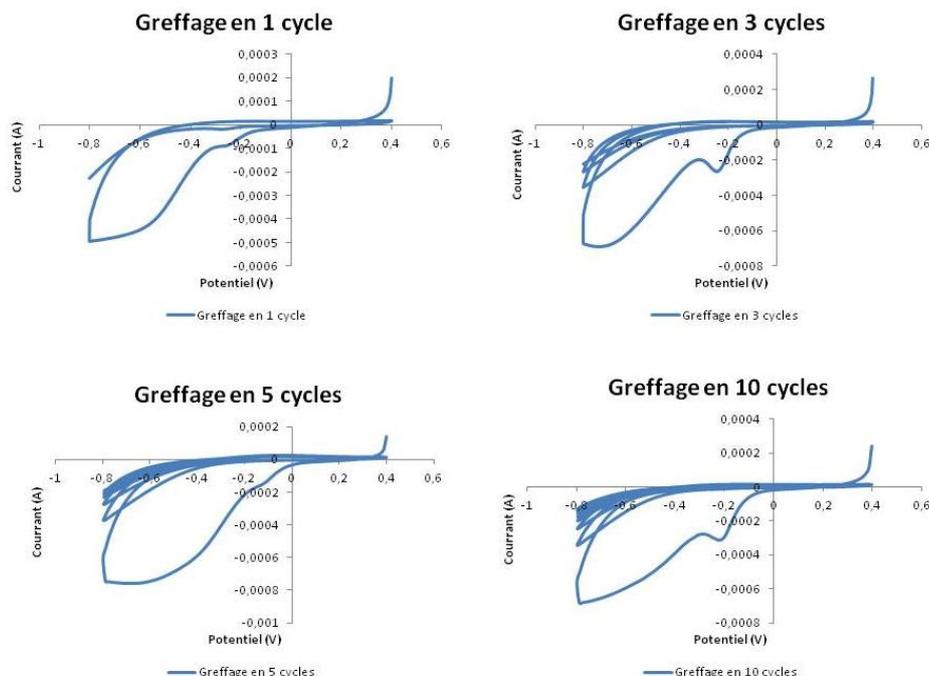


Figure 42 Comparaison des diagrammes de voltammétrie cyclique en fonction du nombre de cycles

La Figure 42 nous montre que la réduction électrochimique a lieu lors du premier cycle et que les cycles suivants ne servent plus à réduire la fonction diazonium, donc un grand nombre de cycles n'est pas nécessaire pour faire réagir le diazonium. De même, le signal du ferrocène après fonctionnalisation montre que dès le premier cycle la surface est passivée (Figure 43). On remarque tout de même un phénomène étrange sur la lame après 10 cycles où le courant est plus important que pour les autres lames.

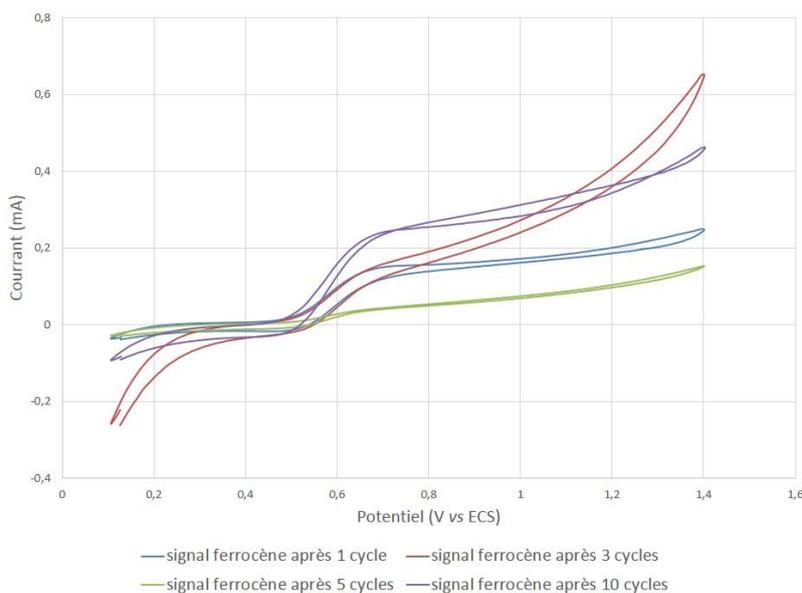


Figure 43 Signal du ferrocène après 1, 3, 5 ou 10 cycles de voltammétrie cyclique

En IR le résultat suit la même tendance, on retrouve les signaux du CBD mais avec seulement une légère amélioration de l'intensité en fonction du nombre de cycles (par exemple à 1410 cm^{-1} et 1160 cm^{-1}) (Figure 44).

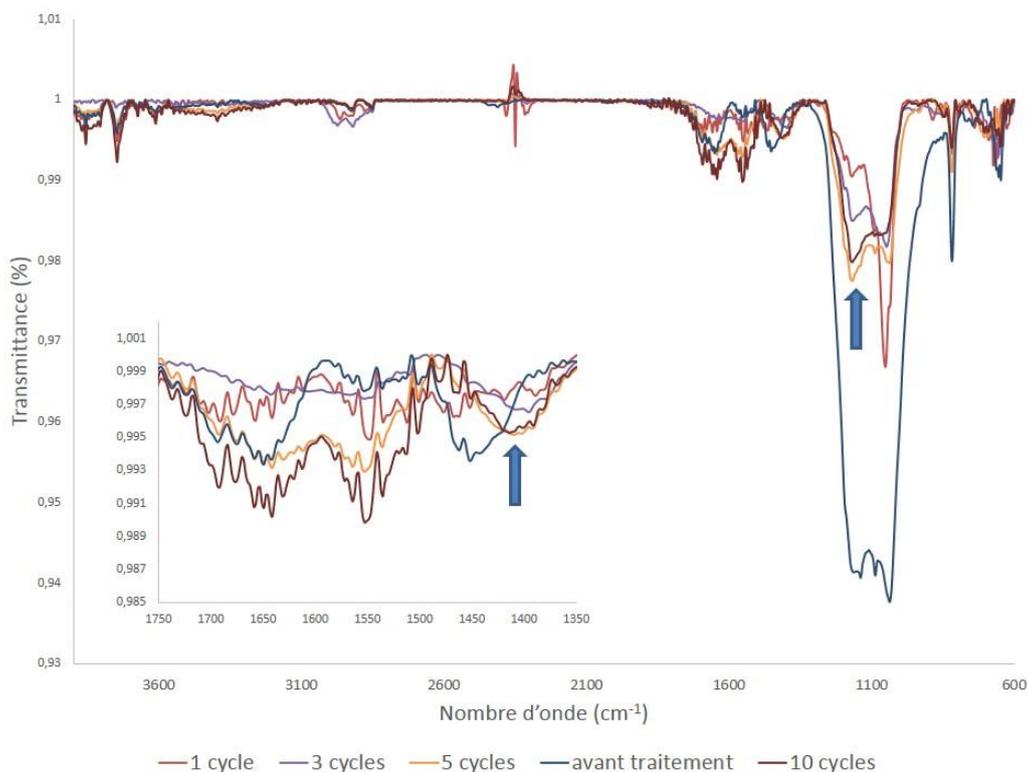


Figure 44 Spectres IR des lames d'Or utilisées en voltammétrie cyclique avant traitement et après 1, 3, 5 et 10 cycles

5.5.1.1.3 Étude de la chrono-ampérométrie

Pour les tests en chrono-ampérométrie, nous fixons le potentiel à -0,3 V pour être en dessous du pic de réduction de CBD (-0,25 V) pendant 60 s puis 120 s et enfin 300 s. Nous avons analysé le signal du ferrocène des lames fonctionnalisées (Figure 45) ainsi que leurs surfaces par spectroscopie IR (Figure 46).

Le signal du ferrocène montre bien que le temps de traitement a une influence sur la passivation de la surface, la passivité augmente avec le temps de traitement appliqué.

En IR, on retrouve bien les pics caractéristiques du CBD (1550 cm^{-1} et 1400 cm^{-1}) et l'intensité des bandes augmente également en fonction du temps d'électroréduction ce qui signifie que plus le traitement est long plus la surface est recouverte par la couche de radicaux aryles (Figure 46).

En termes d'intensité de signaux en spectroscopie IR, le traitement par voltammétrie cyclique avec 5 cycles offre le meilleur résultat, le dépôt couvre bien la surface d'où la passivation quasi-totale.

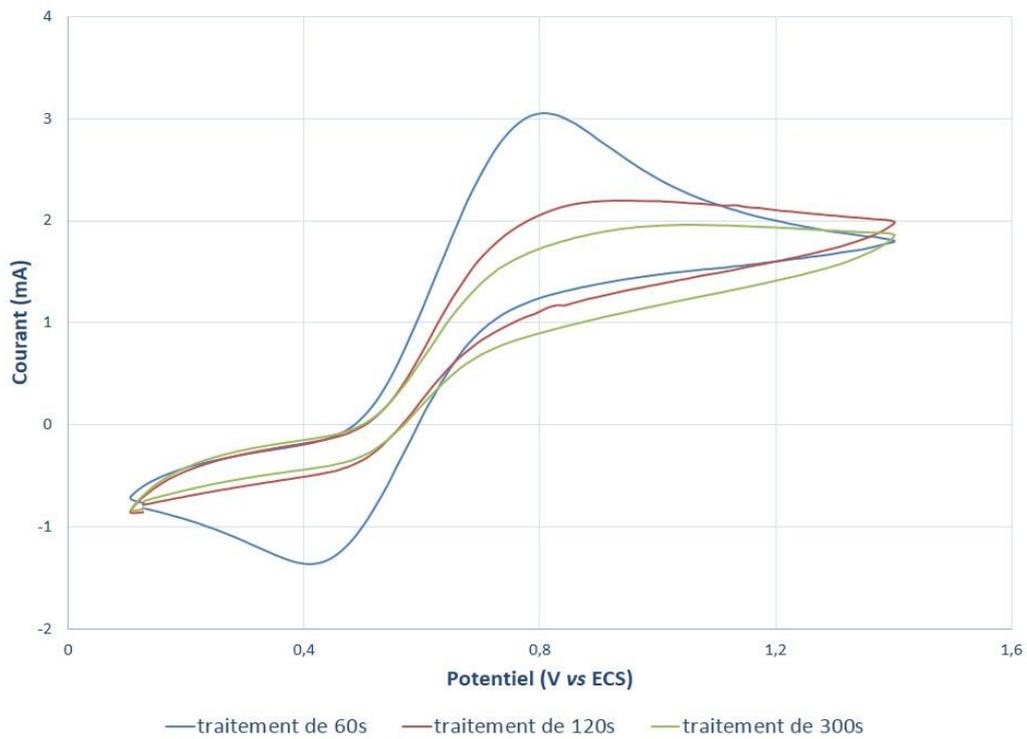


Figure 45 Signal du ferrocène après traitement en chrono-ampérométrie des lames d'Or par le CBD

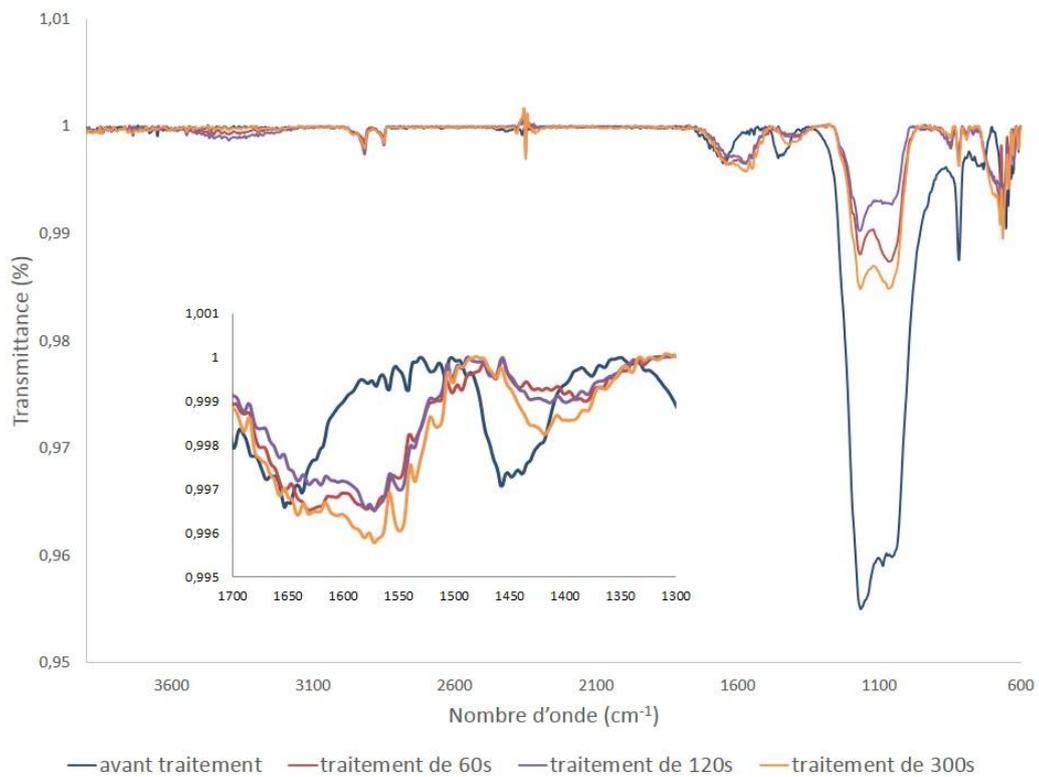


Figure 46 Spectres IR des lames d'Or avant et après traitement en chrono-ampérométrie

5.5.1.2 Greffage électrochimique de l'éthynylbenzène diazonium (EBD) sur Or

Nous avons effectué le greffage de l'EBD **6** en balayant de 0 V à -0,4 V sur 30 cycles en suivant les mêmes étapes que présentées en Schéma 34. Comme nous ne connaissions pas le comportement de ce sel en électrochimie, par mesure de sécurité nous avons augmenté le nombre de cycles utilisés pour avoir un dépôt aussi épais que possible. On note le pic de réduction à -0,34 V/Pt (Figure 47).

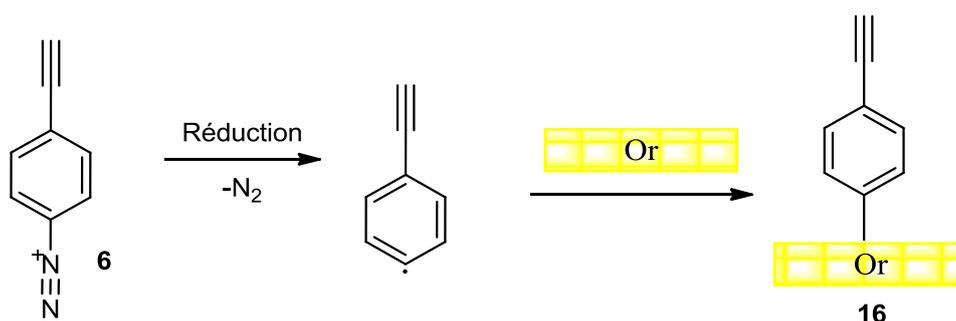


Schéma 34 Électrodéposition de l'EBD sur surface d'Or

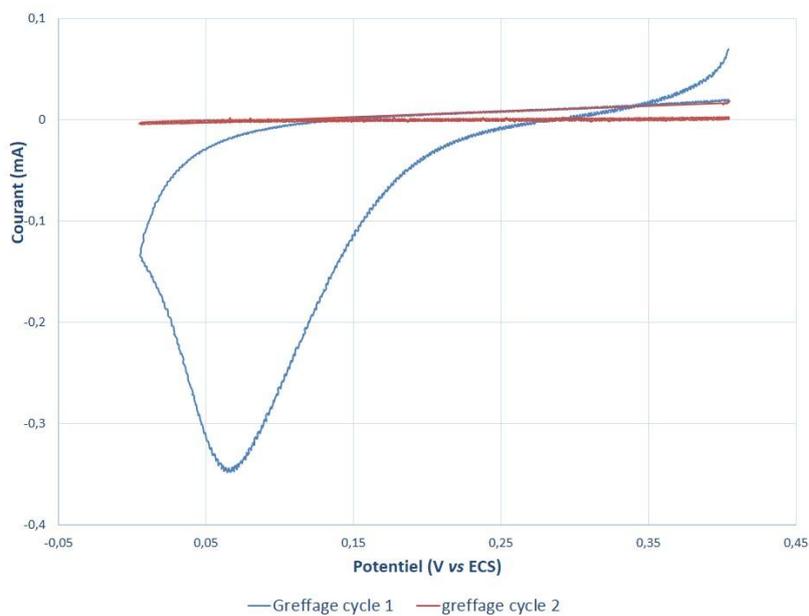


Figure 47 Diagramme de voltammétrie cyclique du greffage d'EBD sur Or

La disparition du pic de réduction dès le 2^{ème} cycle montre que le greffage a eu lieu car toute la surface a été recouverte avec les synthons, l'empêchant donc de conduire le courant.

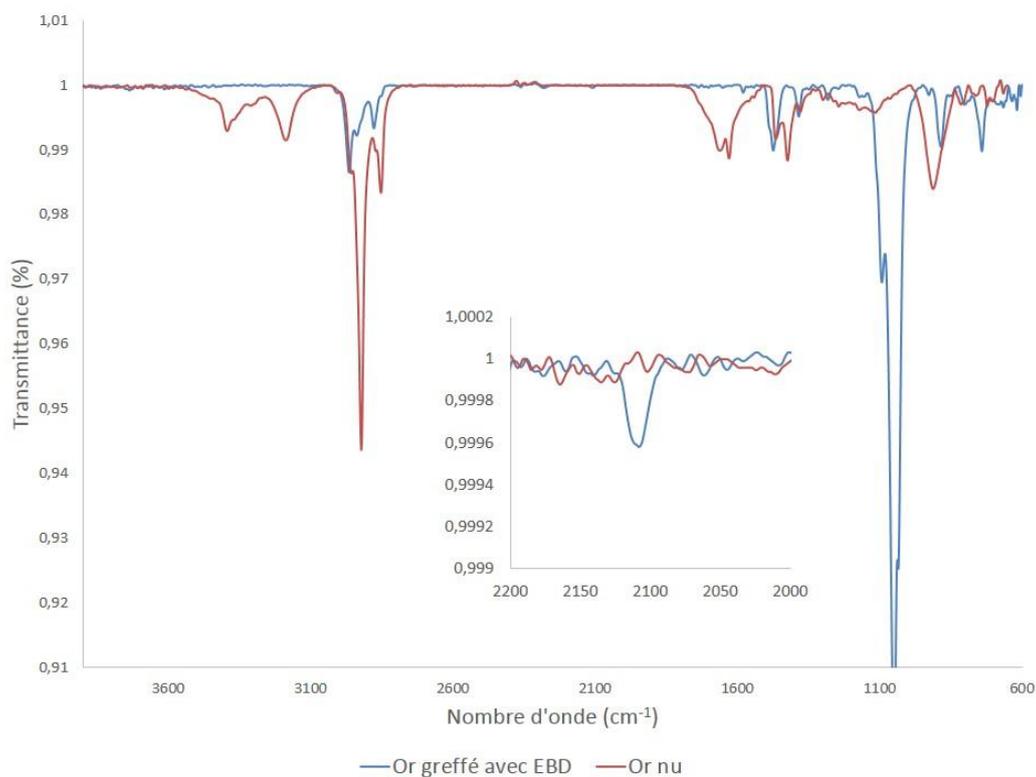


Figure 48 Analyse IR de la lame d'Or fonctionnalisée avec EBD

Le spectre infrarouge (Figure 48) de cette lame nous indique également que nous avons bien la liaison $C\equiv C$ avec un faible pic à 2100 cm^{-1} , idem, un faible signal à 1575 cm^{-1} pourrait indiquer la présence des liaisons $C=C$ aromatiques. Les mesures par ATR-FTIR sur surfaces métalliques sont peu sensibles, il est donc difficile d'avoir des signaux intenses mais les différences entre le spectre de l'or nu et le spectre de l'or greffé avec l'EBD sont suffisamment importantes pour conclure à la réussite du greffage.

5.5.1.3 Greffage électrochimique du 4-aminobenzène diazonium par (ABD)

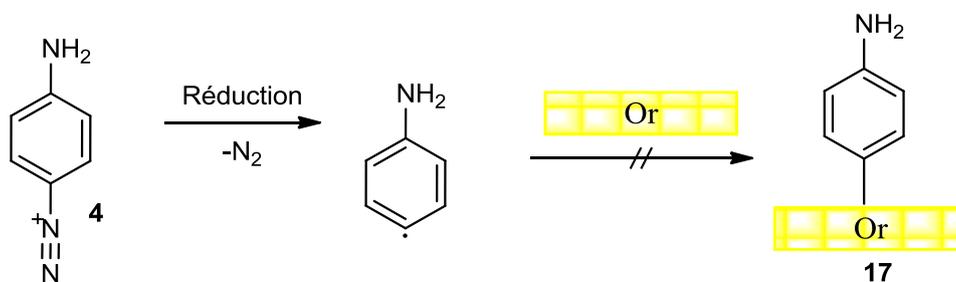


Schéma 35 Électrodéposition d'ABD sur Or

L'aminobenzène diazonium **4** a été greffé sur or par électrochimie en suivant les étapes présentées en 5.5.1 et en effectuant 10 cycles de voltammétrie cyclique entre -0,4 V et 0,8 V (Schéma 35). Les trois premiers cycles sont présentés sur la Figure 49, on remarque que par rapport au CBD, le pic de réduction à 0 V/Pt reste présent malgré les cycles successifs.

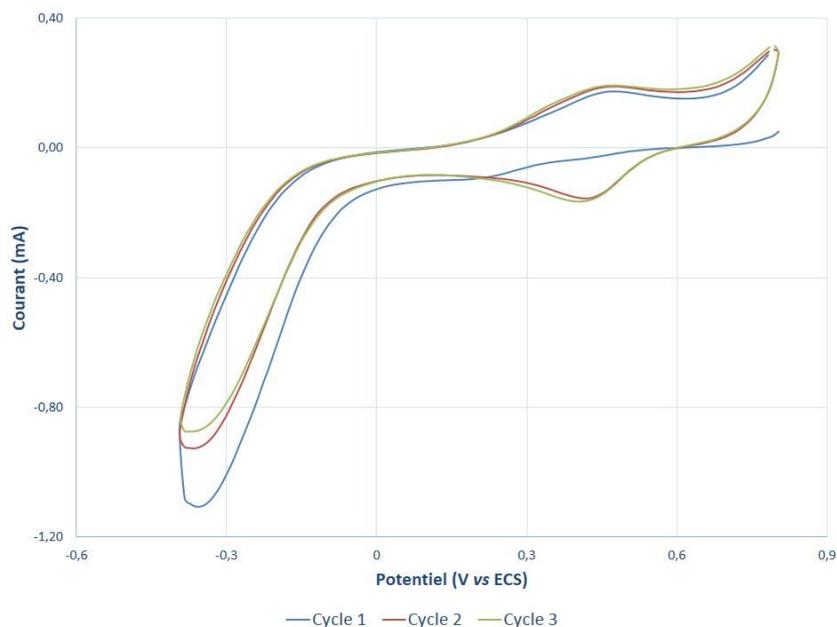


Figure 49 Diagramme de voltammétrie cyclique de l'électroréduction de l'ABD

Une étude de la passivation de la surface fut effectuée pour vérifier que le sel s'est bien greffé (Figure 50). La grande similarité des diagrammes obtenus nous indique que la surface est encore conductrice, l'absence de passivation présuppose que les diazoniums ne se sont pas greffés.

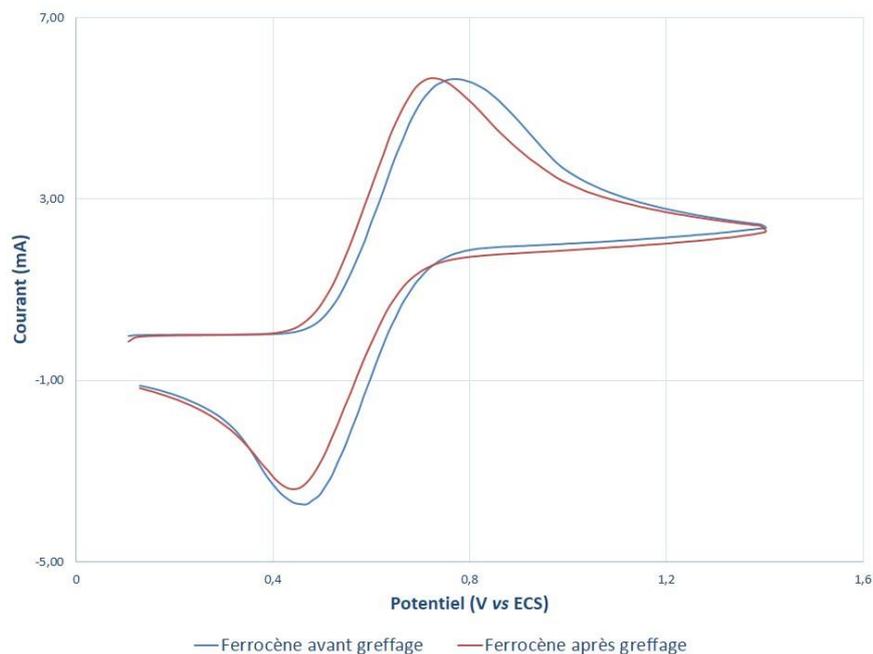


Figure 50 Signal du ferrocène avant (bleu) et après (rouge) traitement par voltammétrie cyclique avec l'ABD

La lame d'or utilisée pour cette expérience fut analysée par spectroscopie IR avant et après traitement (Figure 51) mais au vue des diagrammes d'électrochimie, cela pourrait nous laisser penser que les signaux observés sont dus à de l'adsorption.

On note la présence sur ce spectre IR de :

- Un pic à 850 cm^{-1} qui correspond au C-H aromatiques,
- Une bande à 1150 cm^{-1} provenant de l'élongation de la liaison C-N,
- Un pic à 1650 cm^{-1} correspondant à la vibration de la liaison N-H,
- Un massif centré sur 3400 cm^{-1} provient de l'élongation de la liaison N-H.

Et l'absence du pic du N_2^+ qui confirme bien la réduction du diazonium.

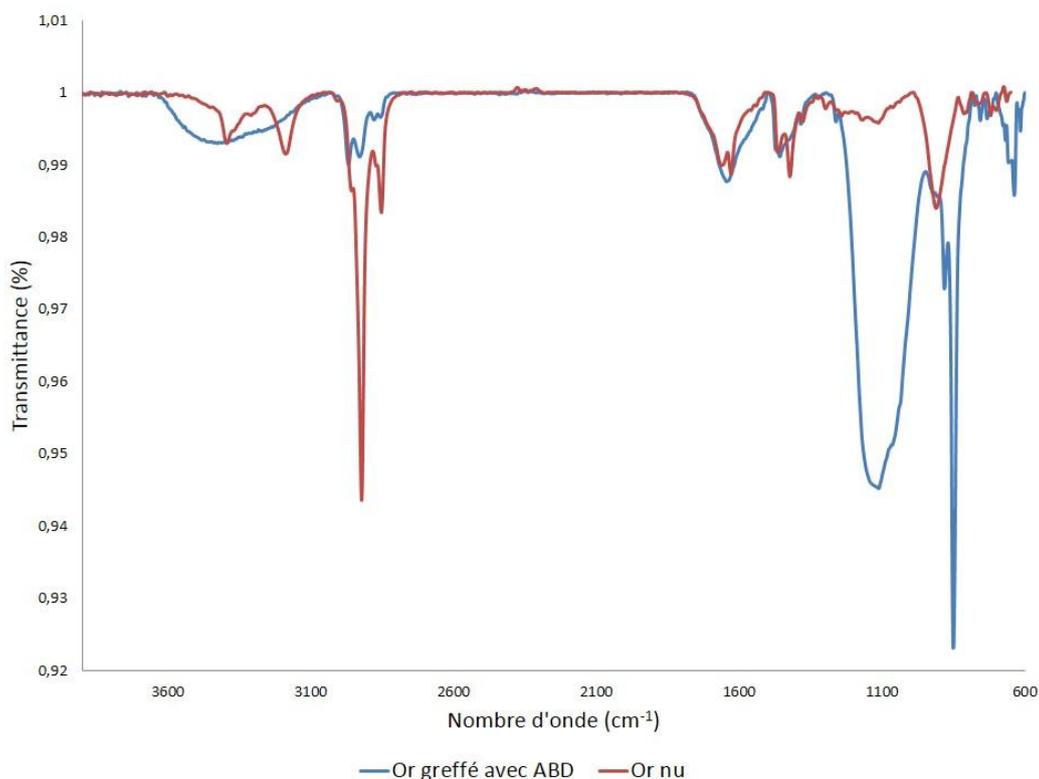


Figure 51 Spectre IR de la lame d'or fonctionnalisée avec ABD (bleu) et d'une lame d'or nu (rouge)

Nous avons démontré que les sels de diazonium synthétisés peuvent être greffés électrochimiquement sur les lames d'or. Mais l'objectif principal de ma thèse étant la fonctionnalisation des lames de COC, l'étude précédente permet de démontrer la preuve du concept sur lequel nous basons les expériences de greffage sur polymère qui vont vous être présentées maintenant.

5.5.2 Greffages chimiques sur le COC par activation

UV de la surface

Nous avons suivi les conditions établies par Florian Brisset pour fonctionnaliser les lames de COC via activation sous UV de la surface et en présence d'un réducteur chimique pour la dédiazotation du sel de diazonium.

Dans un pilulier, une solution de 9 mL d'HCl à 0,5 M et d'1 mL d'acide hypophosphoreux (H_3PO_2 à 50% p/v) est dégazée pendant 10 minutes. Les sels de diazoniums sont ajoutés pour

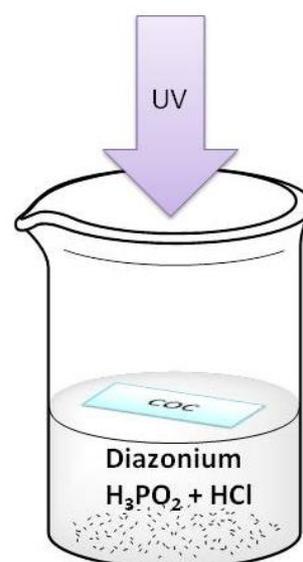


Figure 52 Montage réactionnel pour le greffage sur COC sous activation UV

ajuster la concentration à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ puis la lame de COC est plongée dans la solution (Figure 52). Le pilulier est mis dans un bain-marie qui est ensuite placé dans l'enceinte du four UV ayant préchauffée 20 minutes pour irradier pendant 1 heure. Le matériau du COC étant transparent, les deux côtés de la lame sont activés par l'irradiation UV, mais la lame flottant à la surface de la solution, les 2 faces ne subissent pas le même greffage. Après irradiation, la lame est rincée d'abord à l'eau puis à l'acétone avec un passage aux ultra-sons pendant 5 minutes.

On peut préciser que compte-tenu de l'instabilité des sels de diazonium, il est préférable que les greffages aient lieu peu de temps après les synthèses.

5.5.2.1 COC greffé avec CBD

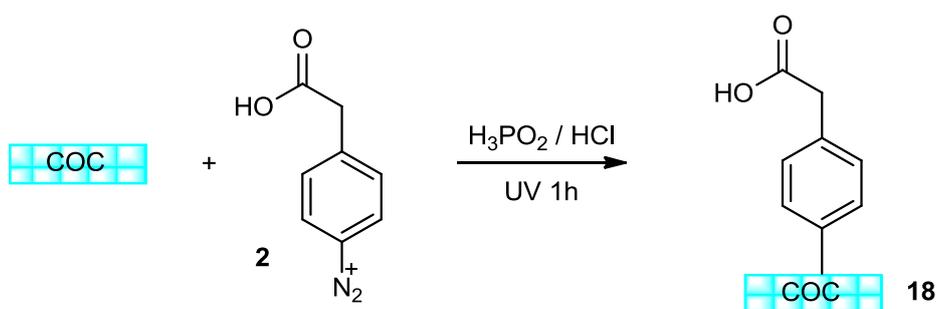


Schéma 36 Schéma réactionnel du greffage du CBD sur COC

La réaction de greffage du CBD sur le COC est représentée en Schéma 36. En analyse de spectroscopie IR (Figure 53) on observe le pic qui apparaît à 1720 cm^{-1} . Il peut être attribué à la vibration d'élongation du groupement C=O de l'acide carboxylique, et celui à 760 cm^{-1} à la vibration des C-H aromatiques. On peut conclure que le CBD est bien greffé sur la surface du COC.

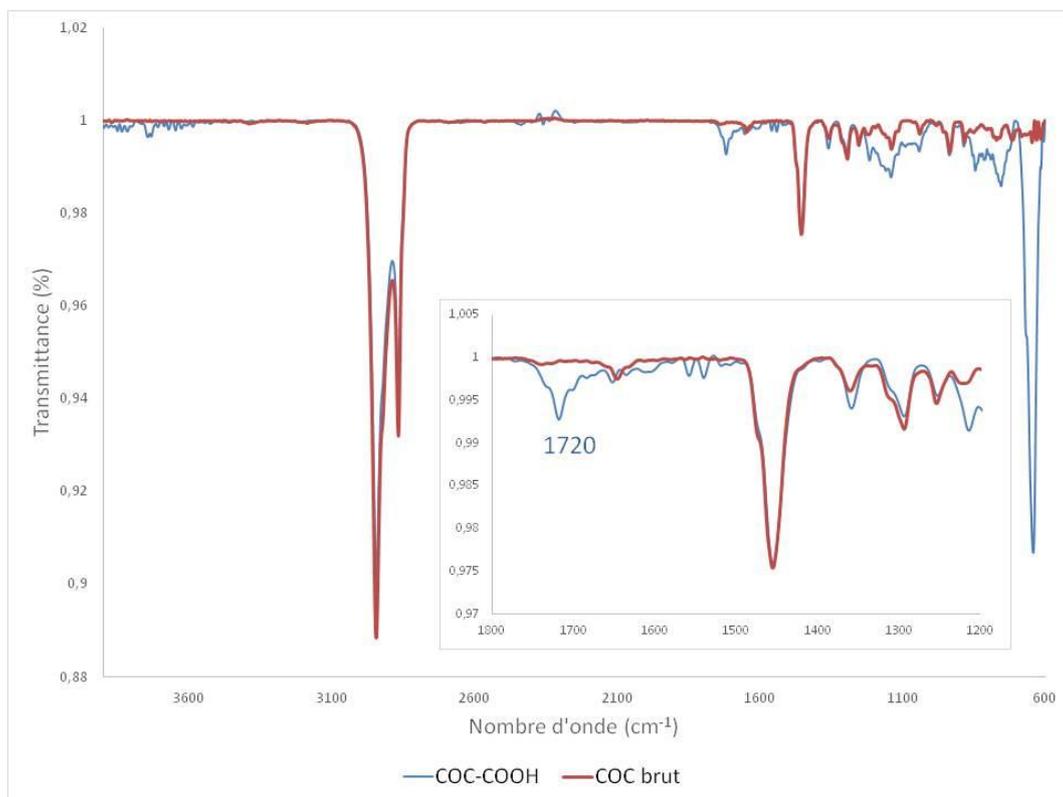


Figure 53 Spectres IR du COC brut (rouge) et du COC greffé avec CBD (bleu)

5.5.2.2 COC greffé avec ABD

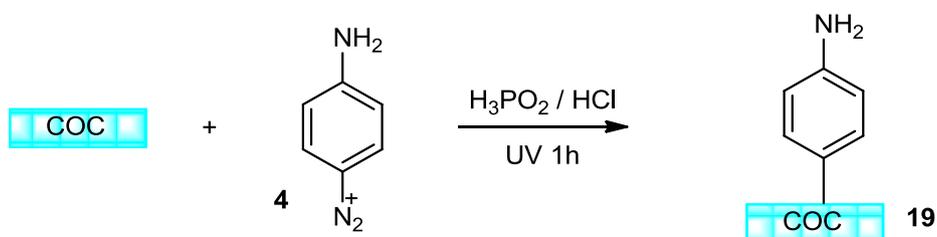


Schéma 37 Schéma réactionnel du greffage du COC avec l'ABD

La caractérisation du greffage du 4-aminobenzène diazonium **4** sur le COC (Schéma 37) a présenté de meilleurs résultats que sur l'or comme on peut le constater sur le spectre IR suivant (Figure 54) :

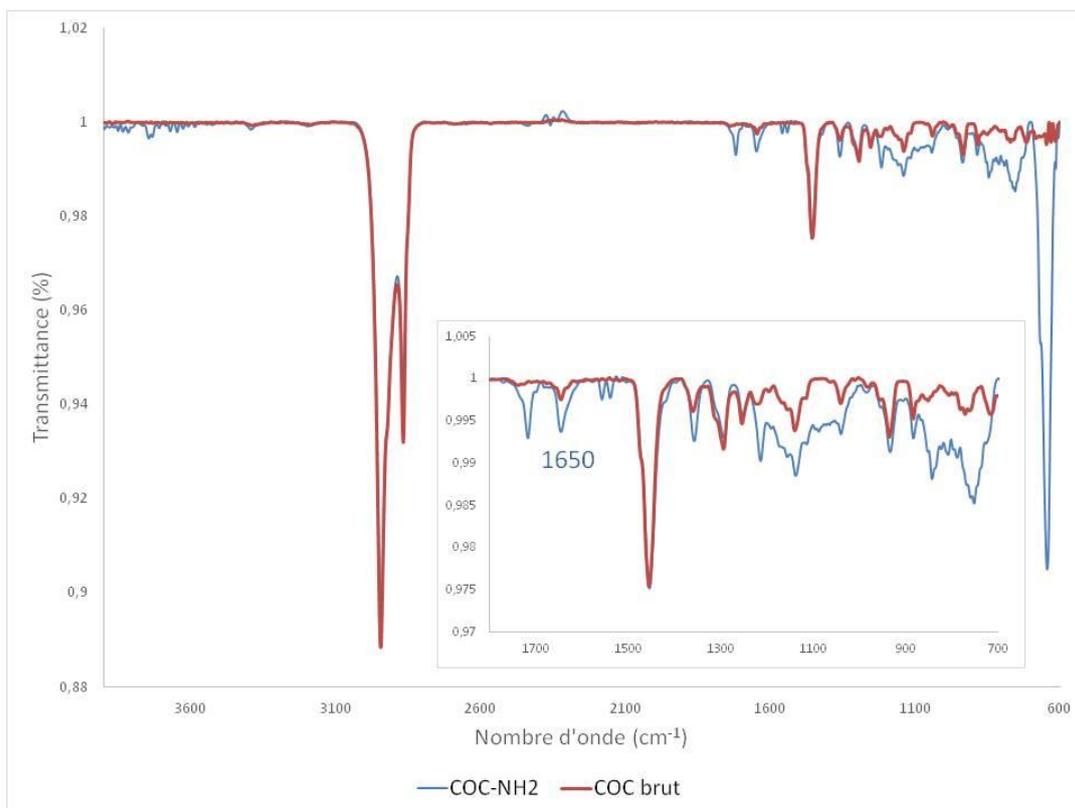


Figure 54 Spectres IR du COC brut (rouge) et du COC greffé avec l'ABD (bleu)

La bande à 1650 cm^{-1} correspond à la vibration de la liaison N-H tandis que la bande vers 1215 cm^{-1} pourrait être attribuée à l'élongation d'une liaison C-N aromatique. Nous retrouvons également le pic à 760 cm^{-1} pour les C-H aromatiques.

5.5.2.3 COC greffé avec EBD

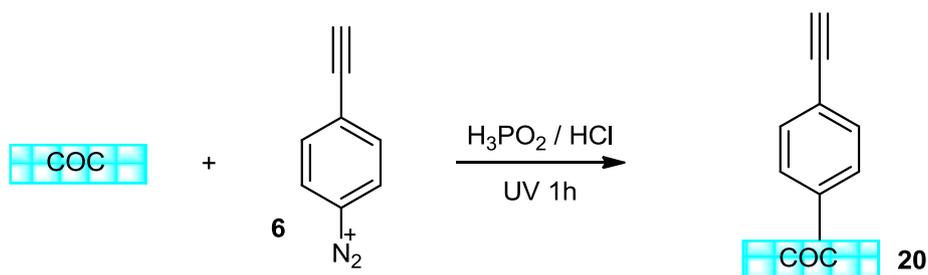


Schéma 38 Schéma réactionnel du greffage du COC avec l'EBD

Nous avons greffé le COC avec l'éthynylbenzène diazonium **6** tel que montré par le Schéma 38. Nous avons analysé la lame fonctionnalisée par spectroscopie IR sur les deux faces pour montrer que la fonctionnalisation a bien lieu recto-verso mais dans des proportions différentes (Figure 55). Le recto et le verso sont par rapport à la solution, car la lame de COC étant

transparente, les rayons UV la traversent. La différence vient du fait qu'étant hydrophobe le COC flotte en surface de la solution, donc une des deux faces est moins en contact avec la solution ce qui explique la différence d'intensité dans le greffage.

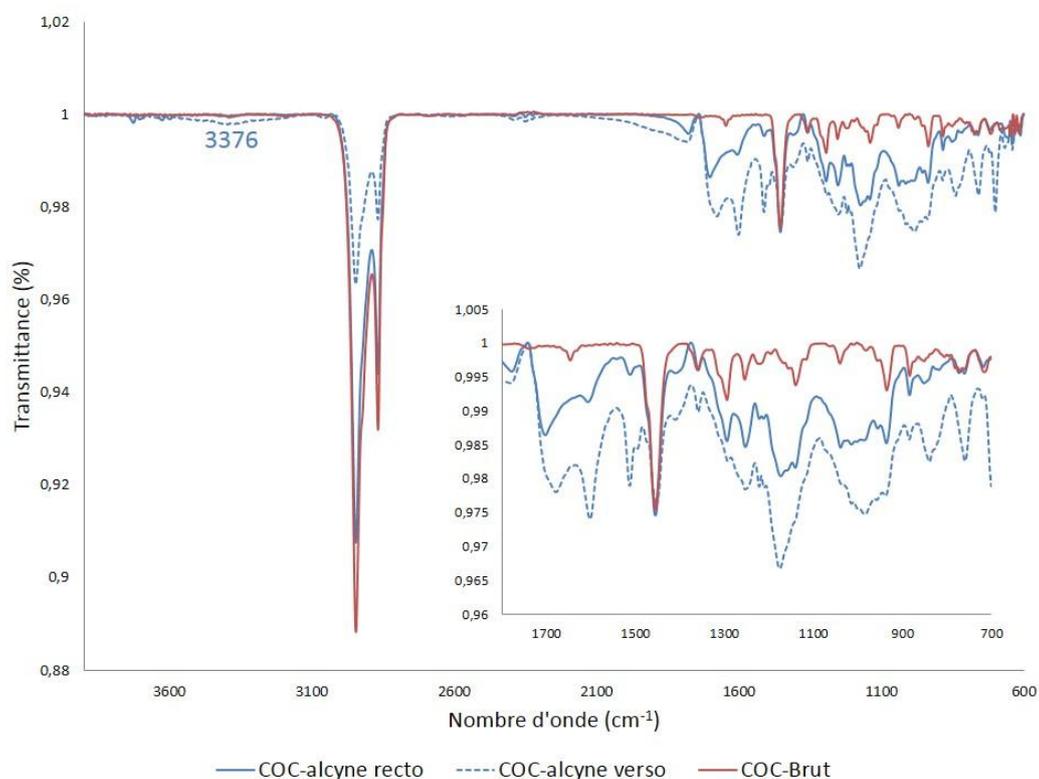


Figure 55 Spectre IR d'une lame de COC fonctionnalisée avec EBD recto (bleu) et verso (rouge) par rapport à une lame de COC brut (vert)

La bande à 3376 cm^{-1} vient de l'élongation de la liaison $\equiv\text{C-H}$ de l'alcyne. On peut aussi noter les bandes à 1600 cm^{-1} et 1510 cm^{-1} des $\text{C}=\text{C}$ aromatiques.

Ces résultats montrent que la stratégie utilisée est bien applicable pour modifier des surfaces de COC par différents sels de diazoniums. Le but de ma thèse étant d'aller jusqu'à l'accroche d'un bioélément sur cette surface fonctionnalisée, j'ai donc testé différentes techniques de couplage peptidique sur les surfaces possédant soit le groupement acide carboxylique, soit le groupement amine. Pour la surface possédant l'alcyne en surface, je présenterai son utilisation dans le chapitre suivant.

5.6 Mise au point de techniques de couplage en surface

Dans leur revue de la littérature, Goddard et Hotchkiss précisent bien que les fonctionnalités présentes en surface doivent être compatibles avec les sites réactifs du composé devant être

lié.²⁶⁶ Nous disposons donc de fonctions amine et acide, ce qui fait penser aux acides aminés. Une technique pour relier ces deux fonctions s'appelle le couplage peptidique (Figure 56). L'utilisation d'agent de couplage (ou cross-linker) est nécessaire pour faire ces réactions de couplage. Hermanson dans son livre « Bioconjugate Techniques »²⁶⁷ fait une liste exhaustive des agents de couplages pouvant être utilisés, et la recherche de nouveaux agents plus efficaces est un domaine toujours d'actualité.²⁶⁸⁻²⁷⁰

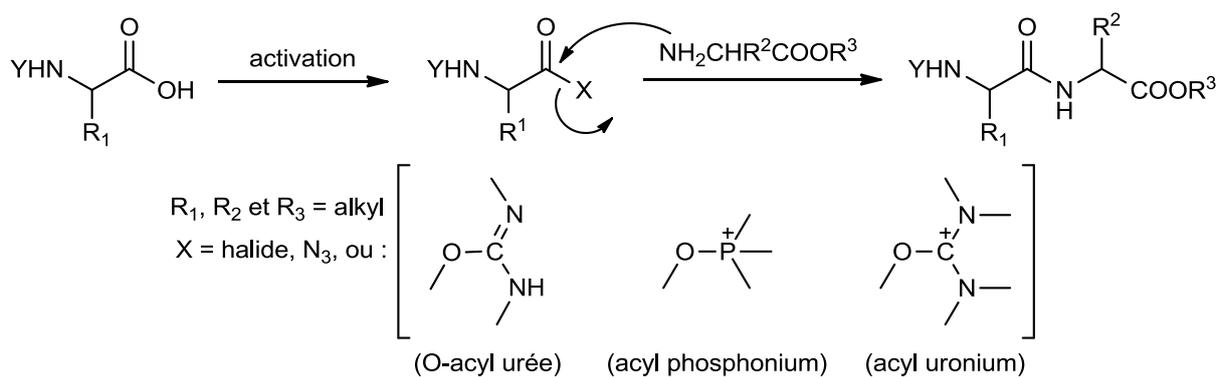


Figure 56 Formation d'une liaison peptidique (R groupement alkyl)²⁷¹

Nous avons développé des couplages en surface du COC modifié soit par le CBD soit par l'ABD avec des molécules tests présentant des fonctions compatibles avec les couplages peptidiques ou bien avec l'estérification. Ces molécules ont été choisies dans le stock de produits chimiques disponibles en sélectionnant des groupements fonctionnels permettant d'avoir des signaux reconnaissables en spectroscopie IR.

Pour chaque test de couplage, nous avons préparé deux témoins négatifs :

- Une lame fonctionnalisée avec le diazonium qui sera mise en présence de la molécule test dans le solvant mais sans agent de couplage (témoin 1).
- Une lame nue qui sera mise dans les conditions de couplage (témoin 2).

5.6.1 Couplages sur des surfaces COC-COOH

5.6.1.1 Test des conditions de couplage entre COC-COOH et une amine

Pour cette expérience nous avons adapté les conditions utilisés par Kelestemur *et coll.*²⁷² pour modifier la surface de nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO) comme montré en Schéma 39. Le mécanisme de la réaction de couplage via EDC/NHS sera présenté en annexe (Figure 103).

Une solution d'1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) à 0,4 M est préparée dans 5 mL d'eau distillée. Une solution de *N*-Hydroxysuccinimide (NHS) à 0,4 M est préparée dans 10 mL d'eau distillée. Et pour finir une solution à 0,2 M d'amine choisie pour tester les conditions, la 3-aminopropyltriméthoxysilane **21**, est préparée dans 20 mL d'eau distillée. Les trois réacteurs seront composés comme suit :

- Pour le couplage : lame fonctionnalisée + 2,5 mL d'EDC + 5 mL NHS + 5 mL amine **21**
- 1^{er} témoin : lame fonctionnalisée + 5 mL amine **21**
- 2^{ème} témoin : lame nue + 2,5 mL EDC + 5 mL NHS + 5 mL amine **21**

Les flacons sont fermés et mis sous agitation grâce à un petit barreau aimanté. On laisse réagir pendant 48 heures à température ambiante puis les lames sont rincées à l'acétone, passées aux ultrasons et séchées à l'air libre.

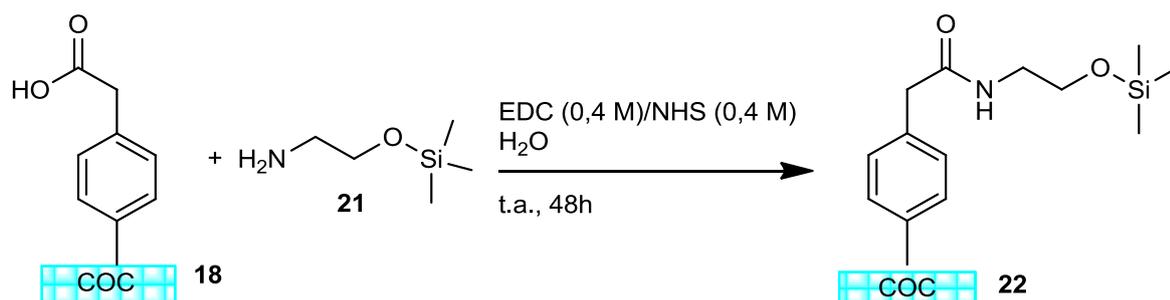


Schéma 39 Schéma réactionnel du couplage en surface COC-COOH avec 3-aminopropyltriméthoxysilane

Les lames furent analysées par spectroscopie IR (Figure 57 et Figure 58). Sur le spectre de la surface de COC après couplage, nous pouvons identifier plusieurs pics :

- à 3350 cm⁻¹, une bande correspondant à l'élongation de la liaison N-H,
- à 1650 cm⁻¹, une bande correspondant à l'élongation de la liaison C=O,
- à 1560 cm⁻¹, une bande provenant de l'élongation des liaisons C=C aromatiques,
- à 1240 cm⁻¹, une bande pour l'élongation de la liaison C-N,
- à 1080 cm⁻¹, une bande pour l'élongation de la liaison Si-O-C de l'éther.

