

Elaboration de biocapteurs électrochimiques d'ADN à base de nano-structure de polypyrrole pour le diagnostic de la tuberculose

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
Préparée à l'université Paris-Sud

École doctorale n°571 : molécules, matériaux,
Instrumentation, et biosystème (2MIB)
Spécialité de doctorat : Chimie

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 11/04/2018, par

Rabih KHODER

Composition du Jury :

Christophe SOLA
Professeur université Paris-Sud

Président

Jean-Louis MARTY
Professeur, Université de Perpignan

Rapporteur

Abdelhamid ERRACHID
Professeur Université Lyon 1

Rapporteur

Valérie STAMBOULI-SENE
Professeur, Université de Grenoble

Examineur

Hafsa KORRI-YO USSOUFI
Directrice de Recherche, Paris-Sud

Directeur de thèse

Remerciements

Ce manuscrit de thèse n'est pas uniquement le fruit de mon travail, il est celui de l'ensemble des personnes qui sont intervenues avec leurs compétences et à divers degrés durant ces trois dernières années.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à ma directrice de thèse Madame **Hafsa KORRI-YOUSSOUFI**, directrice de recherche CNRS, pour sa présence sans faille, pour son écoute, ses conseils fructueux et ses remarques pertinentes. Je la remercie encore pour sa gentillesse, sa générosité, sa confiance et son soutien perpétuel. Vous avez su m'orienter lorsqu'il le fallait tout en me laissant une grande autonomie. Merci encore.

Je remercie aussi tous les membres de notre équipe de recherche LCBB pour la sympathie et l'aide qu'ils m'ont témoignés durant ces années de dur labeur pour leurs accueils chaleureux, leurs aides et leurs gentillesse.

Je remercie également les membres de jury, Pr. **Abdelhamid ERRACHID**, Pr. **Jean-Louis MARTY**, Dr. Valérie **STAMBOULI-SENE**, Pr. Christophe **SOLA** d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Les mots me manquent pour exprimer ma gratitude à ma famille et spécialement à ma chère maman **Maha** pour son soutien moral, sa présence et son encouragement durant les périodes difficiles et pour la confiance dont elle a fait preuve. Sans elle, je n'aurais pas été ce que je suis aujourd'hui.

Merci à Hajer, Hicham, Caroline, Youssef et Layth pour leurs amitiés, leurs encouragements et leurs soutiens durant ma thèse.



Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	3
Introduction	6
1. Chapitre 1: Bibliographie	9
1.1. Introduction générale sur les biocapteurs électrochimiques :	10
1.2. Evaluation de la performance d'un biocapteur	11
1.2.1. Sélectivité	11
1.2.2. Sensibilité	11
1.2.3. Temps	12
1.2.4. Reproductibilité	13
1.3. Les différents types de biocapteurs d'affinité	13
1.3.1. Immunocapteur	13
1.3.2. Les biocapteurs d'ADN	15
1.3.2.1. Définition de l'ADN	15
1.3.2.2. Extraction et amplification de l'ADN	15
1.3.2.3. Biocapteur d'ADN	16
1.4. Transducteur et matériels	18
1.4.1. Introduction sur l'intérêt des polypyrrole comme transducteurs	18
1.4.1.1. Polypyrrole conducteur	18
1.4.2. Formation	18
1.4.2.1. Synthèse par voie chimique	18
1.4.2.2. Synthèse par voie électrochimique	19
1.4.3. Synthèse des nanostructure polypyrrole	20
1.4.3.1. Méthode avec moule dur «hard template»	21
1.4.3.2. Synthèse avec moule souple « Soft template »	22
1.4.3.3. Moule réactif « Wire Template »	23
1.4.3.4. Synthèse sans moule	25
1.4.4. Méthode de synthèse de polypyrroles avec différentes Morphologie	25
1.4.4.1. Synthèse de polypyrrole avec morphologie nanofils.	26
1.4.4.2. Synthèse de polypyrrole avec morphologie nanosphère	28
1.5. Méthodes d'attachement des biomolécules	30
1.5.1. Immobilisation covalente par voie chimique	31
1.5.2. Immobilisation covalente par voie électrochimique	32
1.5.2.1. Fonctionnalisation du polypyrrole par réduction de sel diazonium	32
1.5.2.2. Fonctionnalisation par oxydation des amines	33
1.6. Méthodes de détection de l'ADN	35
1.6.1. . Détection indirecte	35
1.6.1.1. Détection utilisant des molécules redox interagissant avec l'ADN	36
1.6.1.2. ADN marqué par des nanoparticules	36
1.6.1.3. ADN marqué par enzyme	38
1.6.2. Détection directe	39
1.6.2.1. Signal électrochimique du PPy et modulation de son activité redox	39
1.6.2.2. Introduction d'une sonde redox	41
1.6.2.3. Détection basée sur les propriétés redox des bases d'ADN	42
1.7. M. Tuberculose	43



1.7.1. Type de bactéries et structure	43
1.7.2. Information génétique de la séquence d'ADN de la tuberculose	44
1.7.3. Résistance aux antibiotiques	45
1.7.4. Biocapteurs pour la détection l'ADN génomique de la tuberculose	45
1.8. Objectif de la thèse:	46
2. Chapitre 2: E-DNA biosensors based on polypyrrole nanowires modified with ferrocene for DNA detection of M. tuberculosis	58
2.1. Introduction	60
2.2. Experimental section:	62
2.2.1. Reagents:	62
2.2.2. Instrumentals:	63
2.2.3. Electrodeposition of polypyrrole nanowire:	63
2.2.4. Functionalization of PPy with PAMAM G2 Dendrimers and EDA:	64
2.2.5. Association of ferrocene and DNA Probe:	64
2.2.6. Hybridization with DNA target:	65
2.3. Results and discussions	66
2.3.1. Synthesis of polypyrrole nanowires and characterization	66
2.3.1.1. SEM Characterization	66
2.3.1.1. Electrochemical characterization	67
2.3.1. Functionalization of PPy nanowires by electrochemical patterning and Characterization	69
2.3.1.1. Association of PAMAM G2 Dendrimer	69
2.3.1.2. EIS characterization :	71
2.3.2. Electrodeposition of ethylene diamine	72
2.3.3. FT-IR and XPS analyses	74
2.3.3.1. FT-IR characterization	74
2.3.3.2. XPS characterization	75
2.3.4. Association of ferrocene to PPy- nanowires and characterization of the electrode surface	78
2.3.4.1. CV and SWV after ferrocene attachement	78
2.3.4.2. EIS after ferrocene attachement	80
2.3.5. Kinetic characterizations of attached ferrocene on PPy nanowire	81
2.3.6. Properties of biosensors towards DNA detection	84
2.3.7. Detection in real sample of M. Tuberculosis and resistant strand	85
2.4. Conclusion	87
3. Chapitre 3: Biosensor based on polypyrrole nanospheres for DNA detection of M. tuberculosis	93
3.1. Introduction	95
3.2. Section A: Synthesis of PPy nanospheres by electrochemical method	97
3.2.1. Materials and methods	97
3.2.2. Results and Discussion	98
3.2.2.1. Synthesis of Polypyrrole nanospheres and characterization	98
SEM characterization	98
Analyze the morphologies of PPy nanospheres by AFM	100
XPS characterization	101
3.2.2.2. Electrodeposition of Ethylene diamine and PAMAM	103
3.2.2.3. Association of ferrocene to PPy nanospheres and characterization of the electrode surface	105
3.2.2.4. Properties of biosensors towards DNA detection	107
3.2.2.5. Detection in real sample of M. Tuberculosis and resistant strand	109
3.3. Section B: Chemical syntheses of PPy nanospheres	111
3.3.1. Materials and methods	111
3.3.1.1. Synthesis of polypyrrole nanospheres:	111
3.3.1.2. Preparation of covered ns-PPy electrode:	111
3.3.1.3. Association of naphtoquinone and DNA Probe:	111



3.3.2. Results and discussion:	112
3.3.2.1. Particle Size measurement of the prepared polypyrrole nanospheres by DLS	112
3.3.2.2. Characterization by SEM:	113
3.3.2.3. Electrochemical characterization by EIS	114
3.3.2.4. Association of naphthoquinone to PPy nanospheres and characterization and Electrochemical characterization:	115
3.3.2.5. Kinetic characterizations of attached naphthoquinone on PPy nanosphere	116
3.3.2.6. Properties of biosensors towards DNA detection	116
3.3.2.7. Detection in real sample of M. Tuberculosis and resistant strand	118
3.4. Conclusion:	119
Conclusion Générale:	121
List of abbreviations	124
APPENDIX: Experimental techniques	125
Résumé	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
Abstract	<i>Error! Bookmark not defined.</i>

Introduction

Au cours des dernières années, les biocapteurs à ADN ont fait preuve d'une grande efficacité dans la possibilité de détection de microorganismes pathogènes et cela dans de nombreux domaines d'applications. Ce sont les propriétés de reconnaissance moléculaire de l'ADN dans la réaction d'hybridation d'ADN et la conversion de cette réaction biologique par un signal mesurable optique, électrique ou électrochimique qui a permis le développement de systèmes de bioanalyse. Les biocapteurs électrochimiques d'ADN sont devenus rapidement une technique attirante pour l'identification des biomolécules en raison des possibilités de miniaturisation, du faible coût et de la possibilité de la lecture directe des signaux électriques. Ces biocapteurs fonctionnent souvent avec un transducteur qui permet d'une part l'immobilisation des biomolécules et d'autre part le transfert d'électrons et la quantification de cette réaction.

Le polypyrrole est l'un des polymères conducteurs les plus utilisés comme transducteur pour concevoir des capteurs bio-analytiques. Il est fréquemment utilisé dans l'application de biocapteurs électrochimiques, y compris les biocapteurs à ADN. C'est grâce à ces diverses propriétés électriques, chimiques et biologiques, que le polypyrrole représente un matériau de choix pour réaliser des biocapteurs électrochimiques.

C'est dans ce contexte que le projet de ma thèse s'inscrit. En effet, mes travaux se focalisent sur le développement des nanomatériaux de polypyrroles synthétisés avec différentes morphologies nanofils et nanosphère et l'étude de l'impact des différentes morphologies sur les propriétés électriques du matériau et également sur les performances des biocapteurs électrochimiques d'ADN obtenus. J'ai aussi étudié l'effet de la fonctionnalisation par différentes chaînes linéaire et ramifiée sur la structure des nanomatériaux de polypyrroles et leurs effets sur la quantité de biomolécules immobilisées. D'ailleurs, chacune de ces morphologies permet au polypyrrole d'agir dans le biocapteur d'ADN électrochimique avec des propriétés de détection différentes. Ces études ont été menées dans le but de démontrer une preuve de concept de biocapteurs d'ADN avec des oligonucléotides synthétiques et par la suite ont été appliqués à la détection d'ADN génomique de bactérie *M. Tuberculosis* après la lyse et amplification par PCR. .

Le rapport de thèse démontre la démarche poursuivie et les résultats obtenus suivant chaque morphologie de polypyrrole. Il est ainsi divisé en trois chapitres.



Le premier chapitre de la thèse est consacré à la bibliographie. Ce chapitre a pour vocation de donner les contours du sujet et de situer le contexte de ma thèse. Une partie concerne une présentation générale des biocapteurs électrochimique, mais plus spécialement encore les développements sur les biocapteurs électrochimiques d'ADN à base polypyrrole. L'intérêt étant de mettre la lumière sur l'utilisation des polypyrroles comme transducteurs grâce à leurs propriétés intéressantes. A cet effet, les méthodes de synthèse chimique, et électrochimique de polypyrrole avec différentes morphologies sont détaillées. Ce premier chapitre est aussi consacré aux développements des méthodes d'immobilisation de biomolécules sur les matériaux. Ces méthodes constituent une étape clé dans la conception des biocapteurs. Finalement, je me suis attardé sur des généralités concernant la bactérie *Mycobacterium tuberculosis*, et les informations sur la séquence d'ADN de la tuberculose, la tuberculose pharamaco-résistante et les différentes méthodes de diagnostics de cette maladie.

Le second chapitre se polarise sur le biocapteur ampérométrique d'ADN élaboré à base des nanofils de polypyrrole. Dans un premier temps, les propriétés morphologique, moléculaires et électrochimique des nanofils de polypyrrole sont étudiés par XPS, MEB et Impédance électrochimiques. Les résultats obtenus sont présentés discutés et comparés par rapport au film compact. Dans une seconde partie, nous avons procédé à deux types de fonctionnalisation des nanofils de polypyrrole afin d'introduire des groupes fonctionnels en surface et de greffer le ferrocène qui joue le rôle de sonde redox : la première par les dendrimères de seconde génération G2 et la deuxième par l'éthylène diamine. Cette réaction a été suivie par XPS et spectroscopie infrarouge. Le greffage du ferrocène m'a permis d'effectuer une caractérisation de la cinétique électrochimique de transfert de charge et d'évaluer les quantités des molécules de ferrocène greffées sur la surface de nanofils de polypyrrole modifié. Dans un second temps, une étude comparative de l'effet des nanofils de polypyrrole en comparaison avec les films 2-D compact sur les propriétés électriques et les quantités des molécules immobilisées a été effectuée. Ensuite, j'ai réalisé la détection d'ADN synthétique avec des séquences cibles de 15 ou 75 bases longueur par la réaction d'hybridation avec des sondes d'ADN de 15 bases immobilisées sur la surface du biocapteur. L'hybridation a été suivie par le signal redox du ferrocène et les performances des biocapteurs ont été analysées. Je me suis également intéressé à la détection l'ADN issue d'échantillons de PCR de cellules infectées de *M. tuberculosis*. Pour finir, une étude de sélectivité du biocapteur a été réalisée pour distinguer le polymorphisme nucléotidique du gène *ropB* 531 muté qui confère la résistance aux traitements d'antibiotique de type rifampicine que j'ai comparé par rapport à la souche sauvage.

Le dernier chapitre se compose de deux parties :

Le biocapteur ampérométrique d'ADN élaboré à base de nanosphère polypyrrole synthétisé électrochimiquement constitue la pierre angulaire de la première partie de ce chapitre. Dans un premier temps, je présente la caractérisation morphologique par microscopie électronique à balayage (MEB), microscopie à force atomique (AFM) et la caractérisation physicochimique par la spectroscopie de photoélectrons X (XPS) de ce polypyrrole. Une étude similaire à celle opérée précédemment concernant les nanofils, par modification chimique avec une sonde ferrocène est également effectuée pour les nanosphères de polypyrrole et les propriétés électrochimiques sont étudiées. La détection électrochimique de l'ADN cible pour ce nouveau biocapteur est opérée avec l'ADN synthétique et l'ADN issue de PCR.

La deuxième partie de ce chapitre présente un biocapteur d'ADN élaboré à base de nanosphère de polypyrrole, qui contrairement à celui de la première partie, a été synthétisé chimiquement et cela pour étudier l'impact de la méthode de synthèse des nanomatériaux de polypyrrole sur la sensibilité de notre système. Une fois cette synthèse exécutée, une caractérisation par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et par MEB pour déterminer la taille des nanoparticules a été effectuée. Dans un second temps, une autre sonde redox à base de naphthoquinone dont le potentiel redox se situe dans les potentiels cathodiques a été fixé selon la même approche démontrée précédemment après une fonctionnalisation avec des dendrimères poly(amidoamine) G2. L'étude des propriétés électrochimiques et les caractérisations cinétiques après le greffage de cette sonde redox naphthoquinone ont été réalisées. Les études de détection électrochimique de l'ADN cible pour ce nouveau biocapteur ont été réalisées et comparées aux résultats précédents. Cette dernière partie permet de relever le rôle de la sonde redox dans ces biocapteurs électrochimiques et l'impact de son potentiel redox. Les résultats obtenus sont comparés par rapports aux autres structures du polypyrrole (compact et nanofils).

Finalement, une conclusion générale et des perspectives sont présentés, qui résument l'ensemble des résultats obtenus ainsi les conclusions sur le rôle des différentes morphologies du polypyrrole sur les propriétés des biocapteurs. Des perspectives pour la suite de ce travail sont proposées.

Chapitre 1: Bibliographie



1.1. Introduction générale sur les biocapteurs électrochimiques :

Les biocapteurs sont des outils d'analyse biologique qui peuvent reconnaître spécifiquement une molécule en solution. L'effet de la reconnaissance est transformé par un transducteur en un signal électrique observable et mesurable. Les analytes peuvent être, un polluant, un ADN viral, un antigène ou une protéine qui sont détectés par un biorécepteur qui présente une affinité sélective vis-à-vis de l'analyte. Ces derniers peuvent être des enzymes, des brins d'ADN, des anticorps ou des aptamères. Le biorécepteur est généralement attaché au transducteur qui permet de transformer la réaction biologique en un signal mesurable proportionnel à la concentration de la cible de la molécule. Dans la construction des biocapteurs, les transducteurs souvent utilisés sont des polymères organiques conducteurs (polypyrrole [1], polyaniline [2]), des nanotubes de carbone [3], du graphène [4], des nanoparticules métalliques [5] (nanoparticules d'or). Il existe différentes méthodes pour la fixation des biomolécules aux transducteurs comme : le greffage covalent, l'adsorption physique, les interactions électrostatiques, les systèmes d'affinité (biotine / streptavidine, adamantane / β -cyclodextrine), le piégeage dans des polymères ou des gels solins par réticulation chimique ou par électropolymérisation. L'objectif est de fixer les biorécepteurs biologiques sur le transducteur sans altérer leurs propriétés de réactivité vis-à-vis de l'analyte. Le signal de reconnaissance obtenu via le transducteur peut être mesuré par différentes techniques électrochimique [6], optique [7], piézoélectrique [8], conductimétrie [9], spectrophotométrie [10] et calorimétrie [11].

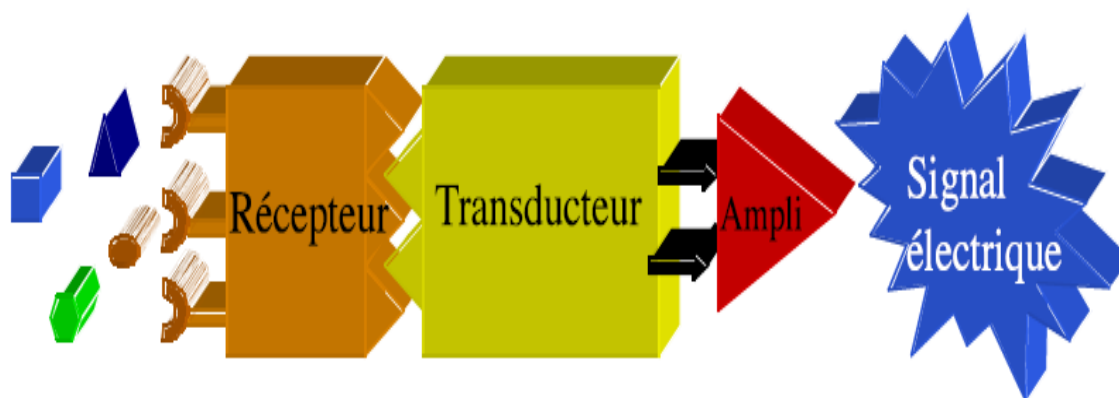


Figure 1 : Schéma présente le biocapteur

1.2. Evaluation de la performance d'un biocapteur

Plusieurs facteurs tels que le pH, la température et certains réactifs peuvent interférer en affectant la réponse d'un biocapteur. Les performances d'un biocapteur peuvent être évaluées grâce à différents paramètres qui sont requis pour toute application dans le domaine de l'analyse.

1.2.1. Sélectivité

Le biocapteur se doit de reconnaître uniquement l'analyte d'intérêt. Cela est d'autant plus vrai lorsque l'analyte se trouve dans un milieu complexe (plasma sanguin, eaux, ...) contenant plusieurs molécules différentes.

Les biocapteurs d'affinité[12] utilisent des biomolécules sélectives capables de réaliser des liaisons spécifiques (anticorps, récepteurs membranaires ou des oligonucléotides) avec l'analyte cible pour produire un signal électrique mesurable. La reconnaissance moléculaire est principalement déterminée par des complémentarités de taille et de forme du site pour l'analyte d'intérêt. La grande affinité et la spécificité de ces biomolécules pour leurs ligands en font des outils très sensibles et très sélectifs. Les biorécepteurs dits « naturels » que l'on trouve dans cette catégorie sont les anticorps et l'ADN.

Les anticorps catalytiques[13], la principale approche pour obtenir ces molécules consiste à produire des anticorps dirigés contre un composé analogue de l'état de transition d'une réaction donnée. Parmi les différents anticorps obtenus, certains ont à la fois la capacité de reconnaissance spécifique des anticorps et une activité catalytique permettant de transformer la substance cible (l'antigène) par un processus similaire à celui de la réaction enzymatique.

1.2.2. Sensibilité

Il est important non seulement de connaître pour quel intervalle de concentrations un biocapteur est efficace mais aussi de définir l'intervalle pour lequel, on a une réponse linéaire. Au niveau le plus bas, on a la limite de détection. Cette dernière est définie comme étant la concentration d'analyte déterminée à partir de l'intersection entre l'extrapolation de la portion linéaire de la courbe de calibration et la ligne horizontale correspondant à un changement de réponse nul.

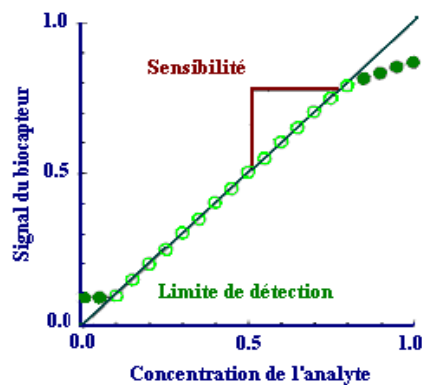


Figure 2: Courbe de calibration d'un biocapteur, (○) zone de linéarité montrant une limite de détection inférieure, (●) zone non linéaire pour des concentrations élevées. La sensibilité est donnée par la pente de la partie linéaire ($\Delta S/\Delta C$) [14].

1.2.3. Temps

Le temps de réponse court et une réponse rapide, relèvent de la performance d'un biocapteur. Le temps de réponse peut varier de quelques secondes à quelques minutes. Un temps de réponse inférieur à 5 min est jugé acceptable mais devient trop long s'il dépasse 10 min. Les biocapteurs enzymatiques opèrent par une consommation de substrats. Ainsi, l'agitation de la solution échantillon permet de réduire le temps de réponse du biocapteur en favorisant la diffusion du substrat à travers la couche active. La perméabilité de cette couche facilite aussi cette diffusion et permet d'atteindre plus rapidement une réponse stable. Le temps nécessaire à un biocapteur pour se régénérer afin d'être prêt pour une nouvelle mesure est appelé temps de régénération. Lors d'un nouvel essai, la réponse d'un biocapteur peut être immédiate ou nécessite un retour à l'équilibre. Généralement, ce paramètre est rapporté comme étant le nombre d'échantillons analysés par heure[15]. Les biocapteurs d'affinité nécessitent un temps de réponse plus long du fait de la cinétique d'interaction entre le bio-récepteur et l'analyte, de ce fait le temps de réponse peut être entre 30mn à 2h. Par ailleurs, la plupart des capteurs chimiques ou des biocapteurs possèdent une durée de vie limitée. De ce fait, il est important de connaître quand un biocapteur n'est plus opérationnel. Généralement, cette durée de vie est définie comme étant le temps après lequel la réponse d'un biocapteur diminue d'un certain pourcentage.

1.2.4. Reproductibilité

La précision ainsi que la reproductibilité des résultats avec une erreur inférieure à une certaine limite sont des facteurs importants pour juger de la performance d'un biocapteur. Plusieurs essais peuvent être réalisés afin de calculer, grâce aux méthodes statistiques, la déviation standard et le coefficient de corrélation. Dans le cas des biocapteurs, la reproductibilité entre les essais doit être inférieure à $\pm$ (5-10) %[15].

1.3. Les différents types de biocapteurs d'affinité

1.3.1. Immunocapteur

Par définition, les immunocapteurs (ou biocapteurs immunologiques) sont des dispositifs d'analyse qui détectent l'interaction entre un antigène et son anticorps spécifique. Les anticorps ou immunoglobulines sont des protéines complexes utilisés par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les agents pathogènes comme les bactéries et les virus[16]. Ils sont sécrétés par des cellules dérivées des lymphocytes B, les plasmocytes, et reconnaissent les antigènes de manière spécifique. Les anticorps peuvent être divisés en trois fragments : deux fragments FAB (fragment de liaison à l'antigène) et qui est spécifique à l'antigène et un fragment FC qui est un fragment constant et qui est commun d'un anticorps à l'autre, caractéristiques de l'espèce et de l'isotype. Pour la construction de l'immuno-capteur, les parties les plus utiles des anticorps sont les fragments variables (FAB), où l'interaction entre l'anticorps et l'antigène reste optimale.