Ces signaux caractéristiques confirment la réussite du couplage à la surface du COC. On remarque sur les spectres IR des témoins négatifs (Figure 58) la présence d'adsorption principalement sur la lame de COC nue, car les pics visibles sur le témoin 1 peuvent être

attribués à la fonctionnalisation acide de la surface de la lame avant traitement. L'intensité des pics d'intérêt est également plus forte sur notre lame couplée que sur les témoins (0,97 % pour la bande à 3350 cm^{-1} par exemple contre 0,99 %), ce qui prouve qu'ils viennent bien d'une réaction avec les acides de surfaces dont ils ont remplacé les signaux

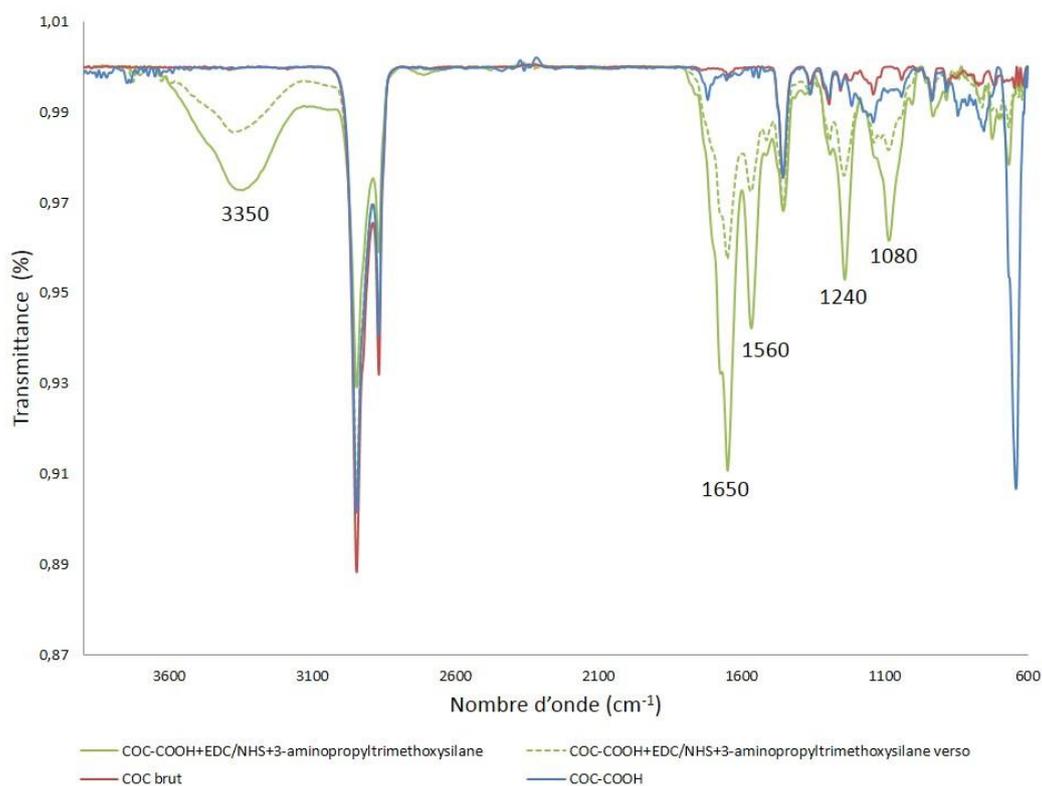


Figure 57 Comparaison des spectres IR du COC brut (vert), du COC-COOH (violet) et des recto (bleu) et verso (rouge) de la lame après couplage

L'utilisation d'EDC/NHS comme agent de couplage pour installer une molécule aminée sur une surface acide est donc efficace. Nous avons ensuite testé des conditions d'estérification.

5.6.1.2 Test des conditions de couplage entre COC-COOH et un alcool

Dans le cas d'une estérification, c'est-à-dire du couplage entre un acide carboxylique et un alcool, nous avons utilisé l'agent de couplage TBTU (Tétrafluoroborate de (1H-benzotriazol-1-yloxy)(diméthylamino)-N,N-diméthylméthaniminium) et suivi le protocole de Twibanire et Grindley²⁷³ (Schéma 40).

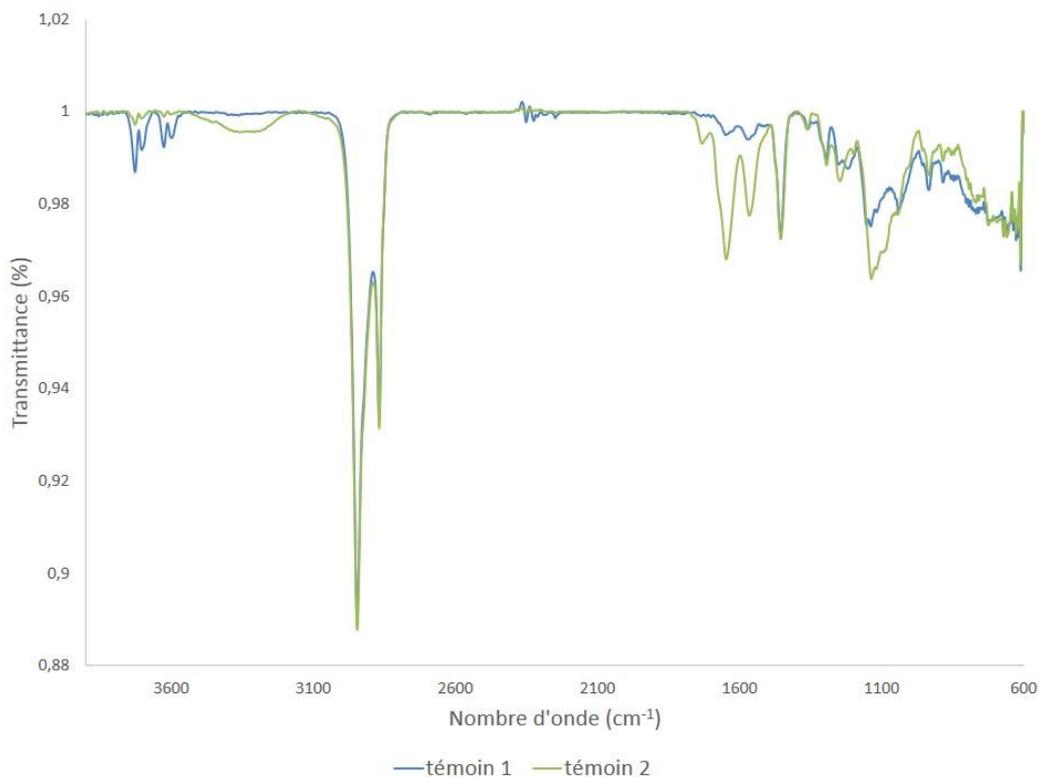


Figure 58 Spectres IR des témoins négatifs du couplage peptidique avec EDC/NHS

Dans des piluliers contenant des barreaux aimantés nous avons mélangé 1 équivalent de TBTU (1,25 mmol) et 2 équivalents d'une base, la diisopropyléthylamine (DIEA) (2,50 mmol) dans 3 mL de DMF. Une première phase d'activation de la surface se fait pendant 30 minutes sous azote puis selon la lame de COC mise en solution nous avons ajouté :

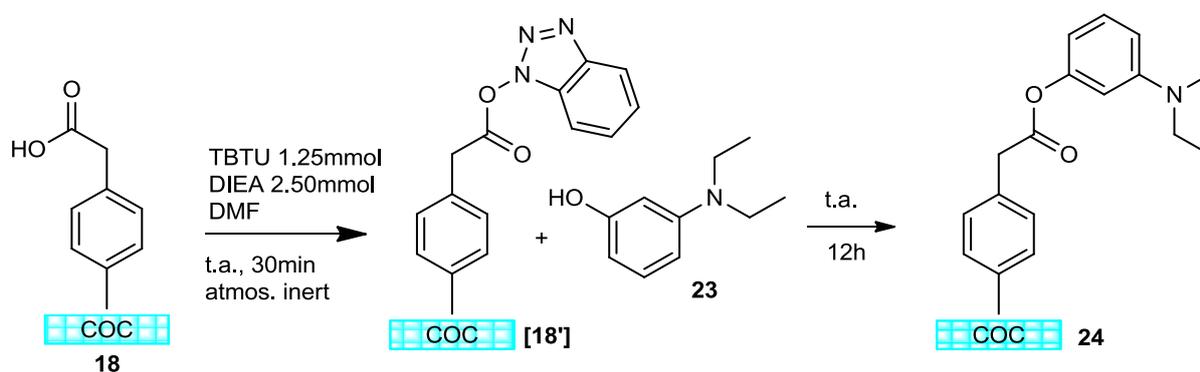


Schéma 40 Schéma réactionnel du couplage entre le COC-COOH et le 3-diéthylaminophénol

- Pour le couplage sur lame fonctionnalisée : 1,25 mmol de 3-diéthylaminophénol (3-DEAP) **23** dans 1 mL de DMF

- Pour le témoin sur lame nue (témoin négatif 2) : 1,25 mmol de 3-DEAP **23** dans 1 mL de DMF
- Pour le témoin sur lame fonctionnalisée (témoin négatif 1) : 4 mL de DMF contenant 1,25 mmol de 3-DEAP **23** seulement

Après une nuit de réaction à température ambiante, les lames sont rincées à l'eau puis à l'acétone. Une première série d'analyse IR est effectuée avant un passage aux ultrasons pendant 5 minutes dans l'acétone puis les lames sont analysées de nouveau (Figure 59, Figure 60). Les bandes caractéristiques de ce couplage sont :

- à 1715 cm^{-1} , l'élongation de la liaison C=O,
- à 1610 cm^{-1} et 1520 cm^{-1} , les déformations des liaisons C=C aromatiques,
- vers 1440 cm^{-1} , la déformation de liaison C-H d'alcane (CH_2 avant le groupement ester),
- idem vers 1340 cm^{-1} , les déformations des liaisons C-H des éthylamines,
- Entre 1340 cm^{-1} et 1260 cm^{-1} se trouve l'élongation de la liaison C-N aromatique,

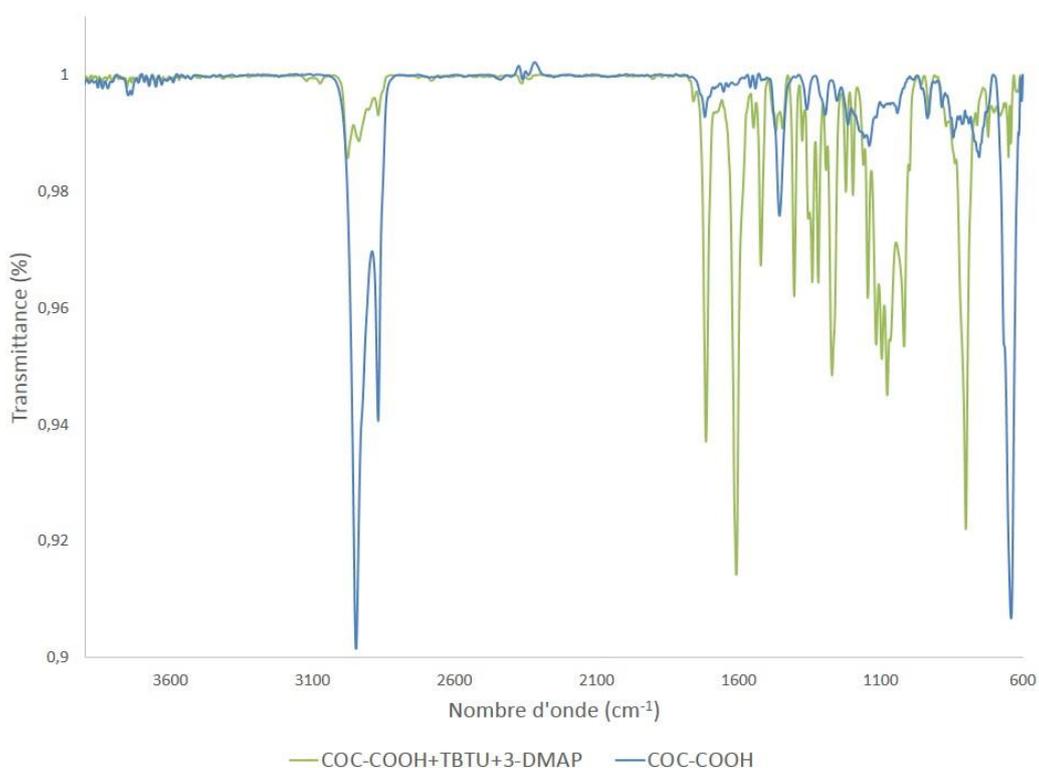


Figure 59 Comparaison des spectres IR du COC-COOH (bleu) et de la lame après couplage (vert)

- Entre 1310 cm^{-1} et 1250 cm^{-1} , l'élongation de la liaison $\text{C}_{\text{ar}}\text{-O}$,
- Entre 1210 cm^{-1} et 1163 cm^{-1} , l'élongation de la liaison C-O de l'ester et
- Entre 1250 cm^{-1} et 1020 cm^{-1} les élongations des liaisons C-N ,

Cette analyse confirme la réussite du couplage avec TBTU.

L'analyse IR des deux lames témoins (Figure 60) illustre bien l'adsorption qui a lieu lors de la réaction de couplage et que le traitement sous ultrasons est nécessaire et suffisant pour évacuer les molécules adsorbées.

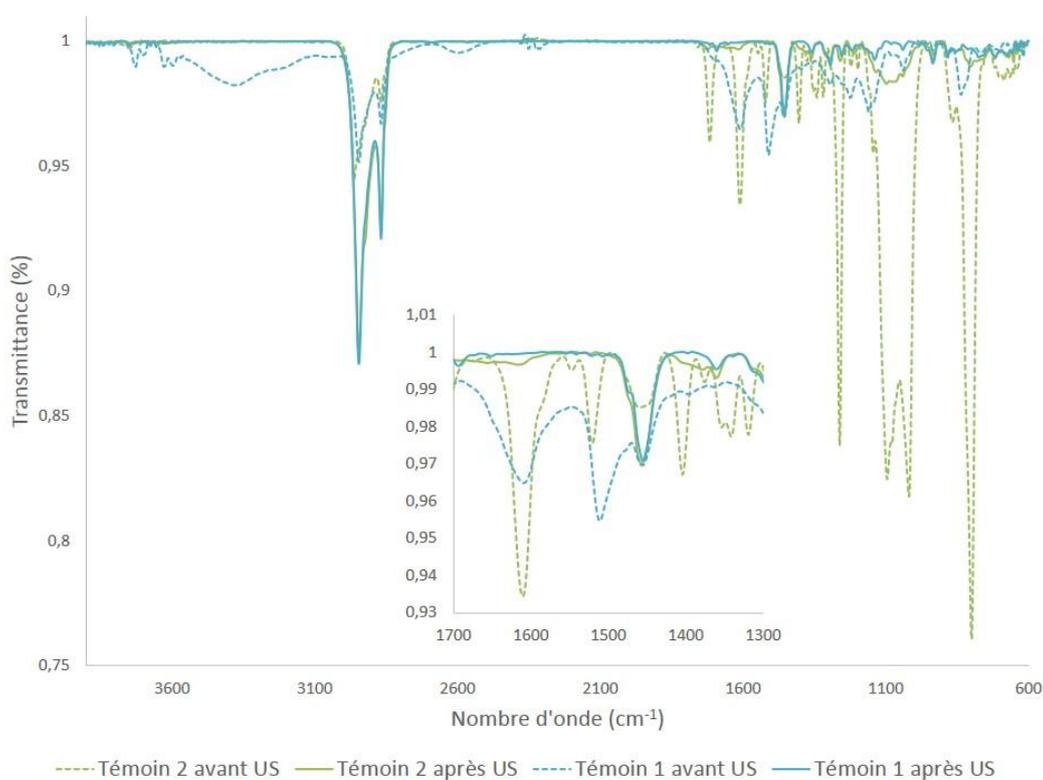


Figure 60 Spectres IR des témoins négatifs 1 et 2 avant (pointillés) et après (trait plein) traitement ultrason

5.6.2 Couplages sur des surfaces COC-NH_2

Le couplage peptidique implique d'abord l'activation de la fonction acide carboxylique puis l'insertion de l'amine. Nous avons établi que l'activation de l'acide en surface est faisable. L'amine en surface pourrait présenter des problèmes de réactivité dus à la gêne stérique c'est pour cela que nous avons également testé les couplages sur nos surfaces de COC modifiées avec l'ABD **19**.

5.6.2.1 Test des conditions de couplage entre COC-NH₂ et un acide

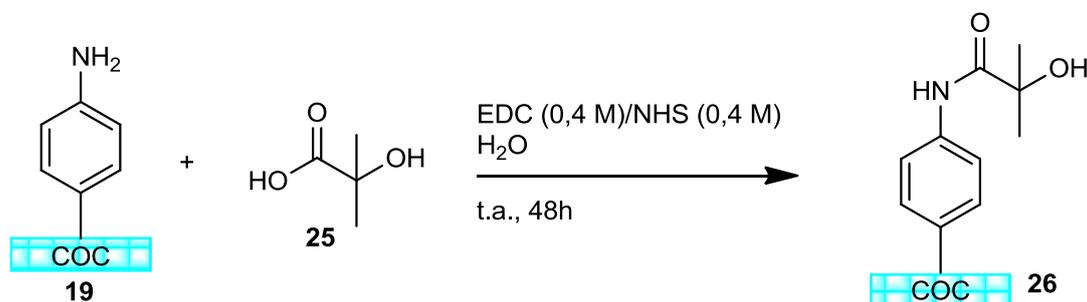


Schéma 41 Schéma réactionnel du couplage sur COC-NH₂ avec l'acide 2-hydroxisobutyrique

Les conditions employées dans ce couplage sont les mêmes que précédemment dans 5.6.1.1, le schéma réactionnel de cette expérience est représenté en Schéma 41. Une solution d'EDC à 0,4 M dans 5 mL d'eau distillée, une solution de NHS à 0,4 M dans 10 mL d'eau distillée et une solution d'acide 2-hydroxisobutyrique **25** à 0,2 M dans 20 mL d'eau distillée sont préparées. Dans des piluliers équipés de petits barreaux aimantés nous plaçons :

- Une lame fonctionnalisée avec 2,5 mL d'EDC, 5 mL de NHS et 5 mL d'acide **25**,
- Une lame fonctionnalisée avec 5 mL d'acide **25**
- Une lame nue avec 2,5 mL d'EDC, 5 mL de NHS et 5 mL d'acide **25**.

Après 48 heures d'agitation dans le pilulier fermé à température ambiante, les lames sont rincées à l'acétone, passées aux ultrasons et séchées à l'air libre avant d'être analysées par spectroscopie IR (Figure 61). Les bandes présentes sur ce spectre peuvent être attribuées comme suit :

- 3480 cm⁻¹, élongation de l'O-H
- 3375 cm⁻¹, élongation du N-H
- 1705 cm⁻¹, élongation du C=O
- 1645 cm⁻¹, déformation du N-H
- 1565 cm⁻¹, élongations de C=C aromatiques
- 1470 cm⁻¹, déformation des liaisons C-H alcane
- 1215 cm⁻¹, élongation de la liaison C-N
- 1080 cm⁻¹, élongation de la liaison C-O
- 975 cm⁻¹, déformation des liaisons C=C

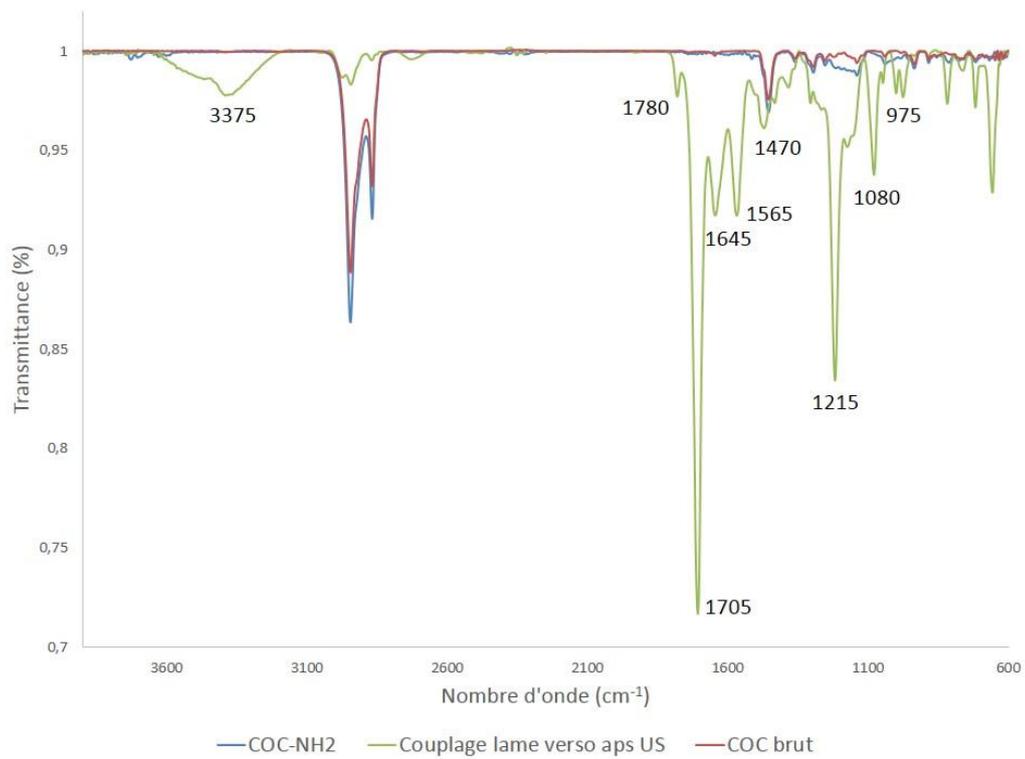


Figure 61 Spectres IR du COC brut (rouge), du COC-NH₂ (bleu) et après le couplage avec l'acide 2-hydroxisobutyrique (vert)

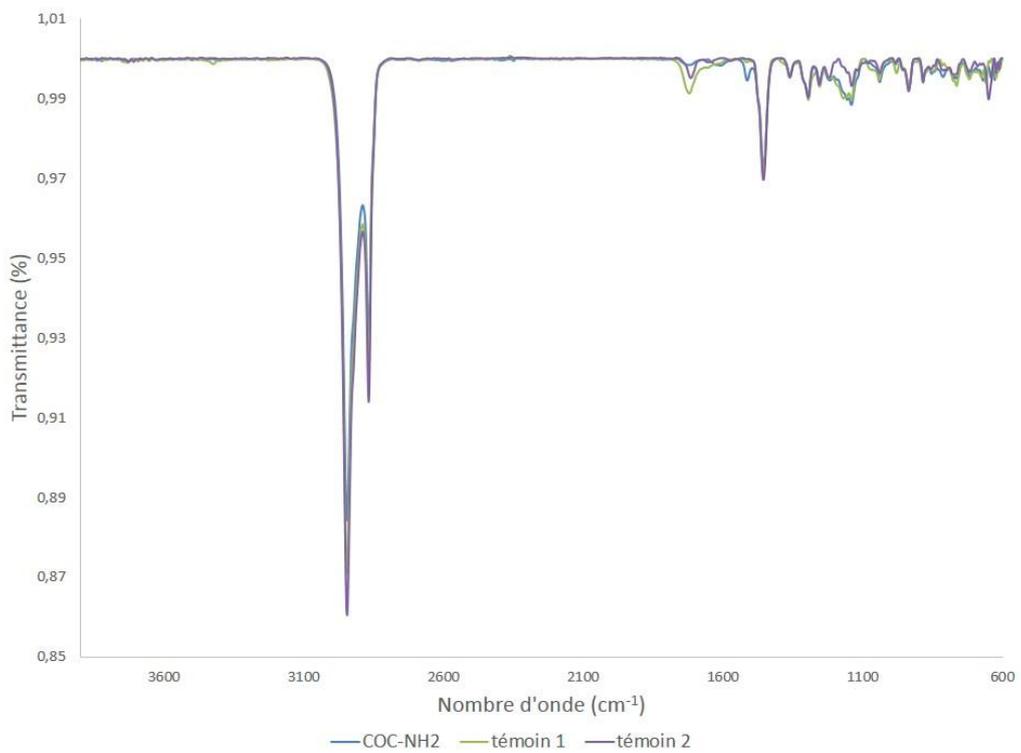


Figure 62 Spectres IR des lames témoins négatif dans le couplage COC-NH₂ + acide

Les analyses IR des lames témoins (Figure 62) nous montrent que dans ce cas nous avons eu peu d'adsorption. On peut noter également que toutes les molécules adsorbées sont bien éliminées aux ultrasons (données non présentées).

5.6.2.2 Test des conditions de couplage entre COC-NH₂ et un alcool

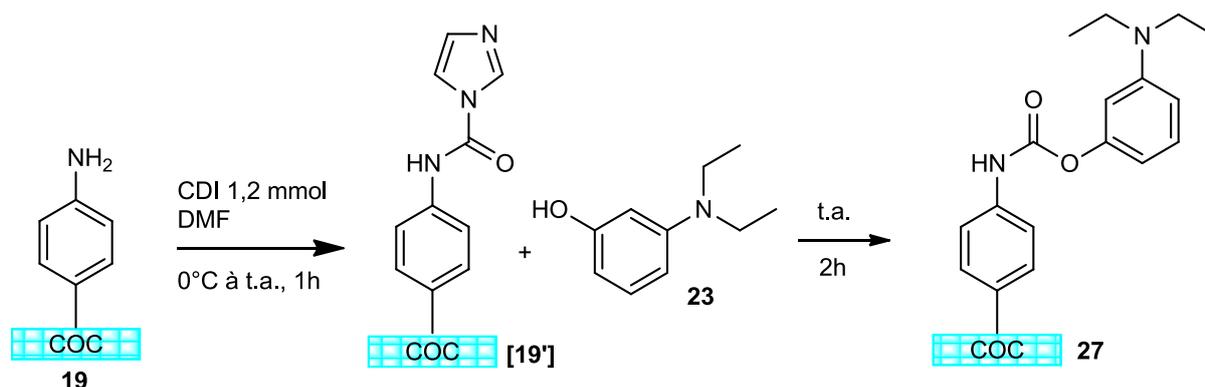


Schéma 42 Schéma réactionnel du couplage test entre COC-NH₂ et 3-DEAP

Pour ce couplage nous souhaitons suivre un protocole vert en effectuant le couplage dans l'eau comme le font Padiya *et coll.*²⁷⁴ mais nos précurseurs ne sont pas solubles dans l'eau. Dans leur article, ils mesurent l'efficacité du couplage dans différents solvants pour pouvoir comparer avec l'eau. Le DMF donnant de bons résultats dans leur étude et étant le solvant usuel dans les synthèses qui seront présentées en chapitre 3, nous avons décidé de l'utiliser pour ce couplage (Schéma 42). Dans des piluliers placés dans un bain de glace, la surface amine de la lame de COC **19** est activée avec 1,2 mmol de carbonyldiimidazole (CDI) sous agitation pendant 1 heure. Au bout de cette heure, 1 équivalent de 3-DEAP **23** est ajouté et la réaction continue pendant 2 heures à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées à l'eau, puis à l'acétone et ultrasons, puis séchées à l'air libre.

L'analyse IR des lames (Figure 63) devrait donner un résultat similaire à ceux de l'estérification avec TBTU car nous avons utilisé la même molécule test, mais ce n'est pas le cas. On s'attend à trouver des bandes pour l'élongation des liaisons C-N vers 1300 cm⁻¹ ou pour la liaison C_{ar}-O vers 1200 cm⁻¹. Par rapport à la lame COC-NH₂ **19**, on observe la disparition du pic à 1650 cm⁻¹ qui correspond à la déformation du N-H. Le pic à 1720 cm⁻¹ pourrait correspondre à l'élongation du C=O et la bande à 1060 cm⁻¹ à l'élongation du C-O,

mais il est difficile de le dire avec certitude. Nous ne pouvons pas conclure à la réussite de ce couplage.

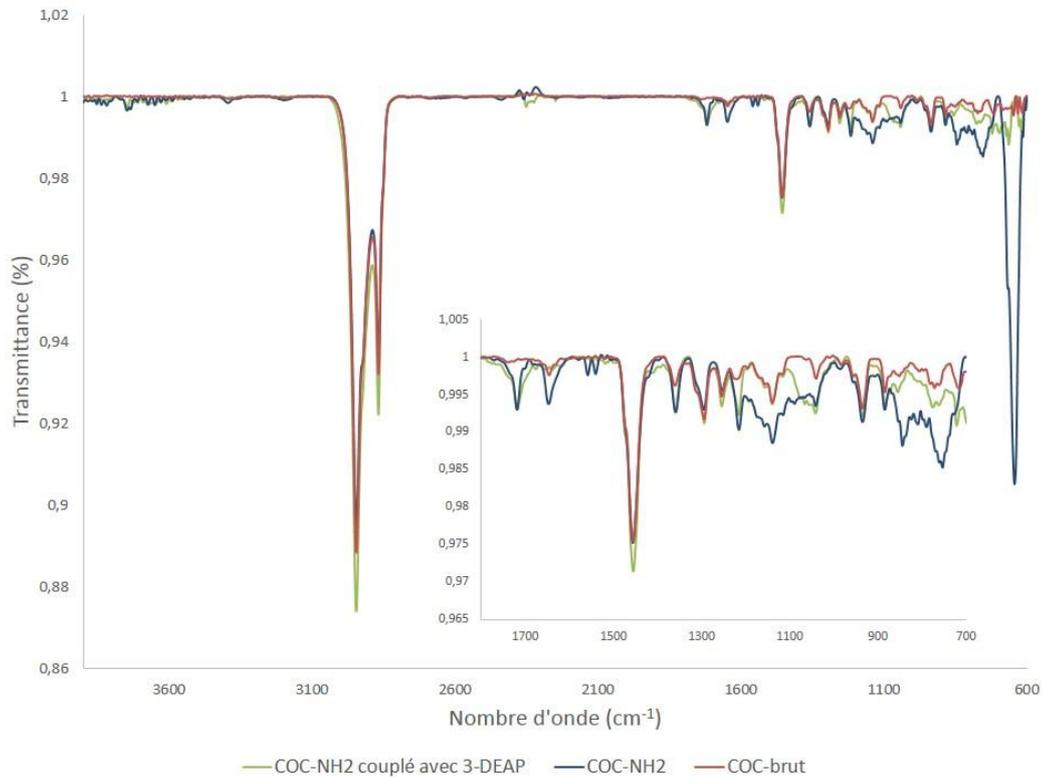


Figure 63 Spectres IR du COC brut (gris), COC-NH₂(vert) et de la lame après couplage (bleu)

6 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons vu que nous pouvions transformer la surface du COC, un matériau intéressant pour une utilisation comme transducteur du fait de sa biocompatibilité et de son faible coût de fabrication. Cette transformation implique l'utilisation de sels d'aryldiazonium, composés chimiques versatiles permettant d'introduire diverses fonctionnalités, telles qu'acide, amine ou alcyne, à la surface de matériaux par différentes voies de fonctionnalisation (électrochimique ou photochimique). Finalement nous avons prouvé que ces fonctionnalités pouvaient être activées pour permettre le couplage de molécules de petite taille à la surface du COC. A chaque étape, nous avons utilisé la spectroscopie infrarouge pour caractériser les différentes modifications intervenues à la surface de nos matériaux.

Dans le chapitre suivant, je présenterai comment notre molécule d'intérêt, l'isatine, a été préparée pour être introduite à la surface du COC. Puis les couplages et autres réactions en surface avec ces isatines modifiées seront décrits.

Chapitre 3 : Modification de l'isatine et couplage en surface

Table des matières

7	Introduction	111
8	Modification de l'isatine par couplages pallado-catalysés	112
8.1	Introduction d'une fonction alcool.....	114
8.1.1	Utilisation du couplage de Sonogashira	114
8.1.1.1	Couplage avec l'alcool propargylique.....	116
8.1.1.2	Couplage avec le propargyloxytriméthylsilane	117
8.1.1.3	Couplage avec le (3-butyn-1-yloxy)(triméthyl)silane.....	117
8.2	Introduction d'une fonction amine.....	118
8.2.1	Utilisation du couplage de Sonogashira	118
8.2.1.1	Couplage avec le 2-propyn-1-ylcarbamate de 2-méthyl-2-propanyle.....	119
8.2.1.2	Couplage avec le 3-butyn-1-ylcarbamate de 2-méthyl-2-propanyle.....	121
8.2.1.3	Préparation du 2-Propyn-1-ylcarbamate de 9H-fluorén-9-ylméthyle	122
8.2.1.4	Couplage avec la 4-éthynylaniline	122
8.2.2	Utilisation du couplage de Suzuki.....	123
8.2.2.1	Avec l'acide phénylboronique	125
8.2.2.2	Application avec l'ester pinacolique de l'acide-aminophénylboronique ..	126
8.2.2.3	Test de couplage de Sonogashira sur iodoisatine protégée	127
8.3	Tentatives d'introduction de la fonction acide	127
8.3.1	Par couplage de Sonogashira	127

8.3.2	Par couplage de Suzuki	128
9	Effets biologiques des isatines modifiées	129
9.1	Mesure de la concentration minimale d'inhibition de croissance bactérienne	130
9.1.1	Étendue des molécules étudiées	130
9.1.2	Technique de mesure et résultats comparés à l'isatine native	131
9.2	Simulation informatique du <i>docking</i> des molécules dérivées de l'isatine sur la protéine Ami-C	133
9.2.1	Étude du <i>Docking</i> étape par étape	134
9.2.1.1	Construction du récepteur	134
9.2.1.2	Préparation des ligands et de la macromolécule	135
9.2.1.3	Calcul des grilles de potentiels	135
9.2.1.4	Simulation de l'amarrage de l'isatine sur AmiC	136
9.2.2	Résultats obtenus pour le <i>Docking</i> sur AmiC	137
10	Installation des dérivés d'isatines en surface	142
10.1	Par transformation d'une fonction amine en diazonium	142
10.1.1	Greffage électrochimique sur lame d'or	142
10.1.2	Formation de la fonction diazonium et greffage chimique <i>in-situ</i> sur lame de COC	144
10.2	Par couplage avec des surfaces fonctionnalisées	146
10.2.1	Estérfication avec TBTU	146
10.2.1.1	Analyses IR	147
10.2.1.2	Analyses XPS	148
10.2.2	Couplage peptidique avec EDC/NHS	151
10.2.2.1	Analyses IR	152
10.2.3	Couplage peptidique avec CDI	154
10.2.3.1	Analyses IR	155

10.2.3.2	Analyses XPS.....	155
10.2.4	Couplage de Sonogashira en surface.....	156
10.2.4.1	Sur Or.....	156
10.2.4.1.1	Analyses IR.....	157
10.2.4.1.2	Analyse SPR.....	159
10.2.4.2	Sur COC.....	161
10.2.4.2.1	Analyses IR.....	162
10.2.4.2.2	Analyses XPS.....	163
10.2.4.2.3	Effet du COC fonctionnalisé sur l'adhérence bactérienne.....	164
11	Conclusion.....	167

7 Introduction

Dans le chapitre 2 nous avons développé des méthodes de couplage en surface d'un COC modifié. Nous avons déterminé des conditions adéquates pour coupler des molécules possédant des fonctions alcool, acide et amine (représenté par la lettre B dans la Figure 64).

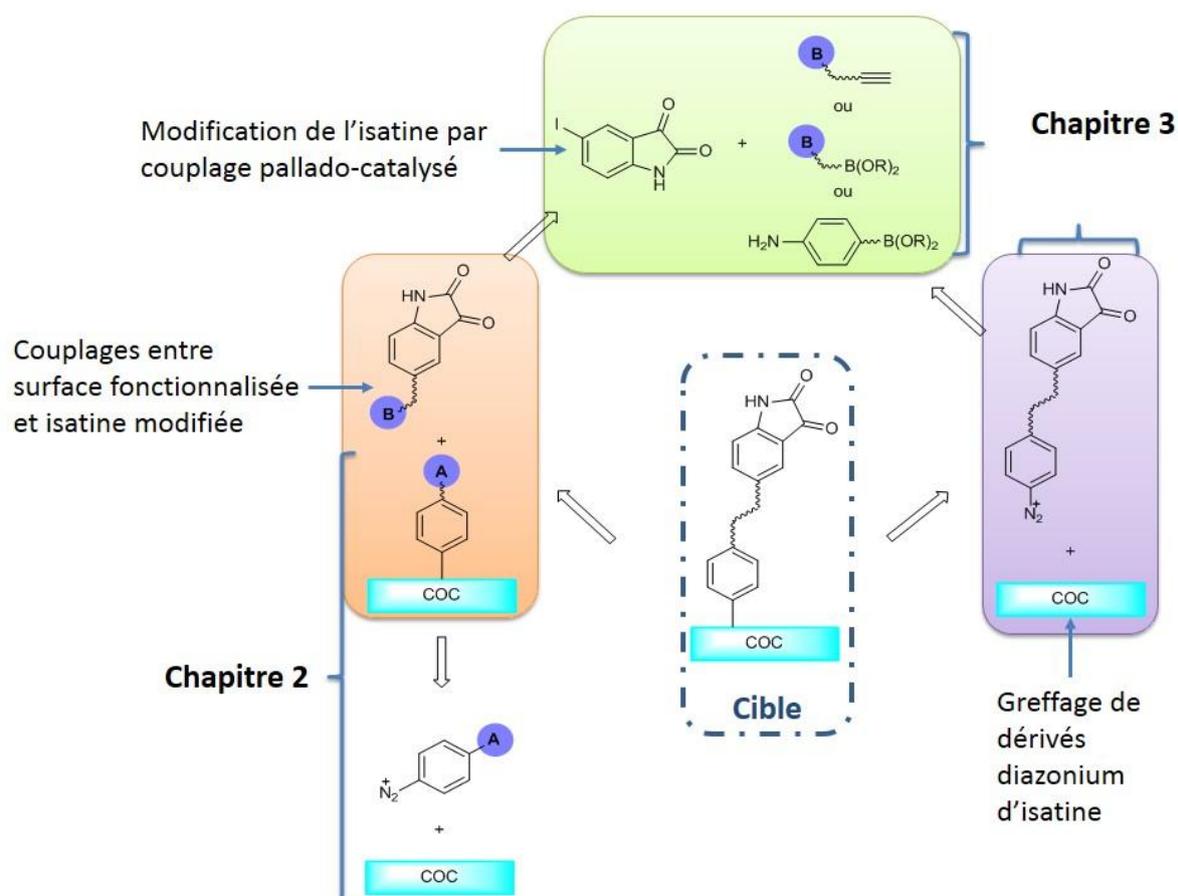


Figure 64 Schéma rétrosynthétique résumé de la thèse et détail sur le chapitre 3

Le but du chapitre 3 est de présenter les protocoles mis en place pour introduire ces fonctions sur le motif isatine en évitant toute modification significative de ses propriétés antibactériennes. Le groupement pharmacophore de l'isatine implique très probablement le motif pyrrolidinedione dont les cétones et l'amine peuvent interagir par liaisons hydrogènes et le cycle aromatique qui lui peut se lier par interaction π - π avec un récepteur. Par exemple, Binda *et coll.* ont étudié la liaison réversible de l'isatine à la MAO-B²⁷⁵ par cristallographie et ont déterminé que l'isatine formait des liaisons hydrogènes avec le groupement oxo en C2 et le NH du pyrrole avec des molécules d'eau présentes dans la cavité pour substrat de l'enzyme. Pour préserver ces groupements fonctionnels, les modifications de l'isatine doivent

donc être préférentiellement effectuées sur le cycle aromatique comme Tavari *et coll.* l'avaient proposé dans une étude antérieure²⁷⁶ (Figure 65).

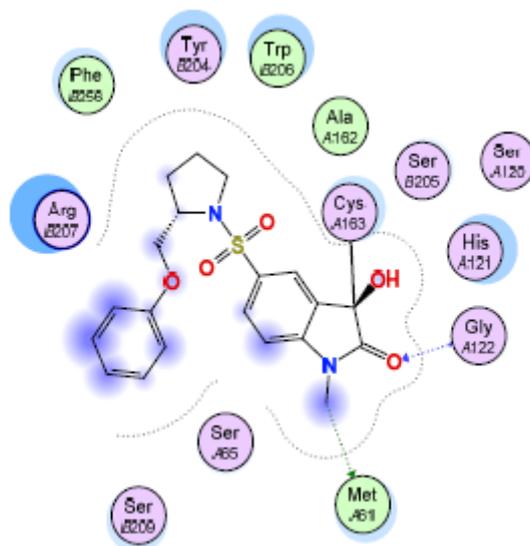


Figure 65 Exemple d'interaction entre un dérivé d'isatine et une enzyme : les flèches pointillées correspondent à des liaisons hydrogènes, les zones bleutées à des interactions hydrophobes²⁷⁶

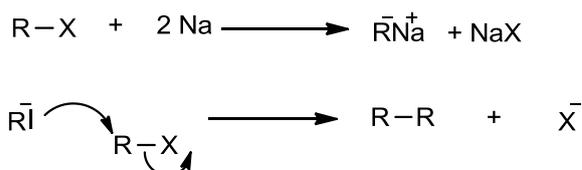
Une technique classique est la substitution électrophile aromatique (1.1.2.2) mais elle nécessite l'utilisation de groupements électrophiles, et de travailler parfois dans des conditions acides fortes. Nous avons donc décidé d'investiguer des réactions de couplage pallado-catalysées de type Sonogashira et Suzuki. Nous présenterons successivement l'introduction d'un substituant portant une fonction alcool, puis une amine et enfin les essais effectués pour introduire une fonction acide sur le motif isatine. Dans chaque paragraphe, nous développerons les synthèses mises au point et les couplages effectués avec les surfaces de COC fonctionnalisées. Seront également abordées dans un paragraphe des techniques n'ayant pas été présentées en chapitre 2 de greffage *in-situ* et de couplage de Sonogashira en surface qui nous ont permis d'introduire directement le motif isatine sur la surface du COC.

8 Modification de l'isatine par couplages pallado-catalysés

On appelle réaction de couplage l'association de deux fragments d'hydrocarbures à l'aide d'un catalyseur métallique. Jusque dans les années 60 on ne pouvait observer ce genre de couplage qu'avec des composés organométalliques (organomagnésiens ou organolithiens) qui sont des entités très réactives. À titre d'exemple, nous pouvons citer le couplage de Würtz,²⁷⁷

basé sur la formation d'un composé organosodique.²⁷⁸ Ce type de couplage est également observé en tant que réaction secondaire d'un organomagnésien avec un halogénoalcane (Figure 66). On catégorise ces deux réactions dans les homocouplages, car les deux fragments d'hydrocarbure couplés sont identiques.

Réaction de Wurtz par formation d'un organosodique :



Réaction secondaire dit de Wurtz lors de la formation d'un organomagnésien :



Figure 66 Couplages de Würtz

En 1972, Kumada en introduisant le nickel comme catalyseur dans cette réaction, permet de faire un couplage croisé entre un organomagnésien et un halogénoalcane²⁷⁹ (Figure 67). Le couplage de Kumada peut être considéré comme le précurseur des couplages croisés modernes métallo-catalysés. Il a ainsi introduit un mécanisme en trois étapes (addition oxydante, transmétallation et élimination réductrice), et le recours à des ligands phosphorés.

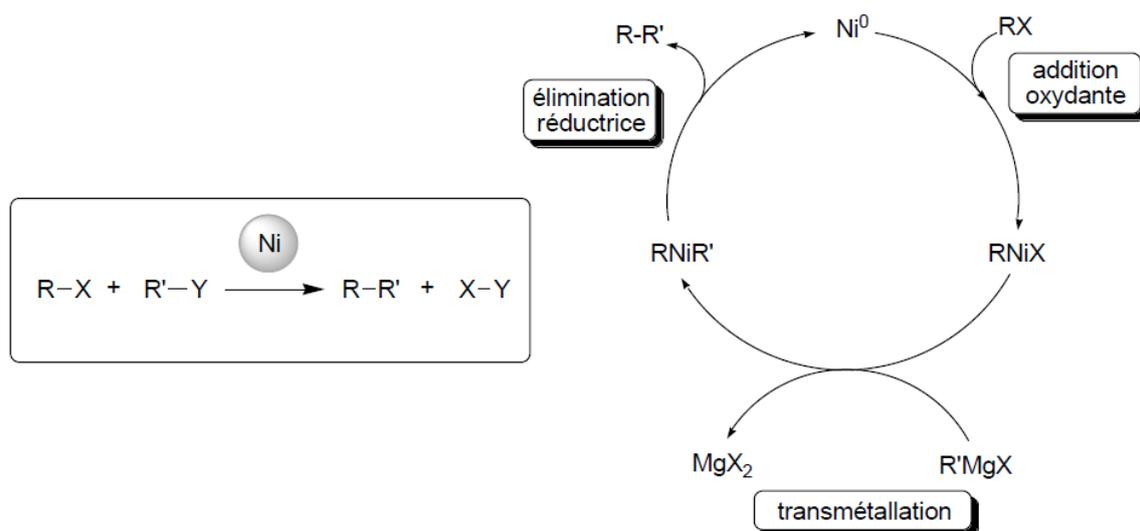


Figure 67 Couplage de Kumada : mécanisme catalytique en trois étapes²⁸⁰

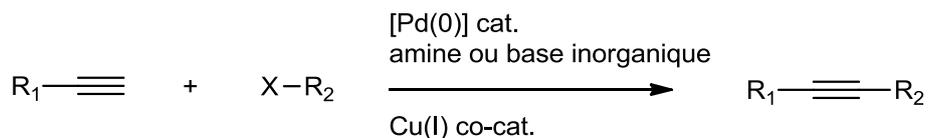
Les couplages croisés couplent un composé organométallique de type R-M, R étant le fragment organique et M le cœur métallique, avec un halogénure de type R'-X pour créer le produit R-R' issu d'une nouvelle liaison carbone-carbone, R et R' étant de nature différente. Divers métaux de transition ont été étudiés, le nom de la réaction variant selon le métal choisi (zinc pour Negishi, bore pour Suzuki, étain pour Stille, cuivre pour Sonogashira et magnésium pour Corriu-Kumada-Tamao). Les couplages ont lieu grâce au palladium qui est utilisé comme catalyseur. Comme le Pd(0) possède 10 électrons libres, il permet l'addition oxydante de composés halogénés. Les catalyseurs commerciaux à base de Pd(II) sont plus stables que ceux à base de Pd(0). Ils ont également comme avantage d'être peu toxiques, d'être compatibles avec une large gamme de fonctionnalités et d'être éliminés sans grande difficulté après réaction. En 2010 les chercheurs Richard Heck, Ei-ichi Negishi et Akira Suzuki, dont chacun a donné son nom à une réaction permettant de former une liaison carbone-carbone, ont été récompensés par un prix Nobel pour leurs travaux sur « les couplages croisés catalysés au palladium en synthèse organique » marquant ainsi l'histoire.^{281, 282}

Dans le cadre de ma thèse, nous avons exploré deux types de couplages pallado-catalysés : d'abord les couplages de Sonogashira, puis ceux de Suzuki. Dans toutes les manipulations expérimentées, nous avons utilisé la 5-iodoisatine **28** comme halogénoalcane de départ pour introduire le motif isatine. Les avantages de ce composé sont qu'il est commercialement accessible et que le groupement iodé est connu pour être plus réactif que les autres halogènes car il induit une plus grande polarisabilité et fragilité de la liaison C-X.

8.1 Introduction d'une fonction alcool

8.1.1 Utilisation du couplage de Sonogashira

Le couplage de Sonogashira est le nom donné à la réaction permettant de créer une liaison entre un carbone terminal hybridé sp d'un alcyne avec un carbone hybridé sp² d'un halogéno-aryle ou vinyle. La réaction à température ambiante, utilisant un catalyseur contenant du palladium et de l'iodure de cuivre comme co-catalyseur dans un solvant aminé a été découverte par Sonogashira en 1975 (Figure 68).²⁸³ Peu de temps après, Heck *et coll.* ont développé une méthode différente à haute température et utilisant le palladium seul.²⁸⁴



R₁ = aryle, hétéryle, alkyle, SiR

R₂ = aryle, hétéryle, vinyle

X = I, Br, Cl, OTf

Figure 68 Protocole de synthèse typique d'une Sonogashira co-catalysée

L'addition de cuivre au système accroît la réactivité mais implique la nécessité d'être en atmosphère inerte car la présence d'oxygène pourrait engendrer une réaction d'homocouplage de Hay ou Glaser (Figure 69).

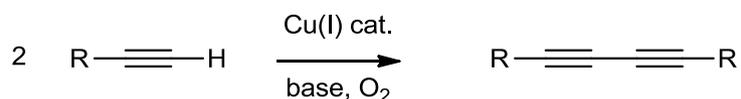


Figure 69 Couplage de Glaser

Le mécanisme de ce type de couplage est encore aujourd'hui incertain car il est difficile d'isoler des intermédiaires de réaction pour pouvoir les caractériser.²⁸⁵

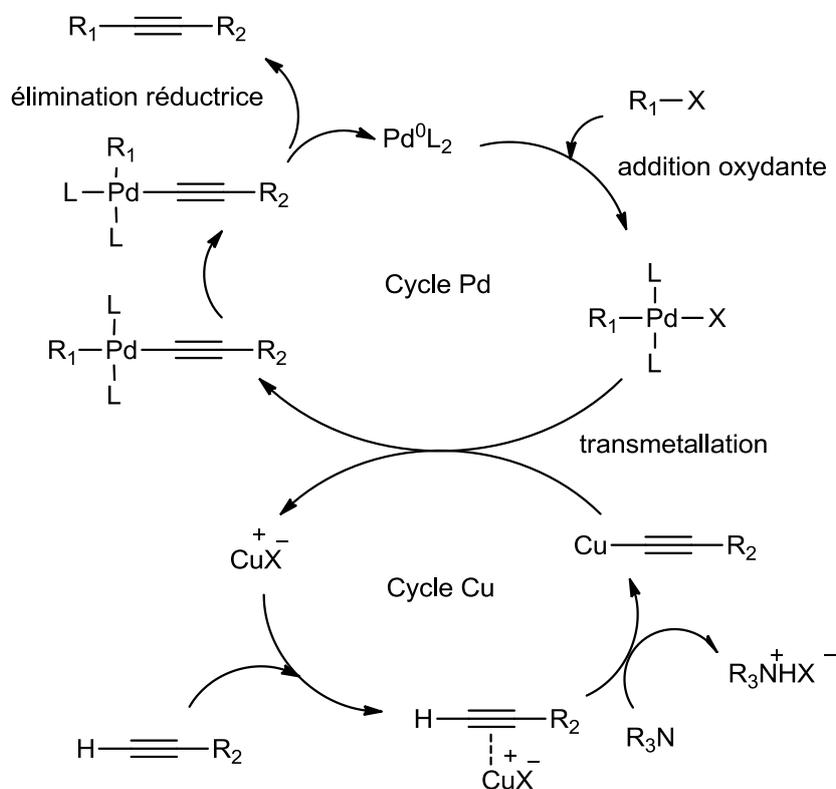


Figure 70 Cycles catalytiques d'une réaction de Sonogashira

Malgré cela on pense que les couplages de Sonogashira se divisent en 2 cycles catalytiques indépendants. Un premier cycle, qui fait intervenir le palladium comme catalyseur (cycle Pd Figure 70), reprend les bases des cycles classiques pour les couplages croisés. Ce cycle débute avec la formation de l'espèce active du catalyseur Pd(0)L₂, puis l'addition oxydante du partenaire halogéné. Cette seconde réaction est l'étape limitante ²⁸⁶ avec une barrière d'activation augmentant lorsque la masse molaire de l'halogène diminue. Puis vient une étape de transmétallation avec l'espèce cuivrée issue du cycle Cu (Figure 70), et pour finir une élimination réductrice du produit de couplage, libérant ainsi le catalyseur qui peut de nouveau entrer dans un cycle.

8.1.1.1 Couplage avec l'alcool propargylique

Le couplage de Sonogashira requérant l'utilisation de précurseurs contenant un alcyne terminal, nous avons commencé nos expérimentations avec l'alcool propargylique **29** qui est l'alcool le plus simple contenant un groupement alcyne. Les réactions ont été effectuées dans les conditions classiques de couplage de Sonogashira (Schéma 43).

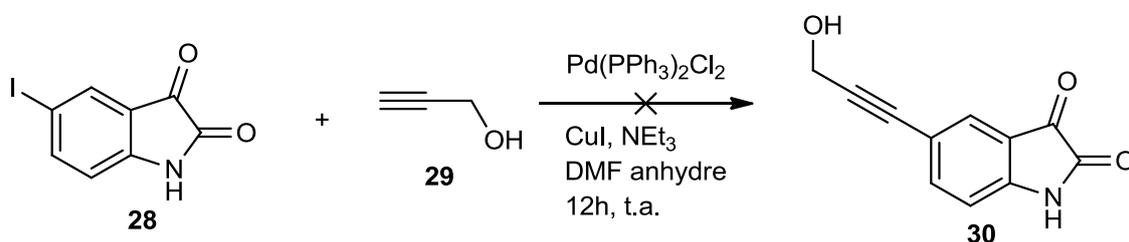


Schéma 43 Réaction de Sonogashira entre 5-iodoisatine et l'alcool propargylique

Les analyses RMN ¹H et spectrométrie de masse n'ont pas permis de mettre en évidence la formation du composé **30**. En effet en spectrométrie de masse le pic de base à m/z = 279,09 ([iodoisatine + 6 H⁺]) pourrait correspondre à la masse de l'iodoisatine ayant le cycle aromatique saturé. En RMN ¹H on note pourtant la présence de plusieurs signaux entre 7.50 ppm et 7.75 ppm intégrant au total pour 10 protons mais dont la superposition ne permet pas une assignation rigoureuse.

Une réaction « test » menée avec le 3,3-diméthylbutyne **31** a cette fois conduit au produit de couplage attendu **32**, montrant que la fonction alcool devait être protégée (Schéma 44).

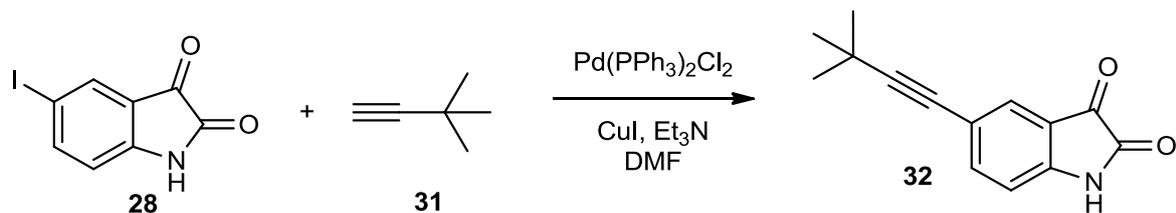


Schéma 44 Test conditions de couplage

8.1.1.2 Couplage avec le propargyloxytriméthylsilane

Le couplage a alors été réalisé avec le dérivé commercial silylé **33** (Schéma 45). Lors de l'étape de purification par chromatographie sur gel de silice, la déprotection de la fonction alcool a conduit directement au produit souhaité, à savoir le produit **30** avec un rendement de 46%.

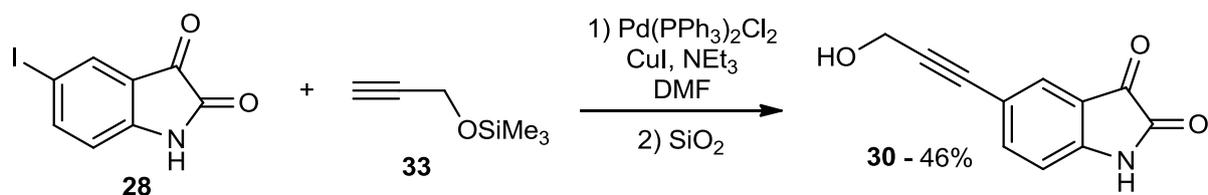


Schéma 45 Couplages de Sonogashira avec le précurseur propargylique ayant la fonction alcool protégée

Le spectre RMN ^1H du composé **30** montre un blindage des signaux aromatiques de 7.88 ppm à 7.42 ppm et de 7.43 ppm à 7.27 ppm, et l'apparition d'un singulet à 4.06 ppm spécifique du CH_2 entre la triple liaison et l'alcool. En revanche, l'absence de signal correspondant aux trois groupements méthyle du dérivé silylé témoigne de la déprotection qui s'est opérée lors de la purification.

8.1.1.3 Couplage avec le (3-butyn-1-yloxy)(triméthyl)silane

L'allongement du bras espaceur présentant un intérêt pour éloigner l'élément de reconnaissance biologique de la surface et diminuer ainsi les interactions hydrophobes et stériques lors de l'approche de la cible, nous avons préparé le dérivé silylé de l'alcool homopropargylique (Composé **36**, Schéma 46) en suivant le protocole décrit par Hansen *et coll.*²⁸⁷

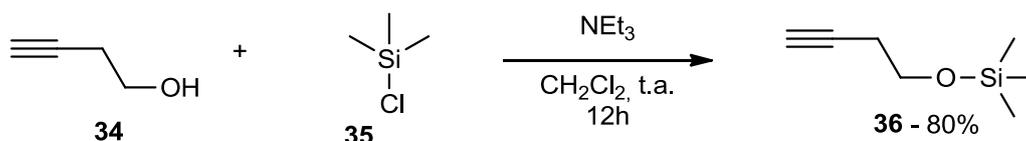


Schéma 46 Protection de la fonction alcool de l'alcool homopropargylique

Les mêmes conditions réactionnelles de couplage de Sonogashira que précédemment appliquées au précurseur **36** et à l'iodoisatine **28** (Schéma 47) ont alors permis d'obtenir le produit souhaité **37**.

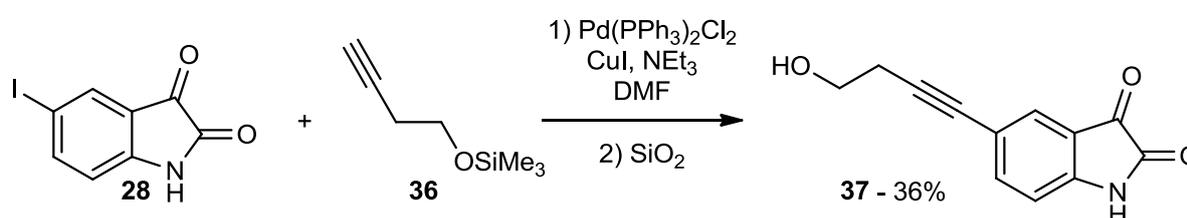


Schéma 47 Couplage de Sonogashira avec le précurseur homopropargylique 36

Les analyses par RMN et spectrométrie de masse confirment la formation du produit **37** (cf. partie expérimentale). Malgré cela l'étape de purification a été rendue difficile par l'insolubilité du produit brut dans le dichlorométhane utilisé pour la séparation chromatographique. Nous avons alors directement procédé à une déprotection en milieu acide de la fonction alcool sur le produit non purifié. Cette étape n'ayant pas permis d'améliorer le rendement ; le dépôt sur colonne a été directement effectué après concentration du brut réactionnel sans évaporation à sec. Du fait de la présence de traces de DMF en fin de colonne, diverses tentatives de recristallisations ont été effectuées. Cependant seul un lavage avec une solution aqueuse de LiCl a permis une diminution significative de la proportion de DMF (analyse par GC-MS).

8.2 Introduction d'une fonction amine

8.2.1 Utilisation du couplage de Sonogashira

Comme avec les dérivés de type alcool, nous avons effectué un premier essai de couplage de Sonogashira avec l'amine propargylique **38** (Schéma 48). L'analyse RMN ^1H n'a pas permis de mettre en évidence la formation du produit **39**.

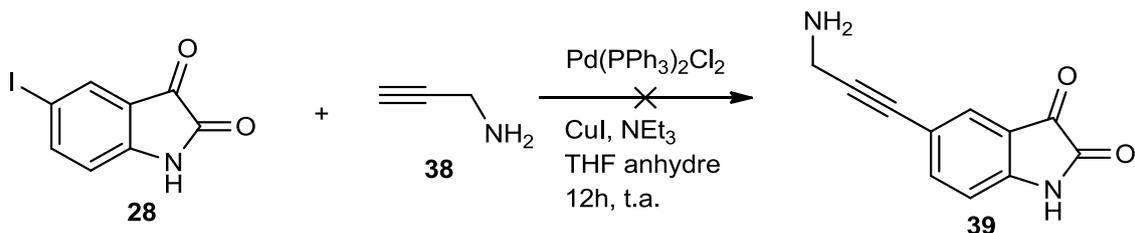


Schéma 48 Essai de couplage de Sonogashira avec la propargylamine

Des précurseurs aminés ont donc été préparés en protégeant la fonction amine.

8.2.1.1 Couplage avec le 2-propyn-1-ylcarbamate de 2-méthyl-2-propanyle

La propargylamine **38** a été protégée par un groupement formiate de 2-méthyl-2-propanyle (Boc) (Schéma 49).

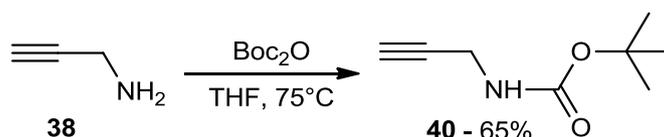


Schéma 49 Préparation du 2-propyn-1-ylcarbamate de 2-méthyl-2-propanyle

Nous avons utilisé ce nouveau précurseur **40** pour effectuer le couplage de Sonogashira avec l'iodoisatine **28** (Schéma 50).

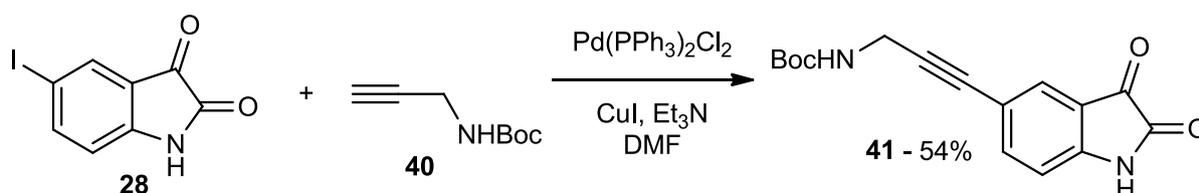


Schéma 50 Couplage de Sonogashira avec le précurseur **40**

Le produit **41** a été obtenu avec 54% de rendement. L'étape de déprotection du groupement Boc s'est avérée plus délicate. Différentes conditions ont été testées (Figure 71). Tout d'abord nous avons additionné une solution d'HCl 4,0M dans le dioxane au produit **41** dissout dans le THF.²⁸⁸ Après agitation pendant une nuit à température ambiante la neutralisation du milieu par une solution d'hydroxyde de sodium NaOH 1M a conduit à l'ouverture du cycle isatine. Le recours à une base moins forte telle que le carbonate de sodium a donné le même résultat. D'autres protocoles de déprotection ont alors été mis en œuvre.

La deuxième méthode expérimentée a impliqué l'utilisation d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane pendant une nuit.^{289, 290} Après neutralisation par de la triéthylamine, l'analyse RMN ¹H a mis en exergue une dégradation du produit.

Une nouvelle tentative effectuée dans des conditions plus douces²⁹¹ ; à savoir un chauffage à reflux de l'eau sur une courte période, n'a pas permis de déprotéger la fonction amine. Le réactif de départ a été principalement retrouvé en fin de réaction.

Compte-tenu de ces résultats, nous avons décidé d'effectuer la déprotection en présence d'acide chlorhydrique selon le protocole initialement utilisé, mais en s'affranchissant du traitement basique ultérieur pour ne pas dégrader l'isatine. Ainsi le composé déprotégé **42** a été isolé sous la forme de chlorure d'ammonium.

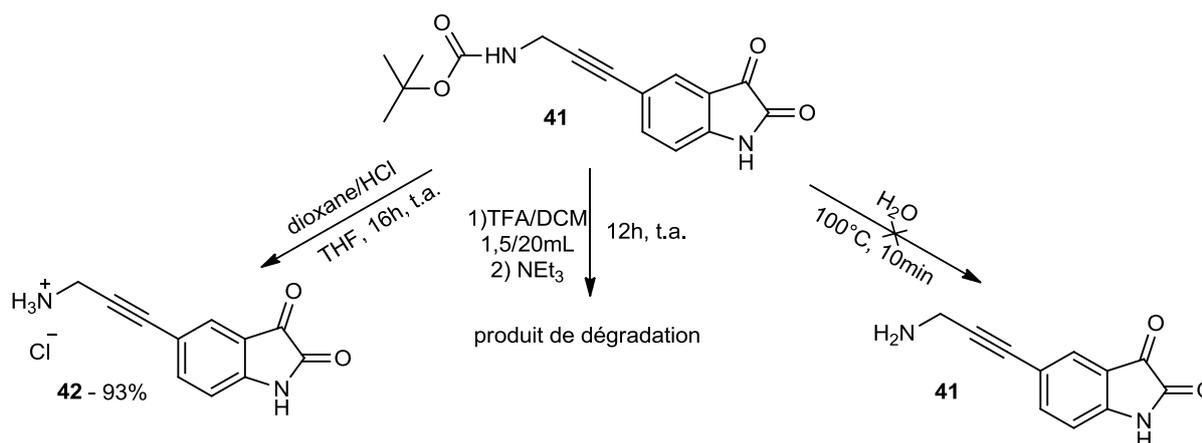


Figure 71 Tentatives de déprotection du groupement Boc

Les dérivés soufrés possédant une fonction thiol terminale ayant la capacité de former des couches auto-assemblées sur des surfaces d'or, ils sont donc parfois utilisés pour permettre une immobilisation d'éléments de reconnaissance biologique.^{292, 293} Dans ce contexte, le composé **42** a été engagé dans un couplage peptidique avec de l'acide 3-mercaptopropionique **43** en présence d'un agent de couplage de type EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide) (Schéma 51)²⁹⁴ pour introduire une fonction thiol.

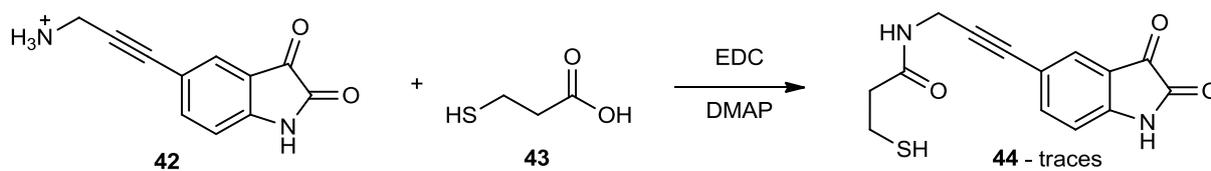


Schéma 51 Couplage avec la forme ammonium du dérivé d'isatine **42**

Le produit **44** n'ayant été détecté qu'à l'état de traces, nous avons tenté une seconde approche visant à effectuer préalablement le couplage peptidique entre le composé **43** et la propargylamine **38**²⁹⁵ avant d'effectuer le couplage de Sonogashira. Ce couplage peptidique n'ayant pas donné le résultat escompté, cette nouvelle voie a été abandonnée.

8.2.1.2 Couplage avec le 3-butyn-1-ylcarbamate de 2-méthyl-2-propanyle

Comme précédemment, nous avons souhaité déterminer si l'allongement du bras espaceur a une influence sur la reconnaissance du motif d'isatine par les bactéries. La préparation du 3-butyn-1-ylcarbamate de 2-méthyl-2-propanyle a été effectuée en suivant le protocole de Ranyuk *et coll.*²⁹⁶ (Schéma 52). Le produit **47** n'ayant été isolé qu'avec un rendement de seulement 9% ; le couplage de Sonogashira ultérieur n'a pas permis de prouver la formation du produit attendu compte tenu des trop faibles quantités de réactif mises en jeu (Schéma 53).

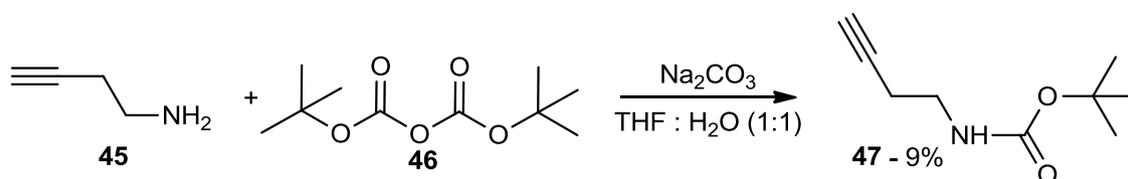


Schéma 52 Protection de la fonction amine de l'amine homopropargylique

Malgré une montée en échelle du composé **47**, une nouvelle tentative de couplage de Sonogashira n'a pas permis d'obtenir le produit **48** souhaité.

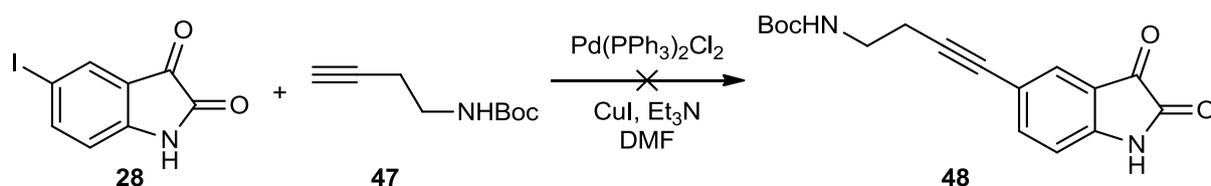


Schéma 53 Couplage de Sonogashira avec le précurseur **47** non efficace dans le DMSO

8.2.1.3 Préparation du 2-Propyn-1-ylcarbamate de 9H-fluorén-9-ylméthyle

Face aux difficultés rencontrées avec la protection par le groupement Boc, nous avons essayé de protéger l'amine par un groupement Fmoc (Schéma 54),²⁹⁷ la déprotection s'effectuant en présence d'une base organique (piperidine), moins agressive pour l'isatine. Nous avons pu ainsi isoler le produit **50** mais avec un faible rendement de 14%, rendement trop faible pour nous pousser à poursuivre les investigations.

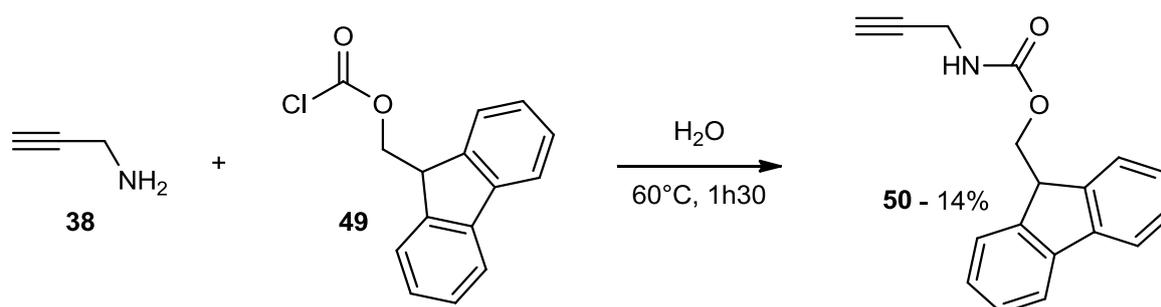


Schéma 54 Protection de la propargylamine avec un groupement Fmoc²⁹⁷

8.2.1.4 Couplage avec la 4-éthynylaniline

Un autre précurseur aminé, la 4-éthynylaniline **5**, a été utilisé pour effectuer le couplage de Sonogashira (Schéma 55). Nous avons testé le couplage sans protection préalable de la fonction amine, et celui-ci a fonctionné. Malgré tout le rendement de cette réaction est faible (12%).

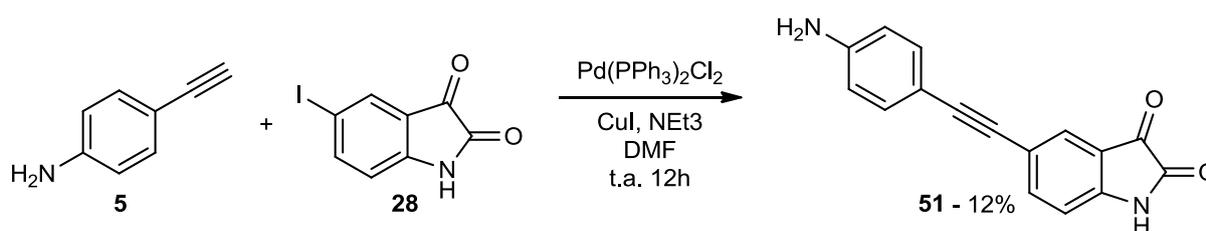


Schéma 55 Couplage de Sonogashira avec la 4-éthynylaniline

Pour essayer d'améliorer le rendement, plusieurs techniques de purification ont été évaluées. Une colonne chromatographique a été réalisée en effectuant un gradient d'éluion (de 100% DCM à 80% DCM : 20% EtOAc v : v). Lors de l'étape de purification un précipité a été isolé par simple filtration, ce qui nous a orienté vers une étape de recristallisation. Différents solvants (dichlorométhane, acétate d'éthyle, cyclohexane, éther de pétrole, eau ou éthanol) n'ont pas conduit au résultat escompté. Les conditions de purification restent à optimiser.

8.2.2 Utilisation du couplage de Suzuki

Pour introduire une fonction aminée sur l'isatine, nous avons orienté nos investigations sur des couplages de Suzuki. Découverte conjointement par Suzuki et Miyaura en 1979,^{298, 299} la réaction de Suzuki a été l'une des synthèses de formation de liaison C-C les plus utilisées depuis.

En mettant en présence des aryles d'acides boroniques et des halogénures d'aryles avec un catalyseur au palladium et une base (Figure 72), la réaction de Suzuki-Miyaura permet de former des unités biaryles intéressantes car présentes par exemple dans des produits naturels³⁰⁰, des polymères³⁰¹, des composés pharmaceutiques³⁰² ou phytosanitaires³⁰³.

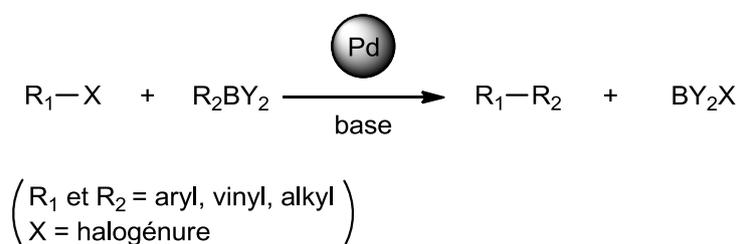


Figure 72 Schéma général de la réaction de Suzuki

Les organoboranes sont des composés largement utilisés dans la chimie organique car ils présentent des propriétés d'acide de Lewis avec une lacune électronique, ce qui les rend très réactifs. Les acides boroniques sont pour la plupart stables dans l'air et disponibles commercialement, contrairement aux dérivés organozinciques de la réaction de couplage de Negishi à préparer avant le couplage, ce qui rajoute une étape de synthèse. On peut également noter que leur faible toxicité les rend plus intéressants que les dérivés d'étain nécessaires pour le couplage de Stille.

On utilise le plus souvent des solvants polaires aprotiques tels que le DME (diméthoxyéthane), le THF (tétrahydrofurane), l'éther diéthylique pour réaliser les couplages de Suzuki, mais de meilleurs rendements peuvent être obtenus avec des solvants permettant d'atteindre des températures de chauffage plus élevées tels que le toluène (T° ébullition = 111 °C), le xylène (T° ébullition = 144 °C) ou le DMF (T° ébullition = 152 °C). Plus récemment des couplages de Suzuki dans des solvants « verts » type liquides ioniques^{304, 305} ou même l'eau^{306, 307} ont été décrits.

La base sélectionnée est le plus souvent de nature inorganique (Na_2CO_3 , Cs_2CO_2 , NaHCO_3 , K_2CO_3 , KF ou NaOH), elle influence la vitesse de réaction selon deux mécanismes (Figure 73), l'un lié au composé boronique et l'autre au palladium. La différence d'électronégativité entre le Bore et le Carbone est faible (0,5 sur l'échelle de Pauling) ce qui fait que la liaison B-C est peu polarisée, et elle fait donc partie des liaisons les plus fortes. L'espèce borée en présence de la base est complexée en boronate ; ce complexe est plus réactif à la transmétallation. Lorsque la base est plus faible, on observe la formation d'un complexe alcoxy-palladium qui sera plus réactif que son pendant halogéné.³⁰⁸ (Figure 73)

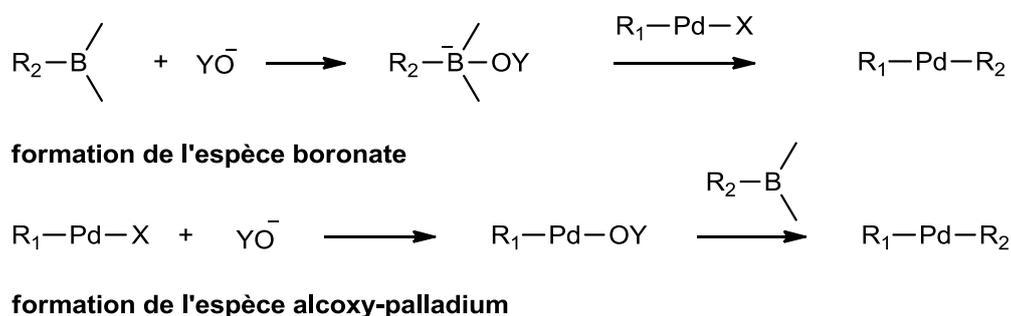


Figure 73 Rôles de la base lors du couplage de Suzuki

Le palladium est le métal de transition le plus utilisé soit à son degré d'oxydation 0 (Pd/C , ...) soit II ($\text{Pd}(\text{OAc})_2$, PdCl_2 , ...) associé à divers ligands (phosphine, pyridine, triazole, ...). On utilise plus rarement le nickel du fait de sa toxicité même s'il donne de bons résultats.³⁰⁹ Le cuivre a aussi attiré l'attention des chercheurs dernièrement du fait de la raréfaction de certains métaux dont fait partie le palladium.^{310, 311} Ces catalyseurs permettent d'obtenir de bons rendements mais avec des quantités pouvant atteindre 10 mol %. On observe aussi l'apparition de catalyseurs supportés permettant un meilleur recyclage^{312, 313} et évitant l'utilisation de ligands toxiques.

D'un point de vue mécanistique, le couplage de Suzuki fait intervenir les 3 étapes classiques (Figure 74) :

- L'addition oxydante : après activation du catalyseur (Pd^{II} à Pd^0) celui-ci s'insère dans une liaison C-X résultant en l'oxydation du métal qui repasse au degré d'oxydation II.
 - L'insertion du palladium forme une espèce *cis* qui ensuite subit une isomérisation *trans*.^{314, 315}

- La transmétallation : selon la base utilisée soit le complexe organo-borate réagira avec l'halogéno-palladium³¹⁶ soit ce sera l'alcoxy-palladium qui réagira avec l'acide boronique.³¹⁷
- L'élimination réductrice : le palladium revient à l'état d'oxydation 0 en éliminant le produit de couplage, rendant ainsi la réaction catalytique.³¹⁸

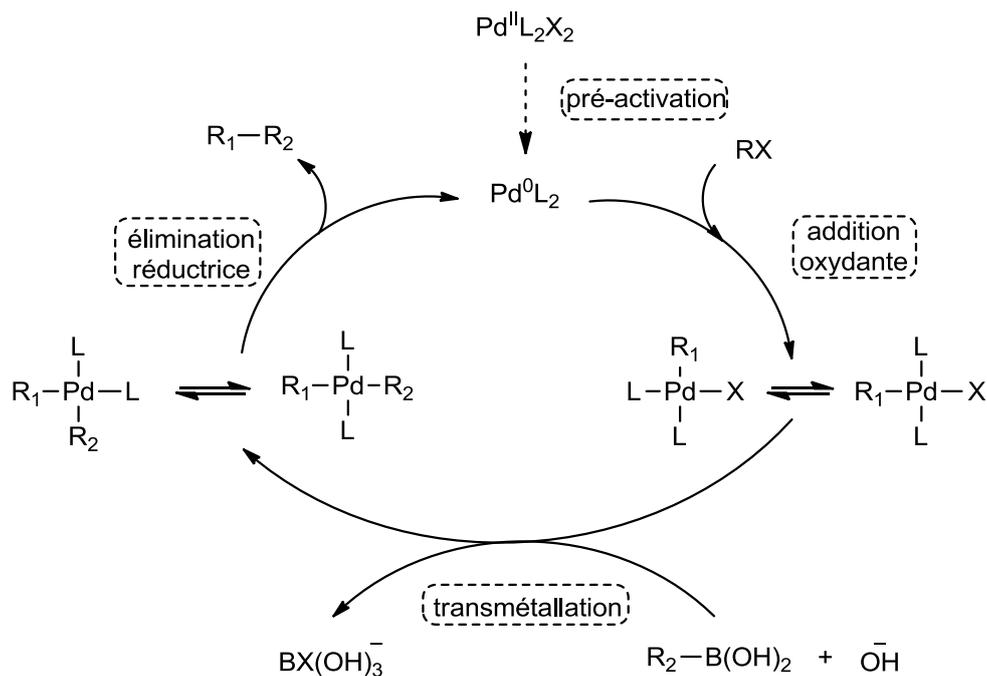


Figure 74 Cycle catalytique du couplage de Suzuki

8.2.2.1 Avec l'acide phénylboronique

Le couplage de Suzuki dans le cadre de ma thèse a d'abord été testé sur une réaction modèle avec de l'acide phénylboronique **52** en présence de dichlorure de bis-triphénylphosphine palladium dans le DMF avec une solution aqueuse de carbonate de potassium (Schéma 56)³¹⁹. La réaction a conduit à plusieurs produits. L'analyse RMN du produit majoritaire obtenu après colonne ne permet pas de vérifier l'efficacité du couplage, en raison, notamment, d'une superposition des signaux dans la zone aromatique.

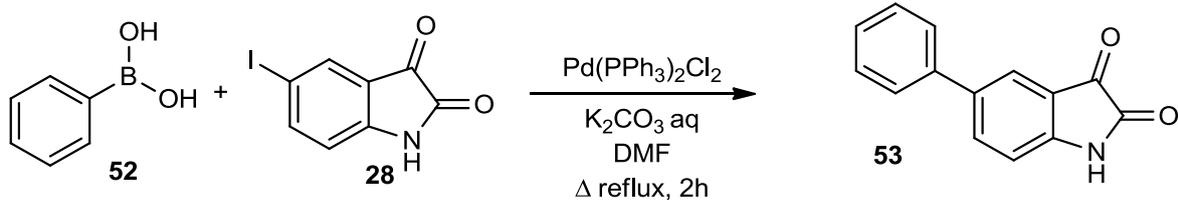


Schéma 56 Première tentative de couplage de Suzuki sur l'iodoisatine

Compte-tenu des difficultés d'isolement et d'analyse du produit de couplage, nous avons directement opté pour une protection du groupe carbonyle C3 de l'halogénoisatine utilisée (Schéma 57).³²⁰

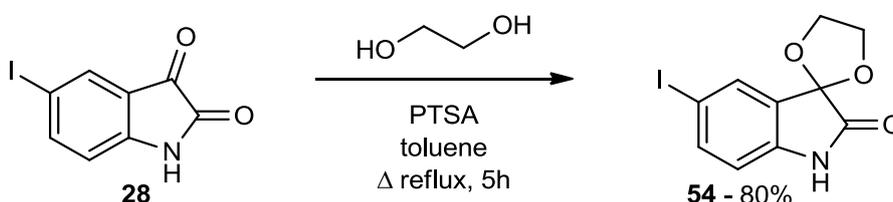


Schéma 57 Protection de la fonction carbonyle par la formation d'un acétal

Cette réaction de protection nous a permis d'obtenir le composé **54** avec de bons rendements (80%). Le spectre RMN ¹H montre l'apparition de signaux vers 4.50 ppm caractéristiques des protons méthyléniques de l'acétal.

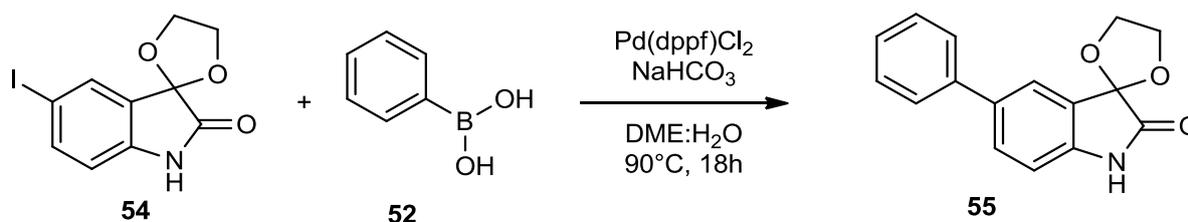


Schéma 58 Condition de couplage de Suzuki par Damgaard et coll.

Le produit **54** ainsi protégé et mis en réaction avec l'acide phénylboronique **52** a permis d'obtenir le produit **55** (Schéma 58) avec un rendement quantitatif (estimation sur la base du spectre RMN ¹H du produit brut joint en annexe).

8.2.2.2 Application avec l'ester pinacolique de l'acide-aminophénylboronique

Ces conditions de couplage sont donc appliquées avec l'ester pinacolique de l'acide phénylboronique *para*-aminé **56a** ou *mé*ta-aminé **56b** de moindre coûts que leurs équivalents acides (Schéma 59).

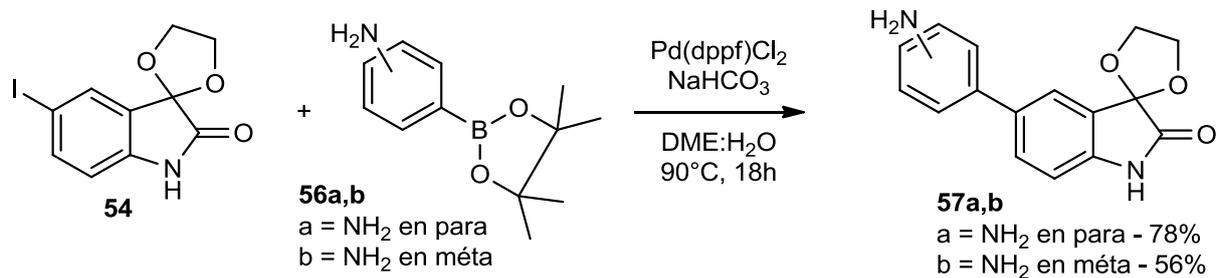


Schéma 59 Couplages de Suzuki avec une fonction amine sur le composé boronique

Les composés **57a** et **57b** ont été respectivement obtenus avec des rendements de 78% et 56%.

Compte-tenu de la bonne efficacité de couplage, nous avons testé l'utilisation du dérivé d'isatine protégé **54** dans un couplage de Sonogashira.

8.2.2.3 Test de couplage de Sonogashira sur iodoisatine protégée

Nous avons donc effectué le couplage entre le dérivé d'iodoisatine **54** et le 3-triméthylsiloxy-1-propyne **33** (Schéma 60).

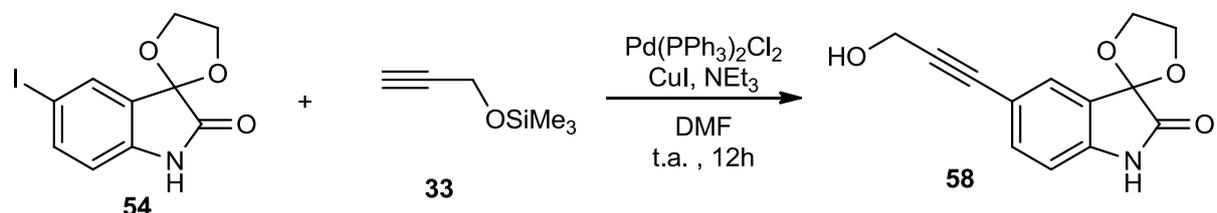


Schéma 60 Couplage de Sonogashira avec l'iodoisatine protégée en C3

Le composé **58** a été obtenu avec un rendement de 35%, donc inférieur à ceux des réactions menées sans protection préalable du groupement carbonyle (46%), donc la protection n'augmente pas le rendement du couplage de Sonogashira.

8.3 Tentatives d'introduction de la fonction acide

8.3.1 Par couplage de Sonogashira

Nous souhaitons également disposer d'une fonction acide pour les couplages peptidiques, mais le test de couplage de Sonogashira avec l'acide 3-butynoïque **59** n'a pas donné le composé **60** désiré (Schéma 61).

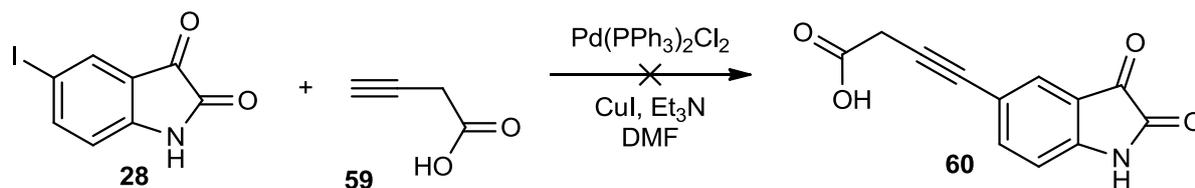


Schéma 61 Couplage de Sonogashira avec l'acide 3-butynoïque

Le suivi CCM de cette réaction montre toujours les spots correspondants aux réactifs de départ même après plusieurs heures supplémentaires de réaction (+ 5h), de même qu'en analyse RMN, nous ne détectons pas le pic correspondant au CH₂ sur l'échantillon post-colonne chromatographique. Seuls les réactifs de départ ont été isolés en fin de réaction.

8.3.2 Par couplage de Suzuki

De même, le couplage de Suzuki fut évalué avec l'ester pinacolique dérivant de l'acide 4-(carboxyméthyl)phénylboronique **61** et le précurseur d'iodoisatine protégé **54** (Schéma 62).

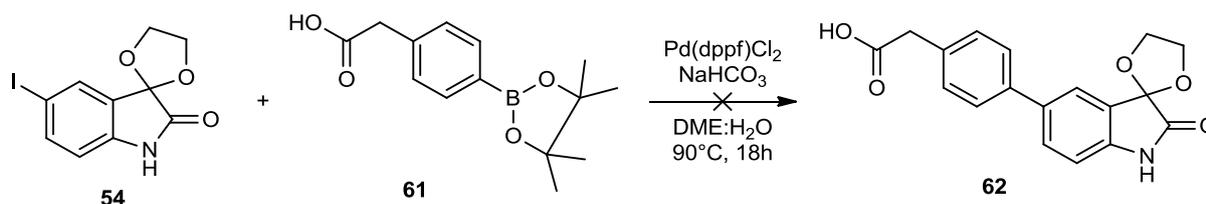


Schéma 62 Couplage de Suzuki avec l'ester pinacolique de l'acide 4-(carboxyméthyl)phénylboronique

A la fin d'une première réaction, différentes tentatives d'extraction par solvant organique (DCM, EtOAc) n'ont pas permis d'isoler le produit **62**. La phase aqueuse a alors été concentrée et nous avons tenté à partir du résidu obtenu une recristallisation dans le méthanol. Celle-ci s'étant révélée infructueuse, nous avons effectué une analyse RMN ¹H du produit brut dans D₂O. L'analyse a permis de mettre en évidence la présence de certains signaux caractéristiques du dérivé d'isatine protégée **54**, sans toutefois pouvoir prouver que le couplage a eu lieu en raison de la présence de nombreuses impuretés dans l'échantillon.

Un deuxième essai a été réalisé en évitant tout traitement aqueux. Le produit brut a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice éluée par un mélange DCM : EtOAc (gradient 1 : 0 v : v ; 0,5 : 0,5 v : v). Il nous a été possible cette fois d'isoler trois fractions, deux d'entre elles correspondant respectivement au dérivé d'isatine **54** et à l'acide boronique **61** de départ. Seule une fraction de 10 mg nous a permis de mettre en évidence le produit de

couplage **62** attendu (Figure 75) accompagné vraisemblablement du produit d'homocouplage. Compte-tenu de la faible efficacité du couplage, nous n'avons pas poursuivi les investigations. Une protection de la fonction acide pourrait être envisagée avant de réaliser cette réaction.

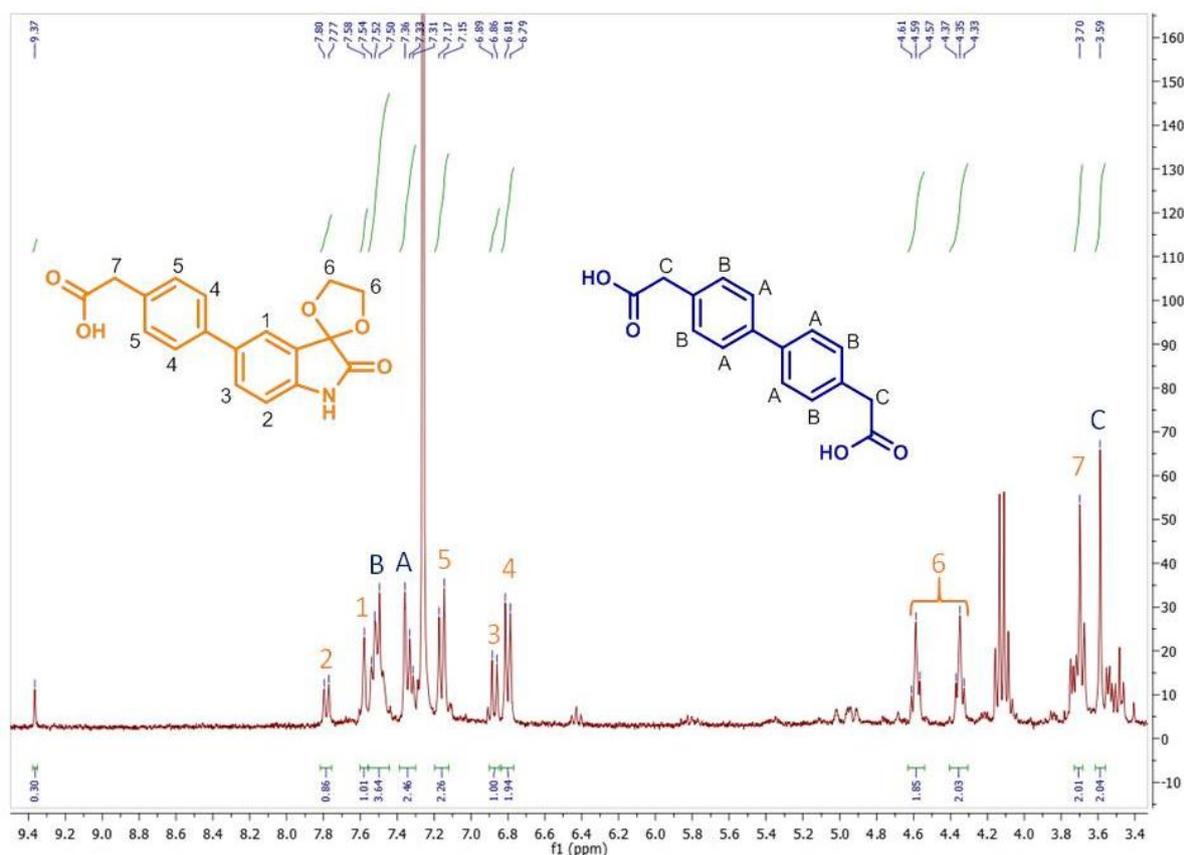


Figure 75 Spectre RMN du mélange entre le produit de couplage **67** et le produit d'homocouplage

9 Effets biologiques des isatines modifiées

Grâce aux couplages de Sonogashira et Suzuki, nous avons obtenu 6 dérivés d'isatine différents portant soit une fonction amine, soit une fonction alcool, et pouvant être utilisés pour la modification de surface (Figure 76). L'isatine ayant des effets antibactériens intéressants, nous avons tout d'abord voulu savoir si nos dérivés de synthèse présentaient également des activités intéressantes dans ce domaine. Leur pouvoir antibactérien fut donc mesuré. Nous avons également étudié la façon dont les dérivés d'isatine interagissent avec la protéine bactérienne Ami-C qui est le récepteur des peptides natriurétiques de type C (CNP)

chez *Pseudomonas Aeruginosa*. Pour cela, nous avons donc effectué des simulations numériques par *docking* moléculaire sur le logiciel AutoDock.

9.1 Mesure de la concentration minimale d'inhibition de croissance bactérienne

Au cours de cette thèse, j'ai eu l'opportunité d'accompagner mademoiselle Eloïse Dufourd, étudiante en première année à l'École Normale Supérieure de Lyon lors de son stage au sein du Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM) de l'Université de Rouen. Au cours de son stage, Eloïse a mené une étude sur l'effet de l'isatine et des dérivés que j'ai développés sur la physiologie de *Pseudomonas Aeruginosa* (Ps. A). Eloïse a également testé l'effet de l'isatine et de ses dérivés sur *S.epidermidis* et *S.aureus* pour pouvoir comparer et évaluer les réponses de bactéries à Gram positif et négatif vis-à-vis de dérivés de l'isatine car ces bactéries sont déjà connues pour y être sensibles³²¹.

9.1.1 Étendue des molécules étudiées

Les dérivés d'isatine étudiés sont donc ceux sur lesquels ont été introduites une fonction alcool (**30** et **37**), une fonction amine (**57a**, **57b** et **51**) et le composé **41** ayant l'amine protégée. Les effets des différentes fonctions introduites pourront être comparés. Les formules chimiques des composés vous sont présentées dans la Figure 76.

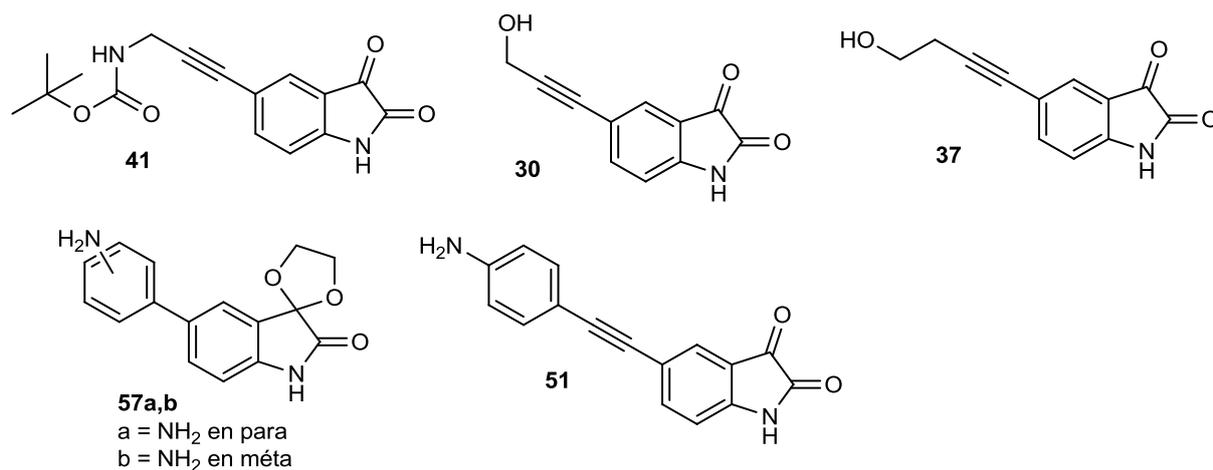


Figure 76 Molécules étudiées pour l'impact sur la physiologie de Ps. A

9.1.2 Technique de mesure et résultats comparés à l'isatine native

L'étude a été menée sur différentes souches bactériennes cryo-conservées au sein du LMSM : la PA14 pour *Ps. A* (souche possédant le plus grand nombre de facteur de virulence et la plus grande résistance), la MFP04 pour *S.epidermidis* (bactérie cutanée résistante, contaminant le matériel médical) et la ATCC 6538 pour *S.aureus* (souche de référence responsable de nombreuses infections nosocomiales). L'isatine et ses dérivés étant des poudres, ils sont dissouts dans du DMF car c'est le solvant dans lequel ils sont le plus solubles et qui n'entraîne pas de précipitation lors de la dilution dans l'eau ou le milieu de culture ; phénomène observé lors d'essais préalables dans le DMSO. Les bactéries mises en pré-culture la veille de l'expérience sont ensuite mises dans une plaque de 96 puits (Figure 77). Les compositions des puits varient selon la ligne. D'abord des témoins : la première ligne contient une solution à 5% de DMF pour évaluer l'impact du solvant sur la croissance des bactéries, un témoin de stérilité qui contient du milieu de culture seul et un témoin de croissance qui contient de la solution de pré-culture ; ces deux témoins permettent d'évaluer les potentielles contaminations et enfin une ligne contenant de l'antibiotique (colistine pour *Ps. A* ou vancomycine pour les *Staphylococcus*). Ensuite dans les lignes Echantillon et Blanc, des dilutions en cascade de 10 mM à 0,01 mM en isatine ou dérivés d'isatine sont préparées puis 50 µL culture bactérienne (10^6 CFU/mL (Colonies Formant Unités)) sont ajoutés dans les puits « échantillon ». La plaque est incubée pendant 24 heures à 37°C et l'observation de l'inhibition de la croissance bactérienne (CMI) est ensuite effectuée visuellement en étudiant la turbidité des solutions. Si la solution est trouble, il n'y a pas d'inhibition donc la concentration en molécules (isatine ou dérivé) est insuffisante.

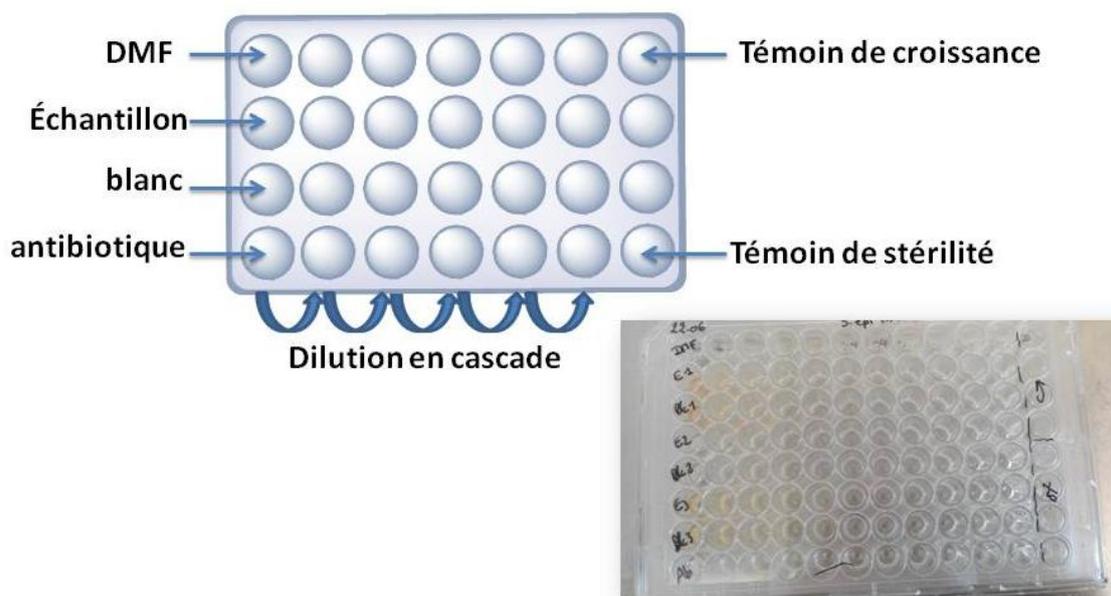


Figure 77 Photo d'une plaque de 96 puits utilisée pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et schéma explicatif du remplissage des puits

La CMI (concentration moyenne d'inhibition) de l'isatine est de 5 mM pour *Ps. A* et *S.aureus* et de 2,5 mM pour *S.epidermidis*, donc les concentrations supérieures n'ont pas été testées car le but était de définir si la modification de l'isatine améliore ses propriétés antibactériennes. Les résultats montrent que les dérivés d'isatine portant un groupement hydroxyle ont une activité antibactérienne à 5 mM sur *S.aureus* et *S.epidermidis* mais pas sur *Ps. A* tandis que tous les autres dérivés n'ont pas d'activité à des concentrations inférieures ou égales à 5 mM.

Eloïse a également suivi la croissance bactérienne de *Ps. A* en fonction de la concentration en isatine ou en dérivé **41**, cette expérience confirme la précédente car aucun effet n'est visible. Elle a effectué d'autres tests comme la survie d'un organisme eucaryote par exemple pour évaluer la toxicité de l'isatine et du pourcentage en DMF ou le développement du biofilm en statique qui a confirmé que l'isatine n'a pas d'influence directe sur les bactéries *Ps. A*. Ces résultats confortent les hypothèses présentées dans l'article de Rosay *et coll.* qui présentaient l'isatine comme un antagoniste du CNP.⁸⁶ Dans ces travaux, les auteurs proposent une action bloquante de l'isatine sur le CNP par compétition au niveau des sites actifs de la protéine AmiC. Le paragraphe suivant aborde la technique de *docking* moléculaire qui nous a permis de valider cette hypothèse.

9.2 Simulation informatique du *docking* des molécules dérivées de l'isatine sur la protéine Ami-C

La méthode de *docking* moléculaire permet de prédire la conformation et le type de fixation non-covalente entre une molécule (ligand) et une macromolécule (récepteur) qui amène à la formation d'un complexe plus stable. Cette technique, qui a été développée dans les années 1990, est largement utilisée en biologie et pharmacie dans le cadre de recherche de nouvelles molécules bioactives.³²²⁻³²⁵ Il existe une multitude de logiciel de *docking* disponible sur le marché, tels que Hex, DOCK, AutoDock, Molegro Virtual Docker ou encore GRAMM. Ces logiciels se répartissent en deux catégories selon la méthode d'amarrage utilisée : l'ajustement de fragments (*matching*) ou la simulation de trajectoire. Dans la première méthode, un modèle « en négatif » du récepteur est construit en inventoriant le volume accessible et les points d'interaction tels que les sites électrostatiques, lipophiles ou de liaison hydrogène. Les ligands sont décomposés en fragments puis reconstruits dans le modèle négatif du récepteur pour faire *matcher* les géométries et les fonctions chimiques. Cette technique est rapide et permet le criblage de larges librairies de composés.