L'interaction anticorps / antigène est caractérisée par la spécificité de la reconnaissance et de l'affinité qui correspond à la force de liaison entre l'anticorps et l'antigène spécifique. La spécificité de la reconnaissance moléculaire est la base de l'analyse des tests immunologiques aussi bien en solution qu'à l'état solide. Cette haute spécificité permet, dans de nombreux cas, une analyse directe de l'antigène dans certaines matrices complexes, comme dans l'échantillon de sang ou dans les urines non traitées. L'affinité de l'anticorps pour son l'antigène est très élevée, même à des très faibles concentrations. Ceci explique la haute sensibilité des immunocapteurs où les limites de détection pouvaient atteindre l'ordre du niveau de fmol dans certains cas.

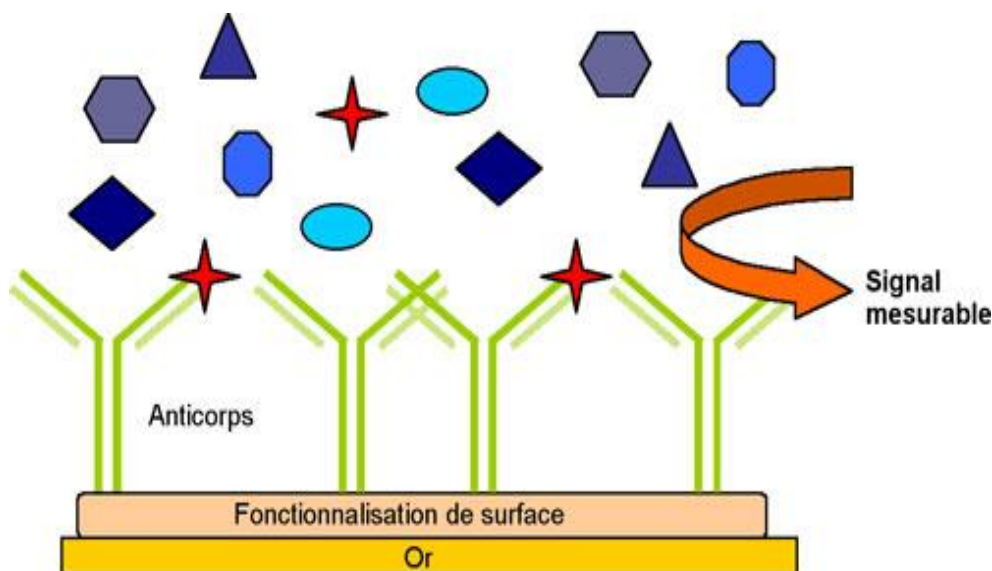


Figure 3 schéma de détection d'immunocapteurs

Les immunocapteurs électrochimiques ont été démontrés comme des méthodes puissantes de mesure des interactions antigène/anticorps. Cela pourrait être effectué par une mesure directe sans marquage ou par amplification avec une deuxième étape d'interaction avec un autre anticorps marqué. Ce système consiste donc en la capture de l'antigène par l'anticorps immobilisé à la surface suivi d'une deuxième interaction avec un autre anticorps marqué avec une sonde qui permet de quantifier la première étape. La méthode la plus couramment utilisée est le marquage de l'anticorps secondaire par une enzyme comme la phosphatase alcaline (ALP) [17] ou la peroxydase de raifort (HRP) [18]. Le signal provient suite à la réaction enzymatique par des substrats redox qui pourraient être mesurés électrochimiquement. D'autres méthodes ont été décrites, tels que le marquage d'anticorps secondaire avec des molécules redox ou des nanoparticules tels que des nanoparticules d'or[19] pour améliorer le signal électrochimique. Dans le cas d'une détection directe, l'interaction antigène/anticorps est transformée en un signal électrochimique grâce à des propriétés redox de transducteurs tels que des polymères organiques conducteurs (ex : polypyrrole[20], polyquinone [21]). Une autre méthode consiste à suivre le marqueur redox intégré dans le biocapteur (tel que ferrocene [22], ions de cuivre [23]). L'étude des propriétés électriques de l'interface entre le système biologique et le transducteur par la technique d'impédance électrochimique permet également de mesurer l'interaction entre l'anticorps / antigène sur la surface. Cette mesure peut être effectuée par l'impédance faradique qui va mesurer le transfert de charge à travers la formation du complexe en utilisant des espèces redox présentes dans la solution comme le couple redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ [24].

Les méthodes de mesure directe sont préférées comme dispositifs d'immunocapteurs car elles permettent l'analyse directe dans l'échantillon biologique sans les étapes d'amplifications. C'est pourquoi il est nécessaire de développer des transducteurs électrochimiques sensibles à ces interactions moléculaires.

1.3.2. Les biocapteurs d'ADN

1.3.2.1. Définition de l'ADN

Les acides nucléiques (ADN et ARN) sont les principaux constituants du noyau de la cellule vivante et servent pour le stockage et la transmission des codes génétiques. Chaque brin d'ADN est composé des bases azotées entourées par deux groupements phosphate chargés négativement. Ces bases sont au nombre de quatre : l'adénine (A), la guanine (G), la thymine (T) et la cytosine (C) ; elles sont complémentaires et peuvent s'associer deux à deux : l'adénine (A) s'associe avec la thymine (T) et la guanine (G) s'associe avec la cytosine (C) pour former l'ADN.

1.3.2.2. Extraction et amplification de l'ADN

L'ADN peut être extrait facilement en éclatant les cellules. Il est possible d'effectuer l'amplification d'une séquence d'ADN d'un gène souhaitée en s'appuyant sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)[25]. Plusieurs protocoles ont été développés pour l'extraction des séquences spécifiques d'ADN. La première étape de ces procédures consiste à détruire les membranes cellulaires et nucléaires pour libérer l'ADN. Pour cela deux voies sont possibles, la première consiste à lyser les cellules en utilisant des billes magnétiques de tailles similaires à celles des cellules. Une simple centrifugation du mélange bille/cellule permet d'exploser les membranes cellulaires et de libérer l'ADN génomique. La deuxième voie repose sur l'utilisation de tampon chimique composée de détergents et des enzymes de digestion comme la protéinase K qui est capable de digérer des cellules et d'extraire les acides nucléiques (ADN ou ARN).

La protéinase K est une endopéptidase qui coupe les liaisons peptidiques, de préférence au niveau du groupement carboxyle d'un aminoacide à chaîne latérale hydrophobe ou aromatique. L'étape critique qui suit la lyse cellulaire est la purification afin d'éliminer les protéines et les contaminants récupérés avec l'ADN en solution[26]. L'ADN récupéré subit différentes étapes

de lavage à l'isopropanol ou à l'éthanol, puis des étapes de centrifugation. La PCR permet d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour pouvoir le détecter et l'étudier. Ce processus consiste à introduire l'ADN génomique dans une solution tampon contenant deux amorces oligonucléotides et une forte concentration des désoxynucléosides triphosphates et d'une enzyme appelée ADN polymérase thermostable. Il y a lieu de signaler que les extrémités 3' des amorces pointent l'une vers l'autre et sont complémentaires des extrémités des séquences du brin d'ADN génomique qu'on souhaite amplifier. L'ADN polymérase thermostable est une enzyme de synthèse de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' de l'ADN, elle est isolée à partir de *Thermus aquaticus* ou de l'E. Coli[27]. La PCR est réalisée en 3 phases effectuées à différentes températures :

La dénaturation s'effectue à 94-96 °C qui consiste à dénaturer l'ADN des matrices pour obtenir deux simples brins.

L'hybridation s'effectue à 68 °C et consiste à borner et amorcer la réplication de la séquence à amplifier à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques.

L'élongation s'effectue à 70-74 °C et consiste à réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire.

Ces étapes sont successives et de ce fait l'amplification obtenue est qualifiée d'exponentielle.

Chaque brin d'ADN s'écrit toujours à partir de l'extrémité 5', associée à un groupement phosphate vers l'extrémité 3', associée à une fonction alcool. Cette succession de nucléotides correspond à une structure primaire simple brin, les deux brins complémentaires étant antiparallèles, ce qui signifie que pour un brin observé dans le sens 3' vers 5', le complémentaire est orienté de 5' vers 3'. La structure ainsi obtenue est alors dite double brin hélicoïdal. Cette orientation antiparallèle est nécessaire pour que les brins s'emboîtent dans l'espace à trois dimensions.

1.3.2.3. Biocapteur d'ADN

Les capteurs d'ADN consistent en une hybridation entre les chaînes d'ADN en solution après la lyse cellulaire ou la réaction d'amplification par PCR avec un brin d'ADN immobilisé à la surface du biocapteur, ce dernier agit comme une sonde de capture dont la séquence est spécifique à une



partie du gène à détecter. Dans le cas des biocapteurs électrochimique, l'appariement entre l'ADN sonde et l'ADN cible génère un signal qui sera transmis par l'électrode [28]. Le développement de systèmes pour la détection de l'ADN est motivé par plusieurs applications dans de nombreux domaines comme le diagnostic et analyse génétique de la présence de pathogènes dans différents milieux.

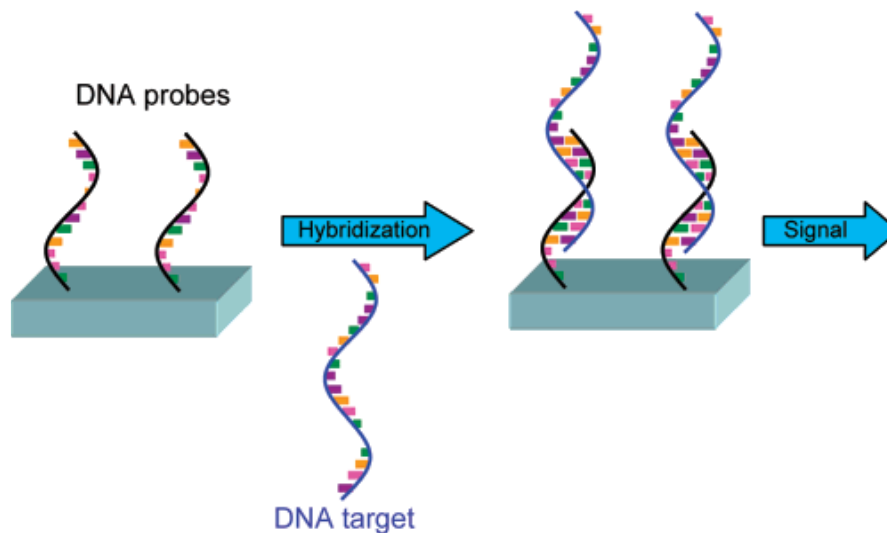


Figure 4 schéma représente la réaction d'hybridation

Les approches électrochimiques de détection de l'ADN sont nombreuses et peuvent être classées en deux catégories et la méthode avec amplification et la mesure directe sans étape supplémentaire d'amplification. Les méthodes indirectes comprennent :

- Le marquage enzymatique d'un ADN secondaire.
- Le marquage avec des molécules redox d'un ADN secondaire.
- Intercalent redox dans l'ADN double brin formée.

Les mesures directes qui ont été développées pour la détection de l'ADN consistent en :

La mesure de l'électro-activité intrinsèque de l'ADN [29] [30] par mesure de l'oxydation de la guanine. La mesure de la réponse d'une sonde redox associé à l'ADN sonde et dont la

proximité ou non par rapport à la surface de l'électrode est contrôlée par la réaction d'hybridation [31] [32]. Les modifications des propriétés interraciales ou électriques de transducteurs électrochimiques tels que les polymères organiques conducteurs, les nanomatériaux à base de nanotube de carbone ou de graphène [33][34].

1.4. Transducteur et matériels

1.4.1. Introduction sur l'intérêt des polypyrrole comme transducteurs

1.4.1.1. Polypyrrole conducteur

Polypyrrole (PPy) est l'un des polymères conducteurs les plus utilisés ces dernières années dans la conception de capteurs bioanalytiques[35] [36] du fait notamment de ses différentes propriétés telles que son activité redox [37], sa capacité d'échanger des ions et de discriminer entre les ions [38] [39] ses propriétés d'absorption des gaz, des protéines, d'ADN, son activité catalytique [40] [41] [41], de protection contre la corrosion [42]. Le polypyrrole peut être caractérisé par sa haute conductivité électrique, son caractère hydrophile et sa grande stabilité dans l'eau [43] et sa biocompatibilité. Son faible potentiel d'oxydation permet de faire croître un film polymère à partir de solutions aqueuses qui sont compatibles avec la plupart des éléments biologiques [44].

1.4.2. Formation

1.4.2.1. Synthèse par voie chimique

Le polypyrrole peut être synthétisé par des méthodes chimiques ou électrochimiques. La première consiste en l'oxydation chimique des monomères de pyrrole dans une solution aqueuse ou organique en présence d'un catalyseur métallique. La meilleure méthode pour préparer une grande quantité de PPy est la polymérisation chimique, car elle est libre de la restriction d'une forme d'électrode. Dans la polymérisation chimique, les oxydants généralement utilisés sont : $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, H_2O_2 et de nombreux types de sels contenant des ions de métaux de transition, par exemple Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cr^{6+} , Ce^{4+} , Ru^{3+} et Mn^{7+} .

La synthèse par voie chimique a été utilisée afin de préparer des polymères conducteurs par couplage oxydant de clusters de monomères. En effet il est possible d'obtenir en présence d'un acide

de Lewis ou d'un acide fort [45], et par l'intermédiaire d'un couplage cationique des monomères des produits de condensation composés des différentes structures de polymères et essentiellement de trimères [46]. Pour l'application des PPy préparés chimiquement, les principaux problèmes à améliorer sont la conductivité et la stabilité environnementale des polymères obtenus. Pour améliorer la capacité de traitement, et la dispersion de PPy composé de poudre fine de nombreux chercheurs se sont engagés dans le développement de PPy soluble [47] [48]. Les propriétés électriques et / ou la stabilité du PPy préparé chimiquement ont également été étudiées dans de nombreux groupes [49].

En général, en solution, les nanoparticules de polymères conducteurs (polypyrrole, polyanniline, polyacéthylènes) obtenues par oxydation des monomères sont protégées de l'agglomération par des stabilisants stériques adsorbés ou liés de manière covalente à la surface des particules [50] [51]. Cependant des nanostructures de polypyrrole ont récemment été synthétisées sans utilisation de stabilisant mais juste en utilisant un processus de polymérisation interfaciale (solution aqueuse/organique ou solution aqueuse/liquide ionique). [52]

1.4.2.2. Synthèse par voie électrochimique

La synthèse par voie électrochimique consiste à déposer un film de polymère par polymérisation anodique (qui conduit à la formation d'un film de polymère à la surface d'une électrode de métal noble (or, platine) ou d'autres matériaux conducteurs.

L'électropolymérisation peut être effectuée par une méthode galvanostatique (polymérisation à courant constant), une méthode potentiostatique (potentiel constant) ou potentiodynamique (en balayant le potentiel). La polymérisation effectuée par voie potentiostatique est réalisée par application d'un potentiel anodique qui correspond à l'oxydation du monomère. La polymérisation par méthode potentiodynamique est réalisée par application d'un balayage de potentiel entre le potentiel d'oxydation de monomère et le potentiel d'oxydo-reduction du film. Cette méthode permet de contrôler certaines propriétés du polypyrrole, notamment ses propriétés redox, sa perméabilité.

Le mécanisme de l'électropolymérisation consiste en une succession d'étapes électrochimique et chimique. La première étape consiste à oxyder le monomère pyrrole pour former des radicaux cations. Ensuite, la dimérisation par couplage de deux radicaux cationiques avec élimination de deux protons est obtenue. Les dimères peuvent être facilement oxydés en raison de la stabilité des cations radicaux. La polycondensation se poursuit par le couplage radicalaire de différentes chaînes

oxydées. La polymérisation est terminée lorsque le cation radicalaire n'est plus actif ou lorsque la dernière chaîne réactive est bloquée par un effet stérique.

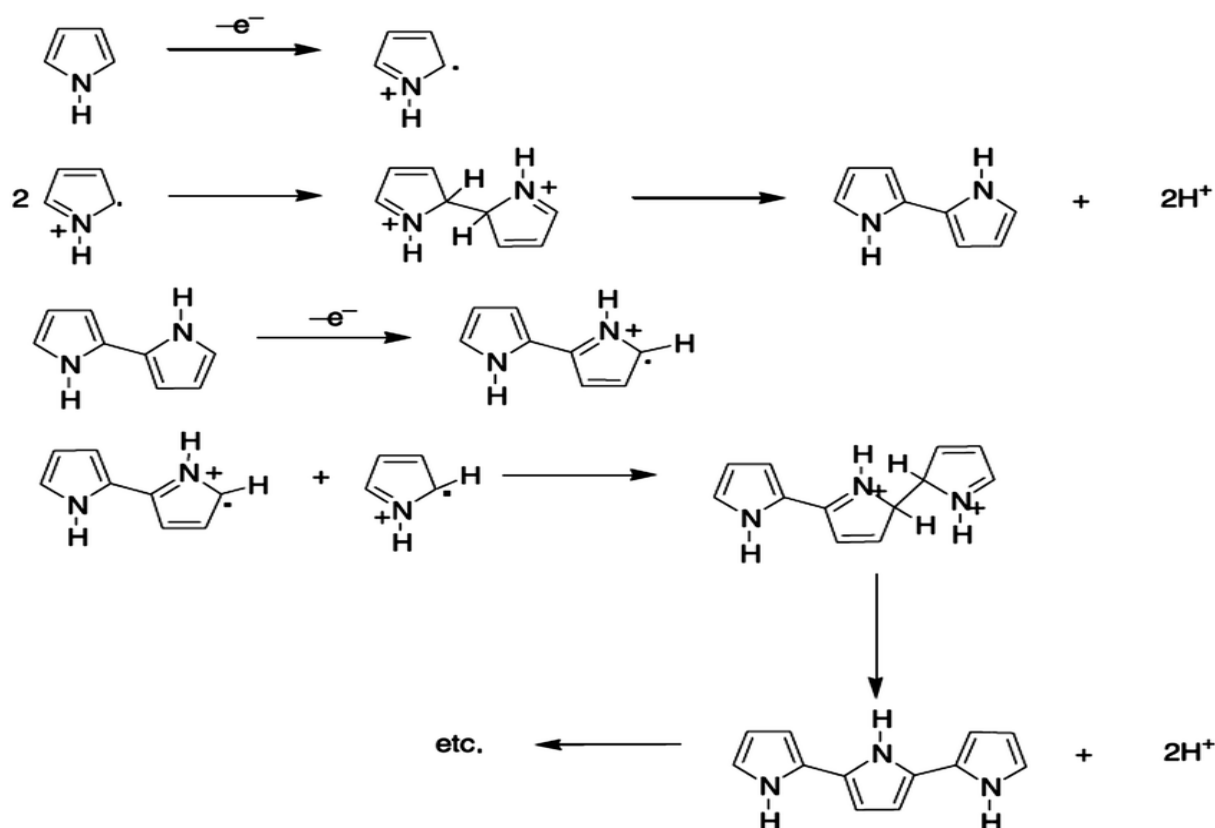


Figure 5 Représentation du mécanisme de polymérisation du pyrrole

1.4.3. Synthèse des nanostructures polypyrrole

La synthèse avec moule chimique ou physique « **template** » est l'une des méthodes les plus utilisées pour la fabrication de nanomatériaux tels que les métaux, les semi-conducteurs inorganiques, les céramiques ou encore les composites. C'est une méthode démontrée être efficace pour la synthèse de nanostructures de polymères conducteurs. Elle permet de contrôler la forme et les dimensions. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite à la fin de la synthèse de retirer la matrice support, ce qui peut avoir pour conséquence la détérioration partielle du matériau synthétisé.

Il existe différents types de synthèse avec moule mais les plus répandues sont :

La méthode utilisant des moules physiques appelée « hard-template », celle utilisant des moules souples dite « soft-template » et une méthode développée plus récemment appelée moule réactive « Wire Template ».

1.4.3.1. Méthode avec moule dur «hard template»

La synthèse consiste à utiliser un gabarit physique comme échafaudage pour la croissance des polymères conducteurs. La méthode « hard-template », permet de synthétiser des nanostructures de polymères conducteurs. Pour cette technique, les moules les plus utilisés et qui sont commercialement disponibles sont la membrane d'oxyde d'alumine anodisée [53] [54] [55] les membranes à base de polycarbonate (PC) [56] [57] [58] [59].

Jeong et al a préparé par électropolymérisation dans une matrice nanoporeuse, préparé à partir d'un copolymère séquencé de polystyrène-bloc-polyméthacrylate de méthyle (PS-*b*-PMMA) (Figure 6), un réseau à ultra haute densité de nano-tiges de polypyrrole (PPy). Ce dépôt est effectué sur un substrat de verre revêtu d'ITO. L'uniformité de la profondeur et de la largeur des pores contenus dans les « hard-templates » permet de contrôler de manière efficace la taille, la forme et l'orientation des polymères produits. D'autre part, grâce à la bonne stabilité des « hard-templates », la morphologie et la taille des nanostructures des polymères conducteurs peuvent facilement être contrôlées en adaptant les conditions de synthèse.

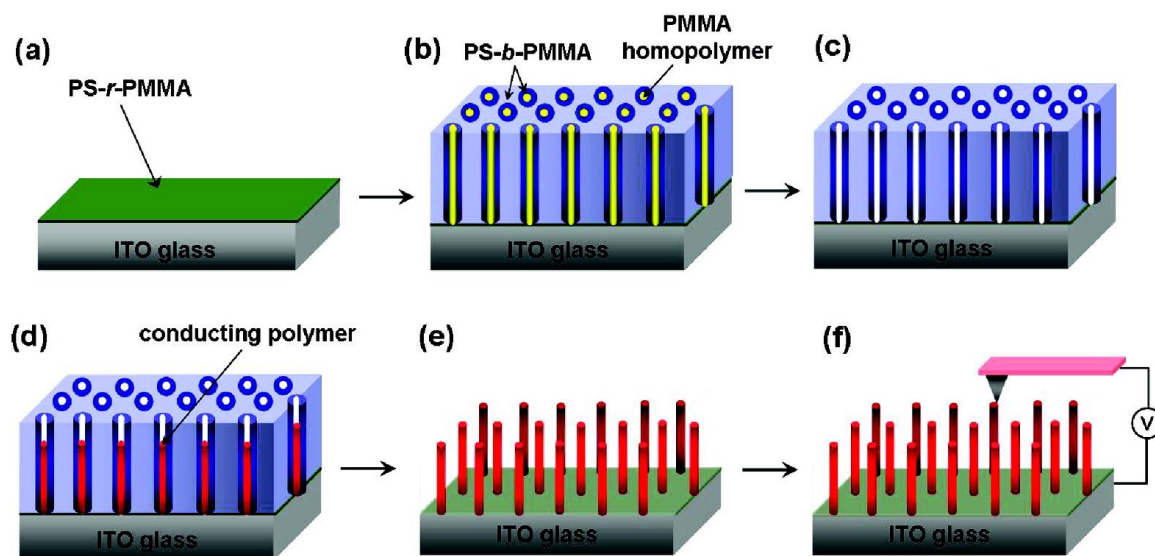


Figure 6 : Schéma illustrant la synthèse de nanostructures de polypyrrole en utilisant le polyméthacrylate de méthyle (PMMA) comme « hard-template » [60]

Des polymères conducteurs avec des formes et des tailles contrôlées permettent leur utilisation dans diverses applications. Cependant cette méthode a des inconvénients non négligeables tels que la difficulté à fabriquer les moules, mais surtout la procédure agressive pour enlever les moules après polymérisation qui a un coût assez élevé et qui affecte souvent les structures et les propriétés des polymères formés.

1.4.3.2. Synthèse avec moule souple « Soft template »

La synthèse avec les méthodes moule souple « soft template » appelée également méthode d'auto-assemblage, utilise des micelles formées par des tensioactifs pour confiner la polymérisation de polymères conducteurs en nanomatériaux à faible dimension. Une synthèse typique de ce type comprend la polymérisation par microémulsion et la polymérisation par microémulsion inversée dans laquelle les tensioactifs sont impliqués dans la polymérisation et la synthèse non-modèle (ou auto-modèle) dans laquelle le monomère ou son sel forme des micelles par lui-même. La polymérisation avec la microémulsion (huile dans l'eau) produit des nanoparticules de polymères conductrices avec un contrôle de la taille des nanoparticules. La structure et la concentration des tensioactifs et des monomères sont des facteurs critiques pour contrôler les paramètres morphologiques des produits. Jang et al. [61] a synthétisé des nanoparticules de polypyrrole mono-dispersées dans une microémulsion avec des tensioactifs cationiques à base d'alkyl-triméthylammonium. La taille des nanoparticules de polypyrrole peut être contrôlée avec des dimensions inférieures à 5 nm. Ces auteurs ont montré que les tensioactifs les plus appropriés pour la polymérisation en microémulsion devraient avoir des longueurs d'alkyle entre 6 à 16 carbones. Les chaînes alkyles inférieures à 6 ont des interactions hydrophobes faibles, tandis que les chaînes alkyles plus longues que 16 carbones ont une viscosité trop élevée pour former des nanostructures auto-assemblées. Les caractéristiques des produits de synthèse telles que la morphologie, la longueur et le diamètre sont principalement déterminées par les micelles pré-assemblées en fonction des concentrations et de la nature des composés amphiphiles.