Dans la seconde approche, le ligand est simulé à l'extérieur du récepteur et on suit sa trajectoire d'exploration par des opérations de translation, rotation ou changement de conformation pour trouver la meilleure interaction ligand-récepteur en plusieurs cycles. Cette méthode est plus précise car elle repose sur un algorithme qui sélectionne à chaque cycle les conformations de plus basse énergie et transmet ces informations aux cycles suivants. Le résultat en fin d'analyse indique un maximum de dix positions possédant la meilleure estimation d'énergie de liaison au récepteur.

Dans ce travail, nous avons choisi le logiciel autodock pour effectuer nos simulations. Ce logiciel fonctionne selon une approche par simulation de trajectoire de sorte à simuler les interactions les plus probables entre un ligand et son récepteur. Toutes nos simulations ont été réalisées sur une station de modélisation disponible au LMSM. Les performances de la station ne nous ont pas permis de travailler avec un récepteur souple. Compte tenu du nombre d'acides aminés dans la protéine AmiC, les temps de calculs auraient été beaucoup trop longs. Nous avons donc fixé la structure de la protéine AmiC et nous avons travaillé avec des ligands en libre rotation axiale. De la même manière, nous avons choisi de travailler avec des

molécules non hydratées et en ne conservant que les hydrogènes polaires d'AmiC. Les quelques tests préliminaires que nous avons faits, ne montraient pas de réelles différences au niveau des interactions intermoléculaires par contre les temps de calculs étaient considérables.

9.2.1 Étude du *Docking* étape par étape

9.2.1.1 Construction du récepteur

Il a été déterminé qu'AmiC est une protéine de *P. Aeruginosa* lui permettant de détecter les hormones humaines et donc de s'adapter à son hôte.⁸⁶ Sa structure 3D est très similaire au récepteur humain du peptide natriurétique C (hNPRC) et comme nous l'avons vu en chapitre 1, l'isatine est un antagoniste au CNP, il est donc logique d'étudier de quelle manière elle interagit avec AmiC. Nous avons également étudié si la modification de la structure de l'isatine jouait sur la manière dont elle agit sur AmiC. La première étape de notre étude était donc reproduire la structure d'AmiC dans notre logiciel.

La *Protein Data Bank* (PDB) est une base de données mondiale référençant toutes les structures cristallographiques des macromolécules connues, obtenues soit par diffraction des rayons X soit par RMN. La protéine AmiC est présente dans cette base sous 4 références (3 correspondent la bactérie PSA et 1 à *E. Coli*) où on la retrouve en interaction avec différents ligands (AmiR, acétamide, butyramide). Les modèles 1pEA et 1qoOp sont les plus utilisés dans la littérature. Bien que ces 2 modèles soient décrits avec 375 acides aminés, les structures sont relativement différentes. 1pEA correspond au récepteur AmiC complexé avec un ligand acétamide à une résolution de 2.1 Å. Bien qu'AmiC soit décrite sous la forme d'un dimère, le modèle 1pEA est présenté sous la forme d'une seule chaîne peptidique. Le modèle 1qoOp quant à lui était utilisable directement sous la forme de dimère (Figure 78).

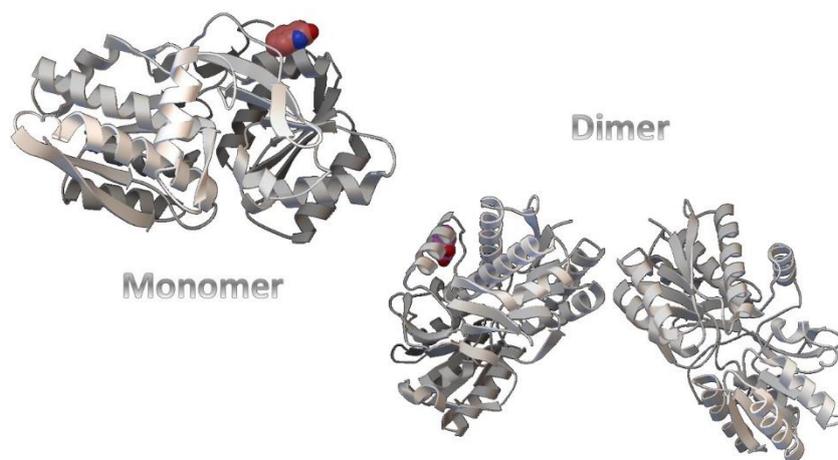


Figure 78 Monomère IpEA et dimer IqOp

9.2.1.2 Préparation des ligands et de la macromolécule

Une fois établie la structure de la macromolécule, elle doit être représentée avec ses hydrogènes polaires susceptibles de faire des liaisons hydrogènes, et avec les charges partielles de ses atomes. On appelle ces charges *Kollman United Atoms*.³²⁶ On fixe également la macromolécule comme étant rigide pour limiter le nombre de calculs. Il en va de même pour le ligand qui doit avoir tous ses hydrogènes et toutes ses charges partielles qui peuvent être calculées avec une méthode empirique, celle de Gasteiger a été utilisée dans notre étude. Pour le ligand, on définira si des pivots seront en libre rotation et on renommera les carbones aromatiques. Ces manipulations permettent d'obtenir des fichiers de coordonnées atomiques au format *pdbqt* qui pourront être utilisés pour chaque nouvelle simulation.

9.2.1.3 Calcul des grilles de potentiels

Une grille est une matrice 3D qui permet de définir la zone du récepteur à étudier : soit dans son intégralité, soit dans une région intéressante prédéfinie (Figure 79). C'est un outil de calcul rapide pour déterminer les énergies d'interaction entre le récepteur et le ligand. Elle est basée sur l'enregistrement à chaque point de la grille, espacés de 0,2 Å à 1,0 Å, d'un potentiel d'interaction entre une sonde moléculaire et l'ensemble des atomes du récepteur à proximité de ce point. Ce potentiel est évaluable car le récepteur étant rigide, son champ d'interaction moléculaire est constant et grâce à l'équation d'énergie libre utilisée.³²⁵

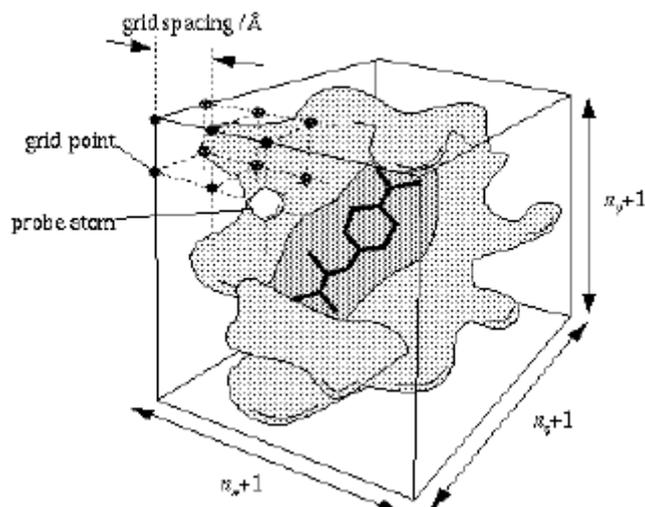


Figure 79 Schéma d'une grille de potentiels construite autour du site actif d'une macromolécule ³²⁵

C'est cette matrice qui définit le champ d'exploration du ligand et AutoDock affichera les solutions d'amarrage possibles dans le volume indiqué. Plus les dimensions de la boîte matricielle seront grandes, plus le temps de calcul sera important. L'énergie d'interaction du ligand sera calculée en faisant une interpolation tri-linéaire des valeurs d'affinité données par les huit points de la grille entourant chaque atome du ligand. Donc le temps de calcul sera aussi dépendant du nombre d'atomes composant le ligand, la taille de la macromolécule n'intervenant pas. Pour la plupart de nos simulations nous avons travaillé avec des résolutions de grille autour des 0.4 Å.

Différents paramètres sont regroupés dans un fichier texte qui permettra au programme AutoGrid de calculer les grilles de potentiels. Ces paramètres indiquent les noms de fichiers du ligand et du récepteur ; la position et la dimension de la boîte en indiquant la distance entre les points de la grille ; chaque type d'atome du ligand nécessitant le calcul d'une grille et la valeur des constantes des différents termes à calculer.

9.2.1.4 Simulation de l'amarrage de l'isatine sur AmiC

Une fois les fichiers contenant le ligand et les différentes grilles à utiliser établis, il faut choisir la méthode de recherche à utiliser avec les paramètres associés. Nous avons basé notre recherche sur un algorithme génétique dans lequel on peut faire jouer des paramètres de taille de la population, de niveau de sélection élitiste (c'est-à-dire le nombre de meilleurs individus qui survivent jusqu'à la génération suivante), de taux de croisements et de mutations, le

nombre de générations et de cycles à exécuter (paramètres d'arrêt si le processus prend trop de temps). Un cycle d'amarrage prend fin lorsque :

- Soit le nombre maximal de générations a été atteint
- Soit le nombre maximal d'évaluation d'énergie a été atteint
- Soit une seule solution a été déterminée par la convergence des résultats

La meilleure solution d'amarrage du cycle est l'individu de la dernière génération présentant la meilleure énergie d'interaction récepteur-ligand, elle est enregistrée avant le lancement du cycle suivant. On obtiendra donc autant de solutions que le nombre de cycles programmés, dans notre étude ce sont 10 itérations qui ont été exécutées à chaque modélisation.

9.2.2 Résultats obtenus pour le *Docking* sur AmiC

Sur le récepteur 1pEA, AutoDock propose 10 sites d'interactions possibles distribués tout autour du monomère. L'absence d'affinité préférentielle parmi les 10 solutions proposées laisse supposer que 2 chaînes peptidiques doivent être modélisées pour avoir une interaction entre isatine et AmiC. La Figure 80 présente les sites d'interactions proposées par AutoDock lorsque l'AutoGrid inclut le récepteur AmiC complet. Comme pour le monomère, on retrouve des isatines distribuées sur l'extérieur des lobes d'AmiC. De manière plus intéressante, 2 solutions proposent un positionnement de l'isatine entre les lobes d'AmiC. Ces résultats confirment les résultats obtenus par Rosay *et coll.* qui ont travaillé avec le modèle 1qOp.

Si cette position est la plus favorable, on peut émettre 2 hypothèses d'interaction :

- Soit, l'isatine occupe le site d'ancrage du CNP sur le récepteur AmiC (position basse sur la Figure 80) ce qui empêche le CNP de venir se fixer.
- Soit, l'isatine se positionne à l'opposé (position haute sur la Figure 80) ce qui induit un réarrangement d'AmiC lequel gêne l'accès du CNP.

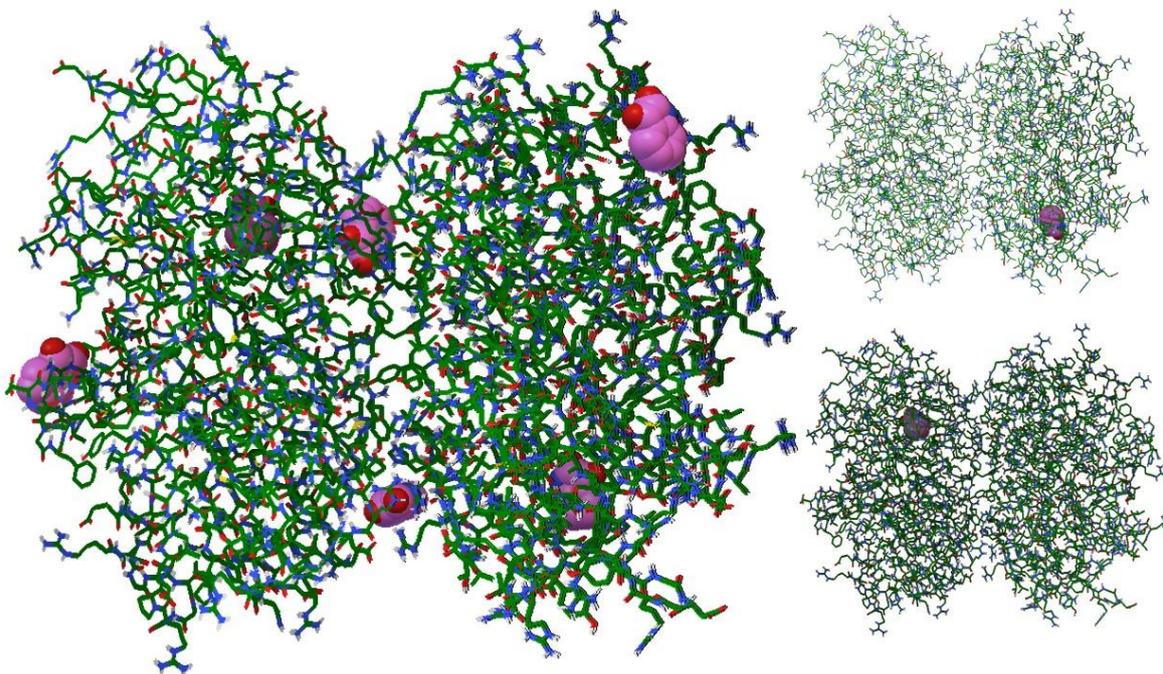


Figure 80 Résultats du docking de l'isatine en transparence sur 1pEA

Les simulations effectuées, en utilisant la structure 1qoOp, présentent 5 conformations préférentielles où seule la solution numéro 5 propose l'isatine en position haute semblant confirmer la seconde hypothèse proposée précédemment (Figure 81).

À ce stade, les K_d mesurés sont tellement grands qu'il est difficile de juger ces simulations d'interaction recevables. Néanmoins, il est intéressant de noter que les K_d estimés par nos simulations sont beaucoup plus petits lorsque l'on utilise le modèle 1qoOp ($K_d = 300$ à $400 \mu\text{M}$) par rapport au modèle 1pEA ($K_d = 850$ à $1000 \mu\text{M}$). Nous avons donc choisi de continuer nos investigations avec le modèle 1qoOp et de réduire la taille de la grille afin de nous focaliser sur les sites d'intérêt haut et bas.

La réduction de la grille autour de l'interface entre les lobes s'est montrée déterminante avec 10 propositions identiques proposant l'isatine en position haute (Figure 82). La seule différence entre les 10 propositions correspond à une orientation variable de l'isatine. L'étude des sites actifs indique une interaction forte par liaison H entre l'isatine et les ARG 77 et TRP 306 de la protéine AmiC ($K_d = 73 \mu\text{M}$).

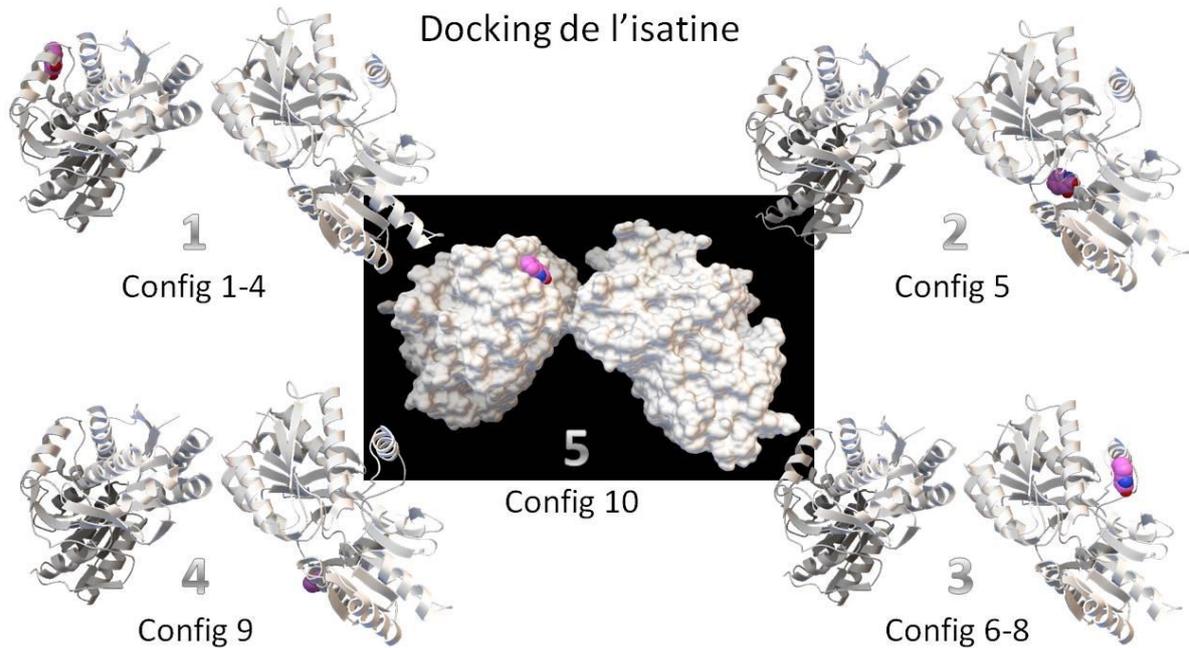


Figure 81 Exemple de différentes positions d'interaction entre l'isatine et la protéine AmiC (modèle 1qoOp) obtenues après analyse du docking avec AutoDock

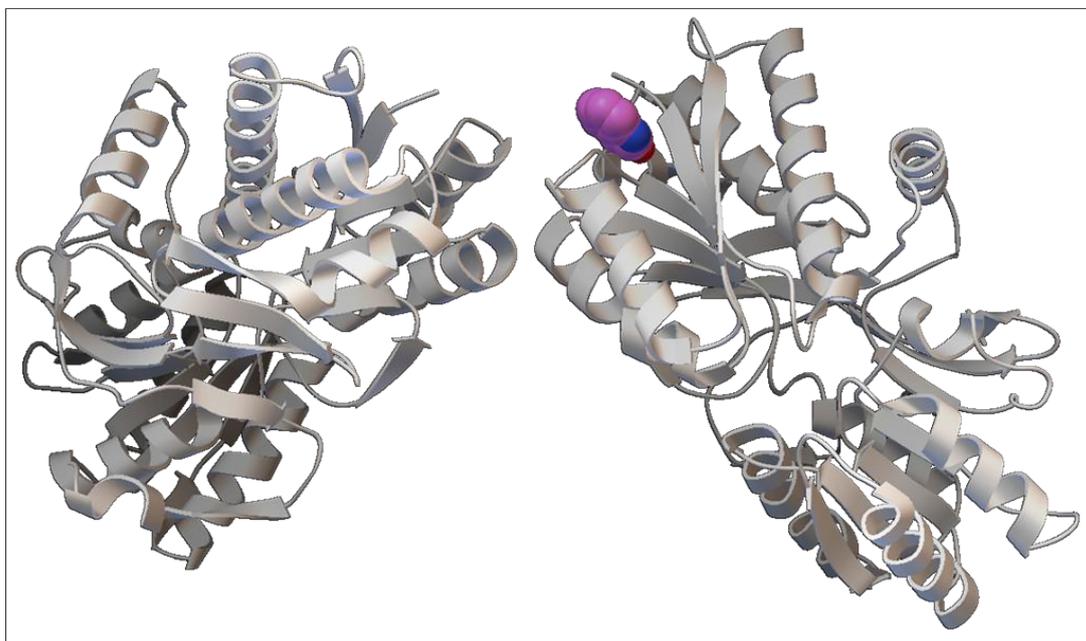


Figure 82 Résultat unique en utilisant une boîte réduite

Les travaux de Rosay *et coll.* ont également montré une interaction AmiC-isatine préférentielle lorsqu'elle se trouve en position haute. Par contre, on peut noter une différence sur la composition du site d'interaction AmiC-isatine. Les travaux de Rosay *et coll.* indiquent que les acides aminés Ile 71, Arg 72, Val 94 et Arg 97 pourraient être déterminants dans

l'interaction AmiC-isatine ce qui ne correspond pas à ce que nous avons obtenu. Nous avons donc cherché à localiser la grille d'étude autour de ces acides aminés pour une nouvelle simulation. Nos résultats confirment 10 solutions possibles dans cette zone d'étude avec une implication des 4 acides aminés cités précédemment (Figure 83).

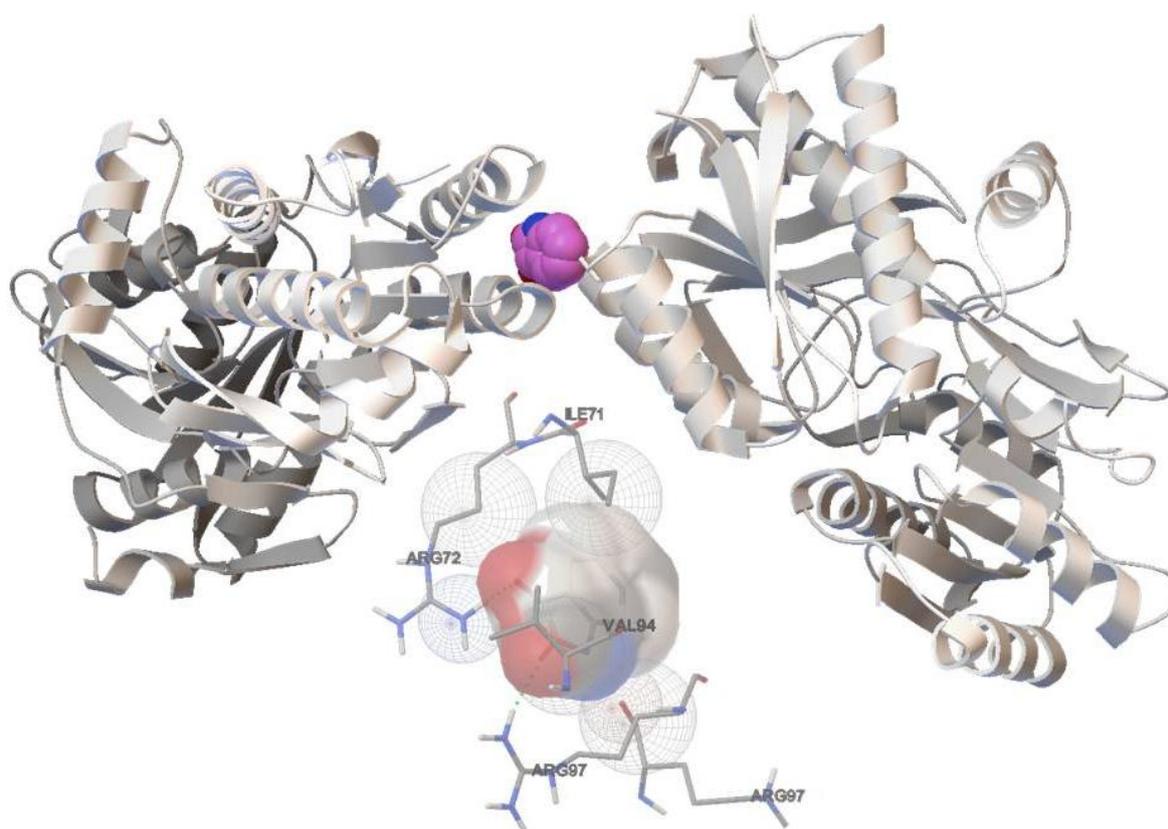


Figure 83 Résultat unique en utilisant une boîte concentrée sur les acides aminés interagissant avec l'isatine (vue d'ensemble et vue sur les zones d'interaction)

En revanche, les K_d obtenus dans ces conformations sont à $150\mu\text{M}$ indiquant un résultat moins favorable que si l'on travaillait dans une zone plus large. Par suite, nous avons fixé les paramètres de la grille et les avons utilisés pour tester les affinités entre la protéine AmiC et les dérivés d'isatine synthétisés (Tableau 3). On retrouve un rôle prépondérant de l'Arg 77 pour tous les dérivés. Il est intéressant de noter que tous nos ligands ont une affinité plus forte pour AmiC que l'isatine. Lors des tests antibactériens, nous avons vu que seuls les dérivés hydroxylés (composés **30** et **37**) conservaient un pouvoir antibactérien comparable à l'isatine. Au vu des résultats du Tableau 3, le couple Arg 77 et Arg 97 semble important pour obtenir l'effet antibactérien escompté. En effet, les autres modifications de l'isatine impliquent des interactions différentes résultant en la perte de l'effet antibactérien du dérivé. On peut noter

que le dérivé **51** qui interagit avec Arg 97 et Arg 77 via une liaison hydrogène n'a également pas d'effet antibactérien, ce qui semble indiquer que l'Arg 77 doit seulement être dans l'entourage de la molécule. Ces résultats sont confirmés par le fait que l'Arg 77 est d'après le Tableau 3 important pour l'accroche de l'isatine et par les résultats de Rosay *et coll.* qui concluaient au rôle prédominant de l'Arg 97 dans la reconnaissance du site de liaison.

Le composé **57b** est le seul à ne pas présenter le même site de liaison que tous les autres. Le groupement aniline et la libre rotation autour de la liaison simple entre ce groupement aromatique et l'isatine peuvent expliquer ce changement de site actif.

Par ailleurs, nous avons également évalué les capacités de liaison des dérivés aminés **57a**. L'objectif étant de voir si la présence du groupement acétal modifiait ou non le site d'interaction AmiC-isatine. Pour le composé **57a**, on trouve des énergies de liaison comparables avec ou sans protection. Dans les 2 cas, on retrouve une liaison H avec l'acide aminé 77. En revanche, on perd la liaison avec l'Asp 99 si on retire le groupement protecteur.

Tableau 3 Résultats des modélisations isatine-AmiC

	Energie de liaison (kcal/mol)	K _d (μM)	Acides aminés en liaison H
Isatine	-5,6	73	Arg 77 et Trp 306
Composé 41	-6,2	26,8	Arg 77, Ala 98, Asp 310, Arg 307
Composé 30	-6,3	23,4	Arg 97, Arg 72, Arg 77*
Composé 37	-6,4	20	Ile 71, Arg 97, Arg 77*
Composé 57a	-7,17	5,5	Asp 99, Arg 77
Composé 57b	-7,36	4,0	Arg 72, Val 94
Composé 51	-6,67	13	Arg 77, Arg 97

* acide aminé présent au voisinage de l'isatine mais pas en liaison hydrogène. Plutôt interaction hydrophile ou hydrophobe.

10 Installation des dérivés d'isatines en surface

Nous disposons donc de différents dérivés d'isatine possédant des fonctions soit alcool soit amine. Dans cette partie seront décrites les différentes stratégies mises en place pour accrocher l'isatine sur le COC. Premièrement en transformant les fonctions amines en diazonium et en effectuant le greffage en surface. Deuxièmement en utilisant des surfaces modifiées grâce aux sels de diazonium pour effectuer des couplages soit peptidiques soit pallado-catalysés avec les dérivés d'isatine.

10.1 Par transformation d'une fonction amine en diazonium

Un article utilisant la technique des sels de diazonium pour fonctionnaliser l'isatine en position 5 montre que l'isatine supporte les conditions expérimentales de formation d'une fonction diazonium³²⁷. La formation d'une fonction diazonium a été effectuée sur les dérivés **57a** et **57b** (Schéma 63).

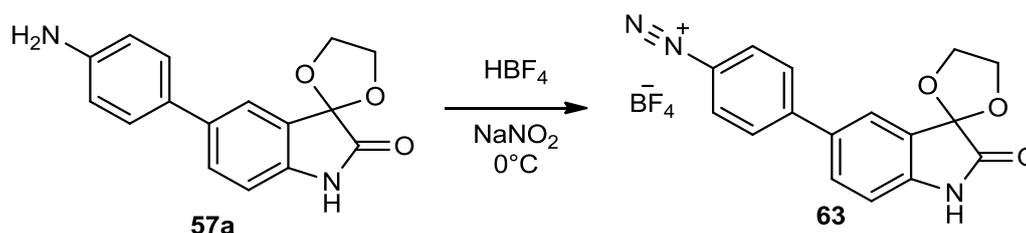


Schéma 63 Formation du diazonium sur 57a

Lorsque l'on compare les spectres RMN (présentés en annexe) avant et après l'expérience, on note la disparition du pic à 5.19 ppm qui correspondait au NH₂, ainsi qu'un shift important de tous les pics aromatiques. Le massif provenant des deux CH₂ de l'acétal est toujours présent et ne se déplace pas. Le produit a également été analysé par spectroscopie IR et nous notons la présence du pic du N≡N à 2259 cm⁻¹ ce qui confirme également la réussite de la synthèse.

Malgré la similarité entre la formation du diazonium (HBF₄) et la déprotection du carbonyle (HCl)^{320, 328, 329}, l'acide tétrafluoroborique n'est pas suffisamment fort pour retirer l'acétal.

10.1.1 Greffage électrochimique sur lame d'or

Les synthons **63** obtenus ont été ensuite immobilisés sur or par réduction électrochimique des fonctions diazonium en suivant le protocole présenté en 5.5.1. Une masse de 0,0115g de Spiro[1,3-dioxolane-2,3'-indol]-2'(1'H)-one, 5'-(4-diazophenyl) **63** est dissoute dans 10 mL

d'électrolyte NBu_4PF_6 à 0,1M. La lame d'or utilisée est plongée dans la solution ainsi que deux électrodes de platine servant de référence et de contre-électrode. Trois cycles de balayage du potentiel entre -0,4V et 0,8V par rapport à l'électrode de platine sont effectués. Ces valeurs sont ensuite ajustées pour correspondre à l'ECS. On voit le pic de réduction de la fonction diazonium à -0,035V lors du premier cycle et plus rien de mesurable à partir du 2^{ème} cycle (Figure 84) ce qui montre que la fonction diazonium a bien été réduite.

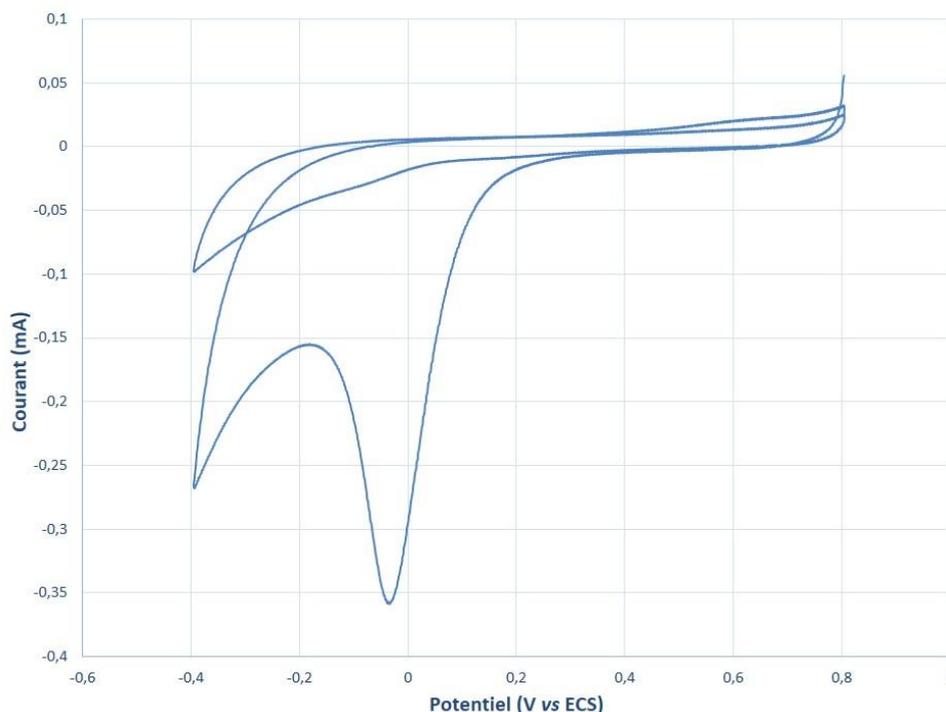


Figure 84 Diagramme d'électroréduction de l'isatine-diazonium 63

La lame d'or greffée fut analysée par spectroscopie IR. Les signaux IR obtenus avant et après greffage sont significativement différents (Figure 85).

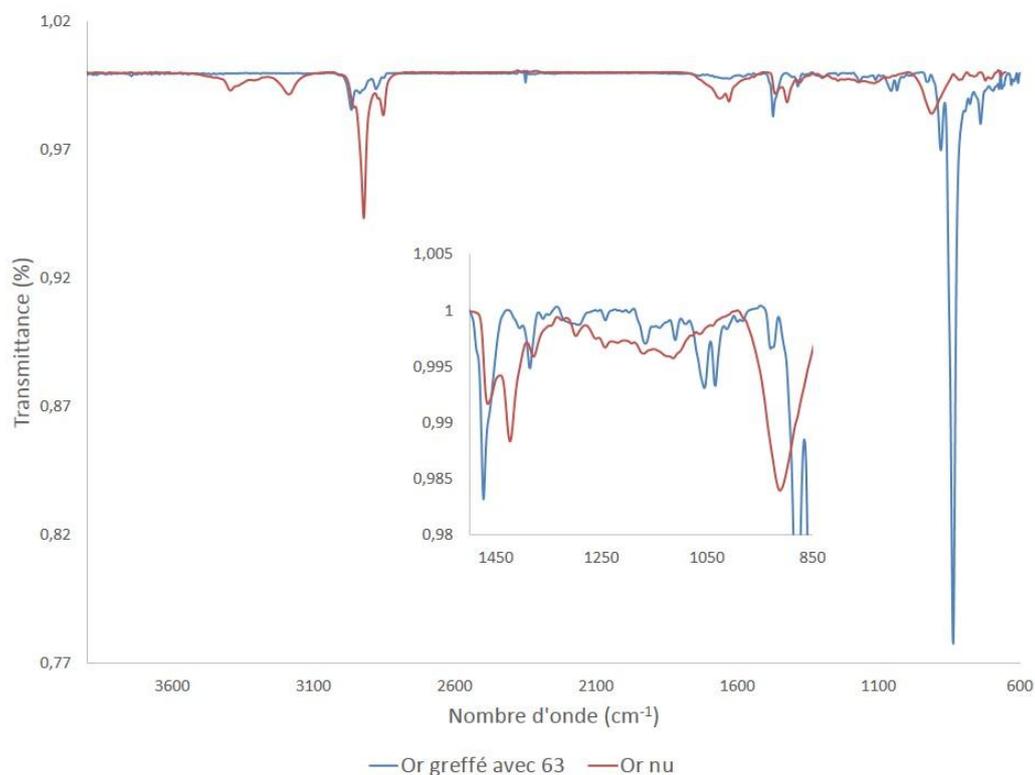


Figure 85 Analyse IR de la lame d'or greffé avec 63

On observe des signaux provenant principalement du groupement acétal et des cycles aromatiques. Par exemple les pics à 1475 cm^{-1} et 1385 cm^{-1} peuvent être attribués à la déformation des C-H des groupements méthyles de l'acétal et ceux à 1055 cm^{-1} et 1035 cm^{-1} à l'élongation des C-O de l'acétal également. Le pic à 880 cm^{-1} vient de la déformation des C=C aromatiques et celui à 835 cm^{-1} plus grand vient de la déformation des C-H aromatiques.

10.1.2 Formation de la fonction diazonium et greffage chimique *in-situ* sur lame de COC

A partir du dérivé Spiro[1,3-dioxolane-2,3'-indol]-2'(1'H)-one, 5'-(4-aminophényl) **57a** nous avons formé le diazonium *in-situ* dans une solution d'acide chlorhydrique à 0,5M à laquelle est ajoutée une solution de nitrite de sodium à 0,3M à 0°C . Le mélange est agité pendant 10 minutes avant que la lame de COC et l'acide hypophosphoreux ne soient ajoutés pour être irradié sous UV pendant 1 heure (Schéma 64).

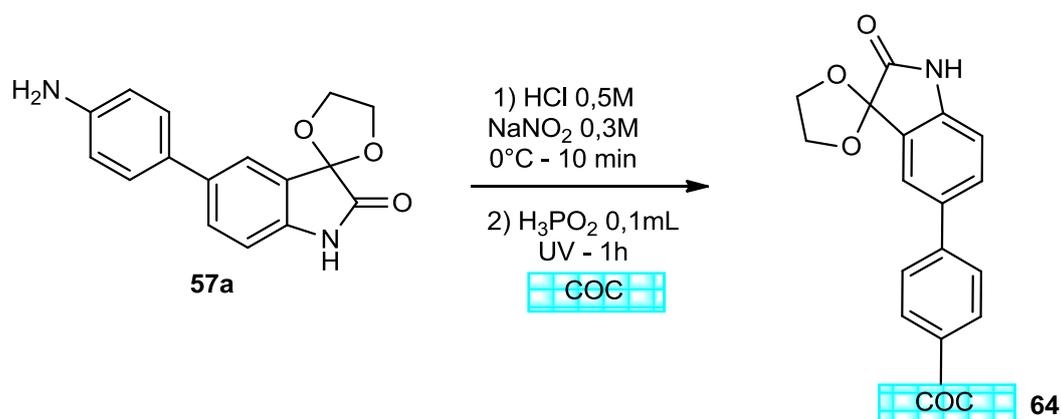


Schéma 64 Greffage du COC par formation in-situ du diazonium sur 62a

Après un rinçage de la lame à l'eau distillée et à l'acétone, nous l'avons analysée par spectroscopie infrarouge (Figure 86). Seuls deux bandes sont significativement différentes du spectre du COC nu ; celles à 1715 cm⁻¹ et à 1625 cm⁻¹ ; et le signal à 2950 cm⁻¹ caractéristique du COC est moins intense, ce qui semble indiquer qu'il y a bien eu une réaction en surface du COC.

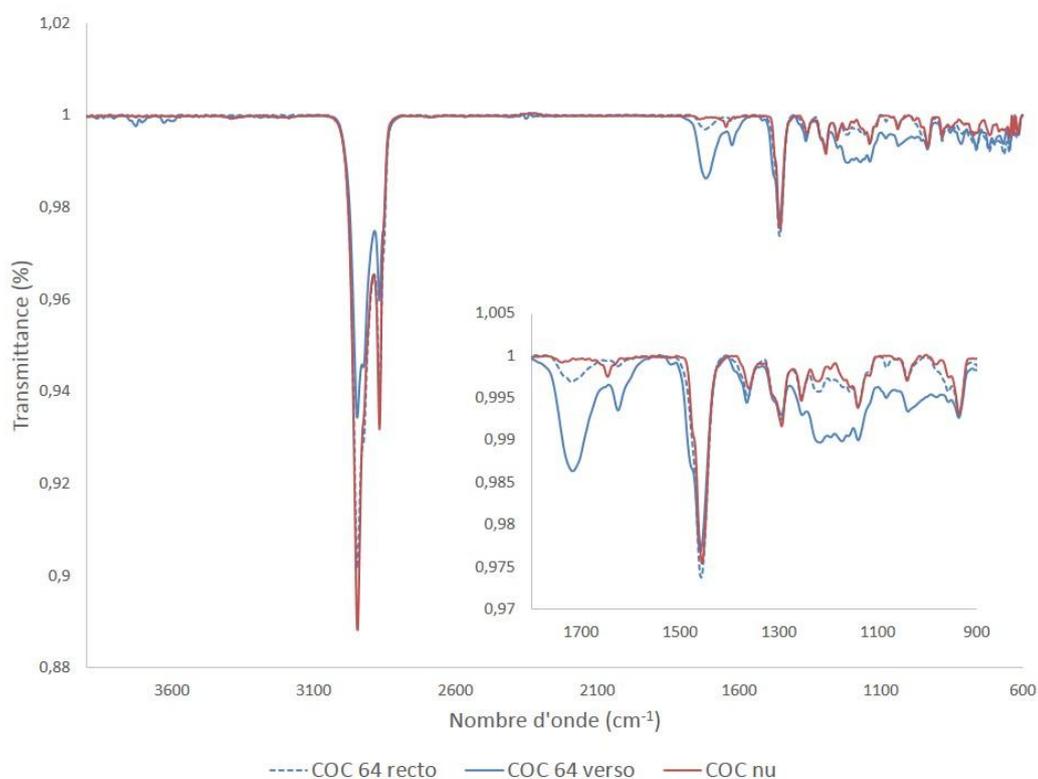


Figure 86 Analyse IR du COC 64

On peut émettre l'hypothèse que la bande à 1715 cm^{-1} provient de l'élongation du $\text{C}=\text{O}$; celle à 1625 cm^{-1} de l'élongation des $\text{C}=\text{C}$ et les signaux à 1220 cm^{-1} et 1080 cm^{-1} de l'élongation des $\text{C}-\text{O}$ de l'acétal. On peut conclure que COC a bien été greffé avec le dérivé **57a**.

Une autre stratégie explorée est basée sur les couplages peptidiques développés dans le chapitre 2.

10.2 Par couplage avec des surfaces fonctionnalisées

Nous avons appliqué les conditions de couplage mises au point avec nos molécules « test » (5.6) et elles seront présentées dans le même ordre, d'abord celles sur les surfaces de $\text{COC}-\text{COOH}$ puis celles en surface $\text{COC}-\text{NH}_2$.

10.2.1 Estérification avec TBTU

Sur une lame fraîchement préparée avec le CBD (COC **18**), nous avons effectué une estérification entre les fonctions acides en surface et la fonction alcool de l'isatine **37** obtenu par couplage de Sonogashira. Dans un pilulier équipé d'un petit barreau aimanté, 1,25 mmol de TBTU et 2 équivalents de DIEA (2,5 mmol, 0,45 mL) dans 3 mL de DMF sont mis en contact avec la lame fonctionnalisée COC **18** pendant 30 minutes pour activer l'acide. Un équivalent d'isatine **37** dans 2 mL de DMF est ensuite ajouté au pilulier et la réaction se poursuit pendant 18 heures à température ambiante (Schéma 65).

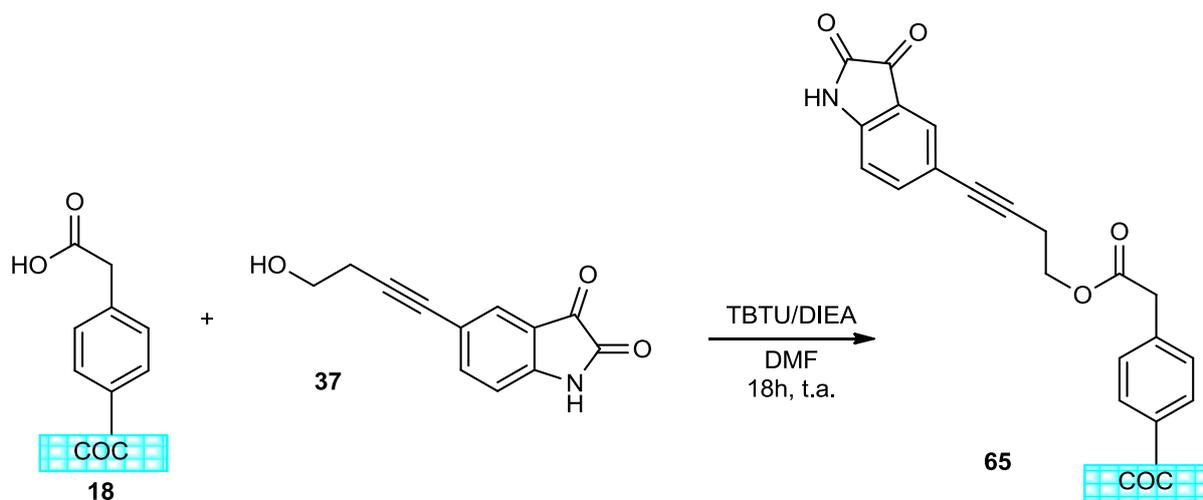


Schéma 65 Schéma réactionnel de l'estérification en surface avec le dérivé d'isatine **37**

Deux lames furent préparées à l'identique ; l'une pour les analyses en spectroscopie IR, l'autre pour des analyses XPS. Une lame témoin a également été préparée en mettant en présence une lame fonctionnalisée type COC **18** avec l'isatine **37** mais sans activation préalable de la surface avec TBTU. Ce témoin doit montrer que l'agent de couplage est nécessaire pour que la liaison ait lieu. Après réaction, les lames sont rincées à l'eau puis à l'acétone et passées 5 minutes aux ultrasons pour éliminer les derniers résidus n'ayant pas réagi.

10.2.1.1 Analyses IR

Les trois spectres sont assez similaires (Figure 87) ; on peut noter la diminution du signal à 2950 cm^{-1} qui pourrait indiquer que la surface du COC est plus éloignée du cristal de spectromètre du fait de l'ajout d'une couche moléculaire supplémentaire.

Certains signaux, même faibles, pourraient être attribués à la structure **65**. La bande à 1750 cm^{-1} proviendrait de l'élongation du C=O de l'ester, à 1690 cm^{-1} du C=O de l'amide, à 1670 cm^{-1} des C=C. On peut attribuer le signal à 1605 cm^{-1} à la déformation de la liaison N-H. La bande à 1375 cm^{-1} est la déformation des C-H des groupements méthyles et à 800 cm^{-1} ce sont les C-H aromatiques. Pour finir les bandes à 1100 et 1020 cm^{-1} peuvent correspondre à l'élongation du C-O de l'ester.

Les signaux du témoin négatif sont similaires à ceux du COC-COOH, ce qui montre que le traitement aux ultrasons est suffisant pour éliminer toute trace d'adsorption en surface. Les lames COC-COOH et témoin 1 sont des lames différentes pour que la surface du témoin 1 ne soit pas détériorée par l'analyse IR avant de faire la réaction, ce qui explique la différence d'intensité entre les deux spectres. Des différences sont quand même notables avec le COC **65**.

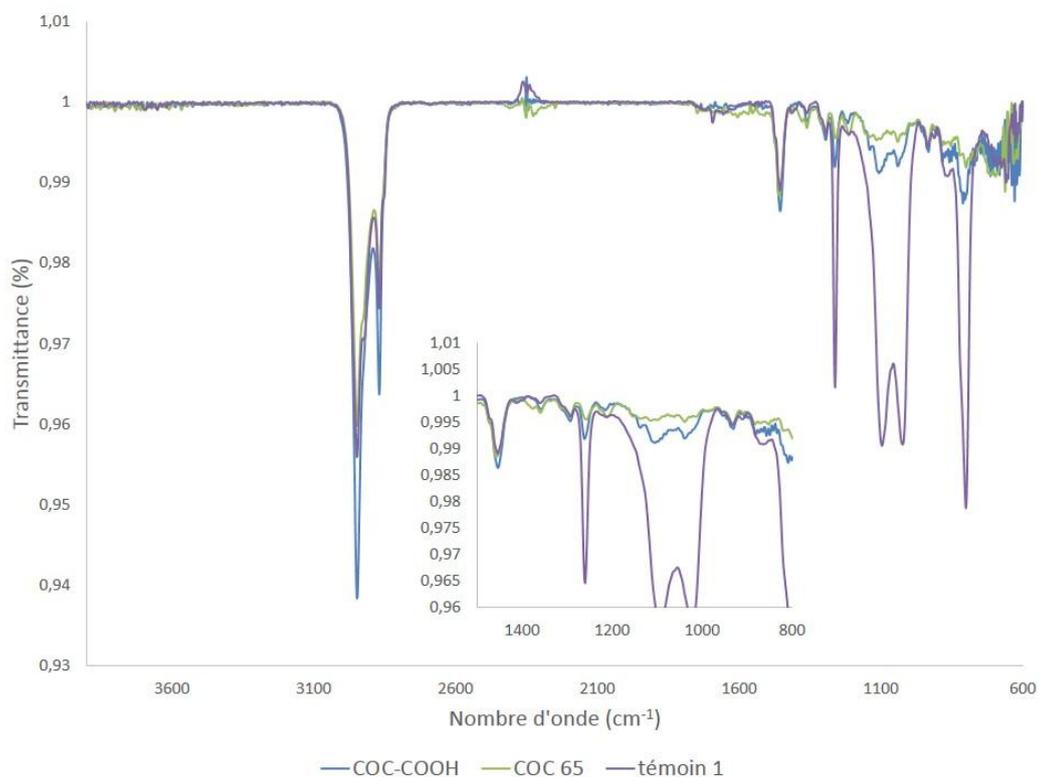


Figure 87 Spectre IR du COC-COOH 18, du COC 65 et du témoin négatif

10.2.1.2 Analyses XPS

La spectroscopie de photoélectrons induits par rayon X (X-Ray Photoelectron Spectroscopy/XPS) permet de déterminer la composition atomique d'une surface. L'irradiation de la surface avec des photons X issus d'une source monochromatique excite les électrons de cœur des atomes présents en surface. Ces électrons seront expulsés avec une énergie spécifique en eV qui sera mesurée par le récepteur. Les signaux obtenus permettront d'obtenir des informations sur la quantité d'atomes présents en surface, sur leur environnement atomique (type de liaison, niveau d'oxydation, etc.)

Nous avons fait ce type d'analyse pour caractériser les surfaces post-couplage peptidique, nous allons les comparer avec le COC natif (Figure 88) et avec les analyses effectuées par Florian Brisset pour sa thèse sur le COC fonctionnalisé avec divers aryldiazoniums.²⁰⁹ Les analyses ont été réalisées par le Dr. Philippe Decorse du laboratoire ITODYS (Université Paris Diderot-Sorbonne Paris Cité).

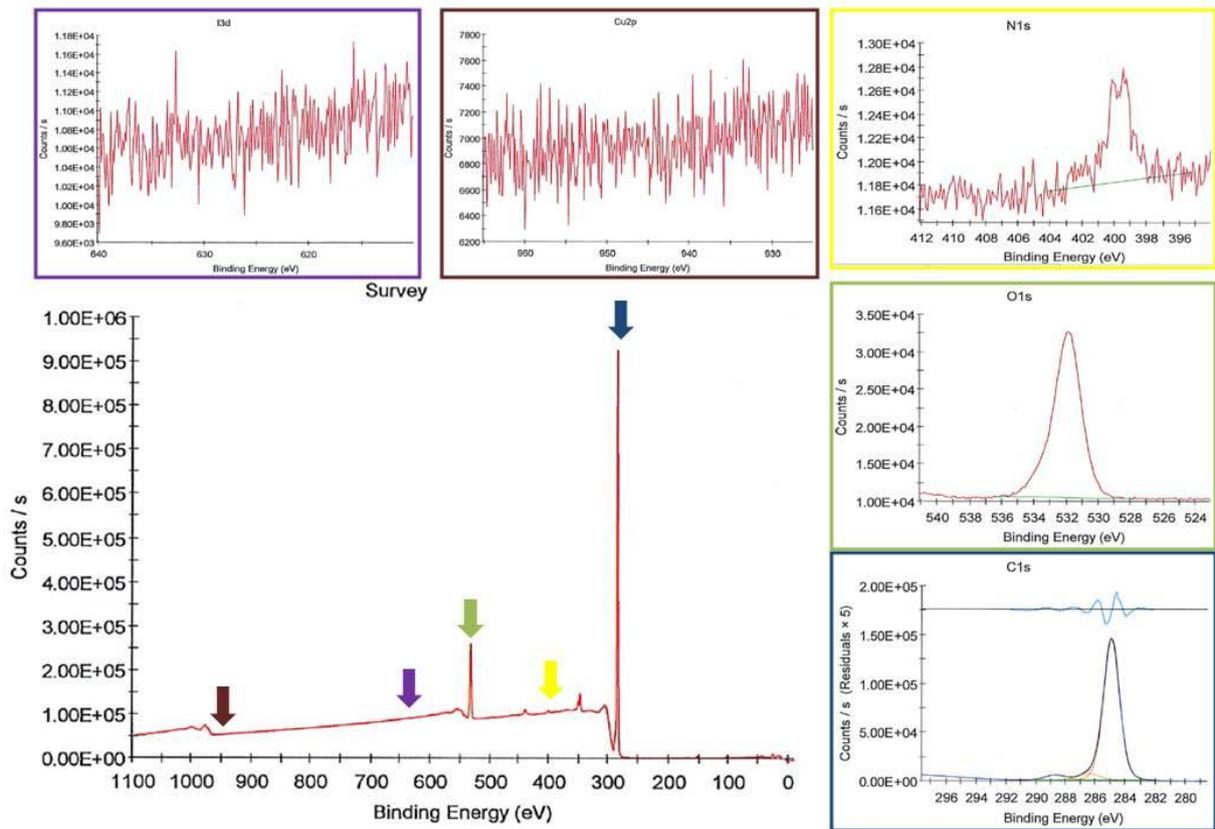


Figure 88 Analyse XPS d'une lame de COC nue

L'analyse du COC brut (Figure 88) présente une grande majorité de carbone (83%) et d'hydrogène, ce qui correspond bien à la composition du COC. Des traces d'oxygène (8,5%) et d'azote (0,5%) sont présentes probablement dues à une contamination gazeuse de la surface ou comme le suggérait Florian Brisset à l'introduction d'oxygène lors de la fabrication du polymère. Les autres énergies mises en évidence (Cu et I) ne montrent aucun pic mais serviront de comparaison pour les surfaces présentées plus loin. Pour rappel, l'analyse XPS du COC **18** par Florian Brisset montrait 88% de C, 9% d'O et 2% de N.

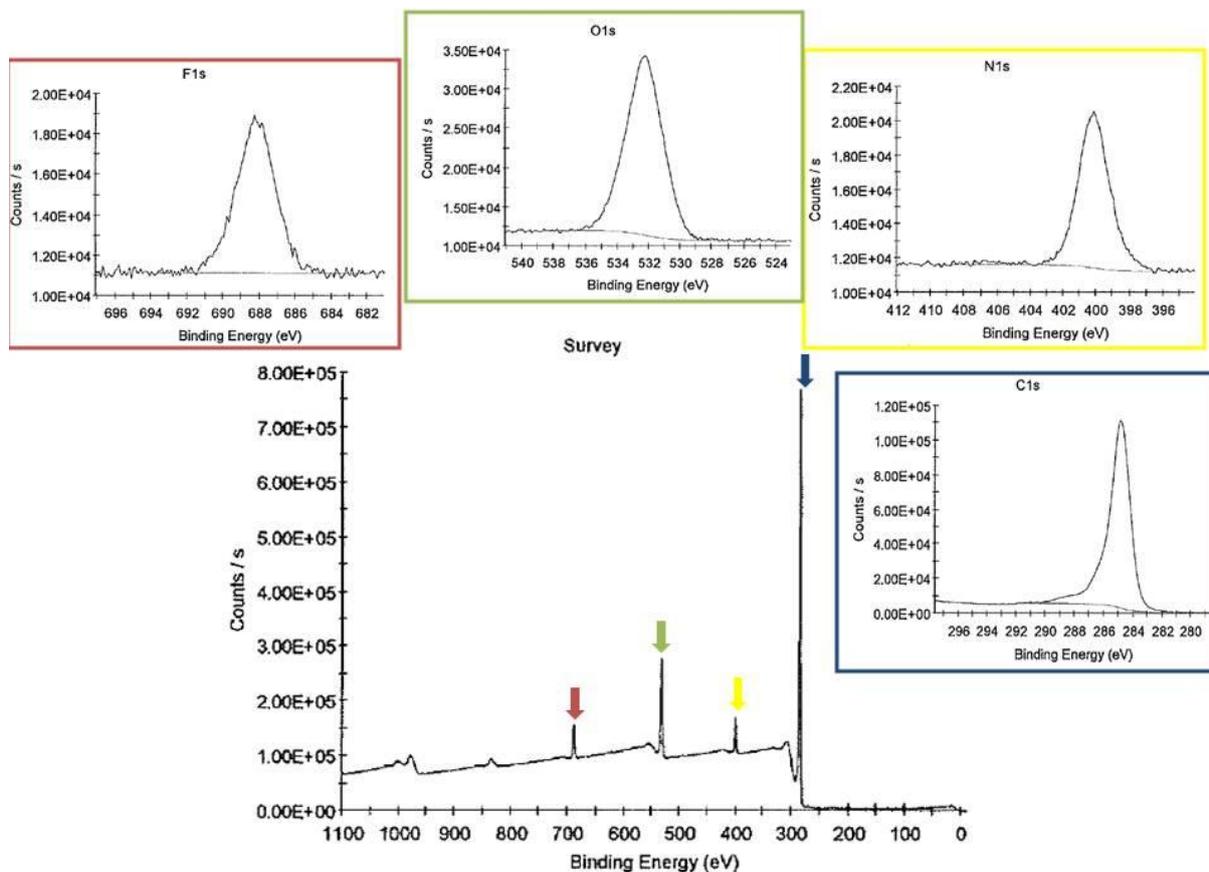


Figure 89 Analyse XPS de la lame COC 78

Le spectre XPS de la lame de COC **65** (Figure 89) montre une légère diminution du pic du carbone (83% à 80,8%), une augmentation des pics correspondant à l'oxygène (8,5% à 10,9%) et à l'azote (0,5% à 5,7%) et l'apparition d'un pic du fluor (2,7%) venant du contre-ion du TBTU (BF_4^-), ce qui laisse penser que l'activation de l'acide par TBTU a bien eu lieu (Schéma 66) mais pas l'accroche de l'isatine. Ce qui est finalement confirmé par l'analyse IR avec la bande à 1550 cm^{-1} que nous n'avions pas attribuée mais qui pourrait venir de l'élongation de la liaison N-O ainsi que celle à 1690 cm^{-1} qui viendrait de l'élongation de la liaison C=N du TBTU.

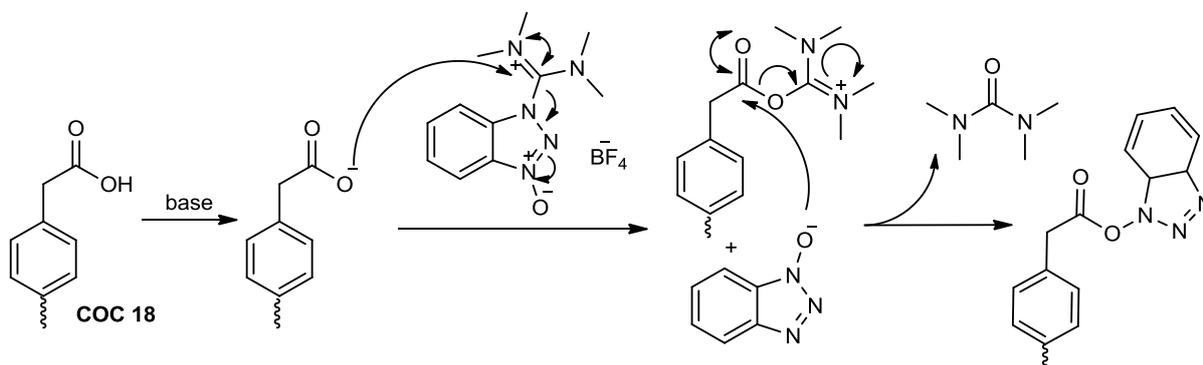


Schéma 66 Activation de la surface acide du COC 18 par TBTU

10.2.2 Couplage peptidique avec EDC/NHS

Toujours sur une surface de COC fonctionnalisée avec CBD, nous avons effectué le couplage avec l'isatine **57a**.

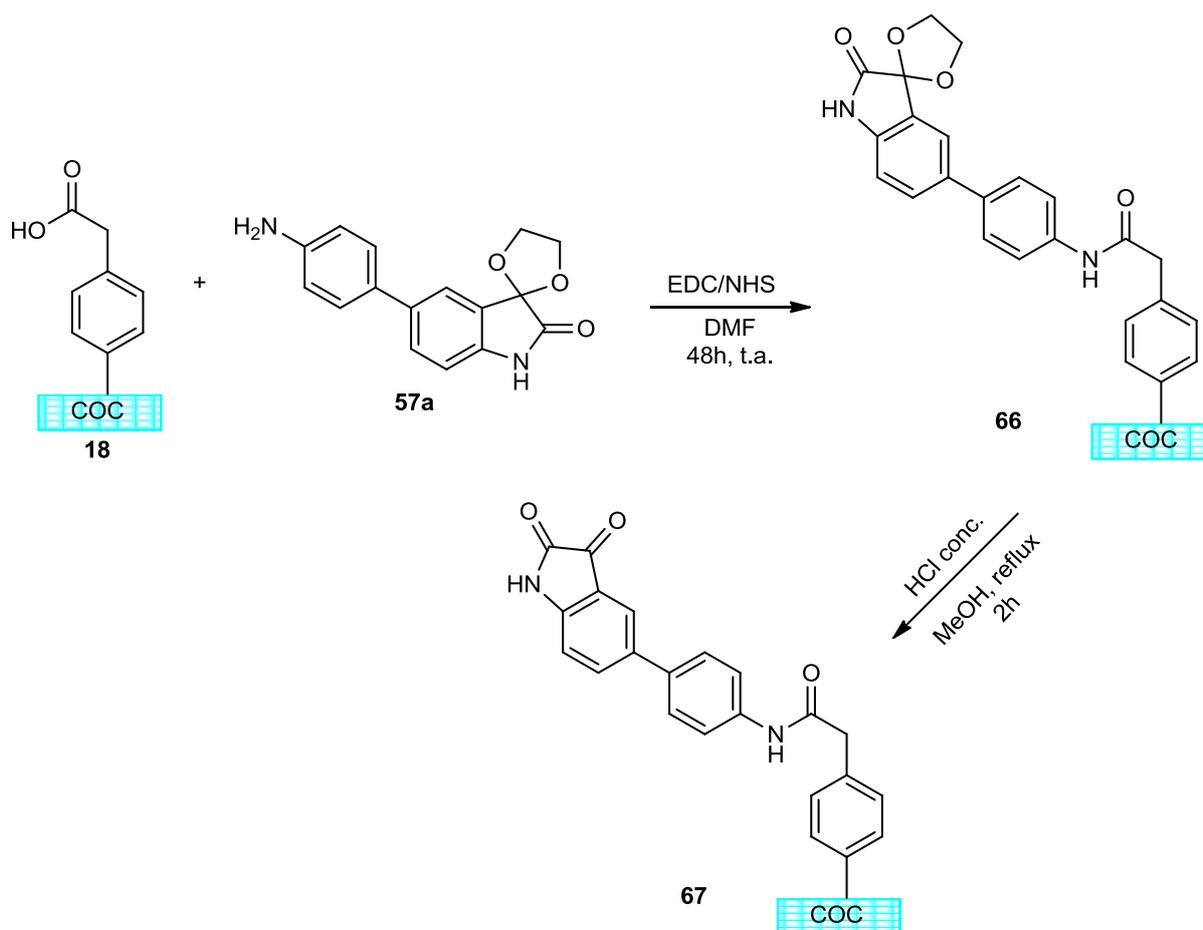


Schéma 67 Couplage peptidique avec EDC/NHS entre le COC 18 et l'isatine **57a** puis déprotection de l'acétal en surface

Pour éviter les problèmes de solubilité des dérivés d'isatine, nous avons préparé nos solutions dans le DMF plutôt que dans l'eau distillée comme il avait été décrit dans le chapitre 2 en 5.6.1.1. Une solution à 0,4M d'EDC dans 3 mL de DMF ainsi qu'une solution à 0,4M de NHS dans 5 mL de DMF sont préparées. N'ayant plus qu'une faible quantité d'isatine **57a** disponible au moment de l'expérience, nous avons fait le témoin 1 (lame fonctionnalisée avec isatine mais sans agent de couplage) avec l'isatine **57b** qui a la fonction amine en méta sur le cycle aromatique et non en para par rapport au motif isatine. Le témoin 2 est une lame de COC nue mise en présence des agents de couplage mais sans dérivé d'isatine.

Après 48 heures de réaction (Schéma 67) dans des flacons fermés à température ambiante, les lames sont rincées à l'eau puis à l'acétone avant d'être analysées par spectroscopie IR (Figure 90). La lame COC **66** est ensuite mise dans un ballon contenant 2 mL d'HCl concentré dilué dans 6 mL de méthanol pour être chauffée à reflux pendant 2 heures dans le but de retirer la protection acétal du carbonyle (Schéma 67). La lame est ensuite analysée par spectroscopie IR après rinçage à l'eau distillée et à l'acétone et traitement aux ultrasons (5 minutes) (Figure 90).

10.2.2.1 Analyses IR

Le signal à 3385 cm^{-1} vient de l'élongation de liaison N-H, type de liaison présent deux fois sur les COC **66** et **67**. Les bandes entre 1815 cm^{-1} et 1730 cm^{-1} peuvent être attribuées à l'élongation de groupement C=O. À 1628 cm^{-1} on peut considérer qu'il s'agit de la déformation de la liaison N-H tandis qu'à 1568 cm^{-1} c'est l'élongation de liaison C=C. À 1455 cm^{-1} on peut attribuer cette bande à la déformation de la liaison C-H qui vient du CBD car elle est présente sur les 3 spectres, par contre à 1480 cm^{-1} cette bande est spécifique au C-H du groupement acétal et disparaît après déprotection. Idem pour la bande à 1083 cm^{-1} qui provient de l'élongation de la liaison C-O de l'acétal et qui disparaît sur le spectre du COC **67**. La bande à 1213 cm^{-1} correspond à l'élongation de la liaison C-N et est présente sur les spectres des deux lames de COC traitées ce qui montre que le traitement acide n'a pas cassé la liaison amide ou endommagé l'isatine. Ces spectres confirment que les réactions de couplage et de déprotection en surface ont été efficaces. Les analyses IR des lames utilisées comme témoins négatifs (Figure 91) sont très différentes des spectres précédents (Figure 90) ce qui confirme de nouveau que le couplage avec EDC/NHS fonctionne.

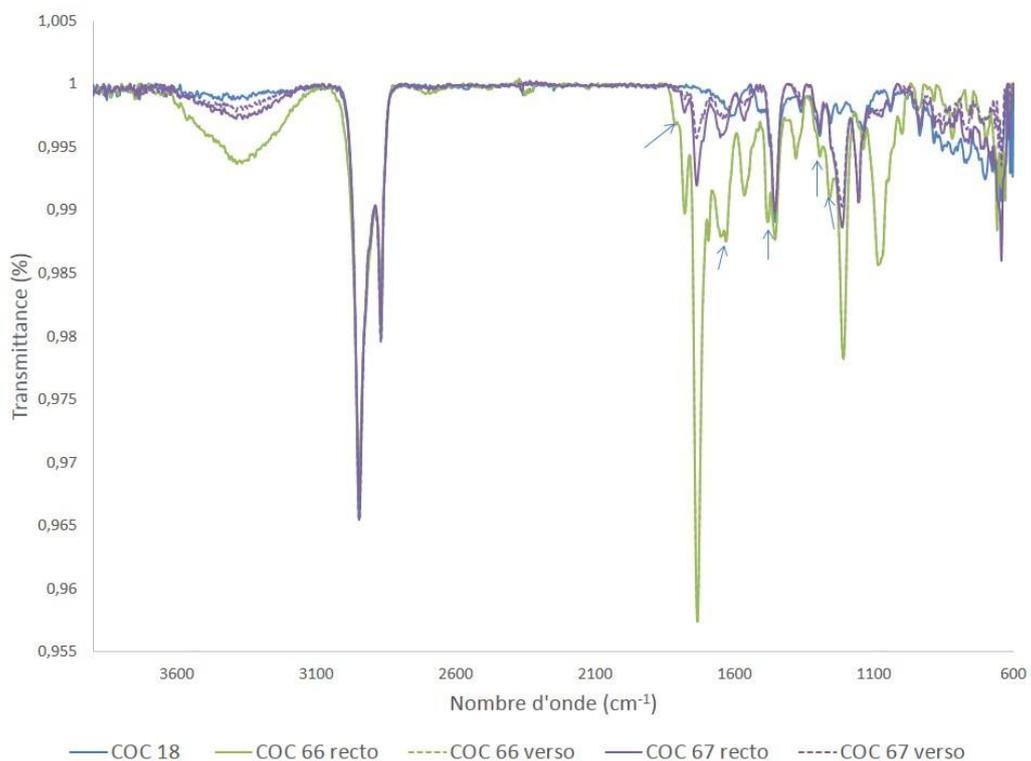


Figure 90 Analyses IR des lames obtenues après couplage entre le COC 18 (bleu) et l'isatine 57a (verte) puis déprotection de l'acétal en surface (violet)

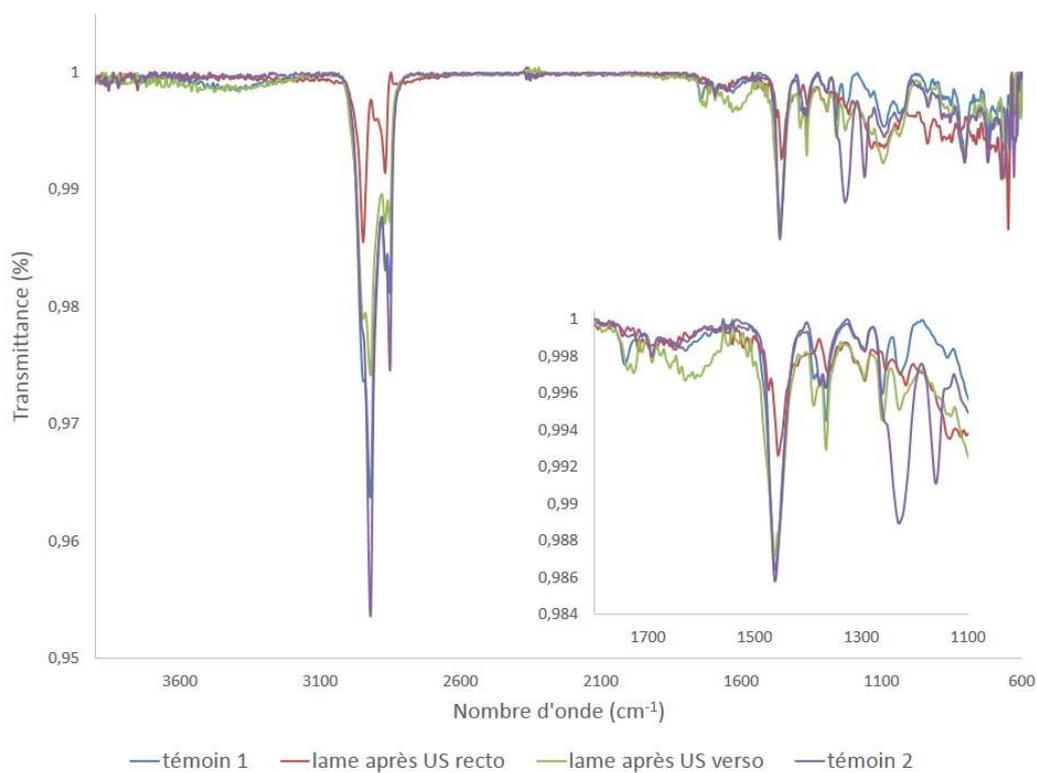


Figure 91 Analyses IR des témoins négatifs pour COC 66

que le COC **19** n'a pas réagi. Par rapport au COC brut où les traces d'oxygène s'élevaient à 8,5% et l'azote à 0,5%, nous notons une augmentation de leur présence en surface. La grande quantité d'oxygène en surface (10,7%), ainsi que les 2% d'azote ne sont pas en adéquation avec notre hypothèse du COC **19** non modifié. En effet le signal de l'azote aurait dû être en quantité plus importante si nous avions encore l'amine non-réagiée en surface. Mais la présence de fluor laisserait plus penser à une pollution de la surface qu'à une réelle réaction ou activation de l'amine. Ces données sont en corrélation avec celles décrites dans le chapitre 2 où nous n'étions pas certains de l'efficacité de ce couplage et nous permettent donc de conclure qu'il ne fonctionne pas dans nos conditions expérimentales.

10.2.4 Couplage de Sonogashira en surface

Nous avons préparé des surfaces de COC et d'or possédant des fonctions alcynes disponibles en surface pour pouvoir effectuer des couplages de Sonogashira directement avec l'iodoisatine. Cette technique nous évite les étapes de purification liées à la synthèse. Le couplage de Sonogashira peut être effectué entre une surface halogénée et un dérivé alcyne^{237, 330, 331} ou bien entre une surface alcyne et un dérivé halogéné.^{239, 332} Nous avons décidé d'appliquer les mêmes conditions opératoires sauf que les fonctions réactionnelles sont inversées, l'iode sur l'iodoisatine et la triple liaison en surface.

Nous avons d'abord expérimenté le couplage de Sonogashira en surface d'Or puis sur le COC.

10.2.4.1 Sur Or

La surface d'Or **16** est placée dans un Schlenck contenant une solution de 5 mg de Pd(PPh₃)₂Cl₂, 10 mg de CuI dans 5 mL de DMF. Après avoir placé le milieu sous atmosphère inerte (N₂), 50 mg d'iodoisatine **28** et 2 mL de triéthylamine sont ajoutés. Le mélange est chauffé à 60 °C avec une agitation modérée pendant 4 heures (Schéma 69). La lame est rincée avec du diéthyléther, passée aux ultrasons et rincée une dernière fois avec de l'éthanol avant d'être analysée.

Deux témoins négatifs furent également préparés ; le premier est une lame d'or nu en condition de couplage et le second une lame d'or **16** en condition de couplage mais sans iodoisatine pour être certain que les pics visibles en IR ne proviennent pas des catalyseurs.

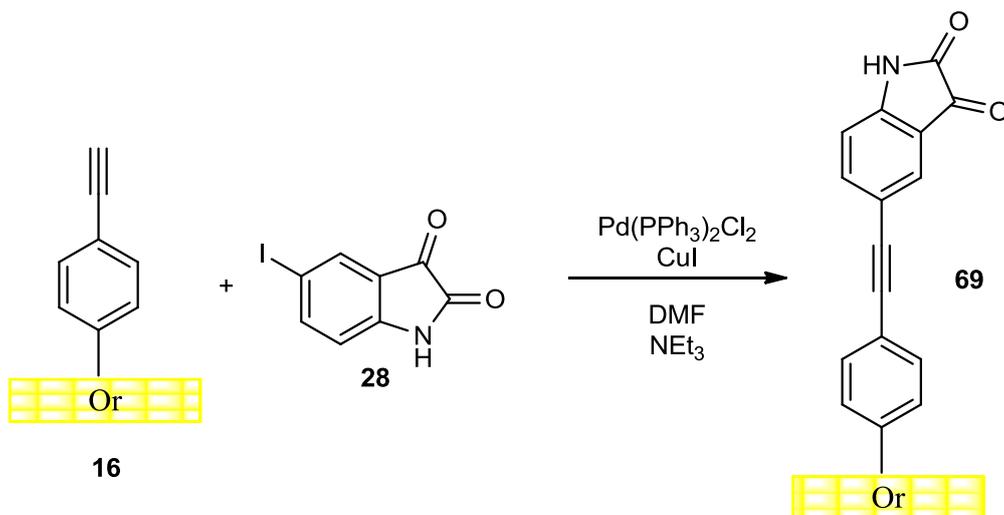


Schéma 69 Couplage de Sonogashira sur surface d'Or

10.2.4.1.1 Analyses IR

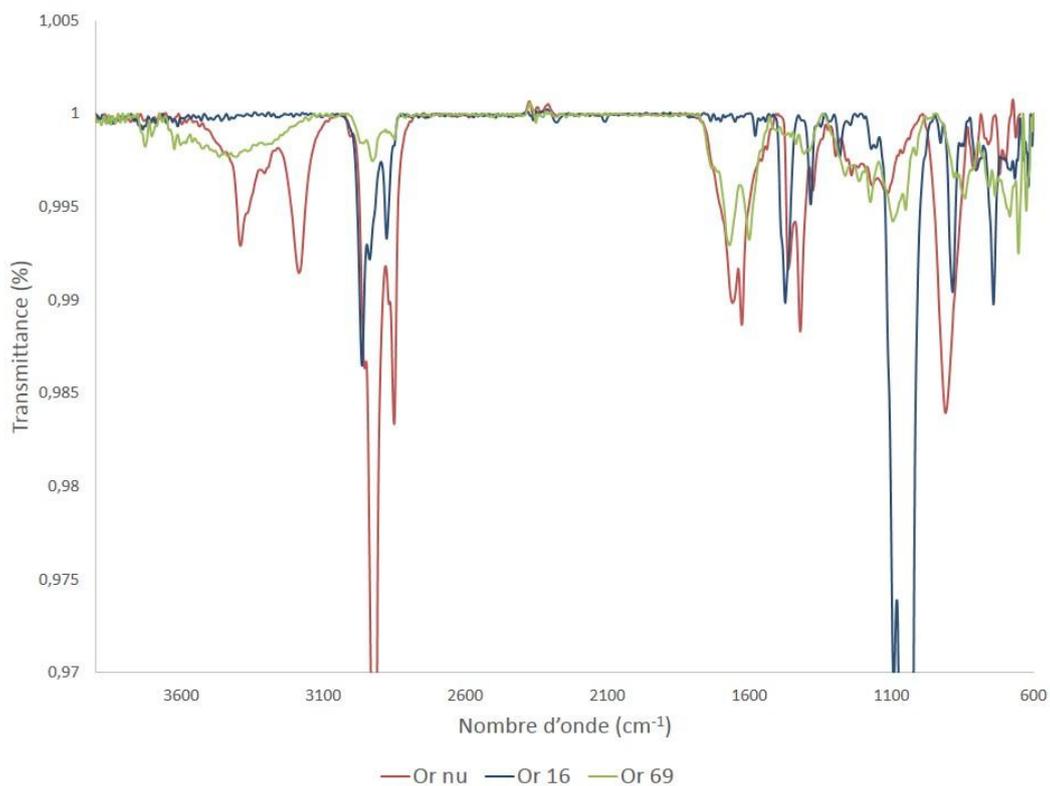


Figure 94 Spectres IR de la surface d'Or nu, d'Or 16 et d'Or 69

Le spectre IR de la lame Or **69** confirme que le couplage a fonctionné car nous retrouvons des signaux différents de la lame d'or nu et de la lame d'Or greffée avec EBD (Or **16**) (Figure 94). Premièrement le pic à environ 2950 cm^{-1} , correspondant à des élongations de liaison C-H

d'alcane polluant la surface de l'or, diminue au fur et à mesure de l'ajout de couche organique sur la surface. Et deuxièmement nous pouvons attribuer des pics, caractéristiques de l'isatine, qui n'étaient pas présents sur l'Or **16**.

Nous pouvons attribuer la large bande à 3400 cm^{-1} à l'élongation du N-H ; à 1675 cm^{-1} à l'élongation du C=O de l'amide, le coude à 1710 cm^{-1} pouvant être le C=O de la cétone. Les bandes à 1600 cm^{-1} et 1400 cm^{-1} proviennent des C=C aromatiques. À 1260 cm^{-1} on observe la bande correspondant à l'élongation de la liaison $\text{C}_{\text{ar}}\text{-N}$. À 1174 cm^{-1} cette bande correspond à la déformation des liaisons $\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}$ des cétones, soit le cycle pyrrole dans le cas de l'isatine.

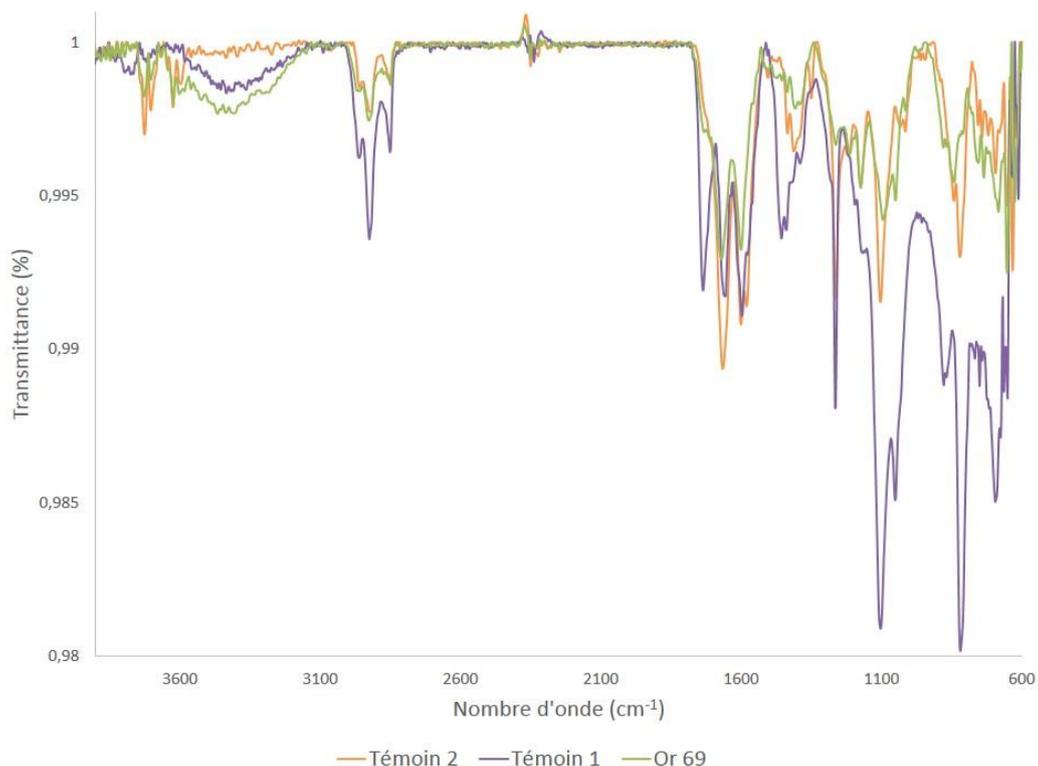


Figure 95 Spectres IR des témoins négatifs du couplage de Sonogashira sur Or

Les analyses IR des témoins négatifs (Figure 95) montrent que l'adsorption sur la surface est importante que l'or soit nu ou fonctionnalisé mais des différences dans les énergies d'absorption des ondes infrarouge entre les différents spectres permettent de confirmer que la réaction en surface a bien eu lieu. L'absence de la bande à 3400 cm^{-1} sur le témoin 2 valide notre attribution au signal du N-H de l'isatine, de même que celle de la bande à 1050 cm^{-1} qui

pourrait être attribué à l'élongation de l'amine $O=C-N$ ou encore de celle à 850 cm^{-1} qui vient de la déformation des liaisons $C=C$ aromatiques.

10.2.4.1.2 Analyse SPR

Grâce à leur nature métallique, nous pouvons utiliser les lames d'or préparées pour le couplage de Sonogashira comme transducteur en SPR. Nous avons étudié comment les modifications apportées à la surface ont modifié l'angle de réflexion de la lumière et le pourcentage de réflectivité.

Pour se faire, nous avons effectué nos analyses sur un appareil SPRI-Plex II du fabricant Horiba-Genoptics. Ma collègue Flavia Fioresi a déposé les lames sur un prisme nu en assurant le contact entre eux grâce à une huile particulière possédant le même indice de réfraction que le prisme. Cet assemblage est placé dans l'appareil qui, une fois fermé hermétiquement grâce à un joint, permet le passage d'une solution tampon.

Pour chaque lame, nous avons effectué une cartographie de la zone à analyser (Figure 96) en choisissant des points « témoins » sur une partie de la lame d'or n'ayant pas été fonctionnalisée et des points d'étude sur une partie fonctionnalisée. Ainsi, comparer les signaux nous évite d'avoir à prendre en compte les différences existant entre deux lames d'or.

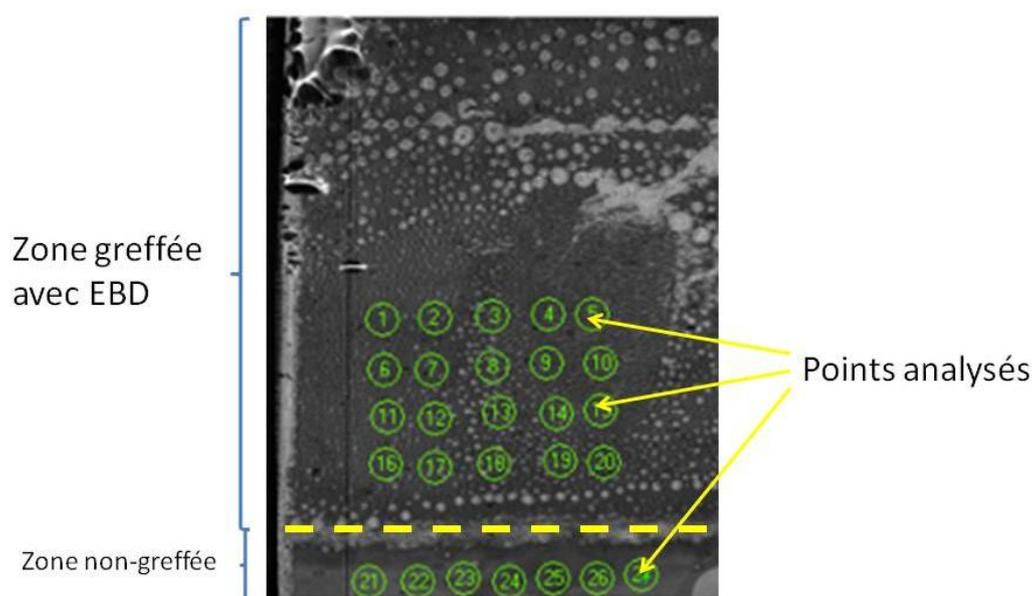


Figure 96 Cartographie d'une lame d'or effectuée sur le logiciel

Nous obtenons une courbe pour chaque point sur la cartographie, après les avoir moyennés par catégorie de point « témoin » ou « d'étude », le spectre suivant (Figure 97) est construit pour une analyse statique :

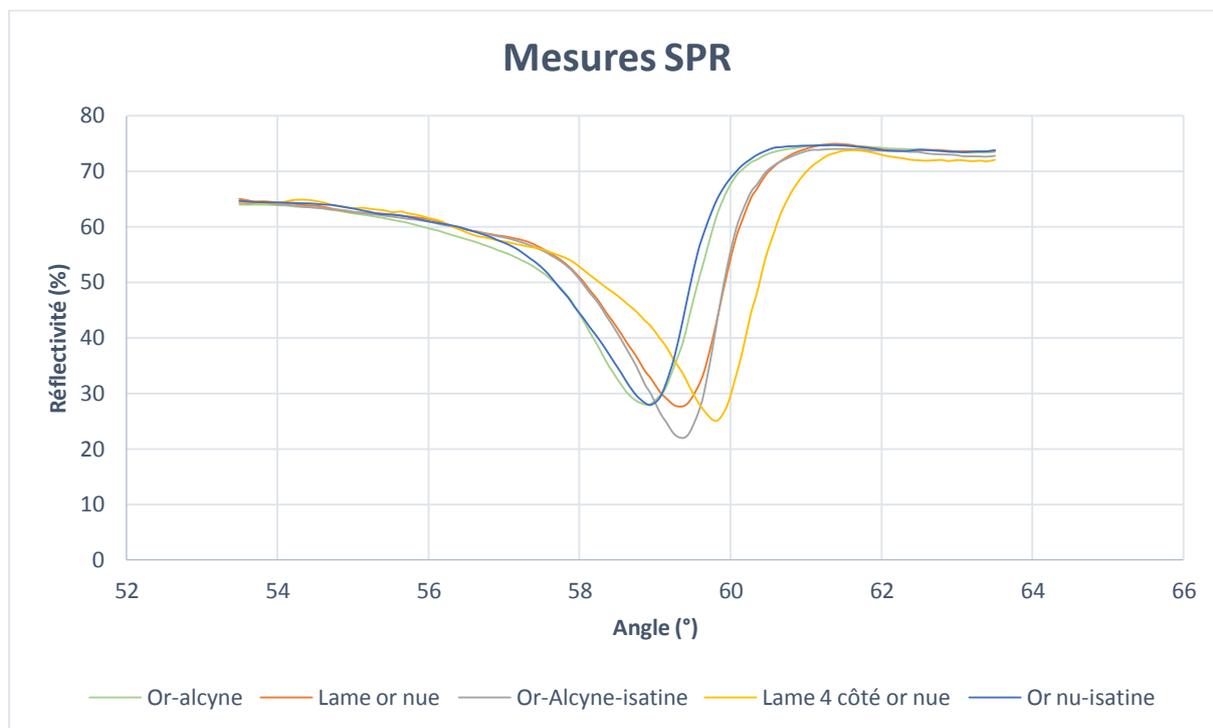


Figure 97 Courbes SPR obtenues pour les lames d'Or nu, Or 16 et Or 69 ainsi que la lame témoin

En fixant la longueur d'onde de la lumière incidente, on peut observer les changements induits par la fonctionnalisation de la surface. Si cette longueur d'onde n'est pas absorbée par la couche moléculaire, on observe un décalage dans l'angle de réflexion ; par exemple entre la lame d'or nue (orange) et la lame d'or fonctionnalisée avec l'EBD (vert clair) l'angle passe de 59,3° à 58,7°. Lorsque par contre la couche moléculaire absorbe la longueur d'onde choisie, la courbe change également en pourcentage de réflectivité ; c'est le phénomène qu'on voit avec la lame ayant subi le couplage de Sonogashira (gris) par rapport au côté non fonctionnalisé de la lame (jaune). Un résultat étonnant concerne la lame témoin d'or nu ayant été mis en condition de couplage (bleu foncé) qui présente un même profil que la lame d'or fonctionnalisée avec l'EBD (bleu clair). Cela pourrait dire que l'adsorption sur la lame nue a une épaisseur comparable à la couche d'EBD.

10.2.4.2 Sur COC

De la même manière que sur l'or, une lame de COC fonctionnalisée avec l'EBD est plongée dans une solution contenant 5 mg de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ et 10 mg de CuI dans 5 mL de DMF. Après mise sous atmosphère inerte (N_2), 50 mg d'iodoisatine et 2 mL de NEt_3 sont ajoutés puis le mélange est chauffé à 60 °C pendant 4 heures (Schéma 70).

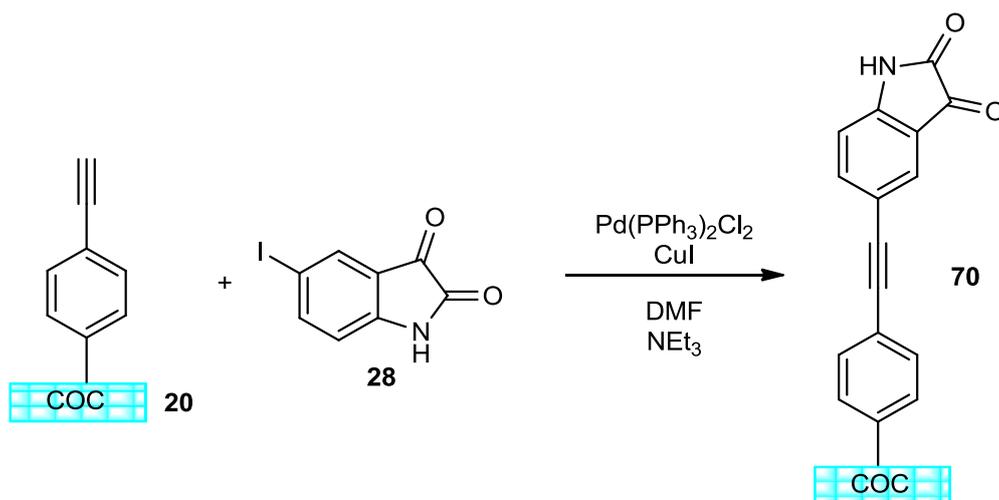


Schéma 70 Schéma réactionnel du couplage de Sonogashira sur COC 20

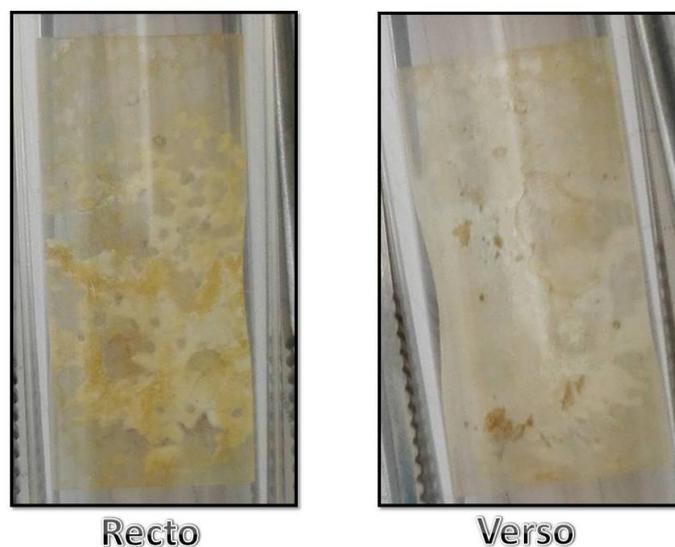


Figure 98 Photo des lames de COC ayant subi le couplage de Sonogashira

Après la réaction, les lames sont rincées avec Et_2O puis sous ultra-sons et enfin avec de l'éthanol. Deux témoins négatifs ont été préparés, le premier pour étudier si les conditions de

couplage avaient un effet sur le COC et le deuxième pour s'assurer de la nécessité du catalyseur pour relier l'iodoisatine à la surface.

Les lames obtenues après ce couplage sont visuellement différentes des lames de COC natives et des témoins négatifs (Figure 98), ce qui donne déjà une preuve que le couplage fonctionne.

10.2.4.2.1 Analyses IR

Sur le spectre IR de la lame de COC **70** (Figure 99) nous retrouvons les signaux vus pour l'Or **69**, tels que la bande à 3350 cm^{-1} qui correspond à l'élongation du N-H, les bandes à 1712 cm^{-1} et 1674 cm^{-1} pour chacun des C=O ou encore les bandes à 1610 cm^{-1} et 1454 cm^{-1} pour les C=C aromatiques. On peut également noter la présence du petit signal à 2300 cm^{-1} qui vient de l'élongation de la liaison C≡C, la bande à 1514 cm^{-1} peut aussi être attribuée au N-H d'un amide. À 1165 cm^{-1} , on retrouve la déformation des liaisons C-C du cycle pyrrole et à 1271 cm^{-1} , l'élongation de la liaison C-N. Pour finir on peut attribuer les bandes à 883 cm^{-1} et 838 cm^{-1} aux liaisons C-H aromatiques.

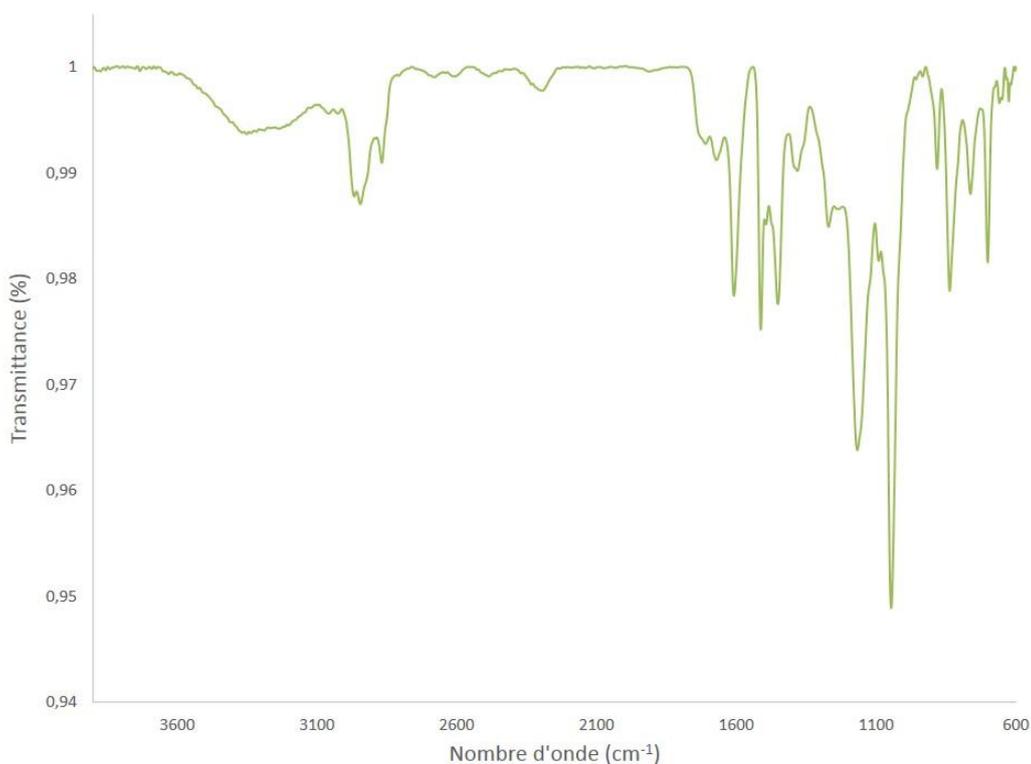


Figure 99 Analyse IR de la lame de COC **70**

10.2.4.2.2 Analyses XPS

L'analyse XPS des lames de COC ayant subie le couplage de Sonogashira a été effectuée sur deux points différents de la même lame de COC **70**. Les résultats pour les deux points sont très similaires (Figure 100 et Figure 101). Le pic du carbone a beaucoup diminué par rapport à la lame de COC nu, montrant que la couche moléculaire atteint sans doute quelques nanomètres et que le COC n'est plus autant responsable pour les signaux obtenus en XPS. Le pic du C est la contribution de quatre différents types de carbones : C1s à 284,8 eV pour les C-C, C1s A à 286,0 eV pour les C≡C, C1s C à 291,1 eV pour les O=C-N et C1s B à 287,8 eV pour les C=O. Ces différents types de carbones correspondent bien aux carbones de l'isatine couplée en surface via une triple liaison. L'oxygène représente 12% des atomes détectés et l'azote 5,3% ce qui équivaut globalement à 1 N pour 2 O de l'isatine. Pour finir on détecte des traces de cuivre (0,5%) et d'iode (0,8%) qui proviennent sans doute de l'iodure de cuivre utilisé comme co-catalyseur du couplage de Sonogashira et qui aurait été mal éliminé de la surface.

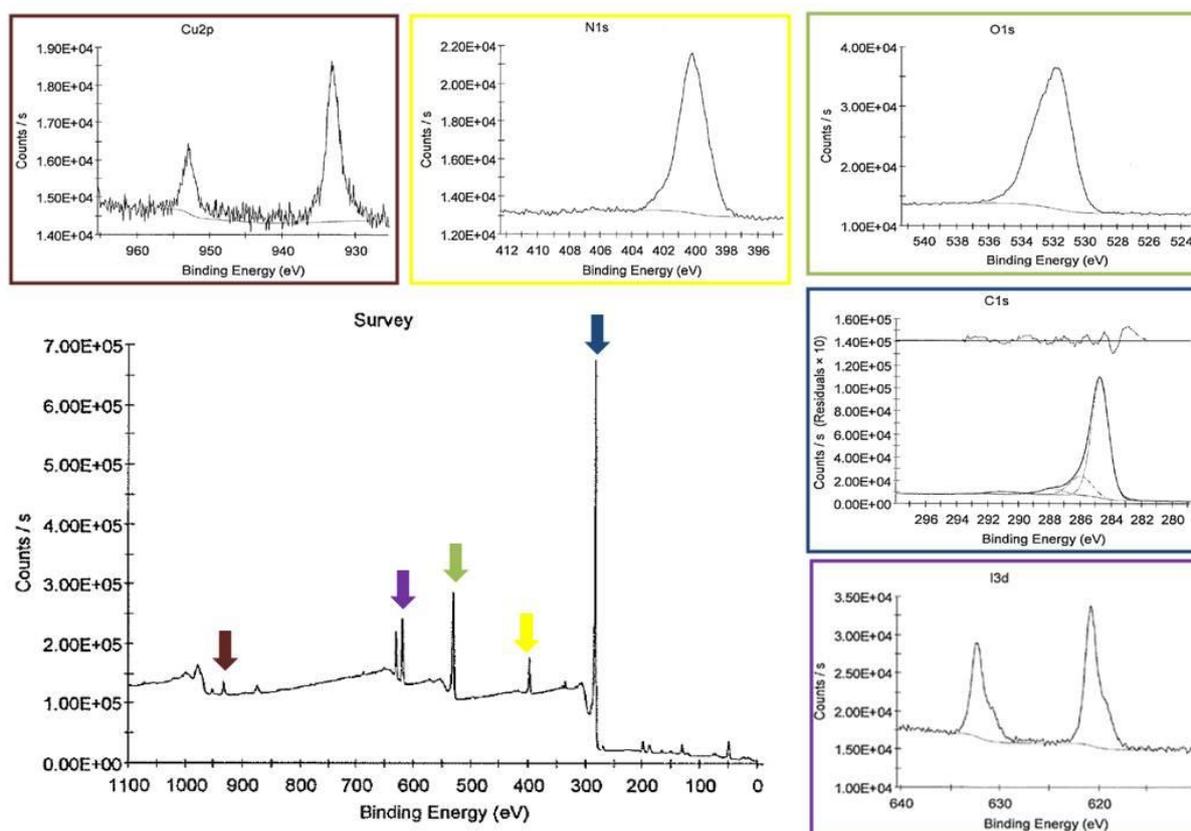


Figure 100 Analyses XPS du COC 70 - point 1

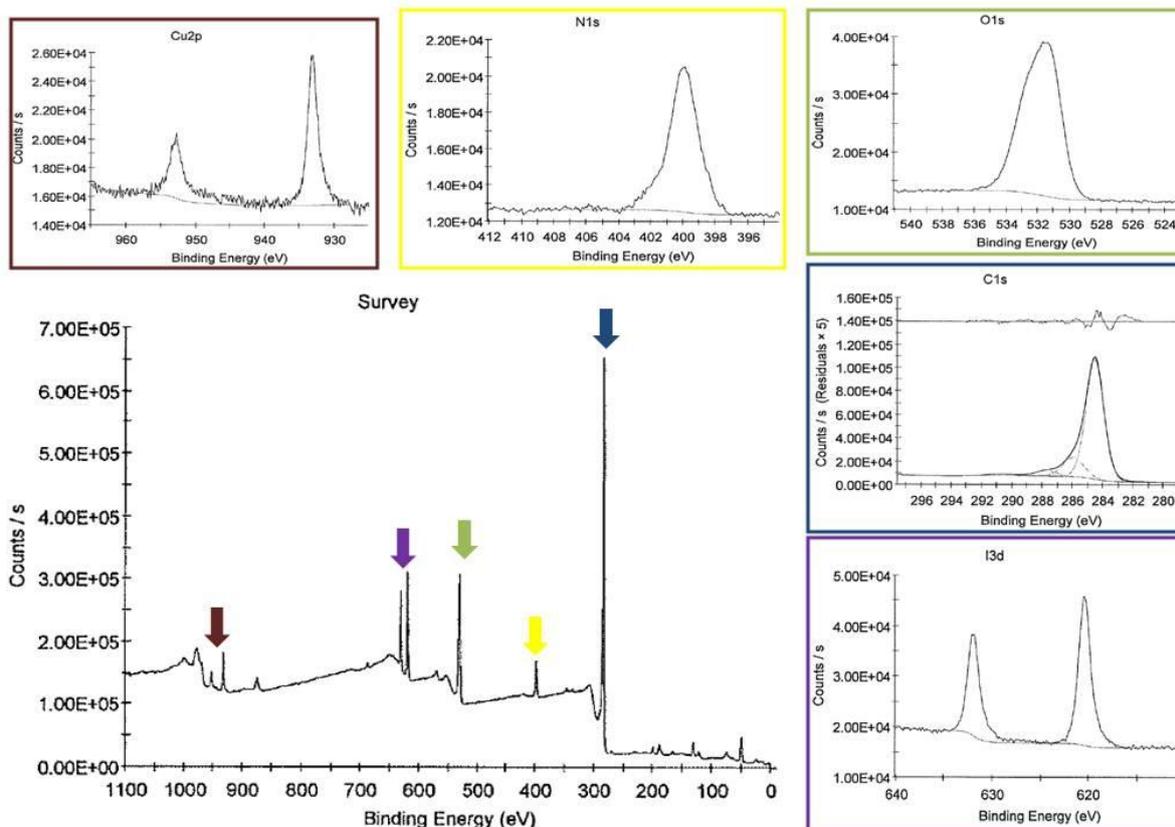


Figure 101 Analyses XPS du COC 70 - point 2

10.2.4.2.3 Effet du COC fonctionnalisé sur l'adhérence bactérienne

L'effet de la fonctionnalisation du COC sur l'adhérence bactérienne a été évalué par dénombrement. Cette étude a été effectuée en collaboration avec le laboratoire LSM (laboratoire de microbiologie – Signaux et Microenvironnement), des lames (4) de COC 70 qui ont été utilisées pour faire ces tests dans les mêmes conditions, par Thomas Clamens, doctorant au LSM.

10.2.4.2.3.1 Protocole

Les études sur COC-diazonium ont été menées sur la souche bactérienne PA01 de *Pseudomonas Aeruginosa*, tandis que pour le COC 70 présentant l'isatine en surface, nous avons utilisé la souche PA14 qui est plus virulente que PA01 et qui est également le groupe clonal le plus commun à travers le monde.³³³

Les bactéries sont mises en pré-culture dans 3 mL de milieu Luria Bertani (LB) qui est un bouillon nutritif riche. Après 24 heures d'incubation à 37 °C sous agitation, ce qui leur a permis d'augmenter en nombre et de retrouver une physiologie normale suite à leur

conservation préalable dans des cryotubes à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; elles sont passées en centrifugeuse. La centrifugation permet de retirer le milieu LB et de le remplacer par de l'eau physiologique stérile. Cette étape est répétée 3 fois.