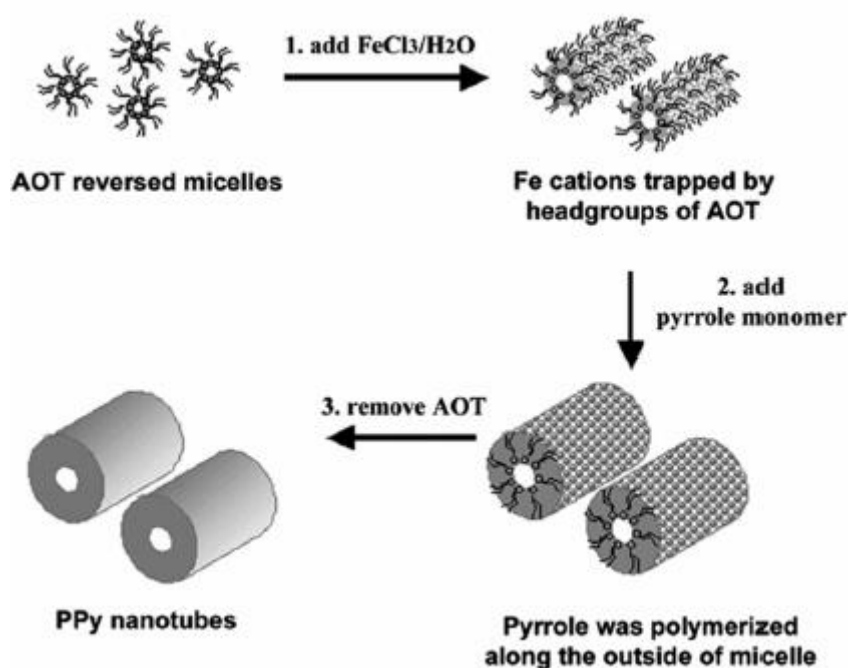


Figure 7 Schéma illustrant la synthèse de nanotubes de polypyrrole en utilisant des micelles inversées comme « soft-template ».[62] (AOT : Sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate).

La méthode « soft-template » est comparable à la méthode « hard-template » en raison des avantages qu'elles ont en commun, notamment la simplicité et la facilité d'utilisation. Cependant la méthode « soft template » présente d'autres avantages, tels que son faible coût et le rendement élevé, ce qui pourrait être intéressant en vue de son utilisation pour la production de matériaux à grande échelle. Cependant, la mauvaise stabilité des moules souples et la difficulté à maîtriser les caractéristiques des produits obtenus (taille, morphologie, etc.) limitent l'application de cette méthode.

1.4.3.3. Moule réactif « Wire Template »

Le principe du moule réactif est d'utiliser un gabarit physique avec une nanostructure qui peut induire la réaction de polymérisation et la formation du polymère sur sa surface.

Parmi les moules physiques possédant un grand potentiel pour la synthèse des polymères conducteurs par cette voie, on trouve les nanomatériaux inorganiques/organiques, tels que les nanofils ou les nanofibres d'oxyde de vanadium et l'oxyde de manganèse V₂O₅ ou MnO₂. Ce type de moule peut initier la polymérisation des monomères par des réactions oxydatives, puis transférer leur morphologie au polymère conducteur. En modifiant simplement la morphologie du moule

réactif, il est possible d'obtenir différentes tailles et formes de polymères conducteurs. La méthode du moule réactif est une procédure simple en une seule étape, puisque la plupart des moules réactifs peuvent être convertis en ions solubles dans une réaction redox. En conséquence, aucune étape de purification spéciale n'est nécessaire pour obtenir le polymère pur.

Pan et al. ont développé une stratégie de moule réactif en utilisant des nanofils d'oxyde de manganèse pour produire des nanotubes de polyaniline, comme le montre la figure (8) [63]. Dans ce cas, les nanofils de MnO_2 ont servi à la fois comme initiateur de polymérisation oxydante et moule physique. Le potentiel d'oxydation de MnO_2 est suffisant pour initier la polymérisation de l'aniline et former ainsi des films de polyaniline formés sur la surface des nanofils de MnO_2 . La morphologie des nanofils de MnO_2 a été reproduite par la polyaniline, qui a donné naissance à des nanotubes de polyaniline ayant des tailles et des formes similaires à celles du modèle de nanofils de MnO_2 . La dissolution du moule se fait durant la formation car le MnO_2 peut être converti en ions Mn^{2+} solubles pendant le processus de polymérisation. En conséquence, aucune étape de purification n'est requise pour obtenir le polymère pur.

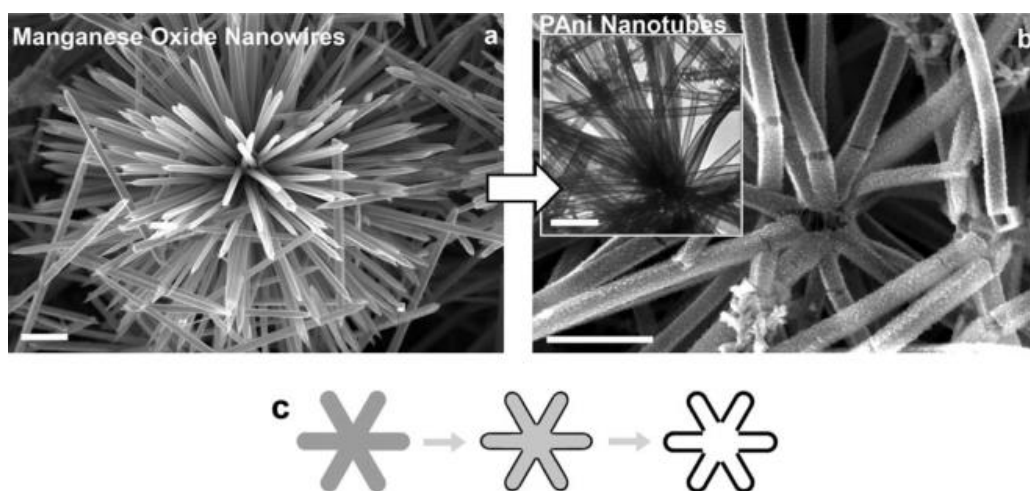


Figure 8 a) Images de microscopie électronique à balayage (MEB) de la matrice d'oxyde de manganèse à phase cryptomélane (b) Image en microscopie électronique à transmission (MET) des nanotubes de polyaniline.

c) Illustration schématique du procédé de fabrication [63].

L'avantage de cette méthode réside dans le fait que de grandes quantités de nanomatériaux peuvent être obtenues à bas prix et que leurs caractéristiques peuvent être contrôlées. Elle permet également de synthétiser différents types de polymères conducteurs avec des structures bien définies.

1.4.3.4. Synthèse sans moule

La méthode de synthèse sans moule « template free » a été développée par la suite pour obtenir des polymères avec des structures contrôlées dans des conditions douces. Les méthodes de synthèse sans moule les plus répandues sont la méthode d'auto-assemblage, la structuration à l'échelle nanométrique et l'électro-spinning. La méthode d'auto-assemblage est une méthode chimique alors que l'électrospinning est l'une des méthodes physiques les plus importantes pour la fabrication de nanostructures de polymères conducteurs. Il s'agit d'une nouvelle approche qui se base sur les conditions de polymérisation pour contrôler la morphologie des polymères organiques conducteurs [63]. Elle consiste à effectuer la polymérisation par voie électrochimique ou chimique dans des conditions particulières qui influencent l'organisation des polymères formés. Différentes structures peuvent être obtenues : des nanofils de polypyrrole ou des nanosphères.

Cette méthode étant très simple, elle représente une stratégie intéressante pour la synthèse de polymères conducteurs. Elle a également d'autres avantages, notamment son faible coût et la possibilité de l'utiliser pour diverses applications telles que les cellules solaires, les diodes électroluminescentes ou encore les transistors à effet de champ [64] [65] [66].

Cependant, les inconvénients majeurs sont la compréhension des caractéristiques des produits formés et la complexité des mécanismes de formation des nanostructures qui ne sont pas encore bien identifiés.

1.4.4. Méthodes de synthèse de polypyrroles avec différentes Morphologies

Les polypyrroles peuvent être synthétisés par de nombreuses méthodes différentes et faciles, y compris la polymérisation électrochimique et chimiques. Le PPy possède d'excellentes propriétés électriques et propriétés mécaniques. Les films de polypyrrole peuvent être formés dans des solvants aqueux ou organiques. Le choix du solvant ainsi que le type et la concentration de l'électrolyte et les conditions de polymérisation ont un impact significatif sur la morphologie des polymères formés.

1.4.4.1. Synthèse de polypyrrole avec morphologie nanofils.

De nombreux procédés ont été développés pour synthétiser le polypyrrole (PPy) avec une faible dimensionnalité [67] en utilisant des matrices telles que des zéolites, des membranes polymères gravées sur piste ou des films d'alumine ayant des pores gravés anodiquement. Des modèles mous tels que des molécules de surfactant[68] et des biomolécules [69] ont également été utilisés.

Wei Shi et al [69] ont proposé une approche assistée par l'amidon pour la synthèse de nanofils PPy par polymérisation électrochimique. L'amidon joue le rôle de molécule matrice qui, en tant que molécule neutre, sert uniquement à diriger la structure et ne peut donc pas être incorporée comme dopant dans le PPy.

La stratégie de synthèse globale des nanofils PPy en présence d'amidon peut impliquer deux étapes (figure 9). Une fois dissous dans l'eau, les monomères de pyrrole ont d'abord été adsorbés spontanément sur des molécules d'amidon par des liaisons hydrogène formées entre des molécules de pyrrole et des groupes -OH d'amidon. Ensuite, les monomères de pyrrole adsorbés ont été polymérisés préférentiellement le long de la chaîne de l'amidon pour former des nanofils de PPy lorsque la réaction électrochimique a été initiée.

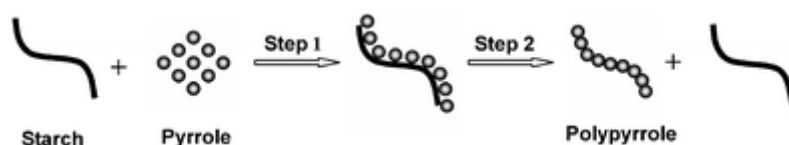


Figure 9 Représentation schématique simplifiée de la stratégie de synthèse pour la formation de nanofils PPy[69].

Les nanofils de polypyrroles peuvent également être obtenus par des méthodes de nanotechnologie telles que, la photolithographie, la lithographie par faisceaux d'électrons [70] ou par la nano-impression. Concernant, la nano-impression différentes approches ont été utilisées telles que la nano-impression de surface d'or avec des monocouches de thiol conducteur et non conducteur et la polymérisation des polypyrroles sur ces surfaces. Cette approche permet la production d'un réseau de nanofils de polypyrrole de 400nm de long et 200nm de large [71]. Récemment le même groupe a démontré la formation de nanofils de polypyrrole par nano-impression sur des substrats non conducteurs sur différents types de surface temoplastics. Ceci a été effectué par le contrôle

de la polymérisation chimique en utilisant des encres à base de pyrrole d'oxydant chimique et d'émulsifiants et également le procédé d'impression [72].

Catherine Debiemme-Chouvy et al [73] ont utilisé une nouvelle stratégie électrochimique en une étape pour la formation directe d'un réseau de nanofils de PPy orienté et sans emploi d'une matrice support. La longueur des nanostructures PPy pourrait être contrôlée de quelques nanomètres à quelques micromètres simplement en fixant la durée de l'électropolymérisation.

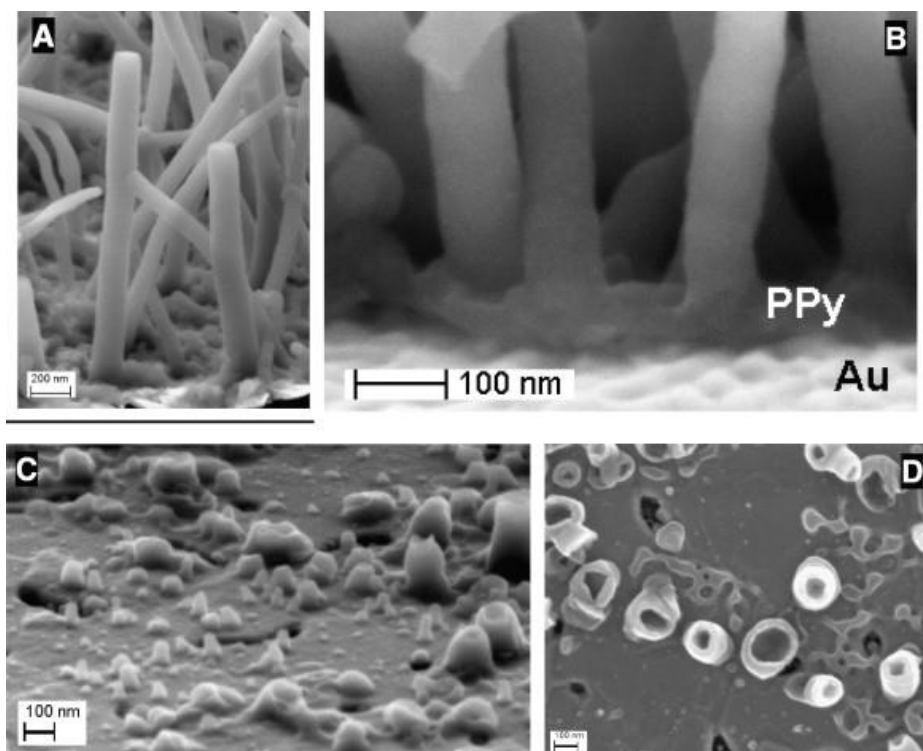


Figure 10 Images MEB des structures de polypyrrole synthétisé sans support avec différents angles [73].

La méthode consiste en l'utilisation d'ions hydrogène-phosphate et une très faible concentration des ions perchlorate. Le mécanisme de réaction proposé, par la croissance du polymère autour des nanobulles d'O₂ formées au cours des premières étapes de polymérisation. Ensuite, lorsque les bulles quittent complètement la surface de l'électrode, la croissance de PPy pourrait continuer d'abord, à l'intérieur de la coupelle sur le film PPy formé lors de la première étape conduisant à la formation de nanotige, et la croissance conduisent aux nanofils de polypyrrole [73]. Le point clé du mécanisme réactionnel proposé est l'oxydation de l'eau qui conduit localement à la formation de nanobulles d'oxygène qui protègent le film du PPy contre les radicaux hydroxyles, c'est-à-dire contre une suroxydation qui permet à l'électropolymérisation du pyrrole de la croissance des nanofils [73].

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France



1.4.4.2. Synthèse de polypyrrole avec morphologie nanosphère

Les approches d'oxydation chimique et électrochimique peuvent être modifiées pour produire des nanosphères de polymères conducteurs dispersés solubles et stables. Les polyanilines [74] [75] ou les polypyrroles [76] [77] solubles peuvent être obtenus en utilisant des dopants appropriés. Des monomères fonctionnels peuvent être utilisés pour produire des versions solubles de polypyrroles [78], de polyanilines [79] et de polythiophènes [80] [81].

Synthèse par voie chimique

Les synthèses chimiques les plus utilisées pour le polypyrrole consiste à utiliser un oxydant chimique fort et conduisent généralement à l'obtention d'une poudre noire. Les nouvelles méthodes utilisées pour la synthèse de polypyrrole à morphologie spécifique utilisent des dérivés du benzène comme stabilisateurs qui induisent la formation des structures. D'énormes quantités de nanosphères de polypyrrole peuvent être synthétisées en une seule étape avec cette approche de polymérisation chimique simple, en utilisant simplement des conditions de polymérisation appropriées et en adaptant ces conditions tels que les solvants (eau, benzène éthanol [82], [83]) et également les différents agents oxydants FeCl_3 [84], persulfate d'aluminium [85]).

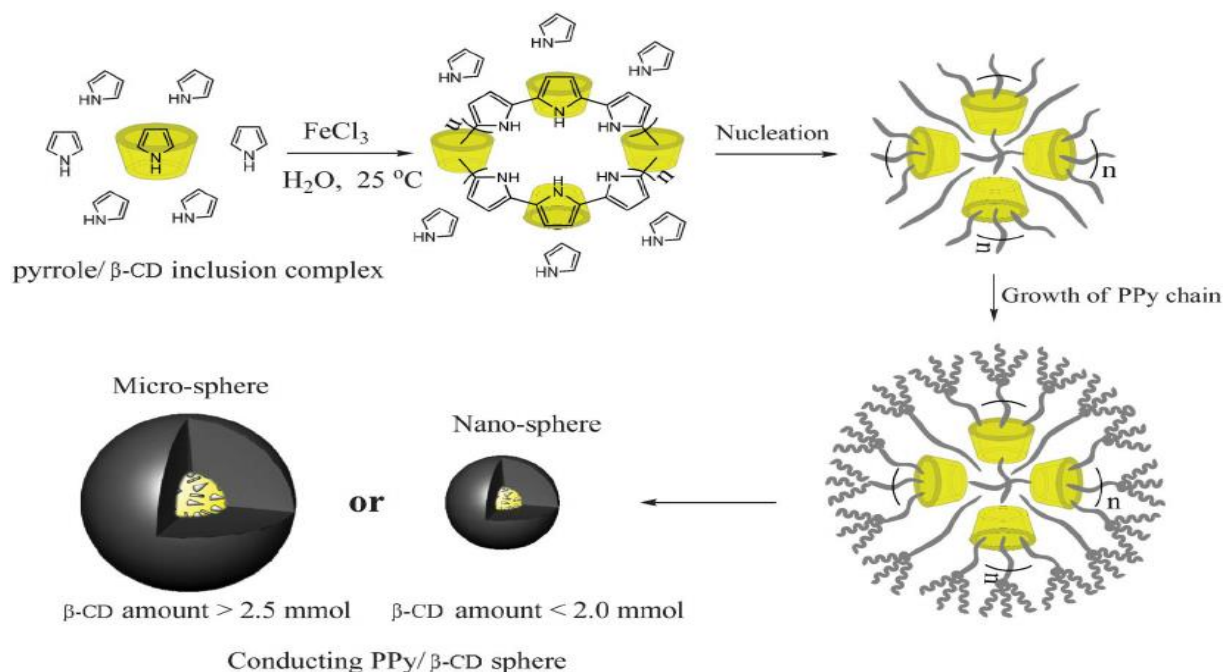


Figure 11 Illustration schématisée de la polymérisation par oxydation du pyrrole pour former des nano- et microsphères PPy [84]

Plusieurs tentatives ont été réalisées récemment pour synthétiser des polymères conducteurs avec des oxydants plus doux et plus écologiques, en utilisant l'acide acétique en association avec des métaux nobles [86] un mélange d'oxydant HCl/ NaCl/ H₂O₂ [87]) et des système d'enzyme/H₂O₂ [88], dans le but de développer des approches plus écologiques, plus douces et encore sans catalyseur.

Zhen Li et al [86] ont montré une approche écologique en utilisant deux catalyseurs différents : les graines de nano-fibre V₂O₅ et le chlorure ferreux (FeCl₂), ainsi que l'oxydant H₂O₂. Il existe plusieurs avantages majeurs à l'utilisation de H₂O₂ dans la polymérisation du pyrrole.

H₂O₂ est un oxydant écologique puisque le seul produit utilisé lors de la réaction est l'eau, qui peut être directement recyclée sans purification.

Différentes combinaisons de H₂O₂ avec les catalyseurs auront des puissances oxydatives variées, ce qui peut aider à comprendre les mécanismes de formation des polymères conducteurs nanostructurés.

Après l'addition de H₂O₂ au mélange pyrrole/ FeCl₂/H₂O, la polymérisation du pyrrole a été initiée. Les nanostructures de polypyrrole formés précipitent et peuvent être filtrées et lavées.

Synthèse par voie électrochimique :

La formation des nanosphères de polypyrrole est possible également avec la voie électrochimique. Celle-ci peut être effectuée grâce aux différentes techniques électrochimiques qui peuvent être employées pour la déposition du polypyrrole sur les électrodes : électrodéposition par l'utilisation d'un potentiel constant, la déposition galvanostatique et la voltammétrie cyclique [89]. Parmi ces techniques, ce sont les méthodes potentiostatiques (potentiel constant) ou galvanostatiques (courant constant) qui sont plus généralement exploitées pour la réalisation de l'électropolymérisation pour obtenir des nanosphères de PPy.

Des microstructures de polypyrrole à morphologie de nanosphère peuvent être générées par électropolymérisation de pyrrole dans une solution aqueuse d'acide camphorsulfonique. La taille et la forme de la microstructure peuvent être contrôlés électrochimiquement par le potentiel appliqué. Liangti Qu et al ont développé des microstructures de PPy en utilisant une électrolyte typique composé d'une solution aqueuse de 0,5 M de pyrrole et 0,6 M d'acide (+) - ou (-) - camphorsulfonique.

Il a été observé (à l'œil nu) qu'une grande quantité de gaz d'hydrogène était libérée de la contre-électrode pendant le processus d'électrolyse. Ceci est principalement dû aux réactions suivantes :



Alors que de nombreuses publications ne présentent que la demi-réaction à l'anode, la réaction de la cathode peut être dérivée par la charge et la balance de masse de l'ensemble des réactions redox. Dans la solution aqueuse de (+) - ou (-) - CSA (un tensioactif typique), des petites bulles de gaz ont été enveloppées par les surfactants avec des charges négatives et dispersées dans la solution aqueuse. Comme un potentiel positif a été appliqué, les bulles de gaz proches de l'anode ont été assemblées sur la surface de l'électrode de travail.

Par conséquent, il est raisonnable de conclure que la croissance des microstructures est due aux bulles de gaz assemblées sur la surface de l'électrode de travail agissant comme un gabarit. Dans les milieux organiques tels que l'acétonitrile, les microstructures ne peuvent pas être générées. Dans ces solvants, bien que du gaz H_2 ait été produit, les bulles de gaz ne peuvent pas être enveloppées par un tensioactif et dispersées dans le milieu ou s'échapper rapidement de la solution [90].

1.5. Méthodes d'attachement des biomolécules

Différentes stratégies ont été étudiées pour immobiliser les biomolécules sur PPy. Les biomolécules peuvent être piégées dans un film électropolymérisé formé par un mélange de monomères et de biomolécules. Cependant, l'inconvénient de cette méthode est la dénaturation des molécules, ce qui peut influencer sur la sensibilité du capteur. Une autre méthode consiste à absorber physiquement des biomolécules sur la surface du polymère, mais les variations de la force ionique ou du pH peuvent provoquer une libération des molécules de la surface, en particulier lors de l'étape de régénération du capteur. Les biomolécules portant des groupes CN - NH_2 , - $COOH$ ou esters activés peuvent également être liées de manière covalente au film de polymère précédemment modifié chimiquement sur la position N- ou 3 du pyrrole. En tenant compte du fait que la croissance du film de polymère et l'immobilisation des biomolécules pourraient être réalisées dans différentes conditions expérimentales, le problème de dénaturation peut alors être surmonté. De nombreux auteurs ont démontré que les biomolécules peuvent également s'attacher à la surface par affinité.

Il existe deux grandes catégories de procédés de fonctionnalisation par greffage covalent : Les procédés reposant sur une réaction chimique, et ceux reposant sur des réactions électrochimiques. Avant de porter plus longuement notre attention sur cette dernière catégorie, un bref rappel s'impose concernant les procédés chimiques, car ils sont les plus courant.

1.5.1. Immobilisation covalente par voie chimique

Le greffage covalent par cette méthode permet de faire une sélection des conditions optimales de réaction pour ces deux étapes impliquées avec une immobilisation de la molécule biologique qui s'effectue uniquement sur la surface extérieure du polymère conducteur.

Les modifications de la position N ou la position 3 du polypyrrole peuvent conduire à une fixation covalente des biomolécules sur la surface. Dans la littérature, plusieurs monomères du pyrrole ont été chimiquement modifiés avec une chaîne de carbone terminée par des groupes fonctionnels puis électropolymérisés sur la surface de l'électrode. L'électrogénération d'un polypyrrole 3-substitué, modifié avec des groupes acides ou esters activés permet d'immobiliser par greffage covalent des biomolécules portant des fonctions amines en positions terminales et ainsi immobilisées des biomolécules sur la surface. Différentes biomolécules ont été immobilisé tel que l'ADN [91], des apatmères [92] ou des anticorps [93]. Des polypyrroles substituées sur l'azote par des groupe cyano ont également permis l'immobilisation d'anticorps (IgG anti-lapin) par des interactions électrostatiques entre les groupes cyano du polymère et les groupes hydroxyles des anticorps [94] [95].