La concentration de la suspension est ajustée à 0,1 unité d'absorbance (UA) mesurée par la densité optique de la solution à 580 nm sachant que le volume final souhaité est de 5 mL. Les lames à analyser ainsi que les témoins (lame de verre comme témoin positif, lame de COC brut comme témoin de référence) sont stérilisés sous irradiations UV pendant 15 minutes avant d'être placés dans des tubes à essai et recouvert de la solution bactérienne avant une incubation de 2 heures à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ce protocole est décrit dans la Figure 102.

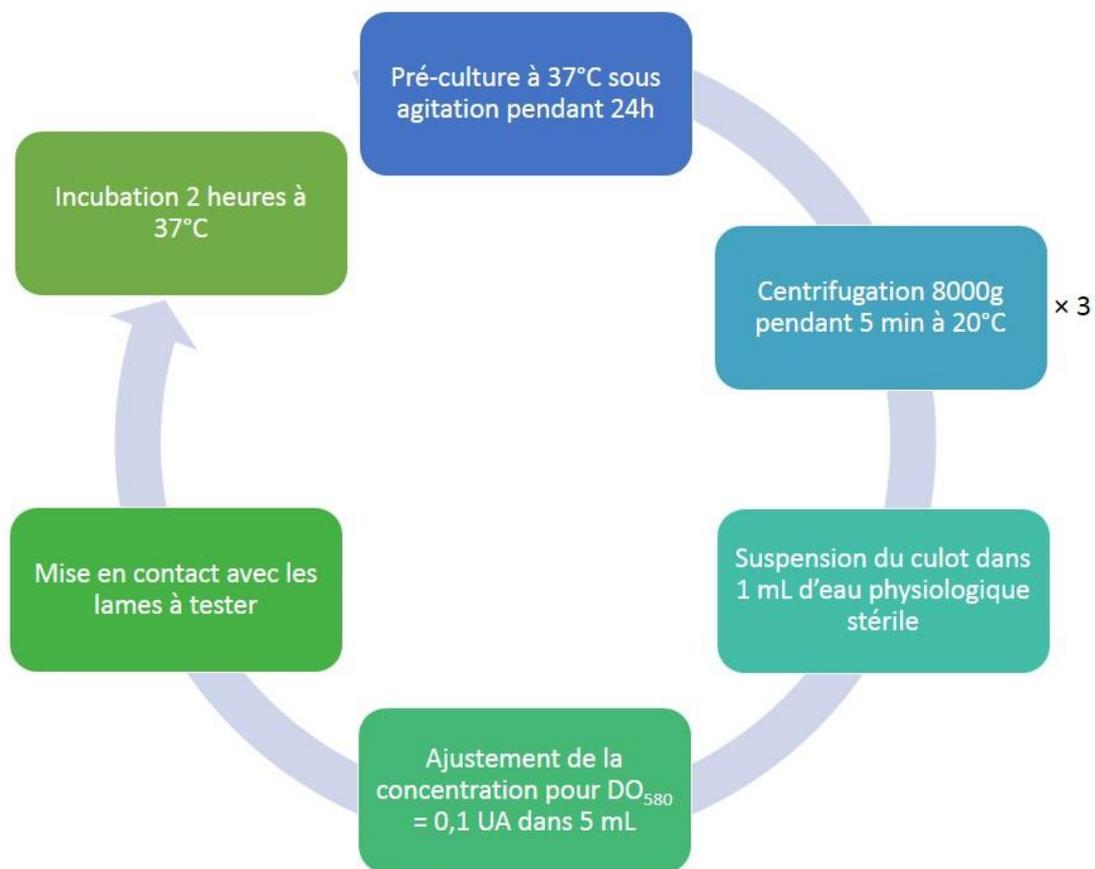


Figure 102 Protocole de préparation de la solution bactérienne utilisée pour l'analyse de l'adhérence

Après l'incubation, les lames sont plongées dans de l'eau physiologique stérile puis passées aux ultrasons pour « décrocher » les bactéries ayant adhéré à la surface. A partir de l'eau récupérée, contenant les bactéries, on réalise des dilutions en cascades de 10^0 à 10^{-8} pour ensuite ensemercer des boîtes de gélose avec 0,1 mL de solution à chacune des

concentrations préparées. La solution est étalée sur la gélose et les boîtes sont mises à l'incubateur pendant 24 heures à 37 °C. Des colonies de petite taille (environ 2 mm) vont se former sur la gélose et être dénombrées. Le résultat de ce comptage permettra de déterminer une concentration bactérienne grâce à la norme AFNOR :

$$N = \frac{\sum c}{(n1 + 0,1 \times n2) \times V \times d} \quad (12)$$

Où N est le nombre d'unités formant colonie (UFC) par mL, $\sum c$ est le total de colonies présentes sur les boîtes sélectionnées, n1 et n2 sont les nombres de boîtes comptées respectivement à la première dilution et à la deuxième dilution, V est le volume de solution répartie sur chaque boîte et d est la première dilution.

10.2.4.2.3.2 Résultats

Le verre a été utilisé pour vérifier qu'aucun problème n'a eu lieu lors de la manipulation car sur cette surface les bactéries adhèrent parfaitement donc leur présence confirme qu'il n'y a eu aucun souci entre la pré-culture et les diffusions sur gélose. Les résultats sont toujours comparés à ceux obtenus avec le COC brut. La différence des valeurs de référence sur le COC brut peut être attribuée à la différence des souches bactériennes utilisées, chacune des souches réagissant différemment. D'une manière générale, l'ajout d'une couche organique sur la surface du COC favorise l'adhésion bactérienne car les colonies dénombrées sont plus nombreuses que sur le COC nu (Tableau 4).

Tableau 4 Comparaison des valeurs d'UFC/mL obtenues selon la lame de COC analysée (NBD = nitrobenzène diazonium, CBD = carboxybenzène diazonium)

<i>Surfaces étudiées</i>	Valeur de référence COC brut en UFC/mL	dénombrement	Nombre d'essais
<i>COC-NBD</i>	9,5.10 ⁴	171.10 ⁴	3
<i>COC-CBD</i>	14,4.10 ⁵	77.10 ⁵	3
<i>COC 70</i>	19.10 ³	44.10 ³	4

Peut-être que l'analyse du COC-EBD pourrait apporter des informations complémentaires pour mieux interpréter ces résultats. L'utilisation de la souche PA01 sur COC **70** pourrait également valider le peu d'adhésion de PA14.

11 Conclusion

Pour assembler notre biocapteur avec un transducteur en COC et un bioélément isatine, nous avons préparé des dérivés d'isatine possédant des fonctions alcool et amine grâce à des couplages pallado-catalysés. Leur influence sur la croissance bactérienne a en partie été évaluée ; il semblerait que la modification de l'isatine n'ait pas un impact important sur son pouvoir antibactérien. Ces dérivés ont ensuite été utilisés dans différentes stratégies d'accroche. Tout d'abord, les isatine-alcool ont subi l'estérification avec TBTU et le couplage avec CDI mais aucune des deux réactions n'a fonctionné. De meilleurs résultats ont été obtenus avec les isatine-amine dont l'amine a soit été transformé en diazonium et greffé *in-situ* sur le COC soit été couplée avec une surface acide grâce à EDC/NHS. Enfin le couplage de Sonogashira en surface a permis d'obtenir le biocapteur en réduisant les étapes de synthèse. Cette dernière surface a été utilisée pour évaluer l'adhésion bactérienne.

Bilan et perspectives

L'accomplissement de ces travaux de thèse a été possible grâce au support financier de la région Normandie, au laboratoire COBRA et à l'Université de Rouen.

Le but de cette thèse était de mettre au point un biocapteur en utilisant le COC, un matériau polymère bon marché, biocompatible et transparent, comme transducteur. Nous avons choisi l'isatine comme bioélément de ce biocapteur du fait de son action sur la bactérie *Pseudomonas Aeruginosa*. Après un point sur la littérature autour de l'isatine et des biocapteurs, nous avons repris les travaux de recherches sur la fonctionnalisation du COC, là où s'était arrêté Florian Brisset.

C'est-à-dire que nous avons appliqué la stratégie de fonctionnalisation de la surface du COC par greffage direct d'aryldiazoniums. Nous avons élargi la gamme de sels de diazonium synthétisés en préparant le 4-aminobenzène diazonium et le 4-éthynylbenzène diazonium. Nous avons obtenu des surfaces d'or et des surfaces de COC offrant soit des fonctions acide, soit amine, soit alcyne. Grâce à ces nouvelles fonctionnalités en surface nous avons pu développer des conditions de couplage en surface en adaptant les agents de couplage mis en jeu par rapport aux fonctions présentes sur les molécules à greffer.

Les fonctions carbonyle et amine présentes sur l'isatine sont impliquées dans l'interaction avec la protéine AmiC, le récepteur à CNP, via des liaisons hydrogène. Ces fonctions doivent être préservées pour assurer le fonctionnement du biocapteur. Nous avons donc modifié l'isatine en effectuant des couplages pallado-catalysés.

A partir de l'iodoisatine, nous avons substitué l'atome d'iode en position C5 soit par un précurseur alcyne en appliquant le couplage de Sonogashira, soit par un précurseur boronique en appliquant le couplage de Suzuki. La protection de la fonction présente sur le précurseur alcyne est nécessaire pour la réussite du couplage de Sonogashira alors que le couplage de Suzuki fonctionne sans étape de protection. Egalement, plus la chaîne alcane sur le précurseur alcyne est longue, plus il est difficile d'obtenir le produit de couplage. Les essais de couplage avec des précurseurs portant une fonction acide n'ont pas permis d'obtenir de dérivés

d'isatine-acide. Nous avons finalement préparé six sortes de dérivés d'isatine dont les effets biologiques ont pu être évalués et le *docking* sur AmiC étudié.

L'application des conditions de couplage en surface avec les dérivés d'isatine obtenus a présenté des résultats mitigés. Les couplages effectués avec les dérivés hydroxylés d'isatine n'ont pas fonctionné. Les dérivés aminés ont permis de greffer l'isatine sur le COC soit par formation du diazonium soit par couplage avec EDC/NHS. Finalement c'est le couplage de Sonogashira sur des surfaces alcynes qui donnent les résultats les plus probants. Les surfaces de COC ainsi traitées ont été utilisées pour évaluer l'adhésion bactérienne avec *Pseudomonas Aeruginosa*, celle-ci y adhère moins que sur des surfaces fonctionnalisées avec des diazoniums mais plus que sur le COC brut.

Les pistes d'amélioration et de perspective peuvent se concentrer sur l'obtention de dérivés d'isatine possédant la fonction acide en trouvant une protection adéquate permettant le couplage pallado-catalysé et la déprotection sans dénaturer la structure de l'isatine.³³⁴ Ces dérivés pourraient être par la suite couplés avec des surfaces amines en utilisant EDC/NHS comme agent de couplage. Une stratégie de protection de l'acide par formation d'un amide a été suivie sans succès. Nous avons procédé à des couplages avec l'aminophénylamine l'un de nos précurseurs à sels de diazonium présenté en 5.4.1 dans l'espoir que la fonction acide transformée en amide permette le fonctionnement du couplage de Sonogashira.

La protection préalable d'une des fonctions amine de l'aniline **3** avec un groupement benzyle carbamate a été testée via deux méthodes. La première, plus répandue, implique l'utilisation de diisopropyléthylamine dans le dichlorométhane de 0 °C à la température ambiante ne permet d'obtenir le produit **72** qu'avec 18% de rendement. La deuxième méthode qui fait simplement réagir l'aniline **3** et le chloroformate de benzyle **71** dans le dichlorométhane à température ambiante pendant 1 heure donne un meilleur rendement (36%).³³⁵ Le couplage peptidique avec TBTU entre cette aniline **72** et l'acide 3-butynoïque **64** a permis de synthétiser le précurseur **73** avec un bon rendement (78%) ; mais l'étape de couplage de Sonogashira avec l'iodoisatine n'a pas permis d'isoler le composé **74**, seuls les produits de départ étant identifiés en fin de colonne chromatographique. Un autre type de protection de l'acide doit donc être trouvé pour pouvoir bénéficier d'une fonction supplémentaire sur l'isatine.

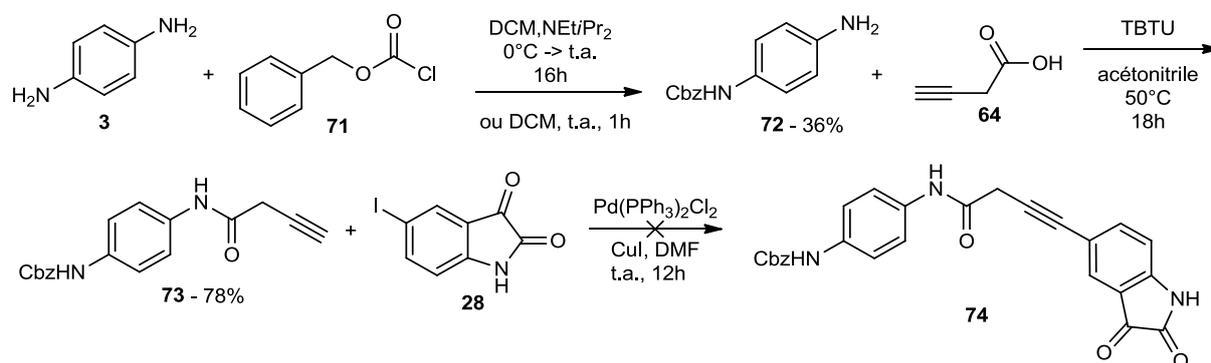


Schéma 71 Utilisation de l'aminophénylamine pour couplage avec l'acide 3-butynoïque

En suivant le principe de couplage de Sonogashira, nous pourrions préparer des sels de diazonium à partir de l'ester pinacolique d'acide aminophénylboronique (Schéma 72) pour fonctionnaliser la surface et ensuite effectuer le couplage de Suzuki avec l'iodoisatine.³³⁶

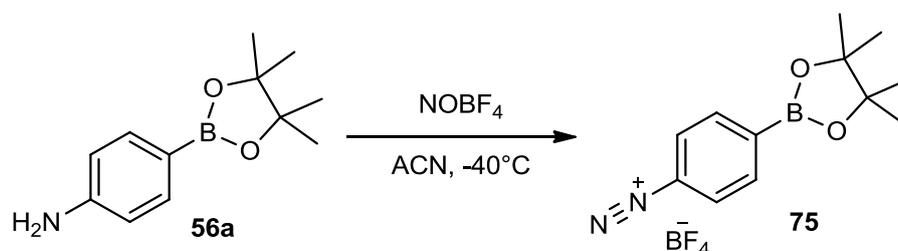


Schéma 72 Formation du sel de diazonium à partir de l'ester pinacolique d'acide aminophénylboronique

Des stratégies de fonctionnalisation de surface différentes de celles présentées dans ces travaux pourraient être mises au point pour relier l'isatine à la surface du COC. Par exemple l'utilisation de l'interaction avidine/biotine.

L'avidine est une protéine que l'on trouve dans les œufs (d'oiseaux ou d'amphibiens) et qui montre une affinité considérable pour la biotine. Le complexe formé par la protéine et ce cofacteur présente la plus forte interaction non-covalente connue à ce jour ($K_d = 10^{-15}$ M). Une protéine dérivée d'avidine (ce qui inclut la streptavidine et la neutravidine) peut se lier jusqu'à quatre molécules de biotine, ce qui rend ce type d'interaction très utilisé dans des stratégies d'amplification du signal de détection³³⁷⁻³⁴³ mais également comme lien intermédiaire pour l'immobilisation de bioélément.³⁴⁴⁻³⁴⁶ Des dérivés d'isatines biotynilées pourraient donc être préparés pour explorer cette voie d'immobilisation. Nous avons tenté d'obtenir des précurseurs biotynilés possédant une fonction alcyne pour effectuer des couplages de Sonogashira (Schéma 73).^{347, 348} Les analyses RMN des composés obtenus

n'étant pas concordantes avec les références utilisées, nous avons préféré ne pas mener plus loin nos investigations ; mais cela reste une bonne piste à explorer.

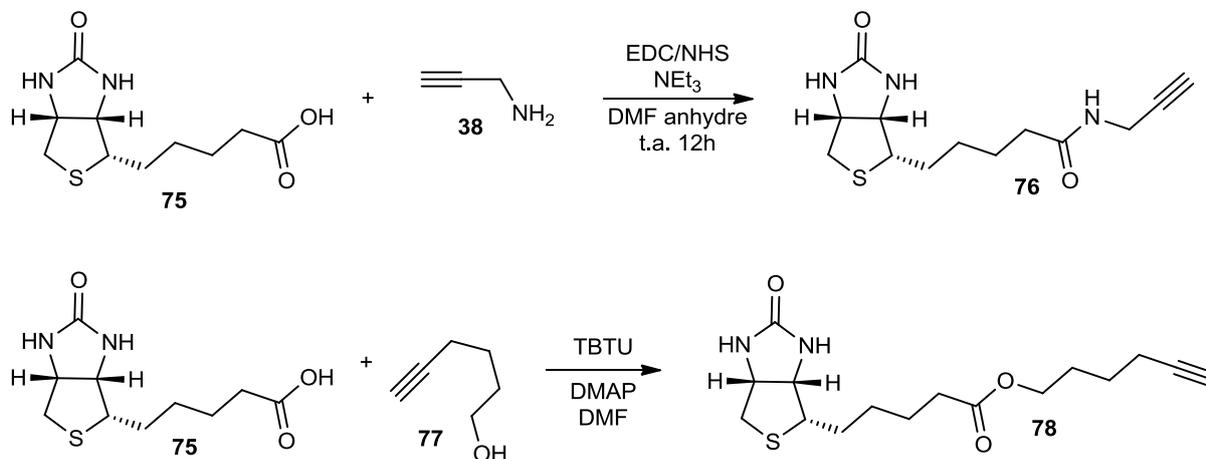


Schéma 73 Préparation de précurseurs propargyliques biotynilés

Du point de vue microbiologie, il serait intéressant de faire des tests sur le pouvoir antibactérien des dérivés d'isatine, obtenus lors de mes travaux, en les mettant en compétition avec le CNP pour déterminer si les modifications de l'isatine influent sur l'effet du CNP sur AmiC. De même pour les dérivés immobilisés en surface, cette immobilisation influence-t-elle l'action de l'isatine lorsque la protéine cible a été mise en présence du CNP ultérieurement ?

Annexes

Table des matières

1	Abbreviations	172
2	Materials and methods	174
3	Synthesis	176
3.1	Diazonium formation	176
3.1.1	4-Carboxymethylbenzene diazonium (2)	176
3.1.2	4-Aminobenzene diazonium (4).....	176
3.1.3	4-Ethynylbenzene diazonium (6)	177
3.2	General procedure for the Sonogashira reaction type	178
3.2.1	Precursor synthesis	178
3.2.2	5-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)indoline-2,3-dione (30)	179
3.2.3	5-(4-hydroxybut-1-yn-1-yl)indoline-2,3-dione (37)	180
3.2.4	tert-butyl (3-(2,3-dioxindolin-5-yl)prop-2-yn-1-yl)carbamate (41).....	181
3.2.5	4-(2,3-dioxindolin-5-ethynyl)aniline (51)	182
3.3	General procedure for the Suzuki reaction type	183
3.3.1	5'-Iodospiro[[1,3]dioxolane-2,3'-indolin]-2'-one (54).....	183
3.3.2	Spiro[1,3-dioxolane-2,3'-indol]-2'(1' <i>H</i>)-one, 5'-(4-aminophenyl) (57a).....	184
3.3.3	Spiro[1,3-dioxolane-2,3'-indol]-2'(1' <i>H</i>)-one, 5'-(3-aminophenyl) (57b).....	185

1 Abbreviations

DCM

dichloromethane

NMR / RMN	nuclear magnetic resonance / resonance magnétique nucléaire
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamide
TEA / NEt ₃	Triethylamine
ESI-MS	electrospray ionization mass spectrometry
IR	Infrared spectrometry
LMSM	Laboratoire de Microbiologie, Signaux et Microenvironnement
COC	Cyclic olefin copolymer / copolymère d'oléfine cyclique
DMSO	dimethyl sulfoxide
THF	tetrahydrofurane
NCS	N-chlorosuccinimide
CNS	central nervous system / système nerveux central
MAO	monoamine-oxydase
NPR-A/B/C	natriuretic peptide receptor A/B/C
ANP/BNP/CNP	atrial natriuretic peptide / brain natriuretic peptide / C-type natriuretic peptide
DNA/ADN	desoxyribonucleic acid/acide désoxyribonucléique
QS	quorum sensing
MIC	minimal inhibition concentration
FET/ISFET	Field Effect Transistor / ion sensitive field effect transistor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay

TR-FIA	time-resolved fluoroimmunoassay
CL/BL	chemiluminescence/bioluminescence
SPR	surface plasmon resonance
ATR	attenuated total reflexion
QCM	quartz crystal microbalance
SAW	surface acoustic wave
MIP	molecular imprinted polymer
CBD	4-carboxybenzene diazonium
ABD	4-aminobenzene diazonium
EBD	4-ethynylbenzene diazonium
EDC-NHS	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide – N-hydroxysuccinimide

2 Materials and methods

Solvents and reagents were purchased from Acros Organic (Fisher Bioblock Scientific division) and Sigma-Aldrich at reagent-grade and used without further purification. Deuterated solvents were purchased from Eurisotop or Aldrich. Distilled water was used for organic synthesis. Water used for analysis was Ultra-Pure 18,2 MΩ and purified on a system Milli-Q Academic A10 from Millipore.

Thin-layer chromatography was carried out on aluminum plates coated with SiO₂-60 from Macherey-Nagel (Alugram sil-G, thickness: 0.20mm). Visualization was achieved by UV light at 254nm then by immersion of the plate in a ninhydrine solution in butanol, drying under high temperature until apparition of persistent spots.

Solvents for extraction or flash column chromatography (FC) were of technical quality. Flash column chromatography (FC) were performed using SiO₂-60 (60Å, particle size 0.035-0.070 mm) from Acros Organics.

HRMS spectra (ESI+) were recorded on a LC Waters AC_quity coupled to a Waters LCT Premier XE instrument. The relevant signals are reported in m/z.

Elemental analyses were performed on a Carlo Erba 1106 apparatus. Measurement accuracy is around $\pm 0.4\%$ on carbon.

Melting points (m.p.) were determined on a Stuart melting point SMP30 capillary melting point apparatus and are uncorrected.

IR Spectra were recorded on a Tensor 27 (Bruker-Daltonic) spectrometer (ATR-unit, Attenuated Total Reflection) equipped with an ATR crystal in germanium (Ge) and a room temperature DTGS detector. The spectra were measured between 4000 and 650 cm^{-1} via OPUS 6.5 software with a 4 cm^{-1} resolution (20 scans), and absorption bands are reported in wavenumbers (cm^{-1}). For all the measurements, a blank substrate spectrum is taken as reference (background) then compared to the treated surfaces. The main numerical treatments were the automatic correction of the baseline and, in case of very thin layers, the subtraction of water and carbon dioxide bands (3100-3300 cm^{-1} and 2300 cm^{-1} respectively).

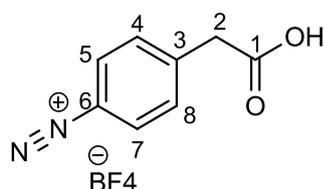
The ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker Advance spectrometer or a Bruker UltraShield 300 operating at 300 MHz and 75 MHz, respectively. The chemical shifts δ are reported in parts per million (ppm) relative to the residual solvent peak. Data appear in the following order: chemical shifts in ppm, number of protons, multiplicity (s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublet; t, triplet; q, quadruplet; quint, quintuplet; m, multiplet), coupling constant J in Hz.

Cyclic voltammetry was performed using a Princeton Applied Research model VersaSTAT 3 potentiostat. The cell used was a simple and undivided cell. A platinum wire was used as the counter electrode. The working electrode potentials were measured versus a platinum wire (all electrodes from IJ Cambria).

3 Synthesis

3.1 Diazonium formation

3.1.1 4-Carboxymethylbenzene diazonium (2)

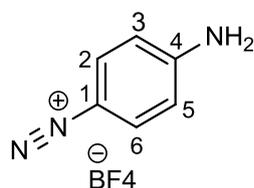


The preparation of compound 2 was conducted according to the method described by Brisset et al.¹⁸⁷ 4-aminophenylacetic acid (2.077g, 17 mmol, 1 eq) was dissolved in tetrafluoroboric acid (11.5 mL, 180 mmol) in a three-necked round-bottomed flask. After cooling down the solution to 0°C with an ice bath, a solution of sodium nitrite (1.173 g, 17 mmol, 1 eq.) in 3 mL of water was added over 20 minutes and the reaction was stirred for 15 min. The solution was then kept at -18°C for minimum 3 hr. After precipitation, the diazonium salt was collected as a light brown solid by vacuum filtration. It was washed with cold diethyl ether, dried, and stored at -18°C. Compound 2 was obtained in 84% yield (m = 3.50 g).

^1H NMR (300 MHz, CD_3CN): δ (ppm) 8.43 (d, $J = 9$ Hz, 2H, H-5, H-7), 7.83 (d, $J = 9$ Hz, 2H, H-4, H-8), 3.94 (s, 2H, H-2)

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN): δ (ppm) 170.98 (C-1), 151.81(C-6), 134.12(C-3), 133.30(C-4 et C-8), 113.49(C-5 et C-7), 41.42 (C-2).

3.1.2 4-Aminobenzene diazonium (4)



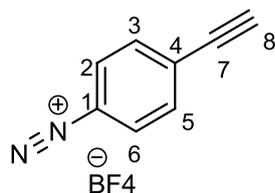
The preparation of compound 4 was conducted according to the method described by Griffete et al.²³⁵ Phenylenediamine (3.75 g, 35 mmol, 1 eq.) was cooled at 0°C in an ice bath. Tetrafluoroboric acid (10 mL, 160 mmol) was then added dropwise under continuous vigorous stirring, followed by addition of *tert*-butylnitrite (2.5 mL, 17 mmol, 0.5 eq.). The

reaction was stirred for 10 min. The solution changes of color from light pink to blue upon the appearance of the precipitate. The diazonium salt was collected by vacuum filtration. The dark green powder was dried and stored at -18°C . Compound 4 was obtained in 96% yield ($m = 6.92$ g).

^1H NMR (300 MHz, CD_3CN): δ (ppm) 7.98 (d, $J = 9.4$ Hz, 2H, H-2, H-6), 7.36 (s, 2H, H-NH₂), 6.87 (d, $J = 9.4$ Hz, 2H, H-3, H-5)

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN): δ (ppm) 135.77 (C-4), 132.55 (C-1), 124.30 (C-2), 124.14 (C-6), 116.81 (C-3 et C-5).

3.1.3 4-Ethynylbenzene diazonium (6)

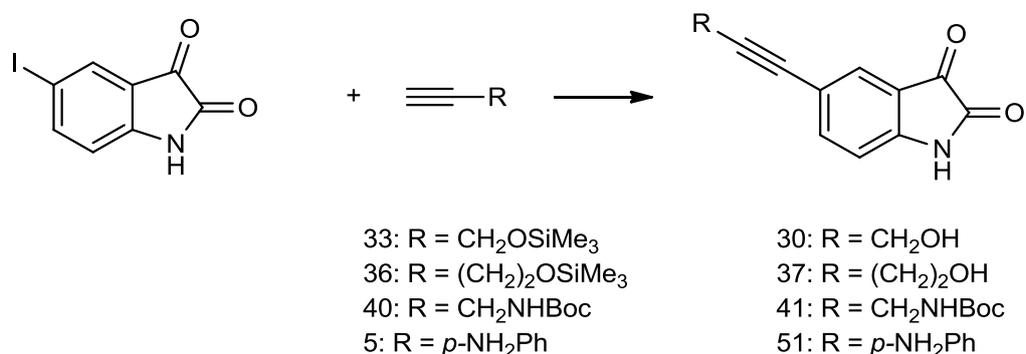


The preparation of compound 6 was conducted according to the method described by Zhang et al.²⁴⁰ In a round-bottom flask, 4-ethynylaniline (1.17 g, 10 mmol) was dissolved in a mixture of absolute ethanol (3 mL) and a 34% aqueous solution of tetrafluoroboric acid (3.7 mL, 60 mmol). *Tert*-butylnitrite (2.7 mL, 23 mmol, 2.3 eq.) was added dropwise to the solution at 0°C . The mixture was stirred at room temperature for 1 h and diethyl ether (20 mL) was added to precipitate the arenediazonium tetrafluoroborate. The beige solid was filtered off and washed with cold diethyl ether ($m = 2.21$ g).

^1H NMR: (300 MHz, CD_3CN) δ (ppm) 8.44 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H-3, H-5), 7.96 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-2, H-6), 4.24 (s, 1H, H-8).

^{13}C NMR: (75 MHz, CD_3CN) δ (ppm) 151.80 (C-1), 136.65 (C-3 et C-5), 135.77 (C-2 et C-6), 133.41 (C-4), 90.87 (C-7), 81.38 (C-8).

3.2 General procedure for the Sonogashira reaction type

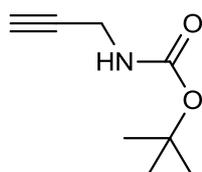


In a Schlenk flask, alkyne **33**, **36**, **40** or **5** (2 eq vs 1 eq of iodoisatin **28**), copper iodide (0.2 eq), bis(triphenylphosphine) palladium II dichloride (0.05 eq) were placed under nitrogen atmosphere. A mixture of anhydrous DMF and TEA (5/2, v/v) was added in order to adjust the final concentration of alkyne to 0.4 mol.L⁻¹. The reaction mixture was then stirred at room temperature for 45 minutes. Iodoisatin **28** (1 eq.) was then added. The solution was stirred at room temperature overnight under inert atmosphere (Ar). The solution was concentrated to 5 mL under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel using a mixture of dichloromethane/ethyl acetate (8/2, v/v) as eluent.

	33	36	40	5	iodoisatin	CuI	Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂
m (g)	1.37	1.96	2.15	0.25	0.27-1.9	0.04-0.27	0.035-0.25
n (mmol)	10	13.8	13.8	2.14	1-7	0.2-1.4	0.05-0.35
eq	2	2	2	2	1	0.2	0.05

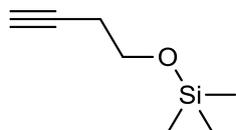
3.2.1 Precursor synthesis

3.2.1.1 2-propyn-1-ylcarbamate de 2-méthyl-2-propanyle (40)



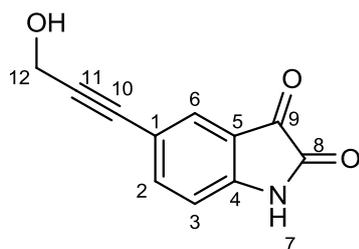
To a solution of 3-amino-1-propyne (1.22 g, 22 mmol, 1.0 eq) in THF (40 mL) was added (Boc)₂O (4.83 mg, 22 mmol, 1.0 eq) and stirred at 75°C for 1 hour.²⁸⁸ Upon completion, the solution was concentrated under reduced pressure, and then the residue was purified by silicagel column chromatography (Hexane / EtOAc = 8/1). The Boc protected carbamate was obtained in as oil with a yield between 63% and 66%. The NMR data was in accordance with the literature.³⁴⁹

3.2.1.2 (3-butyn-1-yloxy)(trimethyl)silane (36)



To a solution of 3-butyn-1-ol **34** (6.50 g, 93 mmol) and triethylamine (15 mL, 0.10 mol) in CH₂CL₂ (50 mL) at 0°C was added dropwise chlorotrimethylsilane **35** (13.0 mL, 100 mmol). The resulting slurry was allowed to warm to room temperature, and left stirring overnight. The mixture was washed with saturated aqueous NaHCO₃ (3 × 15 mL), H₂O (3 × 15 mL), and then dried over Na₂SO₄. Filtration and purification by distillation at ambient pressure (T° = 85°C) yielded the silyl ether **36** (80%) as a colorless oil. The structural analysis are in accordance with the literature.²⁸⁷

3.2.2 5-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)indoline-2,3-dione (30)



Physicochemical properties of **30**:

Empirical formula: C₁₁H₇NO₃, **M.W.** = 201,18 g.mol⁻¹

Yield: 46%

Physical state: orange powder

m.p.: > 400°C

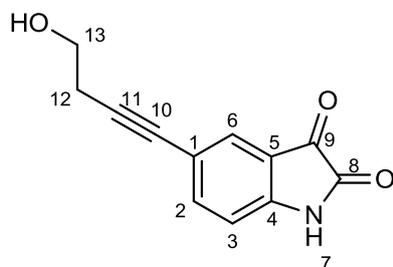
ESI-MS- (m/z): Calcd for C₁₁H₆NO₃ [M-H]⁻ : 200.0348 Found: 200.0346

Elemental analysis: Calcd: C, 65.67; H, 3.51; N, 6.96 Found: C, 65.04; H, 3.79; N, 6.16

¹H NMR: (300 MHz, DMSO) δ (ppm) 11.01 (s, 1H, N-H), 7.42 (dd, J = 8.1, 1.5 Hz, 1H, H-3), 7.27 (s, 1H, H-6), 6.72 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-2), 4.08 (d, J = 5.7 Hz, 2H, H-12).

¹³C NMR: (75 MHz, DMSO) δ (ppm) 183.79 (C-9), 159.60 (C-8), 150.37 (C-4), 141.08 (C-2), 127.10 (C-6), 118.27 (C-3), 116.77 (C-1), 112.83 (C-5), 89.72 (C-11), 82.62 (C-10), 49.60 (C-12).

3.2.3 5-(4-hydroxybut-1-yn-1-yl)indoline-2,3-dione (37)



Physicochemical properties of 37:

Empirical formula: C₁₂H₉NO₃, **M.W.** = 215,06 g.mol⁻¹

Yield: 36%

Physical state: orange powder

m.p.: 177-182°C

ESI-MS- (m/z): Calcd for C₁₁H₆NO₃ [M-H]⁻ : 214.0504 Found: 214.0500

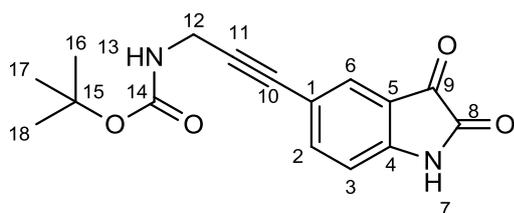
Elemental Analysis: Calcd: C, 66.97; H, 4.22; N, 6.51 Found: C, 62.64; H, 4.91; N, 5.34

¹H NMR: (300 MHz, DMSO) δ (ppm) 11.16 (s, 1H, N-H), 7.58 (dd, J = 8.1, 1.8 Hz, 2H, H-3), 7.45 (s, 1H, H-6), 6.87 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-2), 4.92 (t, J = 5.7 Hz, 2H, H-13), 2.40 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H-12).

¹³C NMR: (75 MHz, DMSO) δ (ppm) 162.34 (C-9), 159.43 (C-8), 149.80 (C-4), 140.78 (C-2), 126.94 (C-3), 118.08 (C-1), 117.42 (C-5), 112.48 (C-11), 59.72 (C-13), 35.81, 30.79, 23.30 (C-12).

IR (cm⁻¹): 3408 (N-H), 3285 (O-H), 2880 (C≡C), 1731 (C=O), 1616 (C=C_{arom}), 1057 (C-O)

3.2.4 tert-butyl (3-(2,3-dioxindolin-5-yl)prop-2-yn-1-yl)carbamate (41)



Physicochemical properties of 41:

Empirical formula: C₁₆H₁₆N₂O₄, **M.W.** = 300.31 g.mol⁻¹

Yield: 54%

Physical state: orange powder

m.p.: 164-169°C

ESI-MS+ (m/z): Calcd for C₁₆H₂₀N₃O₄ [M+NH₄]⁺: 318.1454 Found: 318.1455

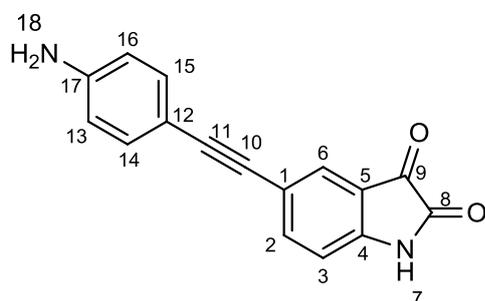
Elemental analysis: Calcd for C₁₆H₁₆N₂O₄: C, 63.99; H, 5.37; N, 9.33 Found: C, 62.90; H, 5.90; N, 8.31

¹H NMR: (300 MHz; acetone d₆) δ (ppm) 10.19 (s, 1H, H-13), 7.62 (dd, J = 8.2, 1.7 Hz, 1H, H-3), 7.50 (d, J = 1.0 Hz, 1H, H-2), 7.02 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-7), 6.45 (s, 1H, H-6), 4.09 (d, J = 5.7 Hz, 2H, H-12), 1.43 (s, 9H, H-16, H-17, H-18).

¹³C NMR: (75 MHz; acetone d₆) δ (ppm) 184.12 (C-9), 159.75 (C-8), 156.28 (C-14), 151.00 (C-4), 141.87 (C-2), 128.05 (C-6), 119.10 (C-3), 118.64 (C-1), 113.44 (C-5), 87.78 (C-10), 81.10 (C-11), 79.37 (C-15), 28.57 (C-16, C-17, C-18, C-12).

IR (cm⁻¹): 3363 (N-H), 2978 (C¹-H), 1737 (C=O), 1622 (C=C_{arom})

3.2.5 4-(2,3-dioxindolin-5-ethynyl)aniline (51)



Physicochemical properties of 56:

Empirical formula: $C_{16}H_{10}N_2O_2$, **M.W.** = 262.07 g.mol⁻¹

Yield: 12%

Physical state: dark red powder

m.p.: >400°C

TOF MS ES+: Calcd for $C_{18}H_{14}N_3O_2$ [M+H+ACN]⁺ : 304.1086 Found: 304.1074

Elemental Analysis: Calcd: C, 73.27; H, 3.84; N, 10.68 Found: C, 71.51; H, 6.11; N, 7.06

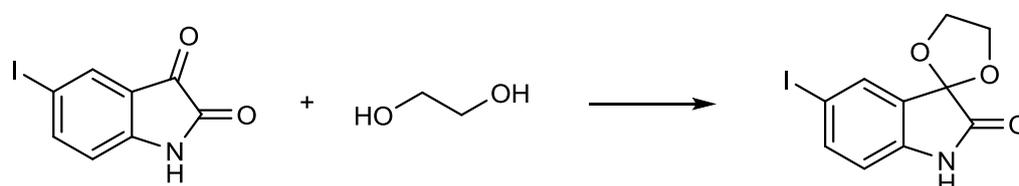
¹H NMR: (300 MHz, acetone d₆) δ (ppm) 10.15 (s, 1H, H-7), 7.69 (dd, J = 8.2, 1.8 Hz, 1H, H-3), 7.58 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H-6), 7.25 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-14, H-15), 7.05 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H-2), 6.68 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-13, H-16), 5.10 (s, 2H, H-18).

¹³C NMR: (75 MHz, DMSO) δ (ppm) 141.64, 141.32, 133.55, 133.10, 132.72, 132.60, 129.51, 129.35, 120.61, 114.78, 32.63, 23.33, 14.36.

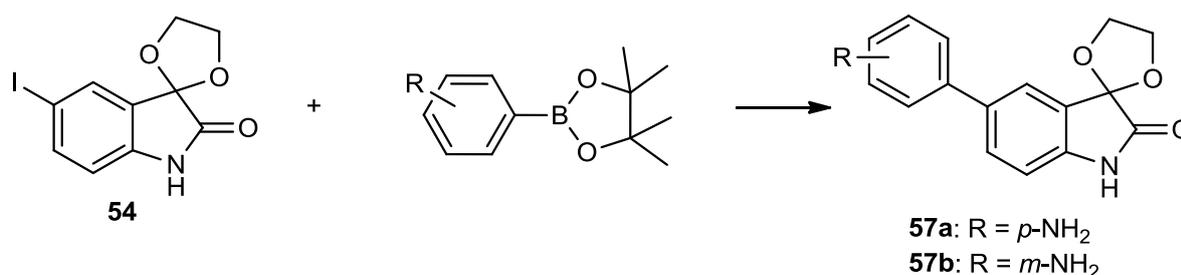
IR (cm⁻¹): 3448 (primary N-H), 3361 (secondary N-H), 2208 (C≡C), 1744 (C=O), 1620-1599 (C=C_{arom})

3.3 General procedure for the Suzuki reaction type

3.3.1 5'-Iodospiro[[1,3]dioxolane-2,3'-indolin]-2'-one (54)



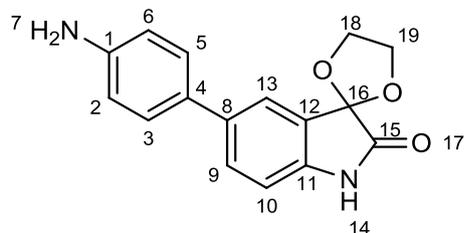
The C3 carbonyl group of iodoisatin has been protected by an acetal group following the method described by Damgaard et al.³²⁰ Iodoisatin **28** (2.25g, 8.2mmol) was dissolved into 80 mL of toluene, to which ethylene glycol (8.65mL, 0.155mol, 19eq.) and *p*-toluenesulfonic acid (77.3mg, 0.40mmol, 0.05eq.) were added. The resulting solution was refluxed (120°C) for 5 hours, after which the reaction was cooled down to room temperature. The solvent was removed by vacuum and the residue was diluted into 30 mL of DCM and successively washed with a saturated solution of NaHCO₃ (3×30mL). The organic phase was dried over MgSO₄, filtrated and evaporated to dryness under reduced pressure. The resulting orange solid was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 75/25 – 50/50) yielding **54** as a white solid (2.16g, 6.80mmol, 83%). The structural analysis are in accordance with the literature.³²⁰



To a sealed tube were added 5'-iodospiro[[1,3]dioxolane-2,3'-indolin]-2'-one **54** (313 mg, 1.00 mmol, 1eq), aminophenylboronic acid pinacol ester (430 mg, 2.00 mmol, 2eq) and NaHCO₃ (252 mg, 3.00 mmol, 3eq) in DME:H₂O (2.5/0.5, 7.5 mL) and the mixture was degassed with N₂ for 5 minutes. Pd(dppf)Cl₂ (40.8 mg, 0.05 mmol, 0.05eq) was added, the mixture was degassed for 2 minutes and stirred at 90°C for 18 hours. After cooling to room temperature; the crude mixtures were filtered over a celite pad, diluted with DCM (30 mL) and washed with saturated NaHCO₃ (3×30 mL). The organic phase was dried over MgSO₄ and evaporated

to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on a silica gel (cyclohexane/EtOAc, 75/25 – 50/50) yielding **57a** and **57b**.

3.3.2 Spiro[1,3-dioxolane-2,3'-indol]-2'(1'H)-one, 5'-(4-aminophenyl) (**57a**)



Physicochemical properties of 62a:

Empirical formula: C₁₆H₁₄N₂O₃, **M.W.** = 282,30 g.mol⁻¹

Yield: 62%

Physical state: light orange powder

m.p.: 222-225°C

TOF MS ES+: Calcd for C₁₈H₁₈N₃O₃ [M+H+ACN]⁺ : 324.1348 Found: 324.1333

Calcd for C₁₆H₁₅N₂O₃ [M+H]⁺ : 283.1083 Found: 283.1068

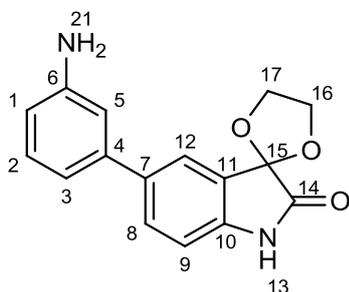
Elemental Analysis: Calcd: C, 68.08; H, 5.00; N, 9.92 Found: C, 68.51; H, 5.95; N, 8.09

¹H NMR: (300 MHz, DMSO) δ (ppm) 10.43 (s, 1H, H-14), 7.48 (dd, J = 10.5, 2.4 Hz, 2H, H-10, H-13), 7.29 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-5, H-3), 6.83 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-9), 6.61 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-2, H-6), 5.19 (s, 2H, H-7), 4.32 (d, J = 8.3 Hz, 4H, H-18, H-19).

¹³C NMR: (75 MHz, DMSO) δ (ppm) 174.53 (C-15), 148.07 (C-1), 140.64 (C-16), 135.53 (C-8, C-11), 128.38 (C-13), 126.94 (C-4), 126.77 (C-3, C-5), 125.31 (C-9), 121.95 (C-10), 114.27 (C-6, C-2), 110.79 (C-12), 101.83, 65.53 (C-18, C-19).

IR (cm⁻¹): 3419 (primary N-H), 3333 (secondary N-H), 2922 (C^H-H), 1736 (C=O), 1626 (C=C_{arom})

3.3.3 Spiro[1,3-dioxolane-2,3'-indol]-2'(1'H)-one, 5'-(3-aminophenyl) (57b)



Physicochemical properties of 62b:

Empirical formula: C₁₆H₁₄N₂O₃, **M.W.** = 282,30 g.mol⁻¹

Yield: 56%

Physical state: dark orange powder

m.p.: 232-237°C

TOF MS ES+: Calcd for C₁₈H₁₈N₃O₃ [M+H+ACN]⁺ : 324.1348 Found: 324.1342

Calcd for C₁₆H₁₅N₂O₃ [M+H]⁺ : 283.1083 Found: 283.1073

Elemental Analysis: Calcd: C, 68.08; H, 5.00; N, 9.92 Found: C, 67.67; H, 5.85; N, 8.27

¹H NMR: (300 MHz, DMSO) δ (ppm) 10.52 (s, 1H, H-13), 7.53 (dd, J = 8.1, 1.9 Hz, 1H, H-9), 7.48 (s, 1H, H-5), 7.07 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H-2), 6.89 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-8), 6.80 (s, 1H, H-12), 6.73 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 6.53 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-3), 4.33 (d, J = 10.9 Hz, 4H, H-16, H-17).

¹³C NMR: (75 MHz, DMSO) δ (ppm) 174.55 (C-14), 149.04 (C-6), 141.95 (C-15), 140.23 (C-4), 135.63 (C-10, C-7), 129.65 (C-12), 129.46 (C-2), 125.23 (C-8), 122.88 (C-9), 113.93 (C-1), 112.94 (C-3), 111.72 (C-5), 110.85 (C-11), 101.71, 65.56 (C-16, C-17).

IR spectra are similar to the product with the amino group in para position.

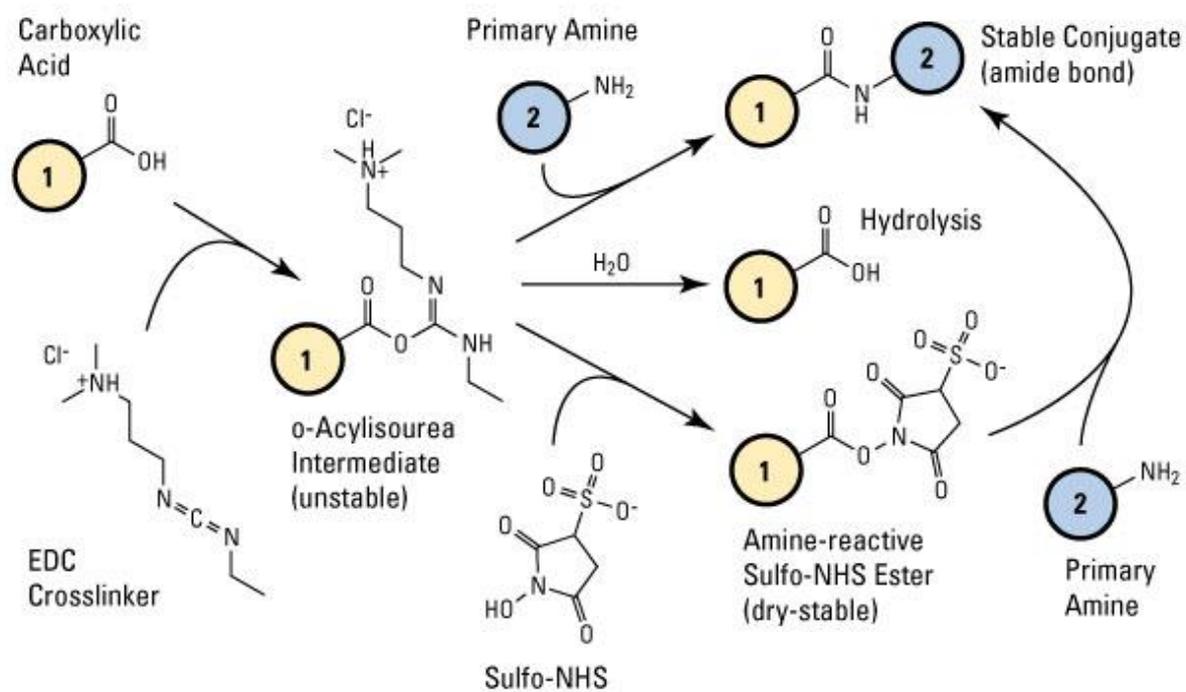
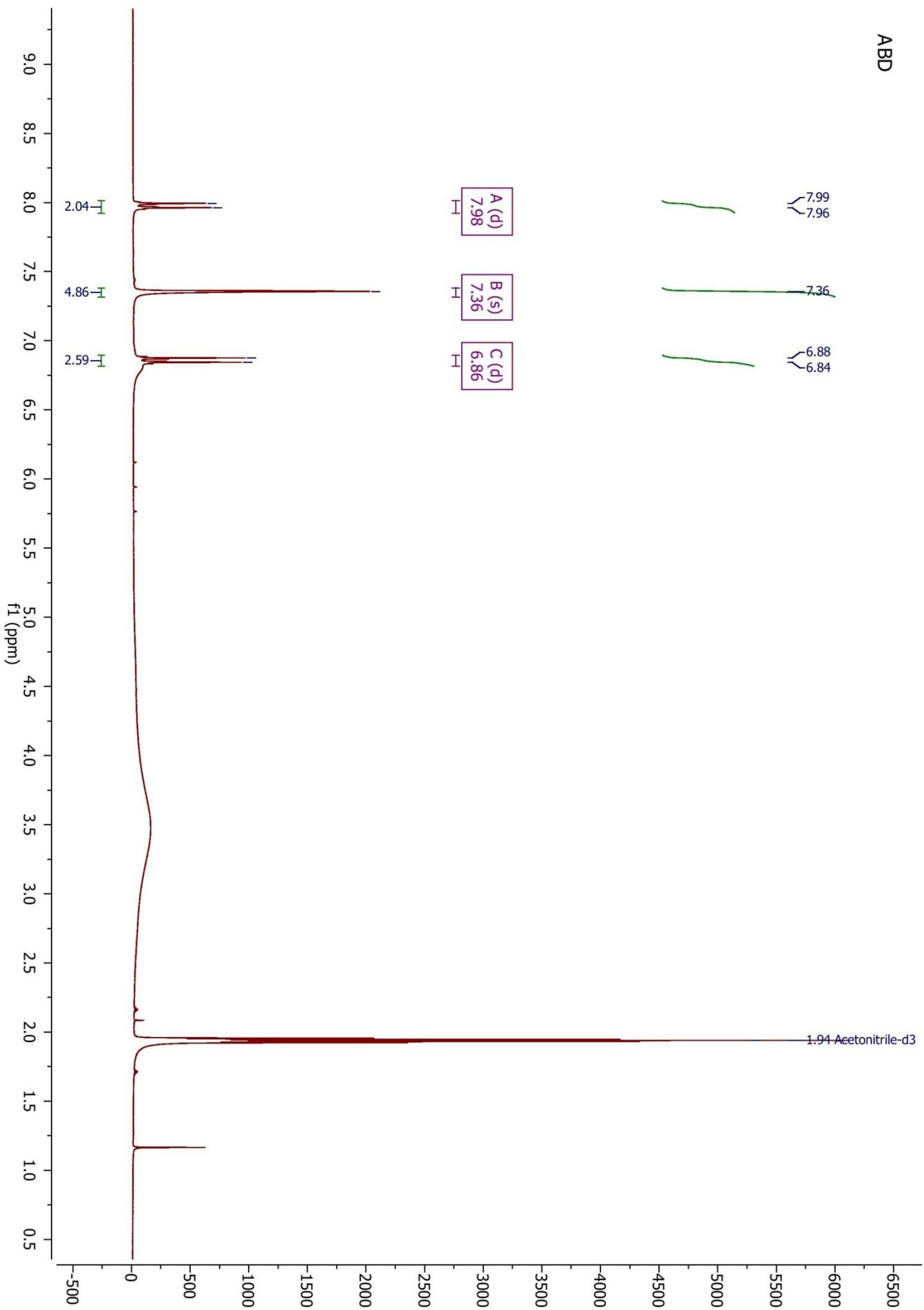


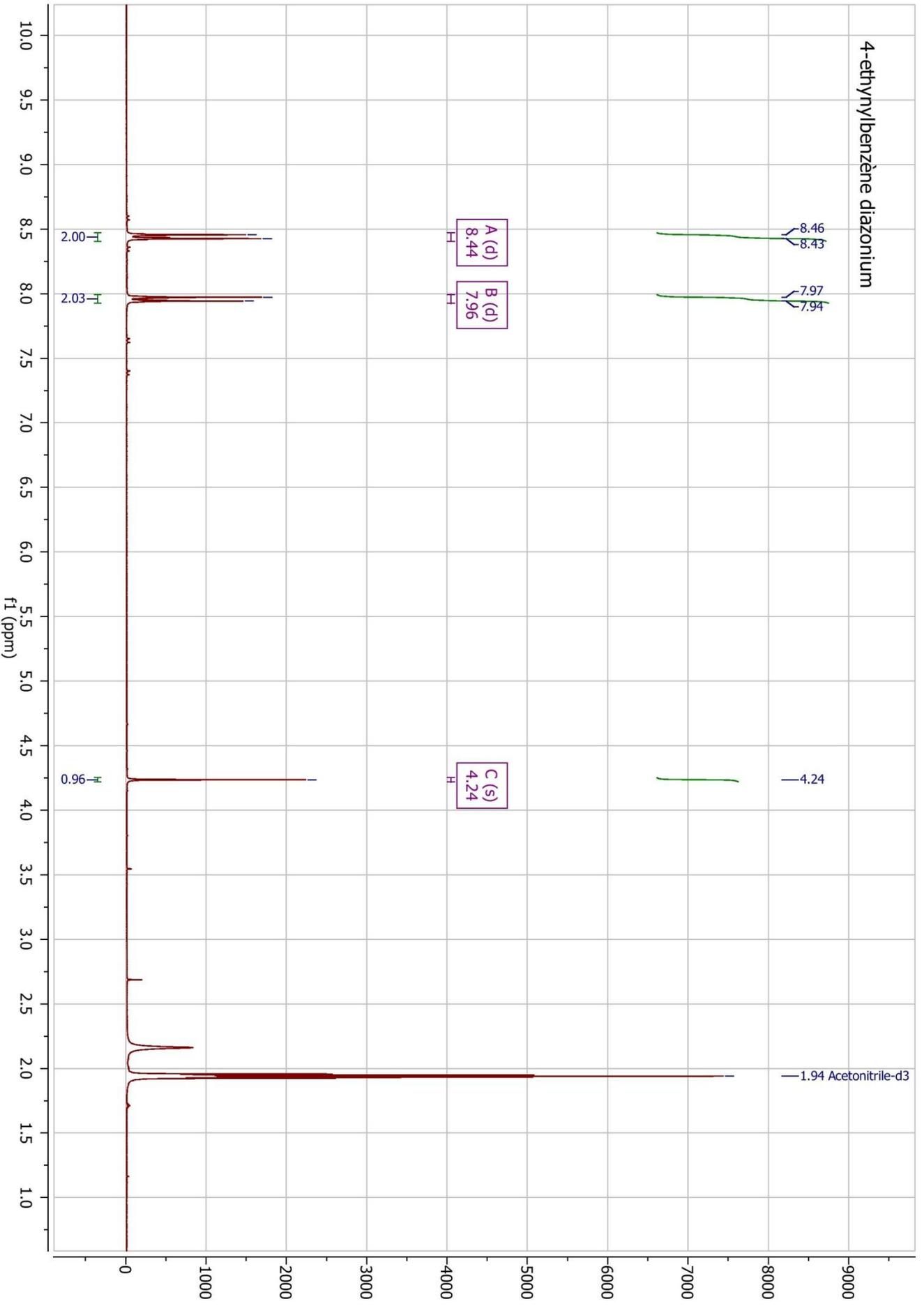
Figure 103 Mécanisme de couplage avec EDC/NHS

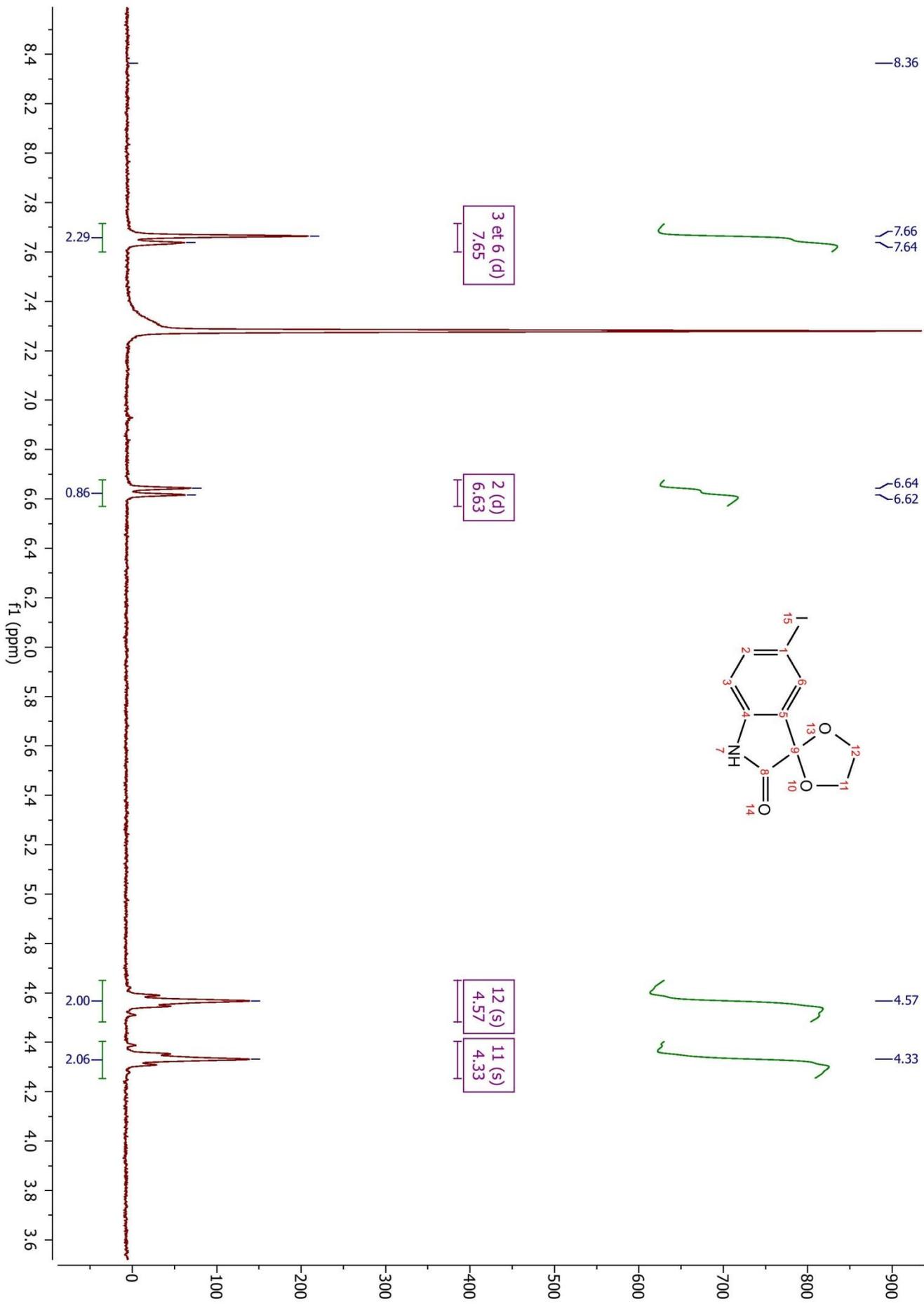
4 ^1H NMR spectrum

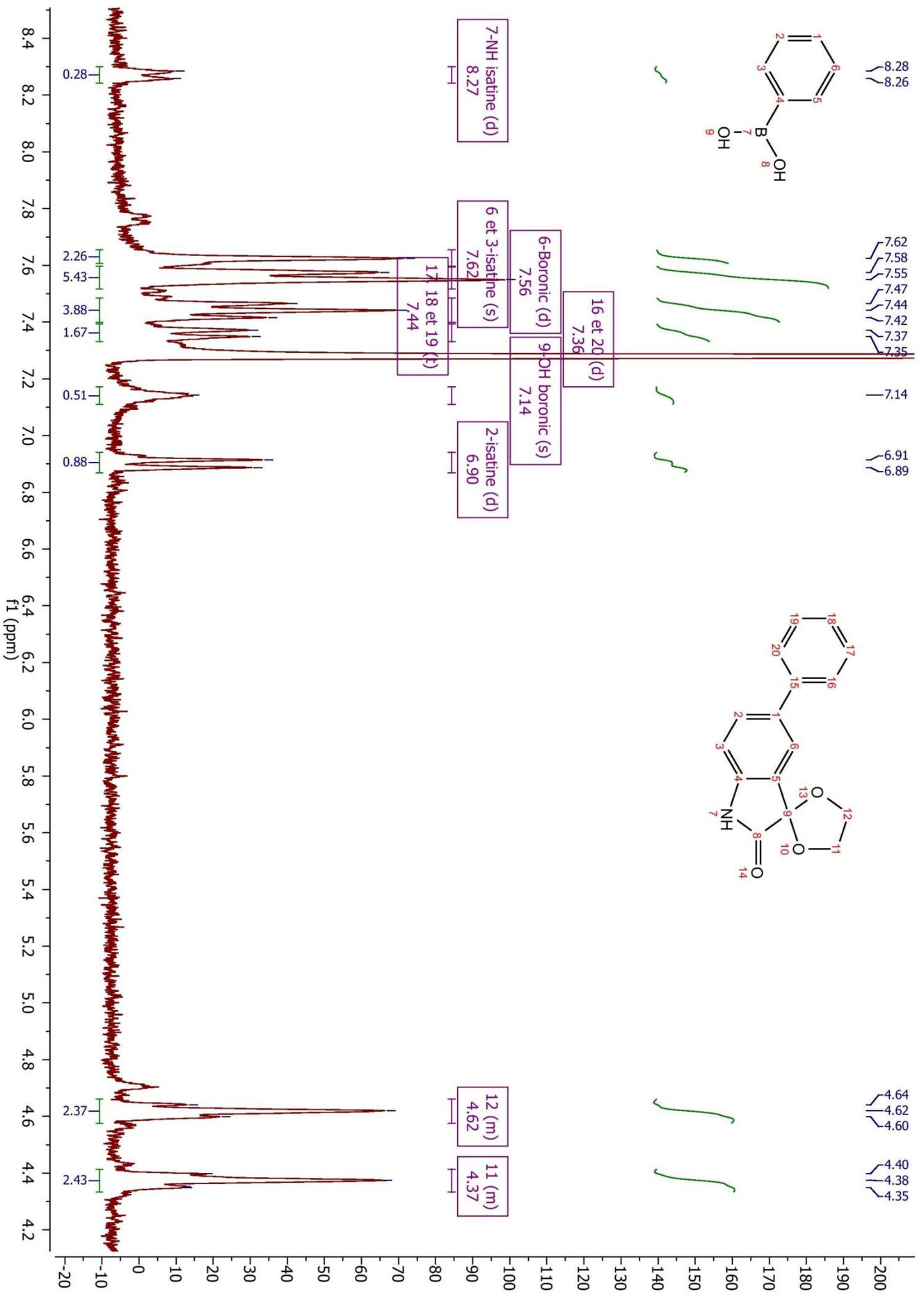
ABD

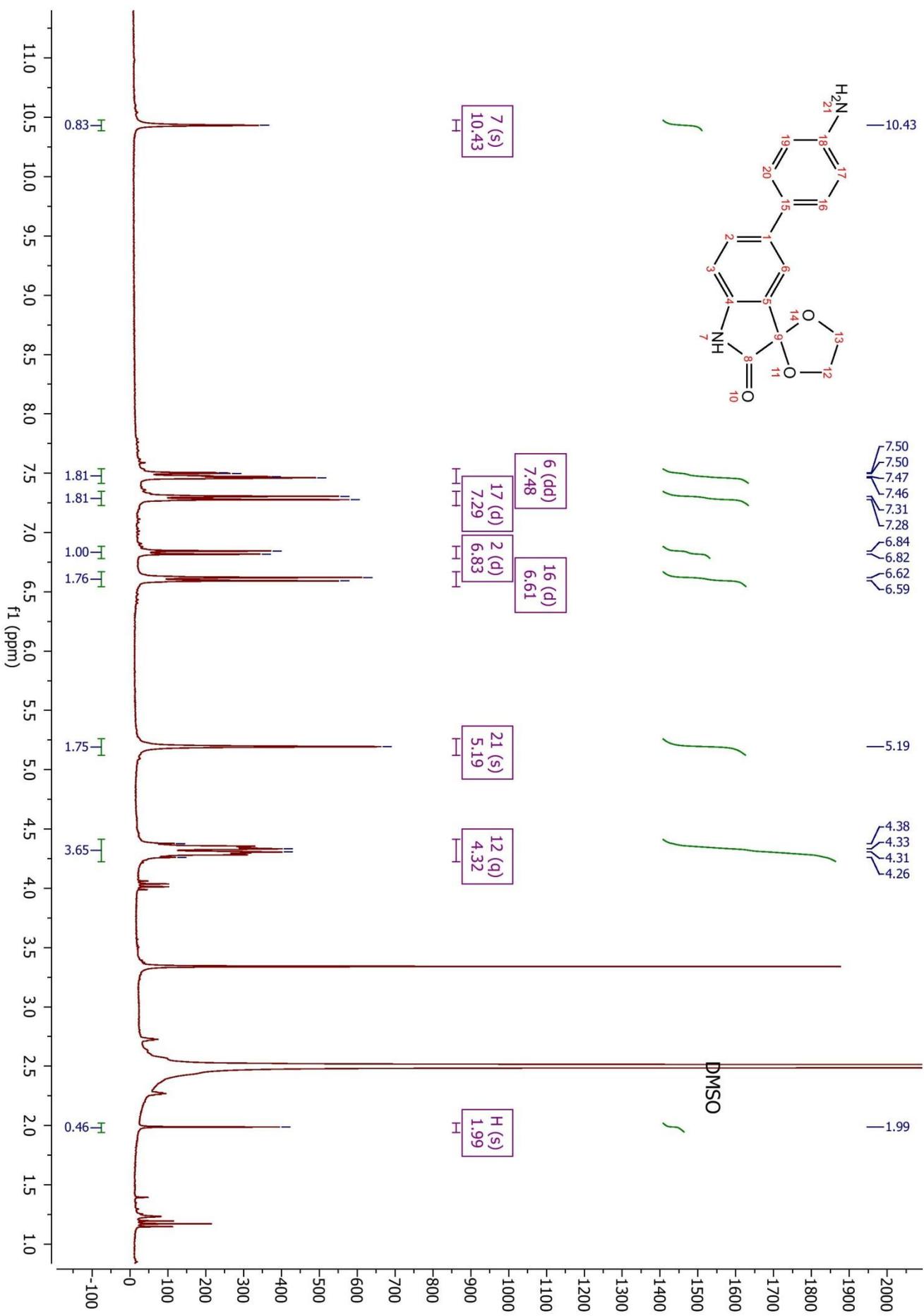


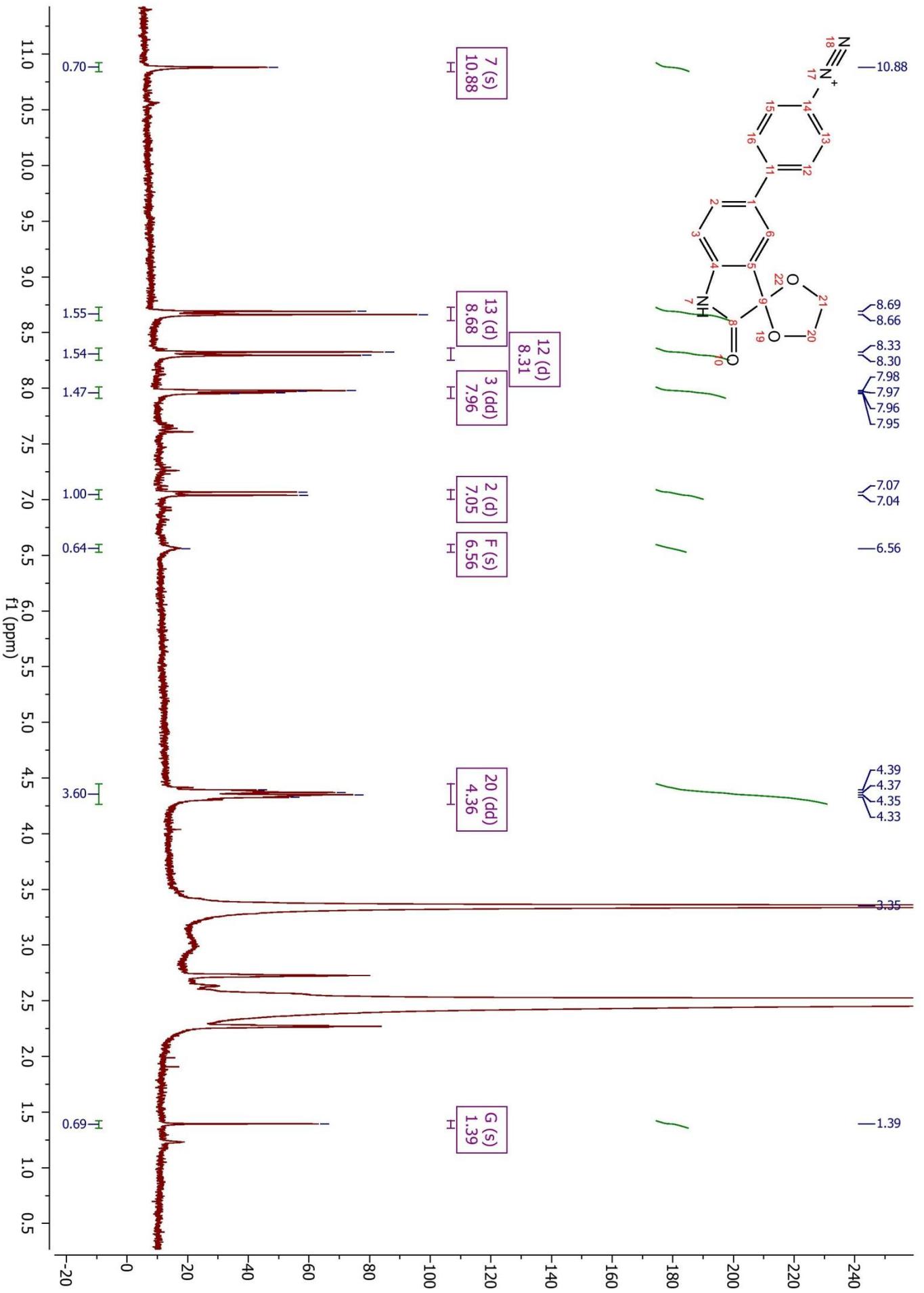
4-ethynylbenzène diazonium











Références bibliographiques

1. d'Ischia, M.; Palumbo, A.; Prota, G., Adrenalin oxidation revisited. New products beyond the adrenochrome stage. *Tetrahedron* **1988**, 44, (20), 6441-6446.
2. Bergman, J.; Lindström, J.-O.; Tilstam, U., The structure and properties of some indolic constituents in *Couroupita guianensis* aubl. *Tetrahedron* **1985**, 41, (14), 2879-2881.
3. Zukerman-Schpector, J.; Castellano, E. E.; Pinto, A. D. C.; Da Silva, J. F. M.; Barcellos, M. T. F. C., Structure of 1-acetylindole-2,3-dione. *Acta Crystallographica Section C* **1992**, 48, (4), 760-762.
4. Bigotto, A.; Galasso, V., Infrared and Raman spectra of phthalimide and isatin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* **1979**, 35, (7), 725-732.
5. Barbuch, R. J.; Peet, N. P.; Coutant, J. E., Tandem mass spectrometry study of 1-methylisatin. *Organic Mass Spectrometry* **1986**, 21, (8), 521-522.
6. Garima, M.; Sumitra, N., Recent Advancement in Synthesis of Isatin as Anticonvulsant Agents: A Review. *Medicinal Chemistry* **2014**, 4, (4), -.
7. Erdmann, O. L., Untersuchungen über den Indigo. *Journal für Praktische Chemie* **1840**, 19, (1), 321-362.
8. Laurent, A., Recherches sur l'indigo. In *Annales de Chimie et de physique*, 1840; Vol. 3, pp 393-434.
9. Sandmeyer, T., Über Isonitrosoacetanilide und deren Kondensation zu Isatinen. *Helvetica Chimica Acta* **1919**, 2, (1), 234-242.
10. Smolders, R.; Waefelaer, A.; Francart, D., 7-Fluoroisatin. *Ing. Chim.(Brussels)* **1982**, 64, 5-6.
11. Loloïu, G.; Loloïu, T.; Maior, O., Synthesis of 1H-pyrrolo[2,3-b]phenoxathiin-2,3-dione. *Chemistry of Heterocyclic Compounds* **1998**, 34, (3), 363-366.
12. Jnaneshwara, G. K.; Bedekar, A. V.; Deshpande, V. H., Microwave Assisted Preparation of Isatins and Synthesis of (±)-Convolutamydin-A. *Synthetic Communications* **1999**, 29, (20), 3627-3633.
13. Varma, R.; Singh, A., A novel pH dependent separation of isatins from their isomeric mixtures. In Council Scientific Industrial Research Publ & Info Directorate, New Delhi 110012, India: 1990; Vol. 29, pp 578-581.
14. Goodwin, B., Hazardous reactions. In Royal Soc Chemistry Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge, Cambs, England CB4 4WF: 1988; Vol. 24, pp 336-336.
15. Klein, L. L.; Tufano, M. D., Synthesis of substituted isatins. *Tetrahedron Letters* **2013**, 54, (8), 1008-1011.
16. Loloïu, G.; Maior, O., Isatin Chemistry: Synthesis of N-methyl-2,3-dioxo-2,3-dihydropyrrolo[2,3-b]phenoxathiin. *Revue Roumaine de Chimie* **1997**, 42, (1), 67-69.
17. Fukuda, Y.; Itoh, Y.; Nakatani, K.; Shiro, T., Synthetic studies on duocarmycin. 1. Total synthesis of dl-duocarmycin A and its 2-epimer. *Tetrahedron* **1994**, 50, (9), 2793-2808.
18. Stollé, R.; Bergdoll, R.; Luther, M.; Auerhahn, A.; Wacker, W., Über N-substituierte Oxindole und Isatine. *Journal für Praktische Chemie* **1930**, 128, (1), 1-43.
19. Raj, V. P.; Shaikh, T. M.; Sudalai, A., H-b Zeolite: an Efficient, reusable Catalyst for One-Pot Synthesis of Isatins from Anilines. *Acta Chim. Slov.* **2012**, 57, 466-469.

20. Wang, Z., Martinet Reaction. In *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, John Wiley & Sons, Inc.: 2010.
21. Kearney, T.; Harris, P. A.; Jackson, A.; Joule, J. A., Synthesis of Isatin 3-Oximes from 2-Nitroacetanilides. *Synthesis* **1992**, 1992, (08), 769-772.
22. Gassman, P. G.; Gruetzmacher, G. D., Azasulfonium salts. Intermediates in a general procedure for the alkylation of aromatic amines. *Journal of the American Chemical Society* **1974**, 96, (17), 5487-5495.
23. Gassman, P. G.; Cue, B. W.; Luh, T.-Y., A general method for the synthesis of isatins. *The Journal of Organic Chemistry* **1977**, 42, (8), 1344-1348.
24. Hewawasam, P.; Meanwell, N. A., A general method for the synthesis of isatins: Preparation of regiospecifically functionalized isatins from anilines. *Tetrahedron Letters* **1994**, 35, (40), 7303-7306.
25. Rivalle, C.; Bisagni, E., Ethyl (4-N-acylaminopyridin-3-yl)glyoxylate and 5-azaisatin as new synthons for a route to various new polyheterocycles. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1997**, 34, (2), 441-444.
26. Bouhfid, R. Synthèse de nouveaux dérivés de l'isatine et de l'oxindole et évaluation de leurs propriétés biologiques. Université Mohammed V-Agdal, Rabat, 2007.
27. Smith, K.; El-Hiti, G. A.; Hawes, A. C., A Novel Procedure for the Formation of Isatins via Carbonylation of Lithiated N'-Aryl-N,N-dimethylureas. *Synlett* **1999**, 1999, (Sup. 1), 945-947.
28. Silva, J. F. M. d.; Garden, S. J.; Pinto, A. C., The chemistry of isatins: a review from 1975 to 1999. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2001**, 12, 273-324.
29. Parrick, J.; Yahya, A.; Ijaz, A. S.; Yizun, J., Convenient preparation of 3,3-dibromo-1,3-dihydroindol-2-ones and indole-2,3-diones (isatins) from indoles. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1989**, (11), 2009-2015.
30. Benincori, T.; Fusco, R.; Sannicò, F., New heterocyclic syntheses from alpha-halohydrazones. Rearrangements of alpha-arylamino- and alpha-arylthio acylhydrazones in acid medium. *Gazzetta chimica italiana* **1990**, 120, (10), 635-639.
31. Meth-Cohn, O.; Goon, S., Synthetic applications of unpoled vilsmeier reagents — A new simple one-pot route to isatins from formamides. *Tetrahedron Letters* **1996**, 37, (52), 9381-9384.
32. Mironov, M. A.; Kleban, M. I.; Mokrushin, V. S., New synthesis of indoles containing the isocyanide group. *Mendeleev Communications* **2001**, 11, (3), 114-115.
33. Manley-King, C. I.; Bergh, J. J.; Petzer, J. P., Inhibition of monoamine oxidase by selected C5- and C6-substituted isatin analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, 19, (1), 261-274.
34. Satish, G.; Polu, A.; Ramar, T.; Ilangovan, A., Iodine-Mediated C-H Functionalization of sp, sp², and sp³ Carbon: A Unified Multisubstrate Domino Approach for Isatin Synthesis. *The Journal of Organic Chemistry* **2015**, 80, (10), 5167-5175.
35. Söderberg, B. C. G.; Gorugantula, S. P.; Howerton, C. R.; Petersen, J. L.; Dantale, S. W., A palladium-catalyzed synthesis of isatins (1H-Indole-2,3-diones) from 1-(2-haloethynyl)-2-nitrobenzenes. *Tetrahedron* **2009**, 65, (36), 7357-7363.
36. Webber, S. E.; Tikhe, J.; Worland, S. T.; Fuhrman, S. A.; Hendrickson, T. F.; Matthews, D. A.; Love, R. A.; Patick, A. K.; Meador, J. W.; Ferre, R. A.; Brown, E. L.; DeLisle, D. M.; Ford, C. E.; Binford, S. L., Design, synthesis, and evaluation of nonpeptidic inhibitors of human rhinovirus 3C protease. *J Med Chem* **1996**, 39.
37. Videos, P., Sodium Hydride (slow motion). In *Periodic Table of Videos*, YouTube, 2014.

38. Chen, G.; Wang, Y.; Hao, X.; Mu, S.; Sun, Q., Simple isatin derivatives as free radical scavengers: Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship. *Chemistry Central Journal* **2011**, 5, (1), 1-5.
39. Coppola, G. M., N-Arylation of isatins. A direct route to N-arylisatoic anhydrides. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1987**, 24, (5), 1249-1251.
40. Veerasamy, R.; Mohan, S.; Suresh Kumar, K., *Synthesis and antimicrobial activity of Mannich bases of isatin and its derivatives with 2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenylacetic acid*. 2007.
41. Bekircan, O.; Bektas, H., Synthesis of Schiff and Mannich Bases of Isatin Derivatives with 4-Amino-4,5-Dihydro-1H-1,2,4-Triazole-5-Ones. *Molecules* **2008**, 13, (9), 2126.
42. K. Jnaneshwar, G.; H. Deshpande, V., Synthesis of Convolutamydine A from Isatin. *Journal of Chemical Research, Synopses* **1999**, (10), 632-633.
43. Magiatis, P.; Polychronopoulos, P.; Skaltsounis, A.-L.; Lozach, O.; Meijer, L.; Miller, D. B.; O'Callaghan, J. P., Indirubins deplete striatal monoamines in the Intact and MPTP-treated mouse brain and block kainate-induced striatal astrogliosis. *Neurotoxicology and Teratology* **2010**, 32, (2), 212-219.
44. Mahajan, T.; Kumar, L.; Dwivedi, K.; Agarwal, D. D., Efficient and Facile Chlorination of Industrially-Important Aromatic Compounds using NaCl/p-TsOH/NCS in Aqueous Media. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2012**, 51, (10), 3881-3886.
45. Garden, S. J.; Torres, J. C.; de Souza Melo, S. C.; Lima, A. S.; Pinto, A. C.; Lima, E. L. S., Aromatic iodination in aqueous solution. A new lease of life for aqueous potassium dichloriodate. *Tetrahedron Letters* **2001**, 42, (11), 2089-2092.
46. Somaskhara, S.; Dighe, V. S.; Suthar, G. K.; Mukherjee, S. L., Chlorosulphonation of Isatins. *Current Science* **1965**, 34, (17), 508.
47. Lee, D.; Long, S. A.; Murray, J. H.; Adams, J. L.; Nuttall, M. E.; Nadeau, D. P.; Kikly, K.; Winkler, J. D.; Sung, C.-M.; Ryan, M. D.; Levy, M. A.; Keller, P. M.; DeWolf, W. E., Potent and Selective Nonpeptide Inhibitors of Caspases 3 and 7. *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, 44, (12), 2015-2026.
48. Jiang, Y.; Hansen, T. V., Isatin 1,2,3-triazoles as potent inhibitors against caspase-3. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, 21, (6), 1626-1629.
49. Liu, W.; Zhu, H.-M.; Niu, G.-J.; Shi, E.-Z.; Chen, J.; Sun, B.; Chen, W.-Q.; Zhou, H.-G.; Yang, C., Synthesis, modification and docking studies of 5-sulfonyl isatin derivatives as SARS-CoV 3C-like protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014**, 22, (1), 292-302.
50. Kopka, K.; Faust, A.; Keul, P.; Wagner, S.; Breyholz, H.-J.; Höltke, C.; Schober, O.; Schäfers, M.; Levkau, B., 5-Pyrrolidinylsulfonyl Isatins as a Potential Tool for the Molecular Imaging of Caspases in Apoptosis. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49, (23), 6704-6715.
51. Watkins, P.; Clow, A.; Glover, V.; Halket, J.; Przyborowska, A.; Sandler, M., *Isatin, regional distribution in rat brain and tissues*. 1990; Vol. 17, p 321-323.
52. Seidel, J.; Wenzel, J., Some histochemical and electrophysiological effects of isatin. *Pol J Pharmacol Pharm* **1979**, 31, (4), 407-412.
53. Glover, V.; Halket, J. M.; Watkins, P. J.; Clow, A.; Goodwin, B. L.; Sandler, M., Isatin: Identity with the purified endogenous monoamine oxidase inhibitor tribulin. *J Neurochem* **1988**, 51.
54. Crumeyrolle-Arias, M.; Medvedev, A.; Cardona, A.; Barritault, D.; Glover, V., In situ imaging of specific binding of [3H]isatin in rat brain. *Journal of Neurochemistry* **2003**, 84, (3), 618-620.

55. Glover, V.; Medvedev, A.; Sandler, M., Isatin is a potent endogenous antagonist of guanylate cyclase-coupled atrial natriuretic peptide receptors. *Life Sci* **1995**, 57.
56. Medvedev, A.; Buneeva, O.; Glover, V., Biological targets for isatin and its analogues: Implications for therapy. *Biologics : Targets & Therapy* **2007**, 1, (2), 151-162.
57. Barbara, M., New Anticonvulsant Agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2005**, 5, (1), 69-85.
58. Popp, F. D., Potential anticonvulsants. VIII. Some hydrazones of indole-3-carboxaldehyde. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1984**, 21, (2), 617-619.
59. N Pandeya, S.; Smitha, S.; P Stables, J., *Anticonvulsant and Sedative-Hypnotic Activities of N-Substituted Isatin Semicarbazones*. 2002; Vol. 335, p 129-34.
60. Smitha, S.; Pandeya, S.; Stables, J.; Ganapathy, S., Anticonvulsant and Sedative-Hypnotic Activities of N-Acetyl / Methyl Isatin Derivatives. *Scientia Pharmaceutica* **2008**, 76, (4), 621.
61. Siddiqui, N.; Alam, M. S.; Stables, J. P., Synthesis and anticonvulsant properties of 1-(amino-N-arylmethanethio)-3-(1-substituted benzyl-2, 3-dioxindolin-5-yl) urea derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 46, (6), 2236-2242.
62. Blackburn, T. P.; Kennett, G. A.; Baxter, G. S. Medicaments for treatment of migraine, epilepsy and feeding disorders. 1994.
63. Karali, N.; Guersoy, A., ChemInform Abstract: Synthesis and Anticonvulsant Activity of Some New Thiosemicarbazone and 4-Thiazolidone Derivatives Bearing an Isatin Moiety. *ChemInform* **1995**, 26, (35), no-no.
64. Bauer, D. J., A history of the discovery and clinical application of antiviral drugs. *British medical bulletin* **1985**, 41, (4), 309-14.
65. Hall, M. D.; Salam, N. K.; Hellowell, J. L.; Fales, H. M.; Kensler, C. B.; Ludwig, J. A.; Szakács, G.; Hibbs, D. E.; Gottesman, M. M., Synthesis, Activity, and Pharmacophore Development for Isatin- β -thiosemicarbazones with Selective Activity toward Multidrug-Resistant Cells. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52, (10), 3191-3204.
66. Kang, I. J.; Wang, L. W.; Hsu, T. A.; Yueh, A.; Lee, C. C.; Lee, Y. C.; Lee, C. Y.; Chao, Y. S.; Shih, S. R.; Chern, J. H., Isatin-beta-thiosemicarbazones as potent herpes simplex virus inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**, 21, (7), 1948-52.
67. Pirrung, M. C.; Pansare, S. V.; Sarma, K. D.; Keith, K. A.; Kern, E. R., Combinatorial Optimization of Isatin- β -Thiosemicarbazones as Anti-poxvirus Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 48, (8), 3045-3050.
68. Chen, L.-R.; Wang, Y.-C.; Lin, Y. W.; Chou, S.-Y.; Chen, S.-F.; Liu, L. T.; Wu, Y.-T.; Kuo, C.-J.; Chen, T. S.-S.; Juang, S.-H., Synthesis and evaluation of isatin derivatives as effective SARS coronavirus 3CL protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, 15, (12), 3058-3062.
69. Teitz, Y.; Ronen, D.; Vansover, A.; Stematsky, T.; Riggs, J. L., Inhibition of human immunodeficiency virus by N-methylisatin- β 4':4'-diethylthiosemicarbazone and N-allylisatin- β -4':4'-diallylthiosemicarbazone. *Antiviral Research* **1994**, 24, (4), 305-314.
70. Pandeya, S. N.; Sriram, D.; Nath, G.; DeClercq, E., Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities of Schiff and Mannich bases derived from isatin derivatives and N-[4-(4'-chlorophenyl)thiazol-2-yl] thiosemicarbazide. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **1999**, 9, (1), 25-31.
71. N Pandeya, S.; Sriram, D.; Nath, G.; de Clercq, E., *Synthesis, Antibacterial, Antifungal and Anti-HIV Evaluation of Schiff and Mannich Bases of Isatin and its Derivatives with Triazole*. 2000; Vol. 50, p 55-9.

72. Willner, I.; Schlittner, A.; Doron, A.; Joselevich, E., Association of Anti-Dinitrophenyl Antibody onto a Patterned Organosiloxane Antigen Monolayer Prepared by Microcontact Printing: An AFM Characterization. *Langmuir* **1999**, 15, (8), 2766-2772.
73. Wu, J.; Lawrence, N. J.; Sebt, S. M.; Lawrence, H. R., Carboxy isatin hydrazones and their esters as Shp2 inhibitors. In Google Patents: 2014.
74. Prakash, C. R.; Raja, S.; Panneer Selvam, T.; Saravanan, G.; Karthick, V.; Dinesh Kumar, P., Synthesis and anti-microbial activities of some novel schiff bases of 5-substituted isatin derivatives. *Rasayan journal of chemistry* **2009**, 2, (4), 960-968.
75. Pandeya, S. N.; Sriram, D.; Nath, G.; De Clercq, E., Synthesis and antimicrobial activity of Schiff and Mannich bases of isatin and its derivatives with pyrimidine. *Il Farmaco* **1999**, 54, (9), 624-628.
76. Chhajed, S. S.; Padwal, M. S., Antimicrobial Evaluation of some novel Schiff and Mannich bases of Isatin and its derivatives with quinolin. *International Journal of ChemTech Research* **2010**, 2, (1), 209-213.
77. Sridhar, S. K.; Saravanan, M.; Ramesh, A., Synthesis and antibacterial screening of hydrazones, Schiff and Mannich bases of isatin derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, 36, (7), 615-625.
78. Vasanthi, R.; Rajendraprasad, Y.; Srinivas, B., Synthesis, Characterization, Antibacterial and Antifungal Activities of Isatin Derivatives. *International Journal of ChemTech Research* **2013**, 5, (6), 3015-3022.
79. Nathani, B. R.; Pandya, K. S.; Jeni, M. M.; Patel, D. J.; Patel, M. R., Synthesis and Antimicrobial Activity of Some New Isatins Derivatives. *Der Chemica Sinica* **2011**, 2, (6), 97-103.
80. Pandeya, S. N.; Gnana Sundari, C.; Mariammal, N.; Saravanan, P.; Saravana Balaji, S.; Sentil Kumar, R.; Sriram, D., Synthesis and Antibacterial activity of Mannich bases of Ciprofloxacin and Lomefloxacin with isatin and its derivatives. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **1998**, 60, (5), 280-282.
81. Ramachandran, S., Synthesis and antimicrobial evaluation of some novel schiff and mannich bases of isatin derivatives. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry* **2011**, 1, (3), 289-294.
82. Song, Z.; Johansen, H. K.; Moser, C.; HØiby, N., Effects of Chinese medicinal herbs on a rat model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *APMIS* **1996**, 104, (1-6), 350-354.
83. Tashiro, Y.; Toyofuku, M.; Nakajima-Kambe, T.; Uchiyama, H.; Nomura, N., Bicyclic compounds repress membrane vesicle production and *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **2010**, 304, (2), 123-30.
84. Blier, A.-S.; Veron, W.; Bazire, A.; Gerault, E.; Taupin, L.; Vieillard, J.; Rehel, K.; Dufour, A.; Le Derf, F.; Orange, N.; Hulen, C.; Feuilloy, M. G. J.; Lesouhaitier, O., C-type natriuretic peptide modulates quorum sensing molecule and toxin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)* **2011**, 157, (7), 1929-1944.
85. Veron, W.; Lesouhaitier, O.; Pennanec, X.; Rehel, K.; Leroux, P.; Orange, N.; Feuilloy, M. G. J., Natriuretic peptides affect *Pseudomonas aeruginosa* and specifically modify lipopolysaccharide biosynthesis. *FEBS Journal* **2007**, 274, (22), 5852-5864.
86. Rosay, T.; Bazire, A.; Diaz, S.; Clamens, T.; Blier, A.-S.; Mijouin, L.; Hoffmann, B.; Sergeant, J.-A.; Bouffartigues, E.; Boireau, W.; Vieillard, J.; Hulen, C.; Dufour, A.; Harmer, N. J.; Feuilloy, M. G. J.; Lesouhaitier, O., *Pseudomonas aeruginosa* Expresses a Functional Human Natriuretic Peptide Receptor Ortholog: Involvement in Biofilm Formation. *mBio* **2015**, 6, (4).

87. Clark, L. C.; Lyons, C., Electrode Systems For Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1962**, 102, (1), 29-45.
88. Scognamiglio, V.; Pezzotti, G.; Pezzotti, I.; Cano, J.; Buonasera, K.; Giannini, D.; Giardi, M. T., Biosensors for effective environmental and agrifood protection and commercialization: from research to market. *Microchimica Acta* **2010**, 170, (3), 215-225.
89. Mohanty, S. P.; Kougiianos, E., Biosensors: a tutorial review. *Potentials, IEEE* **2006**, 25, (2), 35-40.
90. Arora, N., Recent Advances in Biosensors Technology : A review. *Octa Journal of Biosciences* **2013**, 1, (2), 147-150.
91. Janata, J., *Principles of Chemical Sensors*. Springer US: 2010.
92. Pohanka, M.; Skladal, P., Electrochemical biosensors - principles and applications. *Journal of Applied Biomedicine* **2008**, 6, (2), 57-64.
93. Grieshaber, D.; MacKenzie, R.; Vörös, J.; Reimhult, E., Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors* **2008**, 8, (3), 1400-1458.
94. Oliveros, A.; Guiseppi-Elie, A.; Sadow, S. E., Silicon carbide: a versatile material for biosensor applications. *Biomedical Microdevices* **2013**, 15, (2), 353-368.
95. Ivanova, E. V.; Sergeeva, V. S.; Oni, J.; Kurzawa, C.; Ryabov, A. D.; Schuhmann, W., Evaluation of redox mediators for amperometric biosensors: Ru-complex modified carbon-paste/enzyme electrodes. *Bioelectrochemistry* **2003**, 60, (1-2), 65-71.
96. Wang, J., Electrochemical transduction. In *Handbook of Chemical and Biological Sensors*, Taylor & Francis: 1996.
97. Perumal, V.; Hashim, U., Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *Journal of Applied Biomedicine* **2014**, 12, (1), 1-15.
98. Ohnuki, H.; Saiki, T.; Kusakari, A.; Endo, H.; Ichihara, M.; Izumi, M., Incorporation of Glucose Oxidase into Langmuir-Blodgett Films Based on Prussian Blue Applied to Amperometric Glucose Biosensor. *Langmuir* **2007**, 23, (8), 4675-4681.
99. Marzouk, S. A. M.; Ashraf, S. S.; Al Tayyari, K. A., Prototype Amperometric Biosensor for Sialic Acid Determination. *Analytical Chemistry* **2007**, 79, (4), 1668-1674.
100. Newman, J. D.; Turner, A. P. F., Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosensors and Bioelectronics* **2005**, 20, (12), 2435-2453.
101. Bakker, E.; Pretsch, E., Potentiometric sensors for trace-level analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2005**, 24, (3), 199-207.
102. Newman, J. D.; Setford, S. J., Enzymatic biosensors. *Molecular Biotechnology* **2006**, 32, (3), 249-268.
103. Owicki, J. C.; Bousse, L. J.; Hafeman, D. G.; Kirk, G. L.; Olson, J. D.; Wada, H. G.; Parce, J. W., The Light-Addressable Potentiometric Sensor: Principles and Biological Applications. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **1994**, 23, (1), 87-114.
104. Zhang, C.; Chen, P.; Hu, W., Organic field-effect transistor-based gas sensors. *Chemical Society Reviews* **2015**, 44, (8), 2087-2107.
105. Schöning, M. J.; Poghossian, A., Bio FEDs (Field-Effect Devices): State-of-the-Art and New Directions. *Electroanalysis* **2006**, 18, (19-20), 1893-1900.
106. Wang, G.; Xu, J.; Chen, H., Progress in the studies of photoelectrochemical sensors. *Science in China Series B: Chemistry* **2009**, 52, (11), 1789.
107. Siqueira, J. R.; Fernandes, E. G. R.; de Oliveira, O. N.; Zucolotto, V., Biosensors Based on Field-Effect Devices. In *Nanobioelectrochemistry: From Implantable Biosensors to Green Power Generation*, Crespilho, F. N., Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; pp 67-86.

108. Jaffrezic-Renault, N.; Dzyadevych, S., Conductometric Microbiosensors for Environmental Monitoring. *Sensors* **2008**, 8, (4), 2569-2588.
109. Purohit, H. J., Biosensors as molecular tools for use in bioremediation. *Journal of Cleaner Production* **2003**, 11, (3), 293-301.
110. Zeng, H. H.; Matveeva, E. G.; Stoddard, A. K.; Fierke, C. A.; Thompson, R. B., Long Wavelength Fluorescence Ratiometric Zinc Biosensor. *Journal of Fluorescence* **2013**, 23, (3), 375-379.
111. Zadran, S.; Sanchez, D.; Zadran, H.; Amighi, A.; Otiniano, E.; Wong, K., Enhanced-acceptor fluorescence-based single cell ATP biosensor monitors ATP in heterogeneous cancer populations in real time. *Biotechnology Letters* **2013**, 35, (2), 175-180.
112. Zhang, C.; Wei, Z.-H.; Ye, B.-C., Quantitative monitoring of 2-oxoglutarate in *Escherichia coli* cells by a fluorescence resonance energy transfer-based biosensor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2013**, 97, (18), 8307-8316.
113. Chen, A.; Wang, G.; Cao, Q.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Sun, Y.; Wang, H.; Xu, C.; Zhou, Q.; Han, P.; Liu, M.; Yang, Y.; Xing, W.; Mitchelson, K. R.; Cheng, J., Development of an Antibody Hapten-Chip System for Detecting the Residues of Multiple Antibiotic Drugs*. *Journal of Forensic Sciences* **2009**, 54, (4), 953-960.
114. Aceti, A.; Titti, F.; Verani, P.; Buttò, S.; Pennica, A.; Sebastiani, A.; Rossi, G. B., Time-resolved immunofluorescence: a sensitive and specific assay for anti-HIV antibody detection in human sera. *Journal of Virological Methods* **1987**, 16, (4), 303-315.
115. Khan, P.; Idrees, D.; Moxley, M. A.; Corbett, J. A.; Ahmad, F.; von Figura, G.; Sly, W. S.; Waheed, A.; Hassan, M. I., Luminol-Based Chemiluminescent Signals: Clinical and Non-clinical Application and Future Uses. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2014**, 173, (2), 333-355.
116. Roda, A.; Mirasoli, M.; Dolci, L. S.; Buragina, A.; Bonvicini, F.; Simoni, P.; Guardigli, M., Portable Device Based on Chemiluminescence Lensless Imaging for Personalized Diagnostics through Multiplex Bioanalysis. *Analytical Chemistry* **2011**, 83, (8), 3178-3185.
117. Marquette, C. A.; Bouteille, F.; Corgier, B. P.; Degiuli, A.; Blum, L. J., Disposable screen-printed chemiluminescent biochips for the simultaneous determination of four point-of-care relevant proteins. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2009**, 393, (4), 1191-1198.
118. Karsunke, X. Y. Z.; Niessner, R.; Seidel, M., Development of a multichannel flow-through chemiluminescence microarray chip for parallel calibration and detection of pathogenic bacteria. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2009**, 395, (6), 1623.
119. Marques, S. M.; Esteves da Silva, J. C. G., Firefly bioluminescence: A mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB Life* **2009**, 61, (1), 6-17.
120. Charrier, T. Développement d'un biocapteur bactérien bioluminescent multicanal pour la détection de polluants dans l'environnement. 2006.
121. Charrier, T.; Chapeau, C.; Bendria, L.; Picart, P.; Daniel, P.; Thouand, G., A multi-channel bioluminescent bacterial biosensor for the on-line detection of metals and toxicity. Part II: technical development and proof of concept of the biosensor. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2011**, 400, (4), 1061-1070.
122. Roda, A.; Guardigli, M., Analytical chemiluminescence and bioluminescence: latest achievements and new horizons. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2012**, 402, (1), 69-76.
123. Abdulhalim, I.; Zourob, M.; Lakhtakia, A., Overview of Optical Biosensing Techniques. In *Handbook of Biosensors and Biochips*, John Wiley & Sons, Ltd: 2008.
124. Kretschmann, E., Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and nuclei* **1971**, 241, (4), 313-324.

125. Wijaya, E.; Lenaerts, C.; Maricot, S.; Hastanin, J.; Habraken, S.; Vilcot, J.-P.; Boukherroub, R.; Szunerits, S., Surface plasmon resonance-based biosensors: From the development of different SPR structures to novel surface functionalization strategies. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **2011**, 15, (5), 208-224.
126. Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G., Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1999**, 54, (1), 3-15.
127. Yanase, Y.; Hiragun, T.; Ishii, K.; Kawaguchi, T.; Yanase, T.; Kawai, M.; Sakamoto, K.; Hide, M., Surface Plasmon Resonance for Cell-Based Clinical Diagnosis. *Sensors* **2014**, 14, (3), 4948-4959.
128. Liedberg, B.; Nylander, C.; Lunström, I., Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* **1983**, 4, 299-304.
129. Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundström, I., Biosensing with surface plasmon resonance — how it all started. *Biosensors and Bioelectronics* **1995**, 10, (8), i-ix.
130. Wong, C. L.; Olivo, M., Surface Plasmon Resonance Imaging Sensors: A Review. *Plasmonics* **2014**, 9, (4), 809-824.
131. Unser, S.; Bruzas, I.; He, J.; Sagle, L., Localized Surface Plasmon Resonance Biosensing: Current Challenges and Approaches. *Sensors* **2015**, 15, (7).
132. Sepúlveda, B.; Angelomé, P. C.; Lechuga, L. M.; Liz-Marzán, L. M., LSPR-based nanobiosensors. *Nano Today* **2009**, 4, (3), 244-251.
133. Petryayeva, E.; Krull, U. J., Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing—A review. *Analytica Chimica Acta* **2011**, 706, (1), 8-24.
134. Menezes, J. W.; Ferreira, J.; Santos, M. J. L.; Cescato, L.; Brolo, A. G., Large-Area Fabrication of Periodic Arrays of Nanoholes in Metal Films and Their Application in Biosensing and Plasmonic-Enhanced Photovoltaics. *Advanced Functional Materials* **2010**, 20, (22), 3918-3924.
135. Singh, P., SPR Biosensors: Historical Perspectives and Current Challenges. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2016**, 229, 110-130.
136. Durmuş, N. G.; Lin, R. L.; Kozberg, M.; Dermici, D.; Khademhosseini, A.; Demirci, U., Acoustic-Based Biosensors. In *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*, Li, D., Ed. Springer US: Boston, MA, 2013; pp 1-15.
137. Cooper, M. A.; Singleton, V. T., A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions. *Journal of Molecular Recognition* **2007**, 20, (3), 154-184.
138. Becker, B.; Cooper, M. A., A survey of the 2006–2009 quartz crystal microbalance biosensor literature. *Journal of Molecular Recognition* **2011**, 24, (5), 754-787.
139. Speight, R. E.; Cooper, M. A., A Survey of the 2010 Quartz Crystal Microbalance Literature. *Journal of Molecular Recognition* **2012**, 25, (9), 451-473.
140. Janshoff, A.; Galla, H.-J.; Steinem, C., Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors—An Alternative to Optical Biosensors? *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, 39, (22), 4004-4032.
141. Sauerbrey, G., Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik* **1959**, 155, (2), 206-222.
142. Nomura, T.; Okuhara, M., Frequency shifts of piezoelectric quartz crystals immersed in organic liquids. *Analytica Chimica Acta* **1982**, 142, (Supplement C), 281-284.
143. Dickert, F. L.; Forth, P.; Bulst, W.-E.; Fischerauer, G.; Knauer, U., SAW devices-sensitivity enhancement in going from 80 MHz to 1 GHz. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1998**, 46, (2), 120-125.