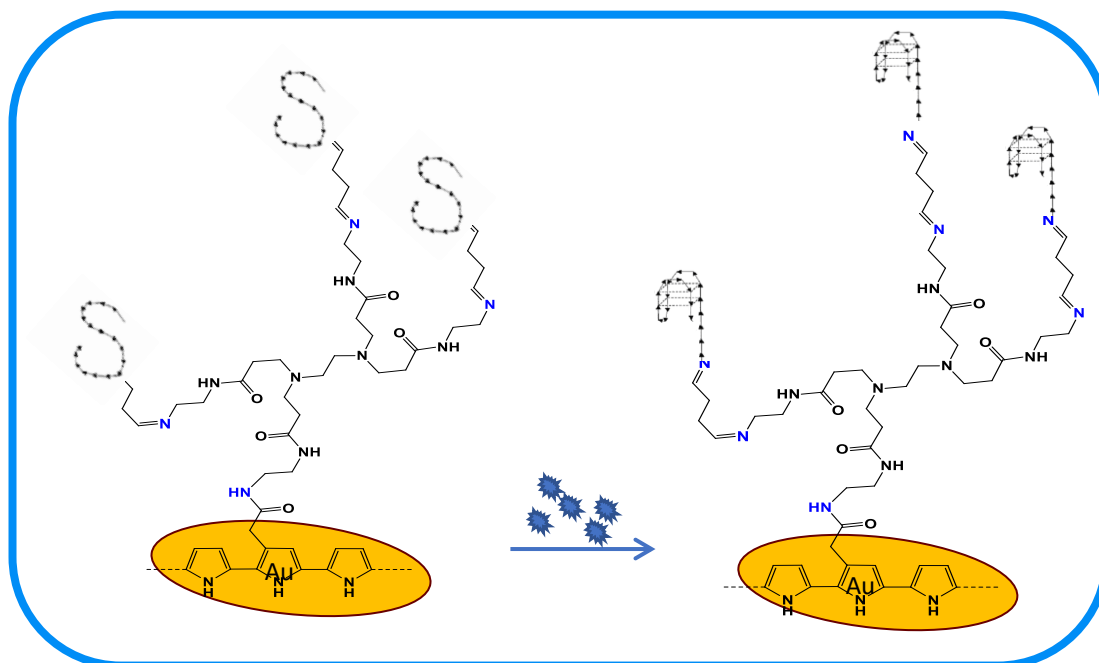


Figure 12 Polypyrrole modifié (PPy), lié de manière covalente aux dendrimères de polyamidoamine de la quatrième génération (PAMAM G4) et un aptamère [95].

1.5.2. Immobilisation covalente par voie électrochimique

La modification par voie électrochimique a été généralement démontrée pour les métaux et les matériaux carbonés (GCE, nanotube de carbone). La modification covalente de substrats est obtenue par attaque d'un radical électrogénéré [96]. Parmi les procédures couramment employées on peut citer la formation de radicaux aryles par réduction de sels de diazonium [97]. Depuis une décennie, cette procédure a connu un succès remarquable grâce à la possibilité d'introduire différents groupes fonctionnels et l'optimisation des conditions de déposition [98].

1.5.2.1. Fonctionnalisation du polypyrrole par réduction de sel diazonium

Les sels d'aryl- ou alkyldiazonium possèdent un groupement $-N_2^+$ et un contre-anion. Ces composés sont connus pour leur caractère instable et leur grande réactivité. Dans certains cas, ils se dégradent facilement à température ambiante et le plus souvent leur synthèse s'effectue à basse température. Les sels de diazonium aromatiques, stabilisés par résonance, sont plus stables que les sels de diazoniums aliphatiques, qui sont très instables voire même inexistantes. Dans ce chapitre, nous discuterons quelques méthodes de préparation des sels d'aryldiazonium.

Les sels de diazonium peuvent être formés à partir de dérivés aniline, dans une solution acide de NaNO_2 . Ce sel de diazonium peut alors être électroréduit pour conduire à la libération d'azote et à la formation d'un aryl-radical de forte réactivité qui se greffe sur la surface d'un matériau qui a fourni l'électron nécessaire à son électroréduction. Il se forme une liaison covalente de type C-X, où X peut être de l'or, du cobalt, carbone, du platine, du cuivre, du graphite, du diamant, ou du silicium.

Le greffage de surface par réduction électrochimique des aryldiazoniums a été découvert en 1992 [99]. Le succès de la méthode, maintenant très répandue, provient du fait que la réaction permet d'attacher de manière covalente des groupements aryles sur le carbone, la plupart des métaux, les semi-conducteurs, les polymères et les diélectriques inorganiques (SiO_2 , Sic...)

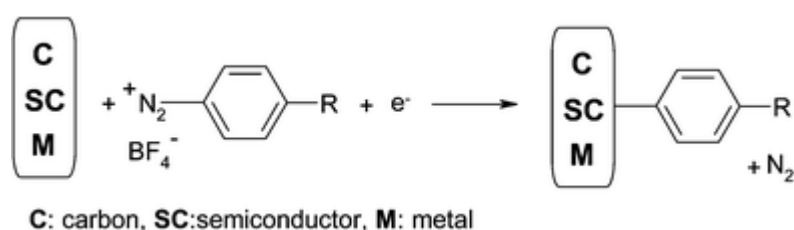


Figure 13 Schéma indiquant la modification des surfaces par réduction électrochimique des sels de diazonium, pouvant être réalisée sur le carbone, le métal ou le semi-conducteur [99]

Le sel de diazonium en solution est réduit par le transfert d'un électron suivi par la libération d'une molécule d'azote, et le radical aryle formé à la surface du substrat va attaquer ce dernier pour former une liaison covalente. La réduction des sels de diazonium est communément observée à des potentiels très cathodiques vers -1.6V (par rapport au système Ag/AgCl pris comme référence des potentiels). Le radical aryle obtenu peut évoluer de différentes façons : -modifications de la surface par réduction de sels de diazonium suivant le sel et le milieu pour soit faire l'abstraction d'un atome d'hydrogène, soit être ultérieurement réduit ou subir des réactions de couplage entre radicaux, avec une molécule ou encore avec la surface du substrat.

1.5.2.2. Fonctionnalisation par oxydation des amines

L'oxydation électrochimique des amines aromatiques a été largement étudiée, car lors de l'oxydation l'aniline permet d'obtenir des polymères conducteurs tels que les polyanilines. La polymérisation est due au couplage des cations radicalaires [100] [101].

La fonctionnalisation des surfaces basée sur le l'oxydation électrochimique des amines a été démontrée dans le cas des amines aliphatiques où leur électro-oxydation a conduit à la fixation sur la surface de couches. Ceci a été démontré dans le cas des électrodes de carbone vitreux [102] [103] ou les surfaces métalliques [104].

Cette méthode a été utilisée pour la fixation d'amines aliphatiques aux nanotubes de carbones[103]. L'oxydation électrochimique implique principalement la production de cations radicaux formés sur des atomes d'azote qui pourraient s'accrocher de manière covalente aux groupes nucléophiles. L'explication de ce mécanisme de réaction suppose que les cations radicaux soient très réactifs et puissent se lier à des groupes nucléophiles tels que le cycle aromatique entraînant la rupture de la double liaison $C = C$ et la formation des liaisons $C-N$ [102]. L'avantage de l'électro-oxydation est démontré par la simplicité de cette réaction, qui se déroule en très peu de temps.

D'autres réactions d'électro-greffage sont aussi connues, comme la réduction des oléfines activées sur les métaux, [105] [106] [107] l'oxydation des acétates d'aryle sur les électrodes de carbone [108], l'oxydation des hydrazides sur le carbone de manière semblable à celle des amines [109], l'oxydation des alcools sur le carbone [110] et la réaction des radicaux hydrogènes avec des surfaces en carbone [111]. Pour toutes ces réactions électro-greffées, des radicaux ont été proposés comme espèces responsables de l'attaque de la surface.

Les macromolécules des dendrimères (poly (amidoamine) PAMAM peuvent être aussi déposées électrochimiquement sur des matériaux conducteurs. Ces macromolécules sont hautement ramifiées car le PAMAM contient un certain nombre de groupes amine terminaux selon la génération. Cette propriété permet d'obtenir un nombre de fonction amine importante en surface et d'améliorer le nombre de biomolécules fixées [112].

Des PAMAM G4 ont été ainsi déposés sur des nano-composite de MWCNT/polypyrrole et d'associer un grand nombre de bio-récepteurs de types aptamères en raison du grand nombre de groupes amine sur la surface du dendrimère. Ce type d'assemblage a permis d'obtenir une sensibilité élevée avec une faible limite de détection [113].

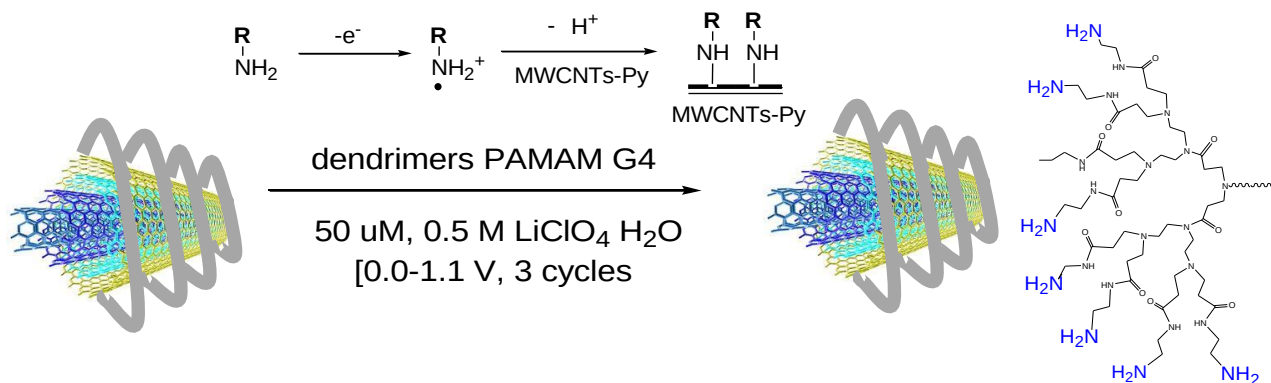


Figure 14 Association of PAMAM G4 through electro-oxidation of amine groups [113]

1.6. Méthodes de détection de l'ADN

La détection des séquences d'ADN présente un intérêt particulier pour la génétique, la pathologie, la pharmacogénétique, l'analyse alimentaire et pour de nombreux autres domaines. Les capteurs d'ADN consistent généralement en la réaction d'hybridation entre une sonde d'ADN simple brin (ss) immobilisée sur un transducteur et une cible présente en solution, formant une hélice d'ADN double brin (ds). Il existe peu de stratégies de construction de biocapteurs électrochimiques pour la détection d'ADN, qui peuvent être généralement classés comme (1) indirects et (2) directs, et qui sont présentés dans cette partie

1.6.1. . Détection indirecte

La détection par la méthode indirecte concerne les capteurs où l'ADN est marqué avec une enzyme, un marqueur redox ou des nanoparticules. La réaction d'hybridation est ensuite suivie via le signal redox du produit de la réaction enzymatique, le signal redox du marqueur électroactif attaché à l'ADN ou par l'amplification du signal redox par la présence de nanoparticules conductrices. La stratégie indirecte peut également consister à utiliser un intercalateur d'ADN redox ayant une affinité pour l'ADNdb. Dans ce cas, la détection de l'ADNdb est observée par l'augmentation du signal d'intercalateur redox qui est proportionnelle aux brins d'ADNdb formés. Quelques exemples significatifs de méthodes indirectes typiquement utilisées dans la détection d'ADN sont présentés dans cette section.

1.6.1.1. Détection utilisant des molécules redox interagissant avec l'ADN

La surveillance de la réaction d'hybridation peut être effectuée en utilisant des molécules redox qui ont une affinité avec certaines bases d'ADN ou certaines structures dsDNA. Ces interactions consistent en une intercalation ou une liaison électrostatique dans des sites de liaison bien définis. En tant que ligands spécifiques, des composés organiques ou complexes de métaux cationiques peuvent être utilisés. La détection est basée sur une plus grande affinité de ces composés pour l'une des formes d'ADN : ADNsb ou ADNdb.

Les intercalaires sont classés comme des ligands d'ADN qui s'insèrent ou s'intercalent entre des paires de bases adjacentes d'ADN double brin. Le mécanisme d'action des intercalateurs est basé sur l'empilement de groupes aromatiques planaires entre des paires de bases nucléotidiques dans une position approximativement perpendiculaire à l'axe de la double hélice. Ces interactions peuvent être très sélectives suivant le type d'intercalant. Par exemple, Mascini et al. ont trouvé que la daunomycine s'insère dans le double brin d'ADN en se liant préférentiellement aux paires de bases GC[114]. En conséquence, pendant la détection électrochimique, en raison des interactions avec l'ADNdb formé, une augmentation du courant est observée.

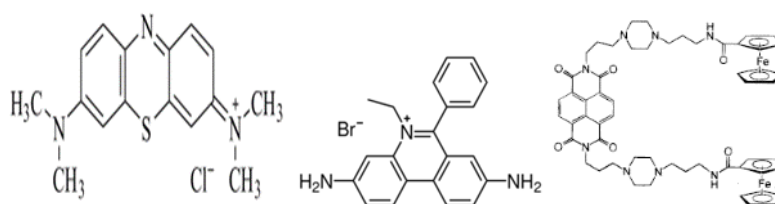


Figure 15 Structure de différents intercalants redox utilisés pour la détection de l'ADN

1.6.1.2. ADN marqué par des nanoparticules

L'ADN peut également être marqué avec des marqueurs redox telles que le ferrocène ou le bleu de méthylène ainsi qu'avec des nanoparticules. Les nanoparticules d'or AuNPs et les nanotubes de carbone NTC peuvent fortement intensifier la réponse électrochimique en raison de leurs conductivités élevées.

Une méthode électrochimique a été proposée par Yan Jin et al [115] pour étudier le clivage de l'ADN par l'endonucléase EcoRI en utilisant le ferrocène comme indicateur électrochimique. Le ferrocène n'a pas été greffé de manière covalente à l'ADN, mais a été co-immobilisé sur les nanoparticules d'or avec de l'ADN cible thiolé par l'intermédiaire de la liaison Au-S. L'interaction EcoRI-ADN a été contrôlée sur la base de l'altération du signal de ferrocène avant et après la digestion avec EcoRI. La spécificité de clivage enzymatique d'EcoRI a été étudiée, et le clivage enzymatique de l'électrode modifiée par l'ADN a également été surveillé en temps réel :

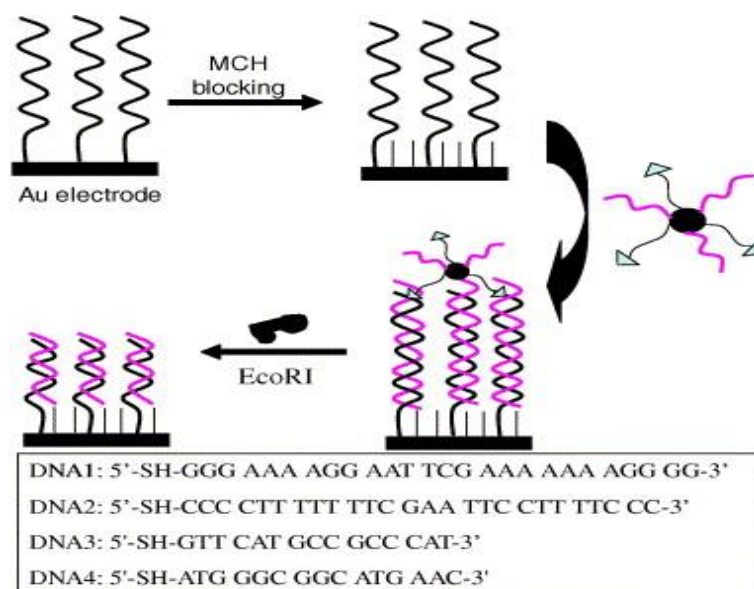


Figure 16 Schéma illustrant la procédure analytique pour utiliser le ferrocène comme indicateur électrochimique pour étudier les interactions ADNdb / EcoRI.

En raison de la capacité des dendrimères à l'encapsulation des métaux, ces molécules peuvent être utilisées comme d'excellentes marqueurs lors de la détection de l'ADN. Gao et al ont utilisé des dendrimères PAMAM G4 encapsulés avec des ions de cuivre pour la détection de l'ADN [116]. Une sonde d'ADN marquée au Cu-PAMAM a été utilisée pour déterminer un ADN cible immobilisé sur une électrode modifiée par des nanotubes de carbone à parois multiples. L'hybridation du brin d'ADN a été suivie par la mesure de la réponse électrochimique de Cu ancré sur le PAMAM. Le courant correspondant aux ions de cuivre augmente proportionnellement à la concentration de l'ADN cible, permettant d'obtenir une limite de détection qui atteint le pM.

1.6.1.3. ADN marqué par enzyme

L'ADN peut être marqué par certaines enzymes comme la peroxydase de raifort [117], la phosphatase alcaline [118] et la glucose oxydase [119]. Le principe de base consiste à marquer les brins cibles d'ADN avec des enzymes. Lorsque l'hybridation se produit avec une sonde d'ADNsb immobilisée sur la surface, l'ADN marqué avec l'enzyme reste sur l'électrode. La réaction d'hybridation pourrait être suivie à travers les propriétés catalytique des enzymes en présence de leurs substrats quand les produits obtenus sont électroactifs. Dans ce cas, les enzymes immobilisées conduisent à la production d'espèces électroactives près de la surface de l'électrode, ce qui donne un courant lié à la quantité de cible d'ADN hybride. Pour l'association de l'ADN avec l'enzyme, certains tests utilisent un système d'affinité biotine/avidine. Dans ce cas, la cible d'ADN est marquée à la biotine, et l'enzyme modifiée avec l'avidine pourrait être fixée à la surface.

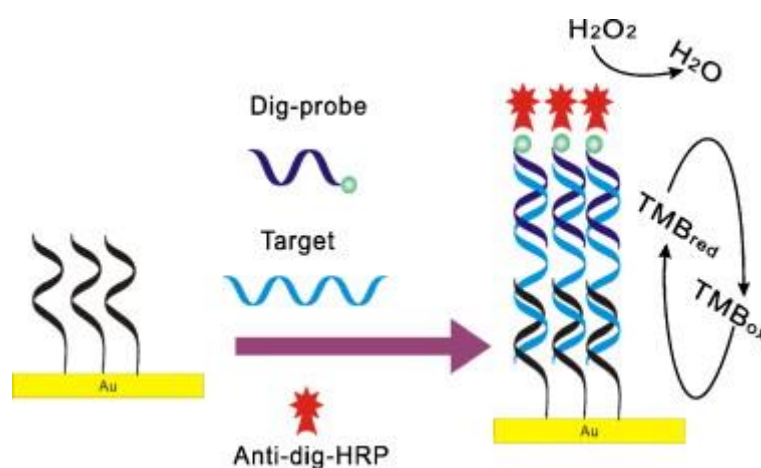


Figure 17 Schéma présentant la stratégie de détection de type "sandwich": en présence d'ADN marqué avec une enzyme [117]

Yin Wan ont employé une stratégie de détection de type "sandwich" (figure 17) qui impliquait une sonde de capture ADN auto-assemblée à des électrodes d'or et l'ADN qui sont spécifique de la séquence cible d'ADN. Lorsque la sonde interagît avec la cible, une autre sonde de capture est ajoutée marquée avec un antigène(dig). L'anticorps anti-dig marqué par l'enzyme -HPR pouvait se lier à la sonde-reporteur marquée par Dig et le substrat de l'enzyme est catalysé produisant des produits électroactifs qui peuvent donner des signaux électrochimiques significativement intenses.

1.6.2. Détection directe

1.6.2.1. Signal électrochimique du PPy et modulation de son activité redox

Les changements des propriétés redox des polymères conducteurs comme le polypyrrole, la polyaniline ou le polythiophène peuvent permettre de suivre la réaction d'hybridation de l'ADN. Le signal électrochimique du PPy peut être utilisé pour la détection directe de l'ADN. L'hybridation de l'ADN cible avec la sonde immobilisée sur la surface de l'électrode modifiée avec du polypyrrole entraîne des changements des propriétés électriques de celui-ci. Différentes méthodes électrochimiques ont été utilisées pour suivre la variation des propriétés électriques du PPy. Le premier exemple a été démontré par Korri-Yousoufi et al. [120] [121], ils ont développé un copolymère électrogénéré composé de deux monomères : le pyrrole modifié par des groupes carboxyliques et le pyrrole modifié par un ester activé (Figure 18). Cette modification servait à l'attachement covalent de l'ADN sonde modifiée avec des groupes amines via une liaison amide. L'hybridation avec cible complémentaire a conduit à des changements dans le signal redox du polypyrrole : l'augmentation du potentiel d'oxydation et la diminution du courant. La chaîne d'ADN complémentaire a apporté plus d'encombrement et de rigidité au film de polypyrrole de sorte que l'insertion de contre-anions pendant l'oxydation soit devenue moins favorable, entraînant un pic d'oxydation à des potentiels plus positifs. La diminution du courant d'oxydation peut être expliquée par une pénétration réduite des contre-ions dans le film.

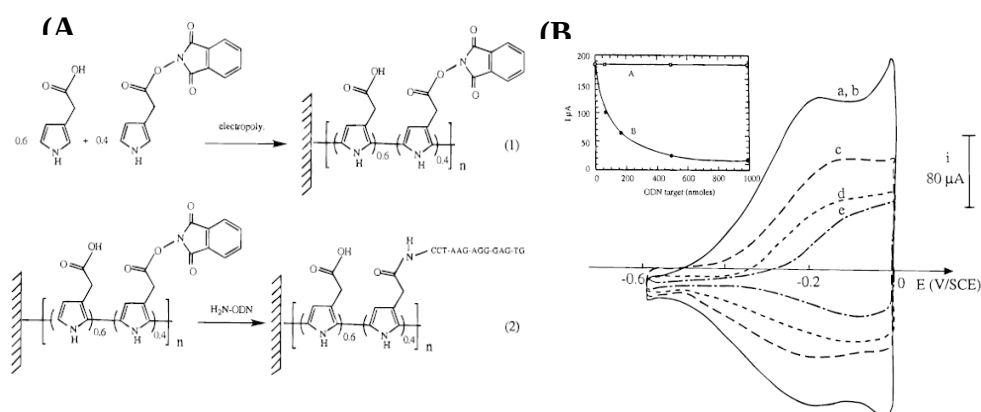


Figure 18 (A) Schéma du capteur d'ADN électrochimique à base de polypyrrole ; (B) CV du capteur d'ADN après incubation dans une solution contenant différentes concentrations d'ODN complémentaires [116].

Un autre exemple dans la littérature est le biocapteur basé sur des polymères conducteurs pour la détection directe d'ADN avec "signal on". Lien et al. ont construit un biocapteur basé sur des MWCNT dopés dans un film de polypyrrole pour la détection d'organismes génétiquement modifiés [122]. Le "signal on" a été démontré comme le résultat de l'augmentation de la conductivité après immobilisation de l'ADN complémentaire sur la surface de l'électrode et/ou des changements conformationnels de l'ADN après hybridation.

Dans la mesure où il a été démontré que la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) constitue l'un des outils analytiques les plus puissants pour l'analyse interfaciale, de nombreux capteurs utilisant cette méthode ont été développés pour l'analyse des biocapteurs à d'affinité pour les interactions protéine, ADN-ADN et anticorps-antigène. Plusieurs papiers ont été publiés sur la base de l'utilisation d'impédance en suivant soit la modification de la résistance de transfert de charge R_{ct} interfaciale ou les variations de la capacité des membranes suite à la réaction d'affinité.

Par exemple, Yang et al ont utilisé la spectroscopie d'impédance électrochimique faradique en présence d'espèces redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ pour suivre l'hybridation de l'ADN [123]. Après interaction de deux brins d'ADN complémentaires, ils ont observé une augmentation de la résistance de transfert d'électrons (R_{ct}). Il a été expliqué que les squelettes de phosphate électronégatifs empêchaient $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ d'atteindre la surface de l'électrode pendant le processus de réaction redox, ce qui a diminué les transferts d'électrons de la membrane vers la surface de l'électrode, puis a entraîné une augmentation de R_{ct} . L'augmentation de la résistance était proportionnelle à l'augmentation de la quantité d'ADN immobilisée sur la surface de l'électrode.