144. Danielsson, B.; Hedberg, U.; Rank, M.; Xie, B., Heat Sensitive Biosensors. In *Uses of Immobilized Biological Compounds*, Guilbault, G. G.; Mascini, M., Eds. Springer Netherlands: Dordrecht, 1993; pp 541-548.
145. Xu, N.; Bai, J.; Peng, Y.; Qie, Z.; Liu, Z.; Tang, H.; Liu, C.; Gao, Z.; Ning, B., Pretreatment-free detection of diazepam in beverages based on a thermometric biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, 241, (Supplement C), 504-512.
146. Justino, C. I. L.; Freitas, A. C.; Pereira, R.; Duarte, A. C.; Rocha Santos, T. A. P., Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2015**, 68, 2-17.
147. Das, P.; Das, M.; Chinnadayala, S. R.; Singha, I. M.; Goswami, P., Recent advances on developing 3rd generation enzyme electrode for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics* **2016**, 79, 386-397.
148. Wang, J., Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges. *Electroanalysis* **2001**, 13, (12), 983-988.
149. Erden, P. E.; Kılıç, E., A review of enzymatic uric acid biosensors based on amperometric detection. *Talanta* **2013**, 107, 312-323.
150. Kuswandi, B.; Mascini, M., Enzyme Inhibition Based Biosensors for Environmental Monitoring. *Current Enzyme Inhibition* **2005**, 1, (3), 207-221.
151. Pundir, C. S.; Chauhan, N., Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. *Analytical Biochemistry* **2012**, 429, (1), 19-31.
152. Liu, S.; Zheng, Z.; Li, X., Advances in pesticide biosensors: current status, challenges, and future perspectives. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2013**, 405, (1), 63-90.
153. Crivianu-Gaita, V.; Thompson, M., Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. *Biosensors and Bioelectronics* **2016**, 85, 32-45.
154. Lu, B.; Smyth, M. R.; O'Kennedy, R., Tutorial review. Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors. *Analyst* **1996**, 121, (3), 29R-32R.
155. Ricci, F.; Volpe, G.; Micheli, L.; Palleschi, G., A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Analytica Chimica Acta* **2007**, 605, (2), 111-129.
156. Binder, P., Immunocapteurs et biocapteurs non enzymatiques: principes et applications possibles en analyse. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* **1990**, 5, (1), 23-33.
157. Peterson, J.; Green, G.; Iida, K.; Caldwell, B.; Kerrison, P.; Bernich, S.; Aoyagi, K.; Lee, S. R., Detection of Hepatitis C Core Antigen in the Antibody Negative 'Window' Phase of Hepatitis C Infection. *Vox Sanguinis* **2000**, 78, (2), 80-85.
158. Sarkar, P.; Pal, P. S.; Ghosh, D.; Setford, S. J.; Tothill, I. E., Amperometric biosensors for detection of the prostate cancer marker (PSA). *International Journal of Pharmaceutics* **2002**, 238, (1-2), 1-9.
159. Jiang, X.; Li, D.; Xu, X.; Ying, Y.; Li, Y.; Ye, Z.; Wang, J., Immunosensors for detection of pesticide residues. *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, 23, (11), 1577-1587.
160. Su, L.; Jia, W.; Hou, C.; Lei, Y., Microbial biosensors: A review. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, 26, (5), 1788-1799.
161. Hassan, S. H. A.; Van Ginkel, S. W.; Hussein, M. A. M.; Abskharon, R.; Oh, S.-E., Toxicity assessment using different bioassays and microbial biosensors. *Environment International* **2016**, 92, (Supplement C), 106-118.
162. Chee, G.-J., Development and characterization of microbial biosensors for evaluating low biochemical oxygen demand in rivers. *Talanta* **2013**, 117, (Supplement C), 366-370.

163. D'Souza, S. F., Microbial biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **2001**, 16, (6), 337-353.
164. Lucarelli, F.; Tombelli, S.; Minunni, M.; Marrazza, G.; Mascini, M., Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection. *Analytica Chimica Acta* **2008**, 609, (2), 139-159.
165. Irvine, D.; Tuerk, C.; Gold, L., Selexion: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment with integrated optimization by non-linear analysis. *Journal of Molecular Biology* **1991**, 222, (3), 739-761.
166. Yuan, T.; Liu, Z.-Y.; Hu, L.-Z.; Xu, G.-B., Electrochemical and Electrochemiluminescent Aptasensors. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **2011**, 39, (7), 972-977.
167. Zhao, W.-W.; Xu, J.-J.; Chen, H.-Y., Photoelectrochemical DNA Biosensors. *Chemical Reviews* **2014**, 114, (15), 7421-7441.
168. Liu, A.; Wang, K.; Weng, S.; Lei, Y.; Lin, L.; Chen, W.; Lin, X.; Chen, Y., Development of electrochemical DNA biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2012**, 37, 101-111.
169. Scognamiglio, V.; Antonacci, A.; Lambrea, M. D.; Litescu, S. C.; Rea, G., Synthetic biology and biomimetic chemistry as converging technologies fostering a new generation of smart biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **2015**, 74, (Supplement C), 1076-1086.
170. Brüggemann, O.; Haupt, K.; Ye, L.; Yilmaz, E.; Mosbach, K., New configurations and applications of molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A* **2000**, 889, (1), 15-24.
171. Cieplak, M.; Kutner, W., Artificial Biosensors: How Can Molecular Imprinting Mimic Biorecognition? *Trends in Biotechnology* **2016**, 34, (11), 922-941.
172. Gui, R.; Jin, H.; Guo, H.; Wang, Z., Recent advances and future prospects in molecularly imprinted polymers-based electrochemical biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, 100, (Supplement C), 56-70.
173. Sharma, P. S.; Iskierko, Z.; Pietrzyk-Le, A.; D'Souza, F.; Kutner, W., Bioinspired intelligent molecularly imprinted polymers for chemosensing: A mini review. *Electrochemistry Communications* **2015**, 50, 81-87.
174. Sassolas, A.; Blum, L. J.; Leca-Bouvier, B. D., Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances* **2012**, 30, (3), 489-511.
175. Talbert, J. N.; Goddard, J. M., Enzymes on material surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2012**, 93, (Supplement C), 8-19.
176. Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R., Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* **2007**, 40, (6), 1451-1463.
177. Chaudhari, P. S.; Gokarna, A.; Kulkarni, M.; Karve, M. S.; Bhoraskar, S. V., Porous silicon as an entrapping matrix for the immobilization of urease. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2005**, 107, (1), 258-263.
178. Dridi, F.; Marrakchi, M.; Gargouri, M.; Garcia-Cruz, A.; Dzyadevych, S.; Vocanson, F.; Saulnier, J.; Jaffrezic-Renault, N.; Lagarde, F., Thermolysin entrapped in a gold nanoparticles/polymer composite for direct and sensitive conductometric biosensing of ochratoxin A in olive oil. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, 221, (Supplement C), 480-490.
179. Susmel, S.; Toniolo, R.; Pizzariello, A.; Dossi, N.; Bontempelli, G., A piezoelectric immunosensor based on antibody entrapment within a non-totally rigid polymeric film. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2005**, 111, (Supplement C), 331-338.

180. Wallington, S.-A.; Labayen, T.; Poppe, A.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Wright, J. D., Sol-gel entrapped materials for optical sensing of solvents and metal ions. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1997**, 38, (1), 48-52.
181. De Flora, A., Use of Red Blood Cells (RBC) as Carriers of Bioactive Compounds. In *Uses of Immobilized Biological Compounds*, Guilbault, G. G.; Mascini, M., Eds. Springer Netherlands: Dordrecht, 1993; pp 23-33.
182. Rosenberg, M. F.; Jones, M. N.; Vadgama, P. M., A liposomal enzyme electrode for measuring glucose. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1991**, 1115, (2), 157-165.
183. Song, H. Y.; Zhou, X.; Hobley, J.; Su, X., Comparative Study of Random and Oriented Antibody Immobilization as Measured by Dual Polarization Interferometry and Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. *Langmuir* **2012**, 28, (1), 997-1004.
184. Menti, C.; Henriques, J. A. P.; Missell, F. P.; Roesch-Ely, M., Antibody-based magneto-elastic biosensors: potential devices for detection of pathogens and associated toxins. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2016**, 100, (14), 6149-6163.
185. Luppa, P. B.; Sokoll, L. J.; Chan, D. W., Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta* **2001**, 314, (1–2), 1-26.
186. Arya, S. K.; Chaubey, A.; Malhotra, B. D., Fundamentals and Applications of Biosensors. *Proceedings of the Indian National Science Academy* **2006**, 72, (4), 249-266.
187. Brisset, F.; Vieillard, J.; Berton, B.; Morin-Grognon, S.; Duclairoir-Poc, C.; Le Derf, F., Surface functionalization of cyclic olefin copolymer with aryldiazonium salts: A covalent grafting method. *Applied Surface Science* **2015**, 329, 337-346.
188. Shin, J. Y.; Park, J. Y.; Liu, C.; He, J.; Kim, S. C., Chemical structure and physical properties of cyclic olefin copolymers (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **2005**, 77, (5), 801-814.
189. Sung, D.; Yang, S.; Park, J. W.; Jon, S., High-density immobilization of antibodies onto nanobead-coated cyclic olefin copolymer plastic surfaces for application as a sensitive immunoassay chip. *Biomedical Microdevices* **2013**, 15, (4), 691-698.
190. Sung, D.; Shin, D. H.; Jon, S., Toward immunoassay chips: Facile immobilization of antibodies on cyclic olefin copolymer substrates through pre-activated polymer adlayers. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, 26, (9), 3967-3972.
191. *The Physics and Chemistry of SiO₂ and the Si-SiO₂ Interface 2*. Springer, Boston, MA: 1993.
192. Tang, C.; Zhu, J.; Li, Z.; Zhu, R.; Zhou, Q.; Wei, J.; He, H.; Tao, Q., Surface chemistry and reactivity of SiO₂ polymorphs: A comparative study on α -quartz and α -cristobalite. *Applied Surface Science* **2015**, 355, (Supplement C), 1161-1167.
193. Zhuravlev, L. T., The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, 173, (1–3), 1-38.
194. Ma, K.-S.; Reza, F.; Saaem, I.; Tian, J., Versatile surface functionalization of cyclic olefin copolymer (COC) with sputtered SiO₂ thin film for potential BioMEMS applications. *Journal of Materials Chemistry* **2009**, 19, (42), 7914-7920.
195. Jin-Hyung, L.; Sang Kyung, K.; Hyung-Ho, P.; Tae Song, K., TiO₂ coated microfluidic devices for recoverable hydrophilic and hydrophobic patterns. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2015**, 25, (3), 035032.
196. El Fissi, L.; Vandormael, D.; Houssiau, L.; Francis, L. A., Surface functionalization of cyclic olefin copolymer (COC) with evaporated TiO₂ thin film. *Applied Surface Science* **2016**, 363, (Supplement C), 670-675.

197. Ou, C.-F.; Hsu, M.-C., *Preparation and characterization of cyclo olefin copolymer (COC)/silica nanoparticle composites by solution blending*. 2007; Vol. 14, p 373-378.
198. Ou, C.-F.; Hsu, M.-C., Preparation and properties of cycloolefin copolymer/silica hybrids. *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, 104, (4), 2542-2548.
199. Jafari, S. H.; Hesabi, M.-N.; Khonakdar, H. A.; Asadinezhad, A., Cyclic olefin copolymer/layered silicate nanocomposite: solid and melt viscoelastic properties and degradation behavior. *Journal of Polymer Research* **2012**, 19, (7), 9911.
200. Yang, T. C. K.; Lin, S. S. Y.; Chuang, T.-H., Kinetic analysis of the thermal oxidation of metallocene cyclic olefin copolymer (mCOC)/TiO₂ composites by FTIR microscopy and thermogravimetry (TG). *Polymer Degradation and Stability* **2002**, 78, (3), 525-532.
201. Favia, P.; Palumbo, F.; Stendardo, M. V.; d'Agostino, R., Plasma-Treatments of Polymers by NH₃-H₂ RF Glow Discharges: Coupling Plasma and Surface Diagnostics. In *Surface Modification of Polymeric Biomaterials*, Ratner, B. D.; Castner, D. G., Eds. Springer US: Boston, MA, 1997; pp 69-77.
202. Moss, S. J.; Jolly, A. M.; Tighe, B. J., Plasma oxidation of polymers. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* **1986**, 6, (4), 401-416.
203. Hwang, S.-J.; Tseng, M.-C.; Shu, J.-R.; Her Yu, H., Surface modification of cyclic olefin copolymer substrate by oxygen plasma treatment. *Surface and Coatings Technology* **2008**, 202, (15), 3669-3674.
204. Ellinas, K.; Tsougeni, K.; Petrou, P. S.; Boulousis, G.; Tsoukleris, D.; Pavlatou, E.; Tserepi, A.; Kakabakos, S. E.; Gogolides, E., Three-dimensional plasma micro-nanotextured cyclo-olefin-polymer surfaces for biomolecule immobilization and environmentally stable superhydrophobic and superoleophobic behavior. *Chemical Engineering Journal* **2016**, 300, 394-403.
205. Felix, T.; Trigueiro, J. S.; Bundaleski, N.; Teodoro, O. M. N. D.; Sério, S.; Debacher, N. A., Functionalization of polymer surfaces by medium frequency non-thermal plasma. *Applied Surface Science* **2018**, 428, (Supplement C), 730-738.
206. Tatoulian, M.; Arefi-Khonsari, F.; Amouroux, J.; Rejeb, S. B.; Martel, A.; Durand, N. F.; Lawrence, J. F.; Le Goffic, F., Immobilization of Biomolecules on NH₃, H₂/NH₃ Plasma-Treated Nitrocellulose Films. *Plasmas and Polymers* **1998**, 3, (4), 211-229.
207. Kai, J.; Sohn, Y.-S.; Ahn, C. H., Study on Protein (IgG) Adsorption in Terms of Surface Modification of Cyclic Olefin Copolymer (COC) for Protein Biochip. In *Micro Total Analysis Systems 2002: Proceedings of the μTAS 2002 Symposium, held in Nara, Japan, 3-7 November 2002 Volume 1*, Baba, Y.; Shoji, S.; van den Berg, A., Eds. Springer Netherlands: Dordrecht, 2002; pp 419-421.
208. Liu, K.; Gu, P.; Hamaker, K.; Fan, Z. H., Characterization of bonding between poly(dimethylsiloxane) and cyclic olefin copolymer using corona discharge induced grafting polymerization. *Journal of Colloid and Interface Science* **2012**, 365, (1), 289-295.
209. Brisset, F. Développement de nouvelles méthodes de greffage de biomolécules sur un matériau polymérique original. Université de Rouen, 2015.
210. Nikolova, D.; Dayss, E.; Leps, G.; Wutzler, A., Surface modification of cycloolefinic copolymers for optimization of the adhesion to metals. *Surface and Interface Analysis* **2004**, 36, (8), 689-693.
211. Ooi, H. W.; Cooper, S. J.; Huang, C.-Y.; Jennins, D.; Chung, E.; Maeji, N. J.; Whittaker, A. K., Coordination complexes as molecular glue for immobilization of antibodies on cyclic olefin copolymer surfaces. *Analytical Biochemistry* **2014**, 456, (Supplement C), 6-13.

212. Rånby, B.; Yang, W. T.; Tretinnikov, O., Surface photografting of polymer fibers, films and sheets. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **1999**, 151, (1), 301-305.
213. Pu, Q.; Oyesanya, O.; Thompson, B.; Liu, S.; Alvarez, J. C., On-Chip Micropatterning of Plastic (Cyclic Olefin Copolymer, COC) Microfluidic Channels for the Fabrication of Biomolecule Microarrays Using Photografting Methods. *Langmuir* **2007**, 23, (3), 1577-1583.
214. Jena, R. K.; Yue, C. Y., Cyclic olefin copolymer based microfluidic devices for biochip applications: Ultraviolet surface grafting using 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine. *Biomicrofluidics* **2012**, 6, (1), 012822.
215. Stachowiak, T. B.; Mair, D. A.; Holden, T. G.; Lee, L. J.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J., Hydrophilic surface modification of cyclic olefin copolymer microfluidic chips using sequential photografting. *Journal of Separation Science* **2007**, 30, (7), 1088-1093.
216. Laib, S.; MacCraith, B. D., Immobilization of Biomolecules on Cycloolefin Polymer Supports. *Analytical Chemistry* **2007**, 79, (16), 6264-6270.
217. Liu, L.-H.; Yan, M., Perfluorophenyl Azides: New Applications in Surface Functionalization and Nanomaterial Synthesis. *Accounts of chemical research* **2010**, 43, (11), 1434-1443.
218. Mecomber, J. S.; Murthy, R. S.; Rajam, S.; Singh, P. N. D.; Gudmundsdottir, A. D.; Limbach, P. A., Photochemical Functionalization of Polymer Surfaces for Microfabricated Devices. *Langmuir* **2008**, 24, (7), 3645-3653.
219. Jeong, S. P.; Hong, D.; Kang, S. M.; Choi, I. S.; Lee, J. K., Polymeric Functionalization of Cyclic Olefin Copolymer Surfaces with Nonbiofouling Poly(oligo(Ethylene Glycol) Methacrylate). *Asian Journal of Organic Chemistry* **2013**, 2, (7), 568-571.
220. Kim, J.; Hong, D.; Jeong, S.; Kong, B.; Kang, S. M.; Kim, Y.-G.; Choi, I. S., Aryl Azide Based, Photochemical Patterning of Cyclic Olefin Copolymer Surfaces with Non-Biofouling Poly[(3-(methacryloylamino)propyl)dimethyl(3-sulfopropyl)ammonium hydroxide]. *Chemistry – An Asian Journal* **2011**, 6, (2), 363-366.
221. Carvalho, R. R.; Pujari, S. P.; Vrouwe, E. X.; Zuilhof, H., Mild and Selective C–H Activation of COC Microfluidic Channels Allowing Covalent Multifunctional Coatings. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2017**, 9, (19), 16644-16650.
222. Griess, P., Vorläufige Notiz über die Einwirkung von salpetriger Säure auf Amidinitro- und Aminotriphenyl-säure. *Annalen der Chemie und Pharmacie* **1858**, 106, 123-125.
223. Heinrich, M. R., Intermolecular Olefin Functionalisation Involving Aryl Radicals Generated from Arenediazonium Salts. *Chemistry – A European Journal* **2009**, 15, (4), 820-833.
224. Jiang, C.; Moraes Silva, S.; Fan, S.; Wu, Y.; Alam, M. T.; Liu, G.; Justin Gooding, J., Aryldiazonium salt derived mixed organic layers: From surface chemistry to their applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2017**, 785, 265-278.
225. Gam-Derouich, S.; Gosecka, M.; Lepinay, S.; Turmine, M.; Carbonnier, B.; Basinska, T.; Slomkowski, S.; Millot, M.-C.; Othmane, A.; Ben Hassen-Chehimi, D.; Chehimi, M. M., Highly Hydrophilic Surfaces from Polyglycidol Grafts with Dual Antifouling and Specific Protein Recognition Properties. *Langmuir* **2011**, 27, (15), 9285-9294.
226. Kullapere, M.; Kozlova, J.; Matisen, L.; Sammelseg, V.; Menezes, H. A.; Maia, G.; Schiffrin, D. J.; Tammeveski, K., Electrochemical properties of aryl-modified gold electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2010**, 641, (1–2), 90-98.

227. Khoshroo, M.; Rostami, A. A., Characterization of the organic molecules deposited at gold surface by the electrochemical reaction of diazonium salts. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2010**, 647, (2), 117-122.
228. Mahouche, S.; Mekni, N.; Abbassi, L.; Lang, P.; Perruchot, C.; Jouini, M.; Mammeri, F.; Turmine, M.; Romdhane, H. B.; Chehimi, M. M., Tandem diazonium salt electroreduction and click chemistry as a novel, efficient route for grafting macromolecules to gold surface. *Surface Science* **2009**, 603, (21), 3205-3211.
229. Polsky, R.; Harper, J. C.; Wheeler, D. R.; Dirk, S. M.; Arango, D. C.; Brozik, S. M., Electrically addressable diazonium-functionalized antibodies for multianalyte electrochemical sensor applications. *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, 23, (6), 757-764.
230. Le Floch, F.; Simonato, J.-P.; Bidan, G., Electrochemical signature of the grafting of diazonium salts: A probing parameter for monitoring the electro-addressed functionalization of devices. *Electrochimica Acta* **2009**, 54, (11), 3078-3085.
231. Harper, J. C.; Polsky, R.; Wheeler, D. R.; Brozik, S. M., Maleimide-Activated Aryl Diazonium Salts for Electrode Surface Functionalization with Biological and Redox-Active Molecules. *Langmuir* **2008**, 24, (5), 2206-2211.
232. Gorlushko, D. A.; Filimonov, V. D.; Krasnokutskaya, E. A.; Semenischeva, N. I.; Go, B. S.; Hwang, H. Y.; Cha, E. H.; Chi, K.-W., Iodination of aryl amines in a water-paste form via stable aryl diazonium tosylates. *Tetrahedron Letters* **2008**, 49, (6), 1080-1082.
233. Kolvari, E.; Amoozadeh, A.; Koukabi, N.; Otokesh, S.; Isari, M., Aryl diazonium nanomagnetic sulfate and potassium iodide: an iodination process. *Tetrahedron Letters* **2014**, 55, (27), 3648-3651.
234. Nemati, F.; Elhampour, A., Green and efficient diazotization-iodination of aryl amines using cellulose sulfuric acid as a biodegradable and recyclable proton source under solvent-free condition. *Scientia Iranica* **2012**, 19, (6), 1594-1596.
235. Griffete, N.; Dechezelles, J.-F.; Scheffold, F., Dense covalent attachment of magnetic iron oxide nanoparticles onto silica particles using a diazonium salt chemistry approach. *Chemical Communications* **2012**, 48, (92), 11364-11366.
236. Nuttall, R. H.; Roberts, E. R.; Sharp, D. W. A., The infra-red spectra of some stable diazonium salts. *Spectrochimica Acta* **1961**, 17, (9), 947-952.
237. Qu, M.; Zhang, Y.; He, J.; Cao, X.; Zhang, J., Pd-catalyzed coupling reaction on the organic monolayer: Sonogashira reaction on the silicon (1 1 1) surfaces. *Applied Surface Science* **2008**, 255, (5, Part 2), 2608-2612.
238. Ladner, Y.; d'Orlyé, F.; Perréard, C.; Da Silva, B.; Guyon, C.; Tatoulian, M.; Griveau, S.; Bedioui, F.; Varenne, A., Surface Functionalization of COC Microfluidic Materials by Plasma and Click Chemistry Processes. *Plasma Processes and Polymers* **2013**, 10, (11), 959-969.
239. Collins, G.; O'Dwyer, C.; Morris, M.; Holmes, J. D., Palladium-Catalyzed Coupling Reactions for the Functionalization of Si Surfaces: Superior Stability of Alkenyl Monolayers. *Langmuir* **2013**, 29, (38), 11950-11958.
240. Zhang, K.; Xu, X.-H.; Qing, F.-L., Copper-Promoted Ritter-Type Trifluoroethoxylation of (Hetero)arene-diazonium Tetrafluoroborates: A Method for the Preparation of Trifluoroethyl Imidates. *European Journal of Organic Chemistry* **2016**, 2016, (30), 5088-5090.
241. Liras, M.; García, O.; Quijada-Garrido, I.; París, R., Transformation of the Bromine End Group into Thiol in (Meth)acrylic Polymers Synthesized by Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* **2011**, 44, (6), 1335-1339.

242. McGettrick, J. D.; Crockford, T.; Schofield, W. C. E.; Badyal, J. P. S., Bromine-containing functional nanolayers for biomolecule immobilization. *Applied Surface Science* **2009**, 256, (3, Supplement), S30-S34.
243. Liang, Y.; Meinhardt, T.; Jarre, G.; Ozawa, M.; Vrdoljak, P.; Schöll, A.; Reinert, F.; Krueger, A., Deagglomeration and surface modification of thermally annealed nanoscale diamond. *Journal of Colloid and Interface Science* **2011**, 354, (1), 23-30.
244. Vilà, N.; Bélanger, D., Mixtures of functionalized aromatic groups generated from diazonium chemistry as templates towards bimetallic species supported on carbon electrode surfaces. *Electrochimica Acta* **2012**, 85, (Supplement C), 538-547.
245. Lyskawa, J.; Bélanger, D., Direct Modification of a Gold Electrode with Aminophenyl Groups by Electrochemical Reduction of in Situ Generated Aminophenyl Monodiazonium Cations. *Chemistry of Materials* **2006**, 18, (20), 4755-4763.
246. Mévellec, V.; Roussel, S.; Tessier, L.; Chancolon, J.; Mayne-L'Hermite, M.; Deniau, G.; Viel, P.; Palacin, S., Grafting Polymers on Surfaces: A New Powerful and Versatile Diazonium Salt-Based One-Step Process in Aqueous Media. *Chemistry of Materials* **2007**, 19, (25), 6323-6330.
247. Berthelot, T.; Garcia, A.; Le, X. T.; El Morsli, J.; Jégou, P.; Palacin, S.; Viel, P., "Versatile toolset" for DNA or protein immobilization: Toward a single-step chemistry. *Applied Surface Science* **2011**, 257, (8), 3538-3546.
248. Liu, G.; Liu, J.; Davis, T. P.; Gooding, J. J., Electrochemical impedance immunosensor based on gold nanoparticles and aryl diazonium salt functionalized gold electrodes for the detection of antibody. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, 26, (8), 3660-3665.
249. Radi, A.-E.; Lates, V.; Marty, J.-L., Mediatorless Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Horseradish Peroxidase Immobilized on 4-Carboxyphenyl Film Electrografted on Gold Electrode. *Electroanalysis* **2008**, 20, (23), 2557-2562.
250. Radi, A.-E.; Muñoz-Berbel, X.; Cortina-Puig, M.; Marty, J.-L., Novel Protocol for Covalent Immobilization of Horseradish Peroxidase on Gold Electrode Surface. *Electroanalysis* **2009**, 21, (6), 696-700.
251. Harper, J. C.; Polsky, R.; Wheeler, D. R.; Lopez, D. M.; Arango, D. C.; Brozik, S. M., A Multifunctional Thin Film Au Electrode Surface Formed by Consecutive Electrochemical Reduction of Aryl Diazonium Salts. *Langmuir* **2009**, 25, (5), 3282-3288.
252. Gam-Derouich, S.; Mahouche-Chergui, S.; Turmine, M.; Piquemal, J.-Y.; Hassen-Chemi, D. B.; Omastová, M.; Chehimi, M. M., A versatile route for surface modification of carbon, metals and semi-conductors by diazonium salt-initiated photopolymerization. *Surface Science* **2011**, 605, (21-22), 1889-1899.
253. Paulik, M. G.; Brooksby, P. A.; Abell, A. D.; Downard, A. J., Grafting Aryl Diazonium Cations to Polycrystalline Gold: Insights into Film Structure Using Gold Oxide Reduction, Redox Probe Electrochemistry, and Contact Angle Behavior. *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, 111, (21), 7808-7815.
254. Laforgue, A.; Addou, T.; Bélanger, D., Characterization of the Deposition of Organic Molecules at the Surface of Gold by the Electrochemical Reduction of Aryldiazonium Cations. *Langmuir* **2005**, 21, (15), 6855-6865.
255. Radi, A.-E.; Muñoz-Berbel, X.; Cortina-Puig, M.; Marty, J.-L., An electrochemical immunosensor for ochratoxin A based on immobilization of antibodies on diazonium-functionalized gold electrode. *Electrochimica Acta* **2009**, 54, (8), 2180-2184.
256. Liu, G.; Böcking, T.; Gooding, J. J., Diazonium salts: Stable monolayers on gold electrodes for sensing applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2007**, 600, (2), 335-344.

257. Hauquier, F.; Matrab, T.; Kanoufi, F.; Combellas, C., Local direct and indirect reduction of electrografted aryldiazonium/gold surfaces for polymer brushes patterning. *Electrochimica Acta* **2009**, 54, (22), 5127-5136.
258. Gam-Derouich, S.; Carbonnier, B.; Turmine, M.; Lang, P.; Jouini, M.; Ben Hassen-Chehimi, D.; M. Chehimi, M., Electrografted Aryl Diazonium Initiators for Surface-Confined Photopolymerization: A New Approach to Designing Functional Polymer Coatings. *Langmuir* **2010**, 26, (14), 11830-11840.
259. Harper, J. C.; Polsky, R.; Dirk, S. M.; Wheeler, D. R.; Brozik, S. M., Electroaddressable Selective Functionalization of Electrode Arrays: Catalytic NADH Detection Using Aryl Diazonium Modified Gold Electrodes. *Electroanalysis* **2007**, 19, (12), 1268-1274.
260. Kullapere, M.; Marandi, M.; Sammelseg, V.; Menezes, H. A.; Maia, G.; Tammeveski, K., Surface modification of gold electrodes with anthraquinone diazonium cations. *Electrochemistry Communications* **2009**, 11, (2), 405-408.
261. Le Goff, A.; Artero, V.; Metayé, R.; Moggia, F.; Joussetme, B.; Razavet, M.; Tran, P. D.; Palacin, S.; Fontecave, M., Immobilization of FeFe hydrogenase mimics onto carbon and gold electrodes by controlled aryldiazonium salt reduction: an electrochemical, XPS and ATR-IR study. *International Journal of Hydrogen Energy* **2010**, 35, (19), 10790-10796.
262. Mrabet, B.; Mejri, A.; Mahouche, S.; Gam-Derouich, S.; Turmine, M.; Mechouet, M.; Lang, P.; Bakala, H.; Ladjimi, M.; Bakhrouf, A.; Tougaard, S.; Chehimi, M. M., Controlled adhesion of Salmonella Typhimurium to poly(oligoethylene glycol methacrylate) grafts. *Surface and Interface Analysis* **2011**, 43, (11), 1436-1443.
263. Bouden, S.; Pinson, J.; Vautrin-UI, C., Electrografting of diazonium salts: A kinetics study. *Electrochemistry Communications* **2017**, 81, (Supplement C), 120-123.
264. Andrieux, C. P.; Pinson, J., The Standard Redox Potential of the Phenyl Radical/Anion Couple. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (48), 14801-14806.
265. Corgier, B. P.; Bellon, S.; Anger-Leroy, M.; Blum, L. J.; Marquette, C. A., Protein-Diazonium Adduct Direct Electrografting onto SPRi-Biochip. *Langmuir* **2009**, 25, (16), 9619-9623.
266. Goddard, J. M.; Hotchkiss, J. H., Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science* **2007**, 32, (7), 698-725.
267. Cannon, J. G., Bioconjugate Techniques By Greg T. Hermanson. Academic Press, San Diego, CA. 1996. xxiii + 785 pp. 18 × 26 cm. ISBN 0-12-342335-X. \$99.00. \$49.95 (pbk). *Journal of Medicinal Chemistry* **1997**, 40, (4), 631-631.
268. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V., Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**, 61, (46), 10827-10852.
269. Han, S.-Y.; Kim, Y.-A., Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **2004**, 60, (11), 2447-2467.
270. Al-Warhi, T. I.; Al-Hazimi, H. M. A.; El-Faham, A., Recent development in peptide coupling reagents. *Journal of Saudi Chemical Society* **2012**, 16, (2), 97-116.
271. El-Faham, A.; Albericio, F., Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chemical Reviews* **2011**, 111, (11), 6557-6602.
272. Keleştemur, S.; Altunbek, M.; Culha, M., Influence of EDC/NHS coupling chemistry on stability and cytotoxicity of ZnO nanoparticles modified with proteins. *Applied Surface Science* **2017**, 403, (Supplement C), 455-463.
273. Twibanire, J.-d. A. K.; Grindley, T. B., Efficient and Controllably Selective Preparation of Esters Using Uronium-Based Coupling Agents. *Organic Letters* **2011**, 13, (12), 2988-2991.

274. Padiya, K. J.; Gavade, S.; Kardile, B.; Tiwari, M.; Bajare, S.; Mane, M.; Gaware, V.; Varghese, S.; Harel, D.; Kurhade, S., Unprecedented "In Water" Imidazole Carbonylation: Paradigm Shift for Preparation of Urea and Carbamate. *Organic Letters* **2012**, 14, (11), 2814-2817.
275. Binda, C.; Li, M.; Hubálek, F.; Restelli, N.; Edmondson, D. E.; Mattevi, A., Insights into the mode of inhibition of human mitochondrial monoamine oxidase B from high-resolution crystal structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, 100, (17), 9750-9755.
276. Tavari, M.; Malan, S. F.; Joubert, J., Design, synthesis, biological evaluation and docking studies of sulfonyl isatin derivatives as monoamine oxidase and caspase-3 inhibitors. *Med. Chem. Comm.* **2016**, 7, (8), 1628-1639.
277. Wang, Z., Wurtz Synthesis. In *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, John Wiley & Sons, Inc.: 2010.
278. Wurtz, A., Ueber eine neue Klasse organischer Radicale. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1855**, 96, (3), 364-375.
279. Kiso, Y.; Yamamoto, K.; Tamao, K.; Kumada, M., Asymmetric homogeneous hydrosilylation with chiral phosphine-palladium complexes. *Journal of the American Chemical Society* **1972**, 94, (12), 4373-4374.
280. Decottignies, A. Catalyse dans l'eau en présence de cyclodextrine native ou modifiée : Application au couplage croisé de type Suzuki. 2013.
281. Suzuki, A., Cross-coupling Reactions of Organoboranes: An Easy Way for C-C Bonding. In *Nobel Lecture*, Grandin, K., Ed. The Nobel Foundation: Aula Magna, Stockholm University, 2010; pp 206-235.
282. Johansson Seechurn, C. C. C.; Kitching, M. O.; Colacot, T. J.; Snieckus, V., Palladium-Catalyzed Cross-Coupling: A Historical Contextual Perspective to the 2010 Nobel Prize. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, 51, (21), 5062-5085.
283. Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N., A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines. *Tetrahedron Letters* **1975**, 16, (50), 4467-4470.
284. Dieck, H. A.; Heck, F. R., Palladium catalyzed synthesis of aryl, heterocyclic and vinylic acetylene derivatives. *Journal of Organometallic Chemistry* **1975**, 93, (2), 259-263.
285. Chinchilla, R.; Nájera, C., The Sonogashira Reaction: A Booming Methodology in Synthetic Organic Chemistry. *Chemical Reviews* **2007**, 107, (3), 874-922.
286. Gottardo, C.; Kraft, T. M.; Hossain, M. S.; Zawada, P. V.; Muchall, H. M., Linear free-energy correlation analysis of the electronic effects of the substituents in the Sonogashira coupling reaction. *Canadian Journal of Chemistry* **2008**, 86, (5), 410-415.
287. Hansen, A. M. Studies towards a total synthesis of manzamine A. University of Glasgow, 2010.
288. Ishida, T.; Kobayashi, R.; Yamada, T., Novel Method of Tetramic Acid Synthesis: Silver-Catalyzed Carbon Dioxide Incorporation into Propargylic Amine and Intramolecular Rearrangement. *Organic Letters* **2014**, 16, (9), 2430-2433.
289. Huang, B.; Du, D.; Zhang, R.; Wu, X.; Xing, Z.; He, Y.; Huang, W., Synthesis, characterization and biological studies of diosgenyl analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, 22, (24), 7330-7334.
290. Krishnegowda, G.; Prakasha Gowda, A. S.; Tagaram, H. R. S.; Carroll, K. F. S.-O.; Irby, R. B.; Sharma, A. K.; Amin, S., Synthesis and biological evaluation of a novel class of isatin analogs as dual inhibitors of tubulin polymerization and Akt pathway. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, 19, (20), 6006-6014.

291. Zinelaabidine, C.; Souad, O.; Zoubir, J.; Malika, B.; Nour-Eddine, A., A Simple and Efficient Green Method for the Deprotection of N-Boc in Various Structurally Diverse Amines under Water-mediated Catalyst-free Conditions. *International Journal of Chemistry* **2012**, 4, (3), 73.
292. Pensa, E.; Cortés, E.; Corthey, G.; Carro, P.; Vericat, C.; Fonticelli, M. H.; Benítez, G.; Rubert, A. A.; Salvarezza, R. C., The Chemistry of the Sulfur–Gold Interface: In Search of a Unified Model. *Accounts of Chemical Research* **2012**, 45, (8), 1183-1192.
293. Snopok, B. A.; Goltsov, Y. G.; Kostyukevich, E. V.; Matkovskaja, L. A.; Shirshov, Y. M.; Venger, E. F., Self-assembled multilayer superstructures as immobilization support for bioreceptors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2003**, 95, (1), 336-343.
294. Mansard, G.; Estour, F.; Galons, H.; Lafont, O., Improvement of synthetic pathways to thalidomide ester derivatives. *Heterocycles* **2005**, 65, (12), 2957-2964.
295. Kato, T.; Hatanaka, K. Immobilized Sugar Chain. 2008.
296. Ranyuk, E.; Lebel, R.; Bérubé-Lauzière, Y.; Klarskov, K.; Lecomte, R.; van Lier, J. E.; Guérin, B., ⁶⁸Ga/DOTA- and ⁶⁴Cu/NOTA-Phthalocyanine Conjugates as Fluorescent/PET Bimodal Imaging Probes. *Bioconjugate Chemistry* **2013**, 24, (9), 1624-1633.
297. Gawande, M. B.; Branco, P. S., An efficient and expeditious Fmoc protection of amines and amino acids in aqueous media. *Green Chemistry* **2011**, 13, (12), 3355-3359.
298. Miyaura, N.; Suzuki, A., Stereoselective synthesis of arylated (E)-alkenes by the reaction of alk-1-enylboranes with aryl halides in the presence of palladium catalyst. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1979**, (19), 866-867.
299. Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A., A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides. *Tetrahedron Letters* **1979**, 20, (36), 3437-3440.
300. Chemler, S. R.; Trauner, D.; Danishefsky, S. J., The B-Alkyl Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reaction: Development, Mechanistic Study, and Applications in Natural Product Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, 40, (24), 4544-4568.
301. Okamoto, T.; Jiang, Y.; Qu, F.; Mayer, A. C.; Parmer, J. E.; McGehee, M. D.; Bao, Z., Synthesis and Characterization of Pentacene– and Anthradithiophene–Fluorene Conjugated Copolymers Synthesized by Suzuki Reactions. *Macromolecules* **2008**, 41, (19), 6977-6980.
302. Magano, J.; Dunetz, J. R., Large-Scale Applications of Transition Metal-Catalyzed Couplings for the Synthesis of Pharmaceuticals. *Chemical Reviews* **2011**, 111, (3), 2177-2250.
303. Stanforth, S. P., Catalytic cross-coupling reactions in biaryl synthesis. *Tetrahedron* **1998**, 54, (3), 263-303.
304. Wang, M.; Yuan, X.; Li, H.; Ren, L.; Sun, Z.; Hou, Y.; Chu, W., Nickel-catalysed Suzuki–Miyaura cross-coupling reactions of aryl halides with arylboronic acids in ionic liquids. *Catalysis Communications* **2015**, 58, (Supplement C), 154-157.
305. More, S.; Jadhav, S.; Salunkhe, R.; Kumbhar, A., Palladium supported ionic liquid phase catalyst (Pd@SILP-PS) for room temperature Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction. *Molecular Catalysis* **2017**, 442, (Supplement C), 126-132.
306. Jerome, P.; Sathishkumar, P. N.; Bhuvanesh, N. S. P.; Karvembu, R., Towards phosphine-free Pd(II) pincer complexes for catalyzing Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction in aqueous medium. *Journal of Organometallic Chemistry* **2017**, 845, (Supplement C), 115-124.
307. Khan, M.; Albalawi, G. H.; Shaik, M. R.; Khan, M.; Adil, S. F.; Kuniyil, M.; Alkathlan, H. Z.; Al-Warthan, A.; Siddiqui, M. R. H., Miswak mediated green synthesized palladium nanoparticles as effective catalysts for the Suzuki coupling reactions in aqueous media. *Journal of Saudi Chemical Society* **2017**, 21, (4), 450-457.

308. Puget, B. New poludentate ligands for homogeneous catalysis application to the aryl-aryl cross coupling reaction of Suzuki-Miyaura. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2008.
309. Leadbeater, N. E.; Resouly, S. M., Suzuki aryl couplings mediated by phosphine-free nickel complexes. *Tetrahedron* **1999**, 55, (40), 11889-11894.
310. Lamei, K.; Eshghi, H.; Bakavoli, M.; Rounaghi, S. A.; Esmaeili, E., Carbon coated copper nanostructures as a green and ligand free nanocatalyst for Suzuki cross-coupling reaction. *Catalysis Communications* **2017**, 92, (Supplement C), 40-45.
311. Thathagar, M. B.; Beckers, J.; Rothenberg, G., Copper-Catalyzed Suzuki Cross-Coupling Using Mixed Nanocluster Catalysts. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, (40), 11858-11859.
312. Gniewek, A., Suzuki-Miyaura cross-coupling of phenylboronic acid with aryl halides catalyzed by palladium and nickel species supported on alumina-based oxides. *Journal of Organometallic Chemistry* **2016**, 823, (Supplement C), 90-96.
313. Rathod, P. V.; Jadhav, V. H., Palladium incorporated on carbonaceous catalyst for Suzuki coupling reaction in water. *Tetrahedron Letters* **2017**, 58, (10), 1006-1009.
314. Amatore, C.; Jutand, A.; Suarez, A., Intimate mechanism of oxidative addition to zerovalent palladium complexes in the presence of halide ions and its relevance to the mechanism of palladium-catalyzed nucleophilic substitutions. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, 115, (21), 9531-9541.
315. Casado, A. L.; Espinet, P., On the Configuration Resulting from Oxidative Addition of RX to Pd(PPh₃)₄ and the Mechanism of the cis-to-trans Isomerization of [PdRX(PPh₃)₂] Complexes (R = Aryl, X = Halide). *Organometallics* **1998**, 17, (5), 954-959.
316. Smith, G. B.; Dezeny, G. C.; Hughes, D. L.; King, A. O.; Verhoeven, T. R., Mechanistic Studies of the Suzuki Cross-Coupling Reaction. *The Journal of Organic Chemistry* **1994**, 59, (26), 8151-8156.
317. Miyaura, N.; Yamada, K.; Suginome, H.; Suzuki, A., Novel and convenient method for the stereo- and regiospecific synthesis of conjugated alkenes and alkenynes via the palladium-catalyzed cross-coupling reaction of 1-alkenylboranes with bromoalkenes and bromoalkynes. *Journal of the American Chemical Society* **1985**, 107, (4), 972-980.
318. Gillie, A.; Stille, J. K., Mechanisms of 1,1-reductive elimination from palladium. *Journal of the American Chemical Society* **1980**, 102, (15), 4933-4941.
319. Lv, G.; Mai, W.; Jin, R.; Gao, L., Immobilization of Dipyridyl Complex to Magnetic Nanoparticle via Click Chemistry as a Recyclable Catalyst for Suzuki Cross-Coupling Reactions. *Synlett* **2008**, 2008, (09), 1418-1422.
320. Damgaard, M.; Al-Khawaja, A.; Vogensen, S. B.; Jurik, A.; Sijm, M.; Lie, M. E. K.; Bæk, M. I.; Rosenthal, E.; Jensen, A. A.; Ecker, G. F.; Frølund, B.; Wellendorph, P.; Clausen, R. P., Identification of the First Highly Subtype-Selective Inhibitor of Human GABA Transporter GAT3. *ACS Chemical Neuroscience* **2015**, 6, (9), 1591-1599.
321. Chiang, Y.-R.; Li, A.; Leu, Y.-L.; Fang, J.-Y.; Lin, Y.-K., An In Vitro Study of the Antimicrobial Effects of Indigo Naturalis Prepared from *Strobilanthes formosanus* Moore. *Molecules* **2013**, 18, (11), 14381.
322. Krebs, F. In silico and experimental studies of the DXR & enantiomerically pur D- and L-GAP synthesis. Université de Strasbourg, 2016.
323. Popov, P. Novel computational methods to predict protein-protein interactions on the structural level. Université Grenoble Alpes, 2015.
324. Grosdidier, A. Design of a new docking software and its applications to drug design. 2007.

325. Fortuné, A. Study and Optimisation of Immunogenic Compounds and Multidrug Resistance Modulators by Molecular Modeling Technics. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006.
326. Singh, U. C.; Kollman, P. A., An approach to computing electrostatic charges for molecules. *Journal of Computational Chemistry* **1984**, 5, (2), 129-145.
327. Silva, B. N. M.; Silbva, B. V.; Silva, F. C.; Gonzaga, D. T. G.; Ferreira, V. F.; Pinto, A. C., Synthesis of novel isatin-type 5'-(4-Alkyl/Aryl-1H-1,2,3-triazoles) via 1,3-dipolar cycloaddition reactions. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2013**, 24, (2), 179-183.
328. Wang, C. H.; White, A. R.; Schwartz, S. N.; Alluri, S.; Cattabiani, T. M.; Zhang, L. K.; Chan, T. M.; Buevich, A. V.; Ganguly, A. K., Novel synthesis and functionalization of ortho-ortho disubstituted biphenyls and a highly condensed novel heterocycle using radical cyclization reaction. *Tetrahedron* **2012**, 68, (47), 9750-9762.
329. Vine, K. L.; Locke, J. M.; Ranson, M.; Pyne, S. G.; Bremner, J. B., In vitro cytotoxicity evaluation of some substituted isatin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, 15, (2), 931-938.
330. Lin, J.-C.; Kim, J.-H.; Kellar, J. A.; Hersam, M. C.; Nguyen, S. T.; Bedzyk, M. J., Building Conjugated Organic Structures on Si(111) Surfaces via Microwave-Assisted Sonogashira Coupling. *Langmuir* **2010**, 26, (6), 3771-3773.
331. Xue, C.; Arumugam, G.; Palaniappan, K.; Hackney, S. A.; Liu, H.; Liu, J., Construction of conjugated molecular structures on gold nanoparticles via the Sonogashira coupling reactions. *Chemical Communications* **2005**, (8), 1055-1057.
332. Gietter, A. A. S.; Pupillo, R. C.; Yap, G. P. A.; Beebe, T. P.; Rosenthal, J.; Watson, D. A., On-surface cross-coupling methods for the construction of modified electrode assemblies with tailored morphologies. *Chemical Science* **2013**, 4, (1), 437-443.
333. Mikkelsen, H.; McMullan, R.; Filloux, A., The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in *ladS*. *PLoS One* **2011**, 6, e29113.
334. Little, R. D., Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Edition Theodora W. Green (The Rowland Institute for Science) and Peter G. M. Wuts (Pharmacia and Upjohn Company). John Wiley & Sons, Inc., New York, NY. 1999. xxi + 779 pp. 15.5 × 23 cm. \$84.95. ISBN 0-471-16019-9. *Journal of Natural Products* **1999**, 62, (9), 1349-1349.
335. Sultane, P. R.; Mete, T. B.; Bhat, R. G., A convenient protocol for the deprotection of N-benzyloxycarbonyl (Cbz) and benzyl ester groups. *Tetrahedron Letters* **2015**, 56, (16), 2067-2070.
336. Polsky, R.; Harper, J. C.; Wheeler, D. R.; Arango, D. C.; Brozik, S. M., Electrically Addressable Cell Immobilization Using Phenylboronic Acid Diazonium Salts. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, 47, (14), 2631-2634.
337. Khan, M.; Park, S.-Y., Specific detection of avidin-biotin binding using liquid crystal droplets. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, 127, 241-246.
338. Chung, D.-J.; Kim, K.-C.; Choi, S.-H., Electrochemical DNA biosensor based on avidin-biotin conjugation for influenza virus (type A) detection. *Applied Surface Science* **2011**, 257, (22), 9390-9396.
339. Lepoitevin, M.; Bechelany, M.; Balanzat, E.; Janot, J.-M.; Balme, S., Non-Fluorescence label protein sensing with track-etched nanopore decorated by avidin/biotin system. *Electrochimica Acta* **2016**, 211, 611-618.
340. Ballesta-Claver, J.; Ametis-Cabello, J.; Morales-Sanfrutos, J.; Megía-Fernández, A.; Valencia-Mirón, M. C.; Santoyo-González, F.; Capitán-Vallvey, L. F., Electrochemiluminescent disposable cholesterol biosensor based on avidin-biotin assembling

with the electroformed luminescent conducting polymer poly(luminol-biotinylated pyrrole). *Analytica Chimica Acta* **2012**, 754, 91-98.

341. Fabre, B.; Samorì, C.; Bianco, A., Immobilization of double functionalized carbon nanotubes on glassy carbon electrodes for the electrochemical sensing of the biotin–avidin affinity. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2012**, 665, 90-94.

342. Lei, K. F.; Yang, S.-I.; Tsai, S.-W.; Hsu, H.-T., Paper-based microfluidic sensing device for label-free immunoassay demonstrated by biotin–avidin binding interaction. *Talanta* **2015**, 134, 264-270.

343. He, P.-G.; Takahashi, T.; Hoshi, T.; Anzai, J.-i.; Suzuki, Y.; Osa, T., Preparation of enzyme multilayers on electrode surface by use of avidin and biotin-labeled enzyme for biosensor applications. *Materials Science and Engineering: C* **1994**, 2, (1), 103-106.

344. DeMarco, D. R.; Lim, D. V., Direct Detection of Escherichia Coli O157:H7 in Unpasteurized Apple Juice With an Evanescent Wave Biosensor. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology* **2001**, 9, (4), 241-257.

345. Golden, J.; Shriver-Lake, L.; Sapsford, K.; Ligler, F., A “do-it-yourself” array biosensor. *Methods* **2005**, 37, (1), 65-72.

346. Zhu, P.; Shelton, D. R.; Karns, J. S.; Sundaram, A.; Li, S.; Amstutz, P.; Tang, C.-M., Detection of water-borne E. coli O157 using the integrating waveguide biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **2005**, 21, (4), 678-683.

347. Cosner, C. C.; Markiewicz, J. T.; Bourbon, P.; Mariani, C. J.; Wiest, O.; Rujoi, M.; Rosenbaum, A. I.; Huang, A. Y.; Maxfield, F. R.; Helquist, P., Investigation of N-Aryl-3-alkylidenpyrrolinones as Potential Niemann–Pick Type C Disease Therapeutics. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52, (20), 6494-6498.

348. Rennhack, A.; Jumpertz, T.; Ness, J.; Baches, S.; Pietrzik, C. U.; Weggen, S.; Bulic, B., Synthesis of a potent photoreactive acidic γ -secretase modulator for target identification in cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, 20, (21), 6523-6532.

349. Molander, G. A.; Cadoret, F., Synthesis of the stereogenic triad of the halicyclamine A core. *Tetrahedron Letters* **2011**, 52, (17), 2199-2202.

Modification de l'Isatine pour la fabrication de biocapteurs

Pseudomonas Aeruginosa est un pathogène opportuniste qui adapte son comportement aux molécules présentes dans son milieu. Il augmente en virulence lorsqu'il détecte des peptides natriurétiques dans son environnement. L'isatine est une molécule qui bloque cet effet. Pour mieux comprendre sur quel récepteur l'isatine agit, la conception d'un biocapteur a été menée. Un biocapteur est un outil alliant un bioélément, réagissant spécifiquement avec une cible biologique, et un support physique permettant la transduction du signal pour le rendre mesurable. Les travaux de thèse suivants décrivent la préparation d'un transducteur polymérique, le copolymère d'oléfines cycliques (COC), par greffage de sels de diazonium en surface. La modification de l'isatine par couplage pallado-catalysé compose la partie principale des travaux de synthèse organique effectués. Les méthodes de couplages peptidiques en surface et techniques d'accroche des isatines modifiées sur les surfaces des transducteurs (or ou COC) sont également décrites dans ce manuscrit. Pour finir, l'évaluation des effets biologiques des isatines modifiées et des biocapteurs conçus a été effectuée sur *Pseudomonas Aeruginosa* et sur d'autres bactéries.

Mot clés : isatine ; *Pseudomonas Aeruginosa* ; couplage pallado-catalysé ; COC

Isatin modification for biosensors making

Pseudomonas Aeruginosa is an opportunistic pathogen which can adapt its behavior to the present molecules in its surrounding. It increases in virulence when it detects natriuretics peptides in its environment. Isatin is a molecule which can block this effect. To determine on which receptor isatin acts on, the conception of a biosensor have been conducted. A biosensor is a tool combining a bioelement, reacting specifically with a biological target, and a physical support allowing the transduction of the signal to make it measurable. The following thesis describes the preparation of a polymeric transducer, the cyclic olefin copolymer (COC), by diazonium salts surface grafting. Isatin modification by palladium-catalysed coupling reaction represents the major part of the organic synthesis carried out. Surface peptide coupling methods and techniques to link the modified isatins to the surfaces of transducers (gold or COC) are also described in this dissertation. To finish, biological effects of the modified isatins and designed biosensors have been evaluated on *Pseudomonas Aeruginosa* and others bacteria.

Keywords: Isatin; *Pseudomonas Aeruginosa*; palladium-catalysed coupling reaction; COC