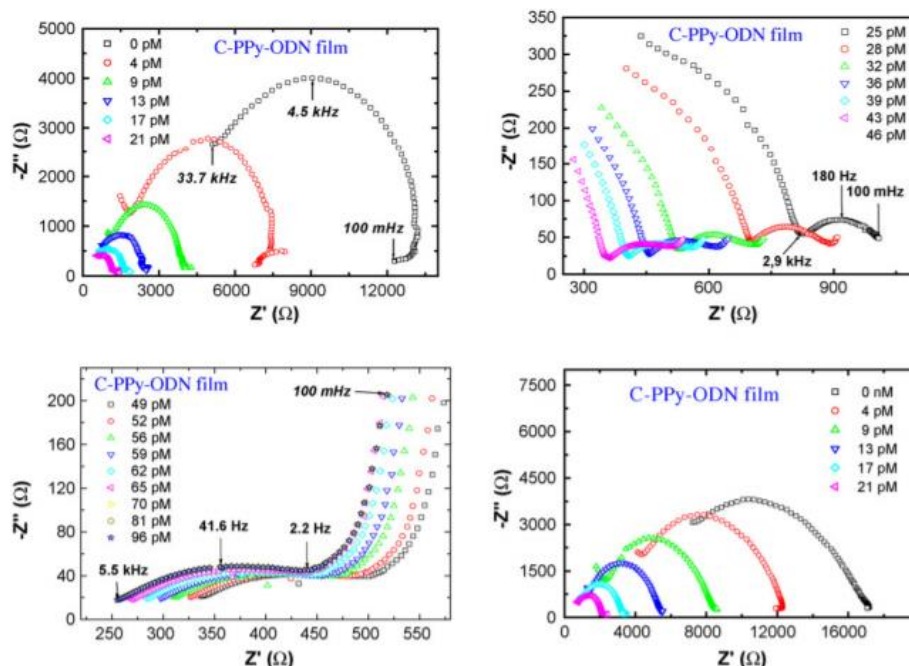


Figure 19 EIS spectra of C-PPy-ODN films during hybridization[122].

Lien et al., ont construit un biocapteur basé sur des composites de MWCNT dans un film de polypyrrole pour la détection d'organismes modifiés génétiquement [122]. Le polypyrrole a été modifié par une sonde d'ADN tandis qu'une hybridation avec la cible complémentaire a été étudiée en utilisant les méthodes de microbalance à cristal de quartz QCM et l'impédance électrochimique (EIS). Il a été montré qu'une augmentation de la concentration de l'ADN complémentaire cible entraîne une diminution de la résistance de transfert de charge faradique (R_{ct}) et cette variation a été désignée sous le nom de "signal on" (Figure 19). Les auteurs ont expliqué ce comportement par l'effet électrostatique et / ou l'effet stérique dû au caractère polyelectrolyte des brins d'ODN qui pourraient modifier le transport vers et à travers l'interface polymère / solution.

1.6.2.2. Introduction d'une sonde redox

Le suivi de la réaction d'hybridation entre les deux brins d'ADN complémentaires pourrait également être effectué par le marquage de la sonde d'ADN simple brin avec un marqueur redox, tel que le bleu de méthylène (MB) [124] [125] ou le Ferrocène (Fc) [126] [127] [128]. L'avantage de cette méthode est la mesure directe des molécules électroactives sur la surface par transduction directe après l'hybridation de l'ADN. Diverses méthodes ont été développées, où le signal est obtenu suite à des changements conformationnels de la structure de l'ADNdb après la réaction d'hybridation avec la cible (Figure 20). Par exemple, Anne et al. ont développé un biocapteur où la chaîne simple

brin ssDNA est immobilisée sur une électrode et modifiée par du ferrocène sur son extrémité. Dans cette structure l'ADN se retrouve dans une structure flexible et le marqueur redox est ainsi proche de la surface permet d'obtenir un signal électrochimique intense [127]. L'hybridation avec l'ADN cible entraîne la formation d'une chaîne d'ADN double brin rigide qui a éloigné le marqueur redox de la surface de l'électrode et donc provoqué la diminution du signal électrochimique.

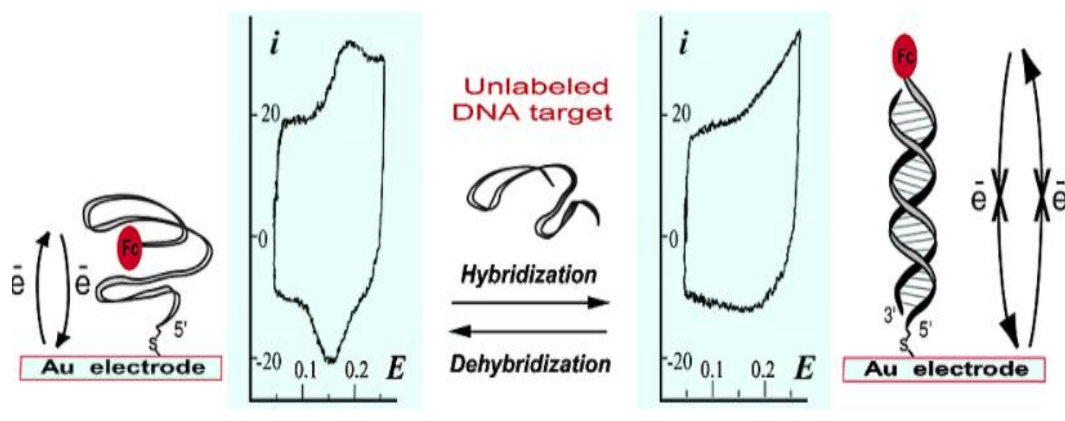


Figure 20 Schéma représentant l'utilisation de Ferrocène pour la détection de l'ADN [127]

1.6.2.3. Détection basée sur les propriétés redox des bases d'ADN

L'observation des pics redox de certaines bases d'ADN, dues aux réactions de réduction et d'oxydation, permis à la surveillance de l'hybridation de l'ADN. Les bases les plus électroactives de l'ADN sont la guanine et l'adénine. La détection directe a été démontrée pour la première fois par Palecek [129]. L'auteur a suivie l'hybridation de l'ADN par oxydation des bases guanine des bases nucléotidiques (figure 21). Récemment, une oxydation de l'adénine a également été rapportée[130].

Cette stratégie peut servir à la détection et à la quantification de l'ADN. Par exemple Bollo et al.[131], Ils ont mesuré le pic d'oxydation de la guanine qui était à environ 1 V.. Ils ont obtenu une relation linéaire entre la quantité d'ADN et le courant correspondant au signal guanine. Cependant, l'utilisation obligatoire d'un fort potentiel d'oxydation de l'ADN est un inconvénient de cette méthode.

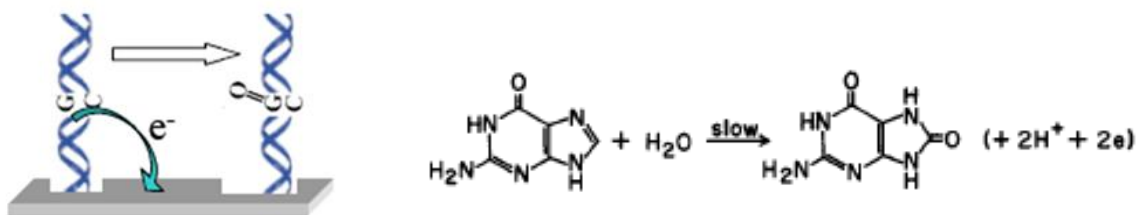


Figure 21 Présentation schématique du biocapteur basé sur les propriétés redox de l'ADN et la réaction de l'oxydation de la guanine

1.7. M. Tuberculose

1.7.1. Type de bactéries et structure

La tuberculose est une **maladie contagieuse** qui s'attaque habituellement aux poumons, mais parfois aussi à d'autres parties du corps, comme les reins, les ganglions et les os. Autrefois, la tuberculose était souvent mortelle et on lui donnait le nom de « consommation ». De nos jours, le traitement par antibiotiques permet d'en guérir. Elle est provoquée par une mycobactérie du complexe tuberculosis correspondant à différents germes et principalement à *Mycobacterium tuberculosis* ou bacille de Koch (BK). Le bacille de Koch est présent dans l'organisme pendant plusieurs mois, voire plusieurs années sans manifestation. C'est la tuberculose latente. Lorsque le bacille se multiplie, la maladie se déclare. Différents symptômes apparaissent alors plus ou moins associés entre eux. Leur persistance pendant plus de 3 semaines doit alerter.



Figure 22 *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculose est une maladie à déclaration obligatoire. Cette démarche anonyme est accomplie par le médecin auprès des autorités sanitaires. Elle permet, si nécessaire, de prendre des mesures pour limiter le risque de contamination dans l'entourage du patient. Doivent ainsi être déclarés tous les cas de tuberculose confirmés ou suspectés, quel que soit l'âge de la personne et tous les cas d'infection de tuberculose latente chez les enfants de moins de 15 ans. Sous certaines conditions, la tuberculose peut aussi être reconnue comme maladie professionnelle pour les personnes contaminées dans le cadre de leur travail. Environ 1 million de décès par tuberculose ont été constatés en 2006. Cette mortalité absolue atteint 1,5 millions huit ans plus tard. La tuberculose, sans bénéficier de programmes de prévention et de cure aussi importants, tue ainsi à peu près autant que le sida, soit environ 4 000 personnes par jour.

1.7.2. Information génétique de la séquence d'ADN de la tuberculose

La génomique, c'est-à-dire l'identification systématique de tous les gènes d'une cellule par séquençage de l'ADN et analyse bioinformatique, ainsi que la génomique comparative permettent d'envisager de nouvelles cibles potentielles pour de nouveaux agents bactéricides. Dans le cas de la *M. tuberculosis*, le séquençage et l'analyse systématique du génome de la souche H37Rv ont été entrepris dans un travail collaboratif entre l'Institut Pasteur de Paris et le Centre Sanger de Hinxton (Cambridge, Grande Bretagne) . Le séquençage du génome a permis de mettre en évidence que le chromosome de la *M. tuberculosis* est circulaire et qu'il contient 4 411 529 paires de bases avec un pourcentage de bases GC d'environ 65,6. De plus, l'analyse bioinformatique a conduit à prédire que 3 924 gènes codent pour des protéines. La fonction est partiellement ou totalement élucidée pour respectivement 20 % et 40 % de ces gènes, tandis qu'aucune information n'a pu être obtenue pour les 40 % restants (Cole et coll., 1998 ; Camus et coll., 2002)[132].

Les travaux génétiques et génomiques sur la *M. tuberculosis* et sur d'autres mycobactéries ont donc permis de recueillir d'innombrables informations sur l'organisation génétique des mycobactéries. Ces données génétiques ont de plus apporté des éléments clés pour la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu par la *M. tuberculosis* pour infecter l'hôte mais aussi de l'effet protecteur du vaccin BCG.

1.7.3. Résistance aux antibiotiques

L'augmentation des cas de tuberculose pharmaco-résistante constitue un problème de santé publique au niveau mondial. Selon des données de l'OMS, en 2011, environ 12 millions de cas de tuberculose ont été recensés dans le monde, dont plus de 630 000 cas de tuberculose multi-résistante (TB-MR)[133]. Ces tuberculoses multi-résistantes sont des cas où les bacilles de Koch résistent non seulement à l'isoniazide mais aussi à la rifampicine, les deux principaux médicaments antituberculeux. Au niveau mondial, le taux de succès des traitements des nouveaux cas de tuberculose pulmonaire à frottis positif était de 87 % en 2009 et de 76 % au Burkina Faso à la même période [134]. En 1997 en Côte d'Ivoire, 192 cas de tuberculose à microscopie positive ont été enregistrés au total au CHU de Treichville, dont 8 ont été confirmés résistants à la rifampicine et à l'isoniazide[135]. De même au Mali en 2010, le taux de TB MR avait atteint 35,7 % des cas sur 126 cas suspects [136].

Le diagnostic des TB-MR est apporté par la mise en évidence des mycobactéries, par la culture suivie de l'antibiogramme, ou par la détection de la présence d'ADN ou d'ARN mycobactérien muté, conférant une résistance à un antibiotique donné. La détermination rapide de la présence du génome bactérien par PCR constitue un progrès récent dans le diagnostic de la tuberculose. Dans les cas graves, où l'établissement rapide d'un diagnostic et la mise immédiate sous traitement antituberculeux sont impératifs, la PCR permet de gagner du temps en révélant la présence de souches mycobactériens alors que l'examen microscopique direct est négatif et que la preuve de la présence de mycobactéries viables sera apportée deux à huit semaines plus tard par culture.

Les mutations dans les positions 531 constituent les mutations les plus fréquemment observées dans les souches résistantes à la rifampicine. Les mutations dans le gène *rpoB* entraînent généralement une résistance de haut niveau ainsi qu'une résistance croisée avec toutes les rifampicines[137].

1.7.4. Biocapteurs pour la détection l'ADN génomique de la tuberculose

Les recherches de kit de diagnostic rapide de la tuberculose à base de nanotechnologies font l'objet de plusieurs études aussi bien dans le milieu académique que dans la recherche clinique. Ces kits pourraient permettre de réduire à la fois le coût, le temps et la quantité de fluide biologique nécessaires pour les tests de la tuberculose. Le défi est de trouver une méthode simple d'analyse peu

coûteuse qui pourrait rivaliser avec la méthode moléculaire d'amplification de l'ADN recommandée par l'Organisation Mondiale de la Santé, qui reste onéreuse pour les pays pauvres malgré un coût négocié.

Les études récemment réalisées dans l'équipe ECBB à l'ICMMO ont développé une stratégie basée sur la détection de l'ADN du gène *rpoB* spécifique de la *Mycobacterium tuberculosis* et de son mutant qui est responsable de la résistance à la rifampicine. Des biocapteurs à base de nanomatériaux composites nanotube de carbones [138] ou polyparaphénylène [139] capable de détecter l'ADN du gène *rpoB* dans un échantillon réel de PCR ont été développés avec des seuils de détection très faible de l'ordre de fM. Ces biocapteurs sont aussi capables *de discriminer* des mutations responsables des résistances à la rifampicine. L'intégration de ces biocapteurs dans des puces microfluidiques permet de baisser les seuils de détection et de détecter l'ADN génomique sans aucune amplification préalable [140].

1.8. Objectif de la thèse:

La détection de séquences spécifiques d'ADN est utile pour la détection ou le diagnostic de virus, de micro-organismes pathogènes et de maladies génétiques humaines. Une détection de haute sensibilité et de haute sélectivité est nécessaire pour le diagnostic et le traitement des maladies. Les méthodes électrochimiques sont intéressantes car elles ont le potentiel de fournir des capteurs de haute sensibilité et à faible coût.

L'objectif de mon travail de thèse est de mettre en œuvre une méthode de détection simple et non invasive de la *Mycobacterium tuberculosis* par des biocapteurs électrochimiques d'ADN. L'approche qui a été envisagée dans cette étude est celle de l'immobilisation de l'ADN cible sur un matériau polymère conducteur fonctionnalisé par une sonde redox. Le but est de développer des nanomatériaux à base de polypyrrole de différentes morphologies (nanofils, nanosphère) formé par des méthodes simples sans moule soit par voie chimique ou électrochimique et d'étudier l'influence de la structure du polymère sur les propriétés des biocapteurs qui en découlent. Les nanomatériaux de PPy formés ont été caractérisés par microscopie électronique à balayage (MEB), la spectroscopie de photoélectrons (XPS) et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR). Pour introduire une fonction en surface une modification par l'oxydation de l'amine a été effectué, par l'éthylenediamine EDA et les dendrimères PAMAM de génération G2. La sonde redox ferrocène modifiée par les deux groupes esters activés a été introduite par la suite pour permettre de

développer un biocapteur électrochimique. Les propriétés de transfert d'électrons ont été étudiées pour mettre en évidence l'influence de la structure du polypyrrole.

Les biocapteurs sont d'abord testés avec des oligonucléotides sondes et cibles de tailles définies et puis la faisabilité de ces biocapteurs dans des échantillons réels est analysé avec des échantillons issus de PCR de cellules infectées par la tuberculose sauvage et mutée.

Références:

- [1] C. Gondran *et al.*, « Electropolymerized biotinylated poly (pyrrole–viologen) film as platform for the development of reagentless impedimetric immunosensors », *Electrochem. Commun.*, vol. 12, n° 2, p. 311-314, févr. 2010.
- [2] A. Uygun, « DNA hybridization electrochemical biosensor using a functionalized polythiophene », *Talanta*, vol. 79, n° 2, p. 194-198, juill. 2009.
- [3] K. Yang et C. Zhang, « Simple detection of nucleic acids with a single-walled carbon-nanotube-based electrochemical biosensor », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 28, n° 1, p. 257-262, oct. 2011.
- [4] J. Yang, X. Liu, L. Huang, et D. Sun, « Antibacterial Properties of Novel Bacterial Cellulose Nanofiber Containing Silver Nanoparticles », *Chin. J. Chem. Eng.*, vol. 21, n° 12, p. 1419-1424, déc. 2013.
- [5] J. Li et X. Lin, « Simultaneous determination of dopamine and serotonin on gold nanocluster/overoxidized-polypyrrole composite modified glassy carbon electrode », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 124, n° 2, p. 486-493, juin 2007.
- [6] A. Heller, « Amperometric biosensors », *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 7, n° 1, p. 50–54, 1996.
- [7] A. Bouchet, C. Chaix, C. A. Marquette, L. J. Blum, et B. Mandrand, « Cylinder-shaped conducting polypyrrole for labelless electrochemical multidetection of DNA », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 23, n° 5, p. 735-740, déc. 2007.
- [8] K. A. Davis et T. R. Leary, « Continuous liquid-phase piezoelectric biosensor for kinetic immunoassays », *Anal. Chem.*, vol. 61, n° 11, p. 1227-1230, juin 1989.
- [9] A. S. Jdanova, S. Poyard, A. P. Soldatkin, N. Jaffrezic-Renault, et C. Martelet, « Conductometric urea sensor. Use of additional membranes for the improvement of its analytical characteristics », *Anal. Chim. Acta*, vol. 321, n° 1, p. 35-40, mars 1996.
- [10] A. Azevedo, D. Prazeres, J. Cabral, et L. Fonseca, « Ethanol biosensors based on alcohol oxidase », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, n° 2, p. 235-247, août 2005.
- [11] Y. Zhang et S. Tadigadapa, « Calorimetric biosensors with integrated microfluidic channels », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 19, n° 12, p. 1733-1743, juill. 2004.
- [12] S. Cosnier, « Affinity Biosensors Based on Electropolymerized Films », *Electroanalysis*, vol. 17, n° 19, p. 1701-1715, oct. 2005.
- [13] P. Vadgama et P. W. Crump, « Biosensors: recent trends. A review », *Analyst*, vol. 117, n° 11, p. 1657-1670, 1992.
- [14] P. B. Lippa, L. J. Sokoll, et D. W. Chan, « Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry », *Clin. Chim. Acta*, vol. 314, n° 1, p. 1-26, déc. 2001.
- [15] O. Lazcka, F. J. D. Campo, et F. X. Muñoz, « Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, n° 7, p. 1205-1217, févr. 2007.

Université Paris-Saclay

Espace Technologique / Immeuble Discovery

Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France



- [16] F. E. Wembe *et al.*, « PARASITOLOGIE », *Bull Soc Pathol Exot*, vol. 98, n° 3, p. 177–181, 2005.
- [17] Y. Hu, Z. Zhao, et Q. Wan, « Facile preparation of carbon nanotube-conducting polymer network for sensitive electrochemical immunoassay of Hepatitis B surface antigen in serum », *Bioelectrochemistry*, vol. 81, n° 2, p. 59-64, juin 2011.
- [18] C. Ding, F. Zhao, R. Ren, et J.-M. Lin, « An electrochemical biosensor for α -fetoprotein based on carbon paste electrode constructed of room temperature ionic liquid and gold nanoparticles », *Talanta*, vol. 78, n° 3, p. 1148-1154, mai 2009.
- [19] Y. Zhang, H. Wang, J. Nie, Y. Zhang, G. Shen, et R. Yu, « Individually addressable microelectrode arrays fabricated with gold-coated pencil graphite particles for multiplexed and high sensitive impedance immunoassays », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 25, n° 1, p. 34-40, sept. 2009.
- [20] H. Q. A. Lê, H. Sauriat-Dorizon, et H. Korri-Yousoufi, « Investigation of SPR and electrochemical detection of antigen with polypyrrole functionalized by biotinylated single-chain antibody: A review », *Anal. Chim. Acta*, vol. 674, n° 1, p. 1-8, juill. 2010.
- [21] S. Reisberg *et al.*, « Label-free DNA electrochemical sensor based on a PNA-functionalized conductive polymer », *Talanta*, vol. 76, n° 1, p. 206-210, juin 2008.
- [22] « Chemical and physical effects of ultrasound: Sonoluminescence and materials - ProQuest ». [En ligne]. Disponible sur:
<https://search.proquest.com/openview/6e01999814345ee47c00b17e4ebbd37b/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y>. [Consulté le: 23-nov-2017].
- [23] S. Chebil, N. Macauley, T. Hianik, et H. Korri-Yousoufi, « Multiwalled Carbon Nanotubes Modified by NTA-Copper Complex for Label-Free Electrochemical Immunosensor Detection », *Electroanalysis*, vol. 25, n° 3, p. 636-643, mars 2013.
- [24] S. Zhang, F. Huang, B. Liu, J. Ding, X. Xu, et J. Kong, « A sensitive impedance immunosensor based on functionalized gold nanoparticle–protein composite films for probing apolipoprotein A-I », *Talanta*, vol. 71, n° 2, p. 874-881, févr. 2007.
- [25] K. S. Lundberg, D. D. Shoemaker, M. W. W. Adams, J. M. Short, J. A. Sorge, et E. J. Mathur, « High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus* », *Gene*, vol. 108, n° 1, p. 1-6, déc. 1991.
- [26] H. Doi, T. Takahara, T. Minamoto, S. Matsushashi, K. Uchii, et H. Yamanaka, « Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (PCR) Outperforms Real-Time PCR in the Detection of Environmental DNA from an Invasive Fish Species », *Environ. Sci. Technol.*, vol. 49, n° 9, p. 5601-5608, mai 2015.
- [27] R. K. Saiki *et al.*, « Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase », *Science*, vol. 239, n° 4839, p. 487-491, 1988.
- [28] H. Peng, L. Zhang, C. Soeller, et J. Travas-Sejdic, « Conducting polymers for electrochemical DNA sensing », *Biomaterials*, vol. 30, n° 11, p. 2132-2148, avr. 2009.

- [29] R. A. Macina et H. C. Riethman, « Direct DNA hybridization screening of primary yeast transformants in the construction of targeted Yeast Artificial Chromosome (YAC) libraries », *Genet. Anal. Biomol. Eng.*, vol. 9, n° 2, p. 58-63, avr. 1992.
- [30] E. L. S. Wong, P. Erohkin, et J. J. Gooding, « A comparison of cationic and anionic intercalators for the electrochemical transduction of DNA hybridization via long range electron transfer », *Electrochem. Commun.*, vol. 6, n° 7, p. 648-654, juill. 2004.
- [31] P. Singhal et W. G. Kuhr, « Ultrasensitive voltammetric detection of underivatized oligonucleotides and DNA », *Anal. Chem.*, vol. 69, n° 23, p. 4828-4832, 1997.
- [32] K. M. Millan et S. R. Mikkelsen, « Sequence-selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators », *Anal. Chem.*, vol. 65, n° 17, p. 2317-2323, 1993.
- [33] K. Hashimoto, K. Ito, et Y. Ishimori, « Novel DNA sensor for electrochemical gene detection », *Anal. Chim. Acta*, vol. 286, n° 2, p. 219-224, 1994.
- [34] H. Cai, X. Cao, Y. Jiang, P. He, et Y. Fang, « Carbon nanotube-enhanced electrochemical DNA biosensor for DNA hybridization detection », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 375, n° 2, p. 287-293, janv. 2003.
- [35] A. Bouchet, C. Chaix, C. A. Marquette, L. J. Blum, et B. Mandrand, « Cylinder-shaped conducting polypyrrole for labelless electrochemical multidetection of DNA », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 23, n° 5, p. 735-740, déc. 2007.
- [36] H. Cai, X. Cao, Y. Jiang, P. He, et Y. Fang, « Carbon nanotube-enhanced electrochemical DNA biosensor for DNA hybridization detection », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 375, n° 2, p. 287-293, janv. 2003.
- [37] H. Peng, L. Zhang, C. Soeller, et J. Travas-Sejdic, « Conducting polymers for electrochemical DNA sensing », *Biomaterials*, vol. 30, n° 11, p. 2132-2148, avr. 2009.
- [38] U. Johanson, M. Marandi, T. Tamm, et J. Tamm, « Comparative study of the behavior of anions in polypyrrole films », *Electrochimica Acta*, vol. 50, n° 7, p. 1523-1528, févr. 2005.
- [39] H. Cai, X. Cao, Y. Jiang, P. He, et Y. Fang, « Carbon nanotube-enhanced electrochemical DNA biosensor for DNA hybridization detection », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 375, n° 2, p. 287-293, janv. 2003.
- [40] A. Azione *et al.*, « Interactions and conformational changes of human serum albumin at the surface of electrochemically synthesized thin polypyrrole films », *Electrochimica Acta*, vol. 50, n° 7, p. 1661-1667, févr. 2005.
- [41] X. Zhang, R. Bai, et Y. W. Tong, « Selective adsorption behaviors of proteins on polypyrrole-based adsorbents », *Sep. Purif. Technol.*, vol. 52, n° 1, p. 161-169, nov. 2006.
- [42] J.-B. Raoof, R. Ojani, et S. Rashid-Nadimi, « Preparation of polypyrrole/ferrocyanide films modified carbon paste electrode and its application on the electrocatalytic determination of ascorbic acid », *Electrochimica Acta*, vol. 49, n° 2, p. 271-280, janv. 2004.

- [43] V. Khomenko, E. Frackowiak, et F. Béguin, « Determination of the specific capacitance of conducting polymer/nanotubes composite electrodes using different cell configurations », *Electrochimica Acta*, vol. 50, n° 12, p. 2499-2506, avr. 2005.
- [44] S. Asavapiriyant, G. K. Chandler, G. A. Gunawardena, et D. Pletcher, « The electrodeposition of polypyrrole films from aqueous solutions », *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, vol. 177, n° 1, p. 229-244, oct. 1984.
- [45] M. Armour, A. G. Davies, J. Upadhyay, et A. Wassermann, « Colored electrically conducting polymers from furan, pyrrole, and thiophene », *J. Polym. Sci. [A1]*, vol. 5, n° 7, p. 1527-1538, juill. 1967.
- [46] R. Olinski, T. Zastawny, J. Budzbon, J. Skokowski, W. Zegarski, et M. Dizdaroglu, « DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues », *FEBS Lett.*, vol. 309, n° 2, p. 193-198, sept. 1992.
- [47] Y. Kudoh, « Properties of polypyrrole prepared by chemical polymerization using aqueous solution containing Fe₂(SO₄)₃ and anionic surfactant », *Synth. Met.*, vol. 79, n° 1, p. 17-22, avr. 1996.
- [48] N. Cawdery, T. M. Obey, et B. Vincent, « Colloidal dispersions of electrically conducting polypyrrole particles in various media », *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, vol. 0, n° 17, p. 1189-1190, 1988.
- [49] M. Satoh, H. Ishikawa, K. Amano, E. Hasegawa, et K. Yoshino, « Highly conducting polypyrrole prepared from homogeneous mixtures of pyrrole/oxidizing agent and its applications to solid tantalum capacitors », *Synth. Met.*, vol. 65, n° 1, p. 39-44, juill. 1994.
- [50] J. Pecher et S. Mecking, « Nanoparticles of Conjugated Polymers », *Chem. Rev.*, vol. 110, n° 10, p. 6260-6279, oct. 2010.
- [51] J. Stejskal, *Colloidal dispersions of conducting polymers*, vol. 18. 2001.
- [52] « Liquid/Liquid Interfacial Polymerization To Grow Single Crystalline Nanoneedles of Various Conducting Polymers - ACS Nano (ACS Publications) ». [En ligne]. Disponible sur : <http://pubs.acs.org.proxy.scd.u-psud.fr/doi/abs/10.1021/nn7001536?source=chemport>. [Consulté le: 23-nov-2017].
- [53] C. R. Martin, L. S. Van Dyke, Z. Cai, et W. Liang, « Template synthesis of organic microtubules », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 112, n° 24, p. 8976-8977, nov. 1990.
- [54] C. R. Martin, « Nanomaterials: A Membrane-Based Synthetic Approach », *Science*, vol. 266, n° 5193, p. 1961-1966, 1994.
- [55] J. Joo *et al.*, « Fabrication and Applications of Conducting Polymer Nanotube, Nanowire, Nanohole, and Double Wall Nanotube », *Synth. Met.*, vol. 153, n° 1, p. 313-316, sept. 2005.
- [56] M. Granström, J. C. Carlberg, et O. Inganäs, « Electrically conductive polymer fibres with mesoscopic diameters: 2. Studies of polymerization behaviour », *Polymer*, vol. 36, n° 16, p. 3191-3196, janv. 1995.

- [57] S. Kuwabata et C. R. Martin, « Mechanism of the Amperometric Response of a Proposed Glucose Sensor Based on a Polypyrrole-Tubule-Impregnated Membrane », *Anal. Chem.*, vol. 66, n° 17, p. 2757-2762, sept. 1994.
- [58] C. R. Martin et R. V. Parthasarathy, « Polymeric microcapsule arrays », *Adv. Mater.*, vol. 7, n° 5, p. 487-488, mai 1995.
- [59] R. V. Parthasarathy et C. R. Martin, « Enzyme and Chemical Encapsulation in Polymeric Microcapsules », COLORADO STATE UNIV FORT COLLINS DEPT OF CHEMISTRY, COLORADO STATE UNIV FORT COLLINS DEPT OF CHEMISTRY, 1995.
- [60] J. I. Lee *et al.*, « Highly Aligned Ultrahigh Density Arrays of Conducting Polymer Nanorods using Block Copolymer Templates », *Nano Lett.*, vol. 8, n° 8, p. 2315-2320, août 2008.
- [61] J. Jang, J. H. Oh, et G. D. Stucky, « Fabrication of Ultrafine Conducting Polymer and Graphite Nanoparticles », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 41, n° 21, p. 4016-4019, nov. 2002.
- [62] Z. Yin et Q. Zheng, « Controlled Synthesis and Energy Applications of One-Dimensional Conducting Polymer Nanostructures: An Overview », *Adv. Energy Mater.*, vol. 2, n° 2, p. 179-218, févr. 2012.
- [63] X. Zhang, W. J. Goux, et S. K. Manohar, « Synthesis of Polyaniline Nanofibers by "Nanofiber Seeding" », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, n° 14, p. 4502-4503, avr. 2004.
- [64] L. Jiang, X. Wang, et L. Chi, « Nanoscaled Surface Patterning of Conducting Polymers », *Small*, vol. 7, n° 10, p. 1309-1321, mai 2011.
- [65] Y. Xu, F. Zhang, et X. Feng, « Patterning of Conjugated Polymers for Organic Optoelectronic Devices », *Small*, vol. 7, n° 10, p. 1338-1360, mai 2011.
- [66] P. V. Kamat, K. Tvrđy, D. R. Baker, et J. G. Radich, « Beyond Photovoltaics: Semiconductor Nanoarchitectures for Liquid-Junction Solar Cells », *Chem. Rev.*, vol. 110, n° 11, p. 6664-6688, nov. 2010.
- [67] Y. Xia *et al.*, « One-Dimensional Nanostructures: Synthesis, Characterization, and Applications », *Adv. Mater.*, vol. 15, n° 5, p. 353-389, mars 2003.
- [68] M. Goren et R. B. Lennox, « Nanoscale Polypyrrole Patterns Using Block Copolymer Surface Micelles as Templates », *Nano Lett.*, vol. 1, n° 12, p. 735-738, déc. 2001.
- [69] W. Shi, P. Liang, D. Ge, J. Wang, et Q. Zhang, « Starch -assisted synthesis of polypyrrole nanowires by a simple electrochemical approach », *Chem. Commun.*, vol. 0, n° 23, p. 2414-2416, 2007.
- [70] L. Xia, B. Quan, et Z. Wei, « Patterned Growth of Vertically Aligned Polypyrrole Nanowire Arrays », *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 32, n° 24, p. 1998-2002, déc. 2011.
- [71] A. Errachid *et al.*, « Electropolymerization of nano-dimensioned polypyrrole micro-ring arrays on gold substrates prepared using submerged micro-contact printing », *Nanotechnology*, vol. 18, n° 48, p. 485301, 2007.
- [72] « garciacruz2016.pdf » .

- [73] C. Debiemme-Chouvy, « Template-free one-step electrochemical formation of polypyrrole nanowire array », *Electrochem. Commun.*, vol. 11, n° 2, p. 298-301, févr. 2009.
- [74] P. J. Kinlen, J. Liu, Y. Ding, C. R. Graham, et E. E. Remsen, « Emulsion Polymerization Process for Organically Soluble and Electrically Conducting Polyaniline », *Macromolecules*, vol. 31, n° 6, p. 1735-1744, mars 1998.
- [75] R. K. Paul, V. Vijayanathan, et C. K. S. Pillai, « Melt/solution processable conducting polyaniline: doping studies with a novel phosphoric acid ester », *Synth. Met.*, vol. 104, n° 3, p. 189-195, juill. 1999.
- [76] J. Y. Lee, D. Y. Kim, K. T. Song, S. Y. Kim, et C. Y. Kim, « A Polypyrrole Solution in Chloroform », *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol. Sect. Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, vol. 280, n° 1, p. 135-144, avr. 1996.
- [77] J. Y. Lee, D. Y. Kim, et C. Y. Kim, « Synthesis of soluble polypyrrole of the doped state in organic solvents », *Synth. Met.*, vol. 74, n° 2, p. 103-106, sept. 1995.
- [78] S. A. Ashraf, F. Chen, C. O. Too, et G. G. Wallace, « Bulk electropolymerization of alkylpyrroles », *Polymer*, vol. 37, n° 13, p. 2811-2819, juin 1996.
- [79] B. C. Roy, M. D. Gupta, L. Bhowmik, et J. K. Ray, « Synthesis and characterization of poly(2,5-dimethoxyaniline) and poly(aniline-Co-2,5-dimethoxyaniline): The processable conducting polymers », *Bull. Mater. Sci.*, vol. 24, n° 4, p. 389-396, août 2001.
- [80] G. A. Diaz-Quijada, B. M. Pinto, et S. Holdcroft, « Regiochemical Analysis of Water Soluble Conductive Polymers: Sodium Poly(ω -(3-thienyl)alkanesulfonates) », *Macromolecules*, vol. 29, n° 16, p. 5416-5421, janv. 1996.
- [81] D. J. Guerrero, X. Ren, et J. P. Ferraris, « Preparation and Characterization of Poly(3-arylthiophene)s », *Chem. Mater.*, vol. 6, n° 8, p. 1437-1443, août 1994.
- [82] Z. Liu, Y. Liu, S. Poyraz, et X. Zhang, « Green-nano approach to nanostructured polypyrrole », *Chem. Commun.*, vol. 47, n° 15, p. 4421-4423, 2011.
- [83] J. Jang et H. Yoon, « Multigram-Scale Fabrication of Monodisperse Conducting Polymer and Magnetic Carbon Nanoparticles », *Small*, vol. 1, n° 12, p. 1195-1199, déc. 2005.
- [84] S. Shang, W. Zeng, et X. Tao, « Fabrication of conducting polypyrrole / β -cyclodextrin nano- and micro-spheres using molecular templates », *RSC Adv.*, vol. 2, n° 11, p. 4675-4682, 2012.
- [85] Y. Shen et M. Wan, « In situ doping polymerization of pyrrole with sulfonic acid as a dopant », *Synth. Met.*, vol. 96, n° 2, p. 127-132, juill. 1998.
- [86] Z. Liu, Y. Liu, S. Poyraz, et X. Zhang, « Green-nano approach to nanostructured polypyrrole », *Chem. Commun.*, vol. 47, n° 15, p. 4421-4423, 2011.
- [87] S. P. Surwade *et al.*, « Catalyst-Free Synthesis of Oligoanilines and Polyaniline Nanofibers Using H₂O₂ », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, n° 35, p. 12528-12529, sept. 2009.

- [88] M. Sai Ram et S. Palaniappan, « Benzoyl peroxide oxidation route to polyaniline salt and its use as catalyst in the esterification reaction », *J. Mol. Catal. Chem.*, vol. 201, n° 1, p. 289-296, juill. 2003.
- [89] W. Schuhmann, C. Kranz, H. Wohlschläger, et J. Strohmeier, « Pulse technique for the electrochemical deposition of polymer films on electrode surfaces », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 12, n° 12, p. 1157-1167, déc. 1997.
- [90] L. Qu, G. Shi, J. Yuan, G. Han, et F. Chen, « Preparation of polypyrrole microstructures by direct electrochemical oxidation of pyrrole in an aqueous solution of camphorsulfonic acid », *J. Electroanal. Chem.*, vol. 561, n° Supplement C, p. 149-156, janv. 2004.
- [91] H. Q. A. Lê, S. Chebil, B. Makrouf, H. Sauriat-Dorizon, B. Mandrand, et H. Korri-Yousoufi, « Effect of the size of electrode on electrochemical properties of ferrocene-functionalized polypyrrole towards DNA sensing », *Talanta*, vol. 81, n° 4, p. 1250-1257, juin 2010.
- [92] N. Mejri-Omrani *et al.*, « Direct detection of OTA by impedimetric aptasensor based on modified polypyrrole-dendrimers », *Anal. Chim. Acta*, vol. 920, p. Pages 37–46, mai 2016.
- [93] S. Chebil *et al.*, « Electrochemical detection of d-dimer as deep vein thrombosis marker using single-chain d-dimer antibody immobilized on functionalized polypyrrole », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, n° 2, p. 736-742, oct. 2010.
- [94] P. N. Bartlett, A. C. Benniston, L.-Y. Chung, D. H. Dawson, et P. Moore, « Electrochemical studies of benzo-15-crown-5 substituted poly(pyrrole) films », *Electrochimica Acta*, vol. 36, n° 8, p. 1377-1379, janv. 1991.
- [95] F. Garnier, H. K. Youssoufi, P. Srivastava, et A. Yassar, « Enzyme Recognition by Polypyrrole Functionalized with Bioactive Peptides », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 116, n° 19, p. 8813-8814, sept. 1994.
- [96] S. Palacin, C. Bureau, J. Charlier, G. Deniau, B. Mouanda, et P. Viel, « Molecule-to-Metal Bonds: Electrografting Polymers on Conducting Surfaces », *ChemPhysChem*, vol. 5, n° 10, p. 1468-1481, oct. 2004.
- [97] C. P. Andrieux, F. Gonzalez, et J.-M. Savéant, « Derivatization of Carbon Surfaces by Anodic Oxidation of Arylacetates. Electrochemical Manipulation of the Grafted Films », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, n° 18, p. 4292-4300, mai 1997.
- [98] P. Allongue *et al.*, « Covalent Modification of Carbon Surfaces by Aryl Radicals Generated from the Electrochemical Reduction of Diazonium Salts », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, n° 1, p. 201-207, janv. 1997.
- [99] J. Pinson et F. Podvorica, « Attachment of organic layers to conductive or semiconductive surfaces by reduction of diazonium salts », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 34, n° 5, p. 429-439, 2005.
- [100] E. M. Geniès, A. Boyle, M. Lapkowski, et C. Tsintavis, « Polyaniline: A historical survey », *Synth. Met.*, vol. 36, n° 2, p. 139-182, juin 1990.
- [101] H. Yang et A. J. Bard, « The application of fast scan cyclic voltammetry. Mechanistic study of the initial stage of electropolymerization of aniline in aqueous solutions », *J. Electroanal. Chem.*, vol. 339, n° 1, p. 423-449, nov. 1992.



- [102] J.-M. Chrétien, M. A. Ghanem, P. N. Bartlett, et J. D. Kilburn, « Covalent Tethering of Organic Functionality to the Surface of Glassy Carbon Electrodes by Using Electrochemical and Solid-Phase Synthesis Methodologies », *Chem. – Eur. J.*, vol. 14, n° 8, p. 2548-2556, mars 2008.
- [103] L. Zhang, X. Jiang, E. Wang, et S. Dong, « Attachment of gold nanoparticles to glassy carbon electrode and its application for the direct electrochemistry and electrocatalytic behavior of hemoglobin », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, n° 2, p. 337-345, août 2005.
- [104] A. Adenier, M. M. Chehimi, I. Gallardo, J. Pinson, et N. Vilà, « Electrochemical Oxidation of Aliphatic Amines and Their Attachment to Carbon and Metal Surfaces », *Langmuir*, vol. 20, n° 19, p. 8243-8253, sept. 2004.
- [105] B. Lakard, G. Herlem, et B. Fahys, « Ab initio and DFT study of aliphatic diamines », *J. Mol. Struct. THEOCHEM*, vol. 584, n° 1, p. 15-36, avr. 2002.
- [106] B. Lakard, G. Herlem, et B. Fahys, « Ab initio study of the electrochemical polymerization mechanism leading from DETA to PEI », *J. Mol. Struct. THEOCHEM*, vol. 593, n° 1, p. 133-141, sept. 2002.
- [107] A. Adenier, E. Cabet-Deliry, T. Lalot, J. Pinson, et F. Podvorica, « Attachment of Polymers to Organic Moieties Covalently Bonded to Iron Surfaces », *Chem. Mater.*, vol. 14, n° 11, p. 4576-4585, nov. 2002.
- [108] F. Geneste, C. Moinet, et G. Jezequel, « First covalent attachment of a polypyridyl ruthenium complex on a graphite felt electrode », *New J. Chem.*, vol. 26, n° 11, p. 1539-1541, 2002.
- [109] M. A. Hayes et W. G. Kuhr, « Preservation of NADH Voltammetry for Enzyme-Modified Electrodes Based on Dehydrogenase », *Anal. Chem.*, vol. 71, n° 9, p. 1720-1727, mai 1999.
- [110] H. Maeda, T. Kitano, C. Z. Huang, K. Katayama, Y. Yamauchi, et H. Ohmori, « Effective Method for the Covalent Introduction of the 2-(2-Carboxymethoxyethoxy)ethoxy Group on a Glassy Carbon Electrode by Anodization in Triethylene Glycol », *Anal. Sci.*, vol. 15, n° 6, p. 531-536, 1999.
- [111] T.-C. Kuo et R. L. McCreery, « Surface Chemistry and Electron-Transfer Kinetics of Hydrogen-Modified Glassy Carbon Electrodes », *Anal. Chem.*, vol. 71, n° 8, p. 1553-1560, avr. 1999.
- [112] S. Demirci *et al.*, « Functionalization of poly-SNS-anchored carboxylic acid with Lys and PAMAM: surface modifications for biomolecule immobilization/stabilization and bio-sensing applications », *Analyst*, vol. 137, n° 18, p. 4254-4261, 2012.
- [113] A. Miodek, N. Mejri, M. Gomgnimbou, C. Sola, et H. Korri-Yousoufi, « E-DNA Sensor of Mycobacterium tuberculosis Based on Electrochemical Assembly of Nanomaterials (MWCNTs/PPy/PAMAM) », *Anal. Chem.*, vol. 87, n° 18, p. 9257-9264, sept. 2015.
- [114] M. Mascini, I. Palchetti, et G. Marrazza, « DNA electrochemical biosensors », *Fresenius J. Anal. Chem.*, vol. 369, n° 1, p. 15-22, janv. 2001.
- [115] Y. Jin, W. Lu, J. Hu, X. Yao, et J. Li, « Site-specific DNA cleavage of EcoRI endonuclease probed by electrochemical analysis using ferrocene capped gold nanoparticles as reporter », *Electrochem. Commun.*, vol. 9, n° 5, p. 1086-1090, mai 2007.

- [116] H. Gao, X. Jiang, Y.-J. Dong, W.-X. Tang, C. Hou, et N.-N. Zhu, « Dendrimer-encapsulated copper as a novel oligonucleotides label for sensitive electrochemical stripping detection of DNA hybridization », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 48, n° Supplement C, p. 210-215, oct. 2013.
- [117] Y. Wan *et al.*, « Ligase-based multiple DNA analysis by using an electrochemical sensor array », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, n° 5, p. 1209-1212, janv. 2009.
- [118] G. Carpini, F. Lucarelli, G. Marrazza, et M. Mascini, « Oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes for enzyme-amplified sensing of nucleic acids », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, n° 2, p. 167-175, sept. 2004.
- [119] P. Kavanagh et D. Leech, « Redox Polymer and Probe DNA Tethered to Gold Electrodes for Enzyme-Amplified Amperometric Detection of DNA Hybridization », *Anal. Chem.*, vol. 78, n° 8, p. 2710-2716, avr. 2006.
- [120] H. Korri-Yousoufi, P. Godillot, P. Srivastava, A. El Kassmi, et F. Garnier, « New method of polypyrrole functionalization toward molecular recognition », *Synth. Met.*, vol. 84, n° 1, p. 169-170, janv. 1997.
- [121] H. Korri-Yousoufi, F. Garnier, P. Srivastava, P. Godillot, et A. Yassar, « Toward Bioelectronics: Specific DNA Recognition Based on an Oligonucleotide-Functionalized Polypyrrole », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, n° 31, p. 7388-7389, août 1997.
- [122] T. T. N. Lien *et al.*, « Multi-wall carbon nanotubes (MWCNTs)-doped polypyrrole DNA biosensor for label-free detection of genetically modified organisms by QCM and EIS », *Talanta*, vol. 80, n° 3, p. 1164-1169, janv. 2010.
- [123] J. Yang, T. Yang, Y. Feng, et K. Jiao, « A DNA electrochemical sensor based on nanogold-modified poly-2,6-pyridinedicarboxylic acid film and detection of PAT gene fragment », *Anal. Biochem.*, vol. 365, n° 1, p. 24-30, juin 2007.
- [124] D. Kang, X. Zuo, R. Yang, F. Xia, K. W. Plaxco, et R. J. White, « Comparing the Properties of Electrochemical-Based DNA Sensors Employing Different Redox Tags », *Anal. Chem.*, vol. 81, n° 21, p. 9109-9113, nov. 2009.
- [125] Y. Xiao, X. Qu, K. W. Plaxco, et A. J. Heeger, « Label-Free Electrochemical Detection of DNA in Blood Serum via Target-Induced Resolution of an Electrode-Bound DNA Pseudoknot », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, n° 39, p. 11896-11897, oct. 2007.
- [126] C. Fan, K. W. Plaxco, et A. J. Heeger, « Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, n° 16, p. 9134-9137, août 2003.
- [127] A. Anne, A. Bouchardon, et J. Moiroux, « 3'-Ferrocene-Labeled Oligonucleotide Chains End-Tethered to Gold Electrode Surfaces: Novel Model Systems for Exploring Flexibility of Short DNA Using Cyclic Voltammetry », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, n° 5, p. 1112-1113, févr. 2003.

- [128] C. E. Immoos, S. J. Lee, et M. W. Grinstaff, « DNA-PEG-DNA Triblock Macromolecules for Reagentless DNA Detection », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, n° 35, p. 10814-10815, sept. 2004.
- [129] E. Paleček, « Oscillographic Polarography of Highly Polymerized Deoxyribonucleic Acid », *Nature*, vol. 188, n° 4751, p. 656-657, nov. 1960.
- [130] E. Paleček, « Adsorptive transfer stripping voltammetry: Determination of nanogram quantities of DNA immobilized at the electrode surface », *Anal. Biochem.*, vol. 170, n° 2, p. 421-431, mai 1988.
- [131] S. Bollo, N. F. Ferreyra, et G. A. Rivas, « Electrooxidation of DNA at Glassy Carbon Electrodes Modified with Multiwall Carbon Nanotubes Dispersed in Chitosan », *Electroanalysis*, vol. 19, n° 7-8, p. 833-840, avr. 2007.
- [132] A. Krogh *et al.*, « Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence », *Nature*, vol. 393, n° 6685, p. 537, juin 1998.
- [133] Z. C. Méda *et al.*, « Tuberculosis in developing countries: conditions for successful use of a decentralized approach in a rural health district », *Pan Afr. Med. J.*, vol. 17, mars 2014.
- [134] S. Zida *et al.*, « [Current status of atypical mycobacterial infections in Burkina Faso: results of a regional survey]., Etat des lieux des mycobactérioses atypiques au Burkina Faso: résultats d'une enquête régionale », *Pan Afr. Med. J. Pan Afr. Med. J.*, vol. 17, 17, p. 188-188, 2014.
- [135] M. Ouedraogo *et al.*, « [Simultaneous resistance to rifampicin and isoniazid in patients with pulmonary tuberculosis] », *Rev. Mal. Respir.*, vol. 17, n° 2, p. 477-480, avr. 2000.
- [136] B. Traore *et al.*, « Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Bamako, Mali », *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, vol. 16, n° 7, p. 911-916, juill. 2012.
- [137] Y. Zhang et W. W. Yew, « Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [State of the art series. Drug-resistant tuberculosis. Edited by C-Y. Chiang. Number 1 in the series] », *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, vol. 13, n° 11, p. 1320-1330, nov. 2009.
- [138] A. Miodek, N. Mejri, M. Gomgnimbou, C. Sola, et H. Korri-Yousoufi, « E-DNA Sensor of *Mycobacterium tuberculosis* Based on Electrochemical Assembly of Nanomaterials (MWCNTs/PPy/PAMAM) », *Anal. Chem.*, vol. 87, n° 18, p. 9257-9264, sept. 2015.
- [139] S. Bizid, R. Mlika, A. Haj Said, M. Chemli, et H. Korri Yousoufi, « Investigations of poly(p-phenylene) modified with ferrocene and their application in electrochemical DNA sensing », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 226, p. 370-380, avr. 2016.
- [140] B. Zribi *et al.*, « Large area graphene nanomesh: an artificial platform for edge-electrochemical biosensing at the sub-attomolar level », *Nanoscale*, vol. 8, n° 34, p. 15479-15485, août 2016.

Chapitre 2: E-DNA biosensors based on polypyrrole nanowires modified with ferrocene for DNA detection of M. tuberculosis

Abstract:

In this work, we developed biosensor based on polypyrrole nanowires as transducer for electrochemical DNA detection of rpoB gene of *Mycobacterium tuberculosis*. The nanowire of PPy (nw-PPy) was formed by template free and deposit on gold electrode by electrochemical polymerization. The formed nanowires was characterized through SEM and electrochemical measurement to follow respectively the shape of nanowire and their electrical properties. Further, the polypyrrole nanowires were chemically modified with ethylene diamine or PAMAM dendrimers which were coated through electrochemical patterning approach following amine oxidation to obtain amine as functional groups on the surface. The formation of nw-PPy-PAMAM was characterized by FT-IR, XPS and EIS to demonstrate the efficiency of the modification step. Ferrocenyl groups were then attached as electrochemical redox reporter and redox properties were characterized by square wave voltammetry and cyclic voltammetry. The DNA probe bearing amine in 5' position was cross-linked on the surface through ferrocenyl linker. The properties of the biosensors were followed through redox properties of ferrocenyls groups. High performance in the DNA detection was obtained with detection limit of 36 attomolaire compared to the same biosensors obtained with non-structured polypyrrole or carbon nanotube. This demonstrates the potential of using high surface area of nw-PPy and the soft modification approaches. The biosensor was applied in detection of DNA in real samples of genomic DNA of *Mycobacterium tuberculosis* and the mutated one which present the resistance of rifampicin. The biosensor based on nw-PPy demonstrates a potential application in DNA sensing and ability to discriminate rpoB gene from the muted one and could be applied as platform in the biosensors technology.

2.1. Introduction

A rapid, accurate, cost-effective of diagnostics of pathogenic and viral DNA biomarkers stills remains a challenge. The development of extremely sensitive, highly selective, simple, robust and yet inexpensive biosensing platforms appears thus essential for a wide range of applications, including not only clinical diagnostics [1] but also environmental monitoring [2] and food safety testing [3]. The detection and identification of multi-resistant strains are raising therapeutic problems. Tuberculosis remains one of major global health problem worldwide. Despite the advent of antibiotics which have widely reduced mortality, antibiotic-resistant strains have now emerged. The ability to obtain sequence-specific genetic information about infectious pathogens and resistant stand remains of great importance.

Electrochemical biosensors have existed for nearly sixty years and have recently found extensive applications in diverse industries. Nowadays, many analytical instruments used in environmental, food, pharmaceutical, or clinical laboratories and most of the commercial point-of-care devices work using chemical biosensors. Electrochemical sensors usually composed of two basic components, a chemical (molecular) recognition system which is the most important part of a sensor and a physicochemical transducer which is a device that converts the chemical response into a signal that can be detected by modern electrical instrumentations[4] [5].

Conducting polymers (CPs) are widely used as transducers for biological interactions. CPs are polyconjugate polymers with an electronic structure giving them intrinsic characteristics such as electrical conductivity, which can be controlled by a doping/de-doping process, low ionization potential, high electron affinity and optical properties. Polypyrrole (PPy) is one of the conducting polymers extensively applied to the design of bioanalytical sensors [6][7] including systems for DNA detection [8]. This is related to their electrical, electrochemical and optical properties provided by π conjugated system and their ability to deposition on micro size surface [9]. One of their potential powerful is the ability for chemical modification and introduction of new function that it's a great's importance in the construction of biosensors devices [10]. Biosensors based on PPy for DNA detection was demonstrated by various groups. Wang et al. described the incorporation of DNA dopants into a PPy network by using an electrochemical QCM (EQCM) and showed that it exhibited a strong affinity for DNA target [11]. Others works demonstrate electrochemical DNA hybridization sensing based on measuring the polypyrrole response [12]. It was demonstrated that experimental parameters including the nature of the electrolyte, the electrodeposition potential and the



monomers concentration affect the morphology and conductivities of so-prepared polypyrrole [11]. Nanostructures of PPy could be obtained following various methods including template synthesis[12], and electro-spinning [14]. Conducting polypyrrole could be synthesized in various nanostructures forms nanowire, nanotubes or nanofibers [15]. They could be formed in aqueous solution or organic solvents. The choice of the solvent as well as the type and concentration of the electrolyte and the polymerization conditions have a significant impact on the morphology of the polymers. The PPy nanostructures present a great interest in biosensors devices as these nanomaterials presents high surface area comparable to carbon nanotubes with tunable conductivity, flexibility, chemical diversity and ease of processing[16] Current research trends showed that vertically aligned PPy nanowires exhibit a unique combination of morphology and intrinsic properties, such as high surface to volume ratio, fast oxidation/reduction kinetic and electrical conductivity[17].

Polypyrrole nanowires can be obtained by a number of ways including growing on templates of inorganic materials such as anodic aluminium oxide [18] (AAO) membranes, zinc oxide [19] or template with organic materials such as the presence of gelatin as the soft mold [20]. Nanostructure of polypyrrole could be also formed through nanotechnology approach through nanocontact printing and controlled polymerization. Immunosensors for cytokine detection were developed through immobilization of antibody on the surface following electrochemical modification approaches through diazonium compounds[21]. polymer nanowires have been also prepared by using DNA-templating of 2,5-(bis-2-thienyl)-pyrrole (TPT) by oxidation with FeCl_3 in a mixed aqueous/organic solvent system. Despite the reduced capacity for strong hydrogen bonding in poly TPT compared to other systems, such as polypyrrole, the templating proceeds well [20]. Template free method of synthesizing nano-structures of CPPy has several advantages like simple synthesis, with no template removing steps needed. Also, uniform nanostructures are formed, which are reproducible [22]. Direct electropolymerization of pyrrole on electrode without template has been demonstrated in the presence of non-acidic and weak-acidic anions. PPy nanowires are obtained where the length could be controlled by the polymerization time [23].

Various electrochemical sensors based on PPy nanowires and nanowire arrays have been presented for detection of small molecules such as NO^{3-} ions [24], Cu^{2+} [25], ammonia gas [26], glutamic acid [27], spermidine [28], glucose [29][30] and pH sensor [31]. DNA biosensors based on PPy nanowires has been demonstrated with PPy generated with inorganic template such as ZnSe/CdSe

quantum dots, within 100 or 200 nm wide and 3 μm long on prefabricated silicon substrate. The DNA target was immobilized through biotin streptavidin interaction and then DNA detection was measured through the variation of resistance where detection limit of 1nM has been demonstrated [32][33].

In this work, we would like to prove that aligned PPy nanowires formed by electropolymerizing without template less could be employed as transducers for DNA detection and provided high surface to volume ratio that leads to detection of DNA at lower level followed redox signal of redox markers attached to the PPy nanostructure. Such nanostructure could be applied for *M. tuberculosis* detection and discrimination of resistant strain with single nucleotide polymorphism. The results will be compared to other materials based polypyrrole.

2.2. Experimental section:

2.2.1. Reagents:

DNA sequences were obtained by Eurogentec company (Eurogentec, Liege, Belgium). The DNA probe corresponding to the biosensor is a sequence of 25 bases. A chain of six carbons and an amino group are present at its 5' phosphate position: $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-5'TCA - ATC- GCT - GGA- TCA - ATC- ATG -TTA - G3'}$. The complementary DNA has a sequence of 25 bases: $5'\text{CTA -ACA - TTG -AGA -TTC -GCC - AGA- TTG - A3 '}$. A non- complementary sequence of DNA also has been used: $5'\text{CTA -ACA - TTG -AGA -TTC - TGA - CGA -GAT -GAT - CTT- C3 '}$ to study the selectivity of the biosensor.

The DNA probe for *M. tuberculosis* is strand from *rpob* gene contained 18 bases with the sequences $\text{NH}_2\text{-C12-5'CCG-ACT-GTT-GGC-GCT-GGG3'}$ and the DNA probe resistant for drug had the mutation TTG in position 531 of *rpob* gene (TCG/TTG). The DNA of *M. Tuberculosis* is obtained by amplification of a fragment of 411 bp length of the *rpob* gene and the mutated one.

Pyrrole, dendrimer polyamidoamines of second generation (PAMAM G2) and lithium perchlorate were purchased from Sigma-Aldrich. The pyrrole is distilled before use and modified ferrocene is synthesized following the procedure described previously [10].

2.2.2. Instrumentals:

The electrochemical measurements are based on a potentiostat biologic controlled with Eclab softwards. All electrochemistry measured was performed with a three-electrode cell with a reference Ag/AgCl electrode, a platinum stem as counter electrode and a working electrode of gold with area of 0.03 cm². The working electrodes are polished several times with different thickness disc (6, 3, 1 μ m) and diamond paste with respectively various thickness) and subsequently activated in a sulfuric acid solution of 0.5 M by cyclic voltammetry by sweeping the potential between 0 to 1.8 V at 100 mV/S for 15 cycles.

Electrochemical impedance measurements (EIS) were carried out in 10mM PBS buffer pH=7.4. All impedances were obtained at 0.10 V vs.Ag/AgCl at DC potential of 10mV in a frequency range from 100kHz to 0.1Hz.

Scanning Electron Microscopy (SEM) images were acquired using a ZEISS SUPRATM 55VP GEMINI®.

Fourier Transform infrared spectra (FT-IR) were measured using a Bruker IFS66 FT-IR spectrometer equipped with a MCT detector and an attenuated total reflectance (ATR) crystal of germanium.

X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) measurements were performed with a K Alpha spectrometer from Thermo-Fisher, using a monochromated X-ray Source (Al K α , 1486.6 eV). For all measurements a spot size of 400 μ m was employed. The hemispherical analyses was operated in CAE (Constant Analyser Energy) mode, with a pass energy of 200 eV and a step of 1 eV for the acquisition of surveys spectra, and a pass energy of 50 eV and a step of 0.1 eV for the acquisition of high resolution spectra. The spectra obtained were processed using the “Advantage” software provided by Thermo-Fisher. A Shirley-type background subtraction was used.

2.2.3. Electrodeposition of polypyrrole nanowire:

Films of nw-PPy were grown on the gold surface electrode by chronoamperometry method with applied potential of 0.84 V vs Ag/AgCl during 2 minutes in a solution containing 0.15M pyrrole, 1 mM LiClO₄ and 0.2 M K₂HPO₄ in 5 mL of distilled water following the published

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France



method [34]. During the electropolymerization, the working and counter electrode were separated in a small volume cell from the reference electrode. After electrodeposition, the electrode was rinsed several times with double distilled water.

2.2.4. Functionalization of PPy with PAMAM G2 Dendrimers and EDA:

The functionalization of nw-PPy by PAMAM was performed by CV in a solution of 1 μM of PAMAM and 0.5 M LiClO_4 by scanning the potential from 0 to 1.2 V at 50 mV/s for three cycles. This leads to a deposition of PAMAM on nw-PPy layer by covalent bonding and affords amine functions on the surface of PPy. The functionalization of nw-PPy with ethylene diamine was performed with the same method. The modified electrode with nw-PPy was placed in water solution containing 0.5 M LiClO_4 and 1M of EDA and the deposition was performed by scanning the potential from 0 to 0.7 V vs. Ag/AgCl during 10 cycles at scan rate of 50 mV.s^{-1} . During the reaction the working and counter electrodes were separated in small volume cell containing 200 μl of 1M solution ethylene diamine. Then electrode was washed with double distilled water.

2.2.5. Association of ferrocene and DNA Probe:

This step is carried out by immersing the modified electrode nw-PPy-PAMAM in a solution of acetonitrile containing 1 μM ferrocene modified by two ester functions $\text{Fc}(\text{NHP})_2$ during 1h at room temperature. The electrode was then rinsed several times with acetonitrile and double distilled water to remove not attached ferrocene. The electrode was then immersed for one hour in a solution of PBS containing 1 μM of DNA probe modified by amine group in 5' end position. The reaction was performed at room temperature for one hour. The electrode was then rinsed with double-distilled water and PBS buffer.

2.2.6. Hybridization with DNA target:

Hybridization between the DNA probe grafted on PPy layer and the target DNA in solution was performed by incubating the biosensor into a target DNA solution for 30 min at 47 ° C. Hybridization was carried out with different concentrations of target DNA: 1 aM, 10 aM, 100 aM, 1 fM, 10 fM, 100 fM. These concentrations were obtained by serial dilution of a stock solution. After incubation, the electrode was washed with double distilled water. Test of non-complementary targets was performed in the same condition to analyze the non-specific interactions on the biosensor.

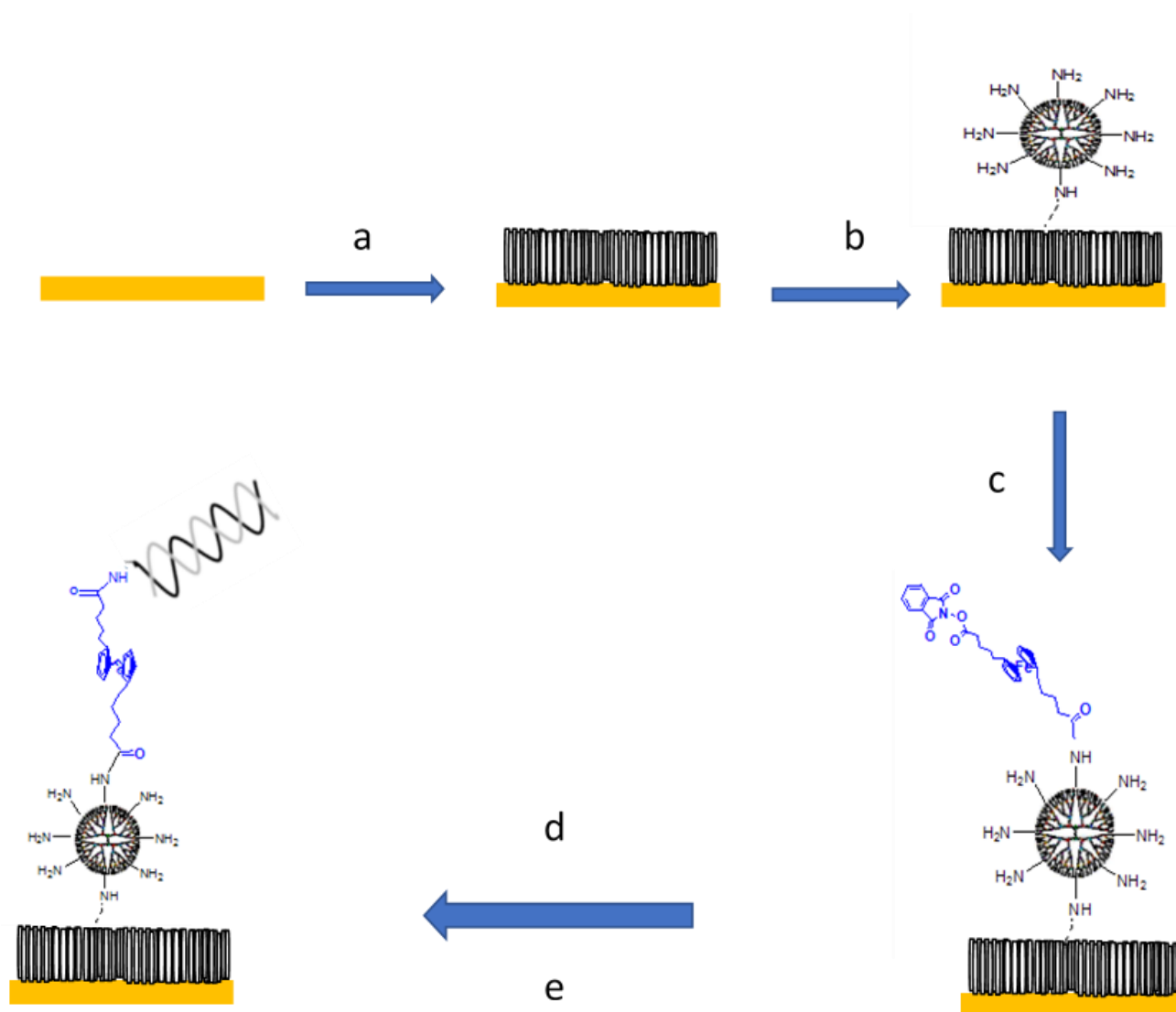


Figure 23 Representation of DNA sensor based on modified nwPPy: a) electro polymerization of PPy film; b) electrodeposition of PAMAM G2; c) covalent grafting of ferrocene; d) anchoring of ssDNA probe; e) detection of specific target.

2.3. Results and discussions

2.3.1. Synthesis of polypyrrole nanowires and characterization

2.3.1.1. SEM Characterization

SEM is used to analyze the surface morphologies of the fabricated PPy nanowires. The oriented nw-PPy were obtained in absence of template following described methods using weak base of H_2PO_4 and low concentration of LiClO_4 . The polymers were obtained by potentiometric methods after optimization of potential applied and time of polymerization. (Figure 24) represents modification of electrode surface with nw-PPy using different potentials of electrodeposition. The morphologies of nanowires such as length, shape, size could be controlled by the potential of polymerization and changing the electrolysis conditions. The resulting images are shown in (figure 24), in case of high applied potential of $E=0.88\text{V}$, the image show a not very well organization of the nanowires with thickness around 400 nm (Fig 24, image a), with decreasing the potential applied during the polymerization to $E=0.86$ and $E=0.84$ the thickness of nanowires decrease with better organization on the surface (Fig 24, images b et c). This proves the relationship between the potential applied for the polymerization and the structure of NWs where the of the potential value has a large effect on the long of nanowires. The optimized condition retained is, applied potential of 0.84V during 120s. The wide of nanofibers presents around 100 nm.

The mechanism of the formation of nw-PPy film without using a template has challenged for a long time. The formation of nanowires has been explained by two hypotheses: i) the first claims that hydrogen interaction of amine of pyrrole and hydrogenophosphate ions $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ used as electrolyte is formed during nucleation process where the chemical environment favors hydrogen bonding. The oligomers of pyrrole formed during the first step is them self-align and form a well-ordered bundle structure on the surface where the growth of the PPy leads aligned polypyrrole nanotube on gold surface [34] . Another explanation was also provided by Debienne-Chouvry et coll. In this mechanism, they suppose that the electrochemical oxidation in these conditions could favor

the formation of self-assembled gas bubbles on the working electrode which could act as the chemical template for the growth of nws-PPy [35].

2.3.1.1. Electrochemical characterization

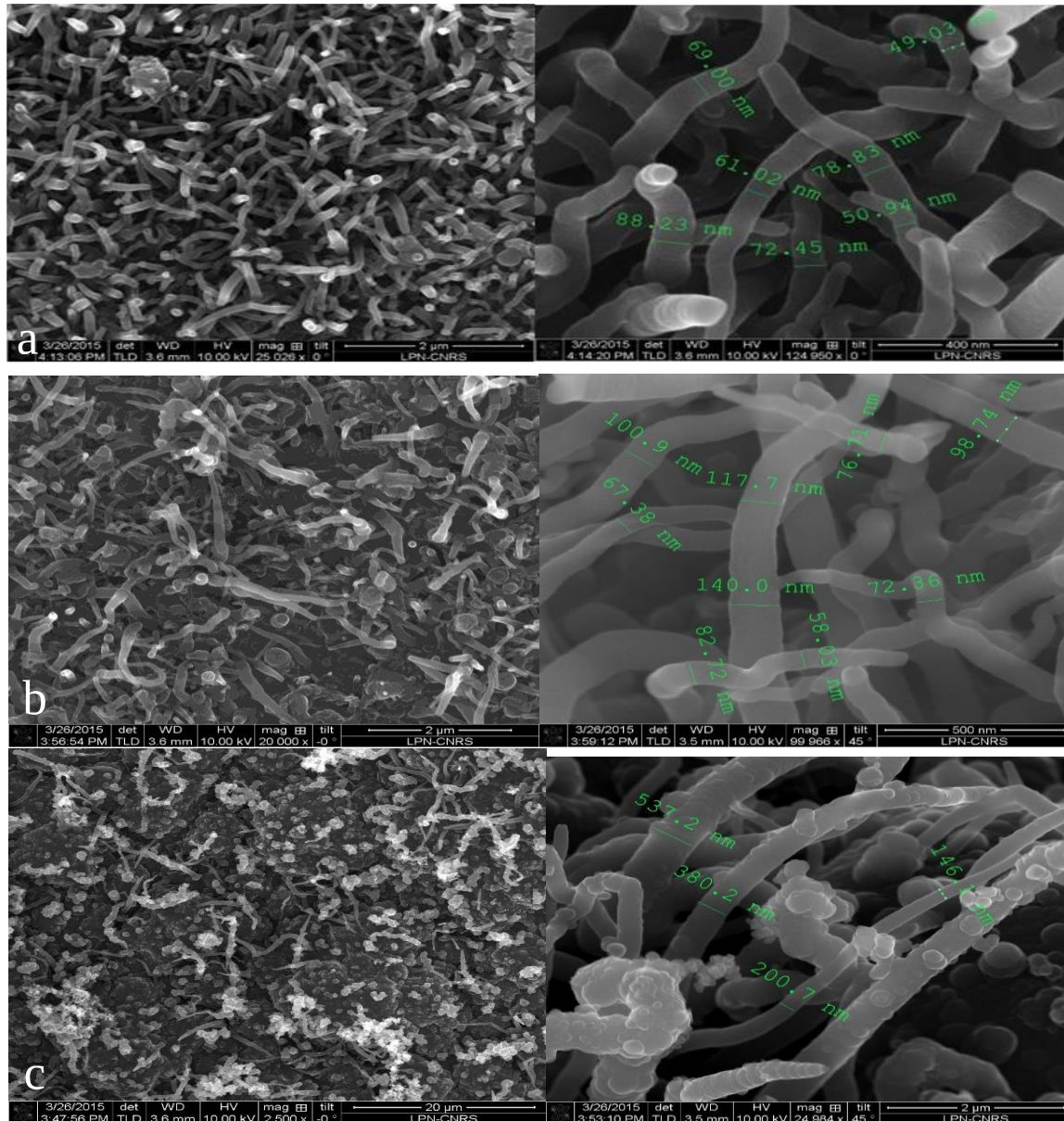


Figure 24 SEM images of gold surface covered by PPy with different scale with applied potential a) $E=0.84V$; b) $E=0.88V$; c) $E=0.80V$.

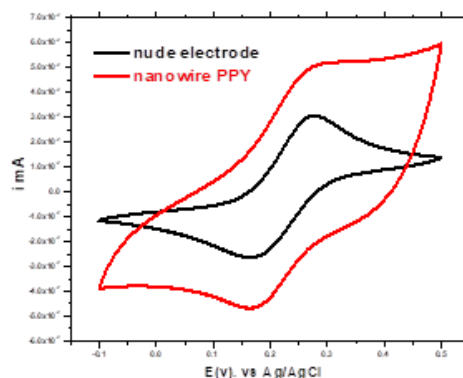


Figure 25 Cyclic Voltammetry of the gold electrode modified with nw-PPy in $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ before and after polymerization.

The electrical properties of the nw-PPy were analyzed through the electron transfer ability of redox process of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ system. CVs (figure 25) show the response obtained with non-modified gold electrode and after the polypyrrole nanowires deposition. The CV show high redox current obtained when gold is coated with PPy nanowires. To confirm the conductivity of nw-PPy, EIS measurement were realized.

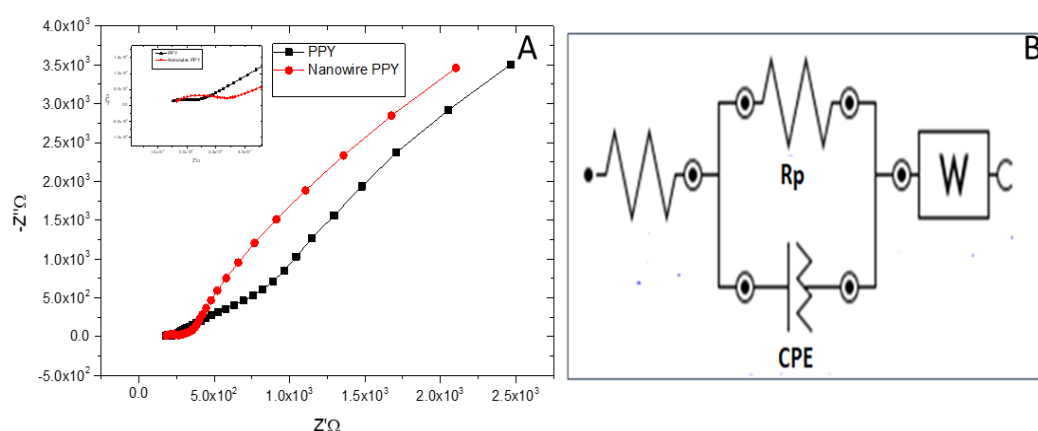


Figure 26 A) Nyquist plots obtained after modifications of gold electrode with PPY and nw-PPY the measurements were obtained in PBS buffer, in frequency range from 0.1Hz to 100 kHz at 0.10 V vs. Ag/AgCl by applying DC potential of 10 mV. The symbols are the experimental data, and the solid lines are the fitted curves using the equivalent circuit showed in (B).

Nw-PPy film has been studied using electrochemical impedance spectroscopy (EIS) to analyses the electrical and electron transport properties of such layer. The analysis has been performed in

label-free solution PBS buffer (figure 26A). EIS data were fitted according to the equivalent circuit model shown in (figure 26B). Due to inhomogeneity of such layer the capacitances were replaced by constant phase element CPE. CPE behavior is obtained when the distribution of time constant is not linear on the entire surface. The impedance of CPE could be written as $Z_{CPE} = \frac{1}{Q(j\omega)^n}$, where Q and n are independent of the frequency, ω is the radial frequency and n is a dimensional parameter with is related to the inhomogeneity of the layer and the value are $0 < n < 1$. The analytical treatment of impedance data allows the demonstration the presence of CPE behavior with n value obtained is 0.8. CPE instead of capacitance is obtained as the PPy formed by nanowires are not homogeneous and the distribution of charge is not the same in all the thickness of the nanostructure. As the measurement was performed in label-free solution, without redox probe the measured charge transfer is corresponding to the electrical properties of PPy layer and its conductivity. Nyquist plot of PPy compact film and nw-PPy showed a characteristic for conducting surface of the deposits materials which provides the almost same R_{ct} value. In case of nw-PPy, R_{ct} value increase compared to R_{ct} value of PPy compact, demonstrating that nw-PPy film is not more conducting than PPy compact. More studies for surface area were realized after grafting of ferrocene groups as redox markers.

Table 1 Summary of estimated EIS parameters obtained in PBS buffer for PPy and nw-PPy.

molecule	$R_s (\Omega)$	$R_{ct} (\Omega)$	CPE(μF)	W(μF)	χ	n
nw-PPy	196.4±0.82	160±0.18	1.23±0.009	227.09±1.6	0.003	0.8
PPy compact	222.3±0.90	120±0.4	1.105±0.01	236.38±2.1	0.015	0.8

2.3.1. Functionalization of PPy nanowires by electrochemical patterning and Characterization

2.3.1.1. Association of PAMAM G2 Dendrimer

In order to functionalize PPy with functional groups bearing amine in terminal position, electrochemical patterning through electrochemical oxidation of molecules containing amine groups could be performed [36]. EDA could be attached to PPy surface through amine electro-oxidation and formation a film layer where the other amine groups could serve for further

functionalization. To increase the number of functional groups dendrimers PAMAM of various generation could be attached with same way as demonstrated previously in the case of compacts film of PPy [36]. The surface of nw-PPy film was modified with dendrimers PAMAM of second generation (PAMAM G2). The modification was performed by scanning the potential between 0 and 1.2 V during 3 cycles until saturation of the surface. During oxidation, amine groups of dendrimers form radical cations $\text{-NH}^{+\bullet}$ which interact with carbon of PPy leading to covalent grafting. This method of covalent grafting by electro-oxidation of amines was developed for various amines and diamines [37][38] and we used this method because electrooxidation is a fast method for obtaining a surface modified with groups bearing amine in terminal position such as dendrimers.

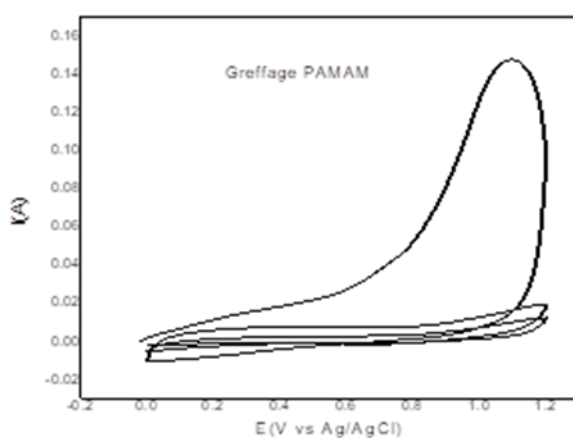


Figure 27 Electro-oxidation of PAMAM dendrimers by CV method in H_2O containing 0.5 M LiClO_4 .

2.3.1.2. EIS characterization :

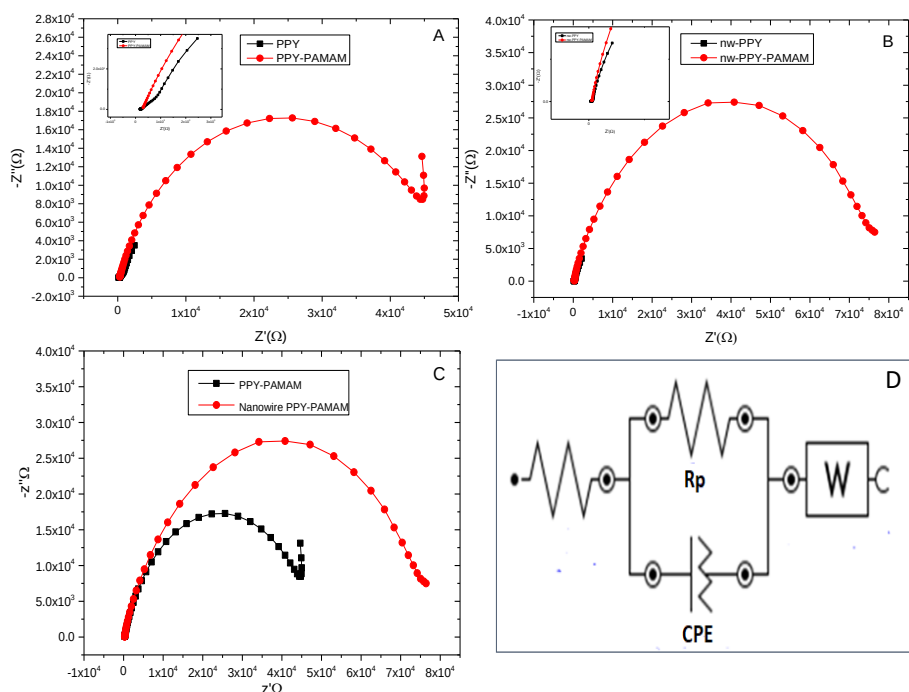


Figure 28 Nyquist plots obtained after modifications of gold electrode with PPy(A) or nw-PPy(B) and after covalent attachment of dendrimers PAMAM G2 to such layers. The measurements were obtained in PBS buffer, in frequency range from 0.1Hz to 100 kHz at 0.10 V vs. Ag/AgCl by applying DC potential of 10 mV. (C) Comparison between PPy-PAMAM-FC and nw-PPy-PAMAM-FC. The symbols are the experimental data, and the solid lines are the fitted curves using the equivalent circuit showed in (D).

EIS measurements allowed the characterization of electrical properties of the surface modified with PPy-PAMAM and nw-PPy-PAMAM composites (Figure 28 A and B). Broadening of the Nyquist plots was obtained after PAMAM immobilization for both layers. The EIS data were successfully fitted by a Randles equivalent circuit model, (Figure 28 D). The analytical treatment of impedance data allowed demonstrating the existence of CPE elements. This could be obtained by plotting $\log Z'$ versus $\log f$ and the value of n determines the CPE behavior.

For two composites PPy and nw-PPy, an important increase in resistance was observed after PAMAM immobilization. This was due to the saturation of the surface with high-surface molecules such as PAMAM which has generally positive charge causing blocking effect. This can suggest that dendrimers were covalently bonded to PPy which lead to increase of surface density of the materials. However, layer composed of nw-PPy shows a more significative increase of charge transfer resistance compared to layer of PPy compact. The number of PAMAM grafted to the surface are much bigger

in case of nw-PPy, blocking effect is large, that's maybe due the high specific surface of nw-PPy who allow to grafted more PAMAM dendrimers than 2-D PPy compact surface.

Table 2 Summary of estimated EIS parameters obtained in PBS buffer.

	$R_s (\Omega)$	$R_{ct} (k\Omega)$	CPE(μF)	W (μF)	χ	n
PPY-PAMAM	198.48±5.2	41.19±0.1	2.18±0.1	191.5±8.5	0.0015	0.9
nw-PPY-PAMAM	172.4±0.82	72.70±0.17	1.50±0.009	81.09±1.3	0.001	0.8

2.3.2. Electrodeposition of ethylene diamine

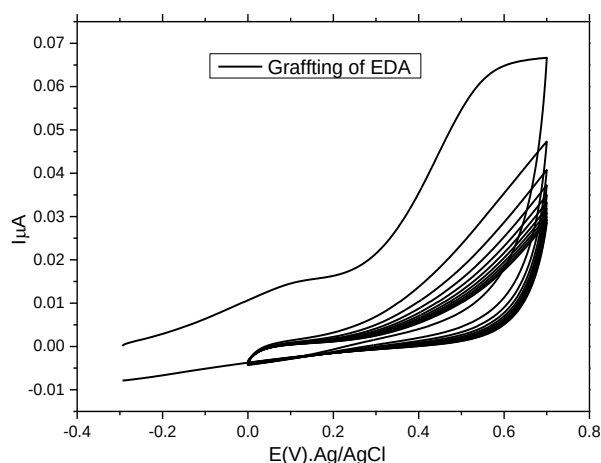


Figure 29 Cyclic voltammogram of 1M ethylene diamine at electrode modified with nw-PPy in H_2O containing 0.5 M $LiClO_4$, scan rate 50 mV.s^{-1} .

Covalent bonding of ethylene diamine on the modified electrode with nw-PPy was performed in H_2O containing 0.5 M $LiClO_4$ and 1M of EDA by scanning the potential from 0 to 0.7 V vs. Ag/AgCl during 10 cycles rate 50 mV.s^{-1} (Figure 29), the EIS measurements were realized.

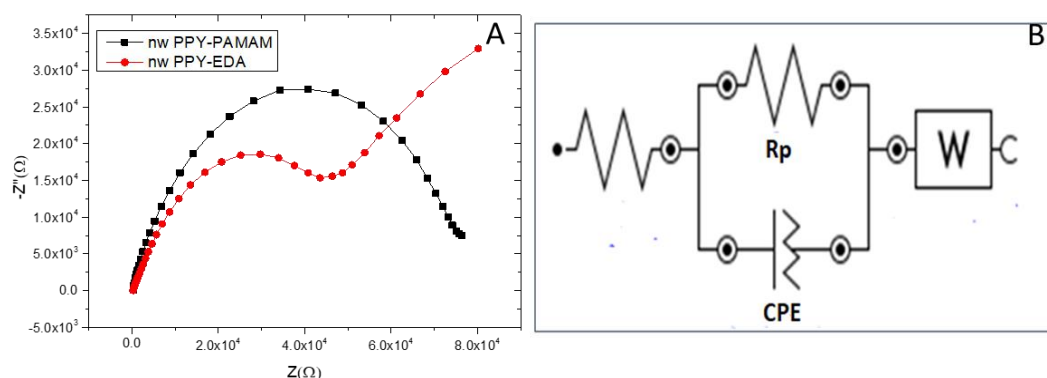


Figure 30 (A) Nyquist plots obtained after modifications of gold electrode with nw-PPy-EDA and nw-PPy-PAMAM. The measurements were obtained in PBS buffer, in frequency range from 0.1 Hz to 100 kHz at 0.10 V vs. Ag/AgCl by applying DC potential of 10 mV. The symbols are the experimental data, and the solid lines are the fitted curves using the equivalent circuit showed in (B).

EIS measurements represent the characterization of electrical properties of the surface modified with nw-PPy-PAMAM and nw-PPy-EDA composites. The Nyquist plots show that in case of nw-PPy-EDA the charge transfer resistance is smaller than the resistance in case of nw-PPy-PAMAM, that's due to the big volume of dendrimer PAMAM G2 who cause a blocking effect for charge transfer. Another EIS analysis were performed after grafting of ferrocene to see the effect of grafted EDA or PAMAM in surface of nw-PPy and to get information about number of molecule of ferrocene grafted in two case which will show in next section.

Table 3 Summary of estimated EIS parameters obtained in PBS buffer

molecule	R_s (Ω)	R_{ct} ($k\Omega$)	CPE (μF)	W (μF)	χ	n_1
nw-PPY-PAMAM	172.4 $\pm$ 0.82	72.70 $\pm$ 0.17	1.50 $\pm$ 0.009	81.09 $\pm$ 1.3	0.001	0.9
nw-PPY-EDA	201.3 $\pm$ 1.0	40.80 $\pm$ 0.1	2.12 $\pm$ 0.01	182.38 $\pm$ 2.2	0.0025	0.8

2.3.3. FT-IR and XPS analyses

2.3.3.1. FT-IR characterization

FT-IR spectroscopy has been performed to analyze the structural properties of nw-PPy before and after electrochemical deposition of amines. We show here the spectra of PPy substituted with PAMAM are the one that gives significant information (Figure 31). The fundamental bands of PPy related to the asymmetric ($C=C$) and symmetric ($C=N$) ring stretching vibration of pyrrole ring are observed at ~ 1545 and 1305 cm^{-1} . The bands at 1175 and 903 cm^{-1} are characteristic of doped PPy chains[39]. Covalent attachment of dendrimers PAMAM leads to new bands in FT-IR spectra a new band at 1709 attributed to the amide bond $C=O$ of PAMAM.

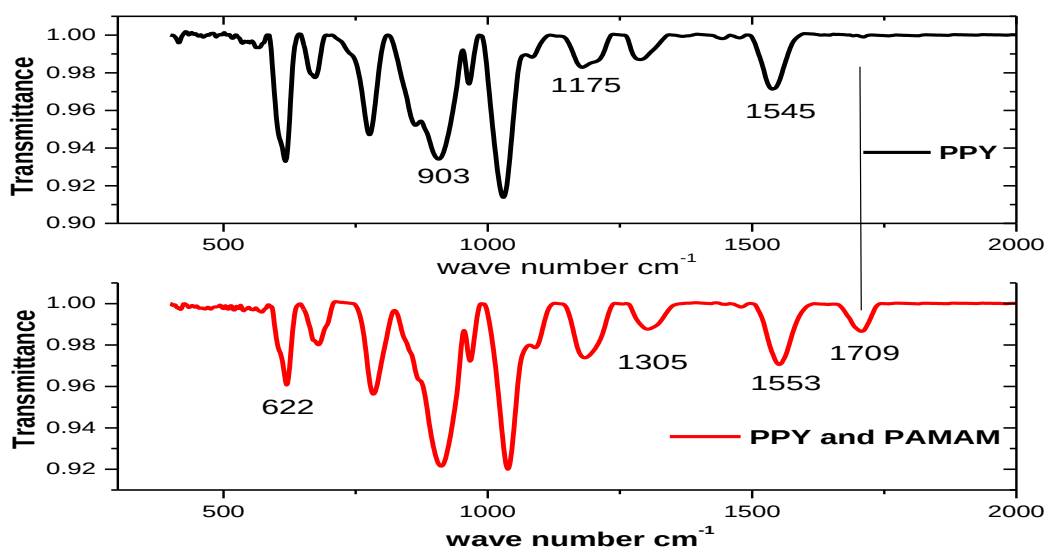


Figure 31: FT-IR analysis of PPy layer before and after modification with PAMAM G2 dendrimers.

2.3.3.2. XPS characterization

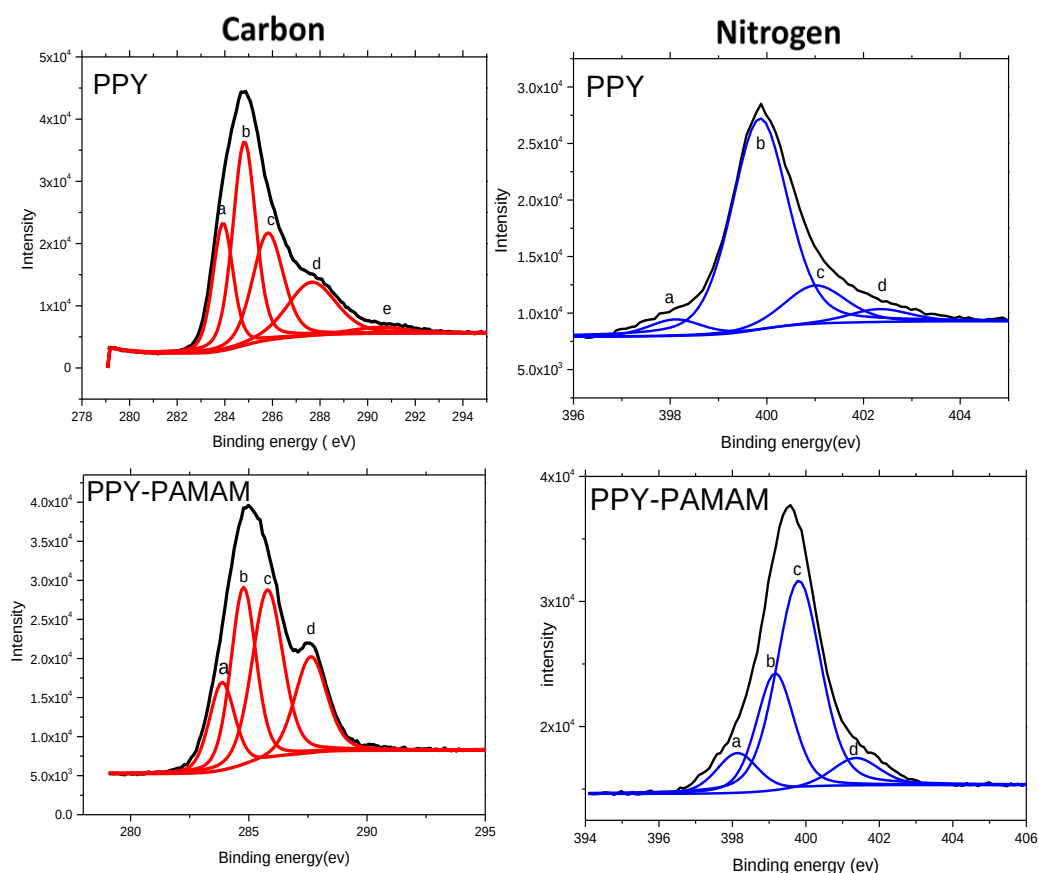


Figure 32 XPS spectra of PPy layer in carbon and nitrogen region before and after electro-oxidation of PAMAM G2 dendrimers.

XPS spectra also demonstrate the modifications of the nw-PPy surface with PAMAM G2. The (Figure 32) shows the results of XPS analysis in carbon and nitrogen regions for nw-PPy and nw-PPy-PAMAM layers. The XPS spectrum in carbon region of nw-PPy film shows five bands after deconvolution and peaks separations with maximum at 283.92, 284.82, 285.81, 287.65 and 290.94. The two peaks at lowest energy correspond to α and β carbon atoms, as already demonstrated in the case of PPY [38,39]. The peak (c) observed at 285.81 eV corresponds to imine C=N or C-N⁺ structures and that at the pic at 287.65 eV is associated to C=N⁺ band [40]. The peak (e) at 290.94 eV is much weaker and could be attributed to π - π^* satellite commonly found in aromatic. The spectrum obtained after PAMAM G2 electrodeposition on PPy layer shows a significantly increase of the peaks ratio at 285.79 eV and 287.62 eV corresponding respectively to C-N and C=O bonds of PAMAM G2 structures[41].

In specific nitrogen region PPy layer was characterized with component of the peaks maximum at 401 eV which could be attributed respectively to N-H bonds and to the positively charged nitrogen (-NH^+ or =NH^+ (polaron/bipolaron))[42]. Small contribution at 398.1 eV could be associated to aromatic amines structure. After modification of the surface with PAMAM G2, significant modifications of PPy-PAMAM spectrum were observed as shown in (figure 32). The nitrogen peaks show two maximums at 399.80 and 401.36 eV which could be attributed to amine and amide bonds respectively. The relative intensity at 399.80 eV is much higher than for PPy before modification and could correspond to C-N and N-H bonds of PAMAM G2 linked to the surface. The component at binding energy region of 401-403 eV corresponds usually to positively charged nitrogen, and the energy band obtained at 399.16 eV could be attributed to amines of PAMAM G2. These results confirm the association of PAMAM G2 dendrimers through covalent attachment to polymer. To confirm that the attachment of PAMAM G2 form carbon-nitrogen reaction on the polypyrrole ring and not nitrogen-nitrogen on the amine of polypyrrole, the electrodeposition of PAMAM was realized also on PPy nanowires modified in nitrogen by methylene group.

	Carbon				Nitrogen			
	Nr	bond	eV	FWHM	Nr	bond	eV	FWHM
PPy	(a)	C-C α	283.92	1.00				
	(b)	C-C	284.82	1.13	(a)	aromatic	398.1	1.30
	(c)	C-N	285.81	1.52	(b)	N-C, N-H	399.85	1.37
	(d)	oxide	287.65	2.4	(c)	polaron/bipolaron	401.0	1.5
	(e)	π	290.94	2.02	(d)	N1s N $^{\pm}$	402.33	1.5
PPy-PAMAM	(a)	C-C α	283.87	1.27	(a)	N1S-C-NH $_2$	399.16	1.2
	(b)	C-C	284.77	1.26	(b)	N-C, N-H	399.80	1.42
	(c)	C-N	285.79	1.54	(c)	Amide	401.36	1.2
	(d)	C=O,C=N	287.62	1.6	(d)	N1s-N $^+$	398.13	1.32

Table 4 Summary of XPS results for PPy and PPy modified with PAMAM G2 dendrimer.

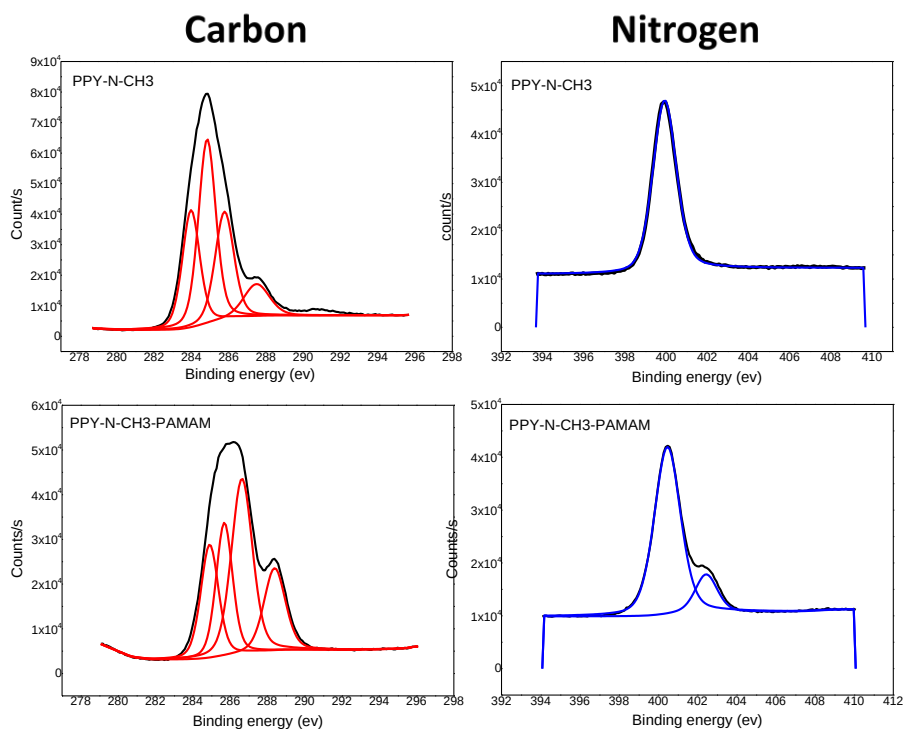


Figure 33_XPS spectra of PPy-N-CH₃ layer in carbon and nitrogen region before and after electro-oxidation of PAMAM G2 dendrimer

XPS analysis was then used for further investigation on PPy-N-CH₃ and PPY-CH₃-PAMAM (figure 33). The deconvolution of N_{1s} in the case of PPy-N-CH₃ gave one peak at 400.5 eV and it is related to that carbon-nitrogen bond. After grafting of PAMAM in PPY-CH₃-PAMAM the nitrogen region shows after deconvolution a peak related to carbon-nitrogen and a new peak at 402.4 eV which could be attributed to nitrogen positively charged in PAMAM. Thus, it proves that the PAMAM is well grafted on the surface of PPy-N-CH₃ and this link is surely between the nitrogen of PAMAM and carbon β of pyrrole.

	Carbon				Nitrogen			
	Nr	bond	eV	FWHM	Nr	Bond	eV	FWHM
Ppy-N-CH ₃	(a)	C-C α	283.98	1.1	a) N1s N-C 399.93 1.35			
	(b)	C-C beta	284.84	1.1				
	(c)	C-N	285.78	1.19				
	(d)	oxide	287.5	1.63				
Ppy-N-CH ₃ -PAMAM	(a)	C-C α	284.91	1.12	(a)	N1sN-C=O	400.47	1.57
	(b)	C-C beta	285.77	1.04			402.45	
	(c)	C-N	286.64	1.33		N1sN+		1.32
	(d)	C=O,C=N	288.39	1.36				

Table 5 Summary of XPS results for PPy-N-CH₃ and PPy-N-CH₃ modified with PAMAM G4 dendrimer.

2.3.4. Association of ferrocene to PPy- nanowires and characterization of the electrode surface

2.3.4.1. CV and SWV after ferrocene attachment

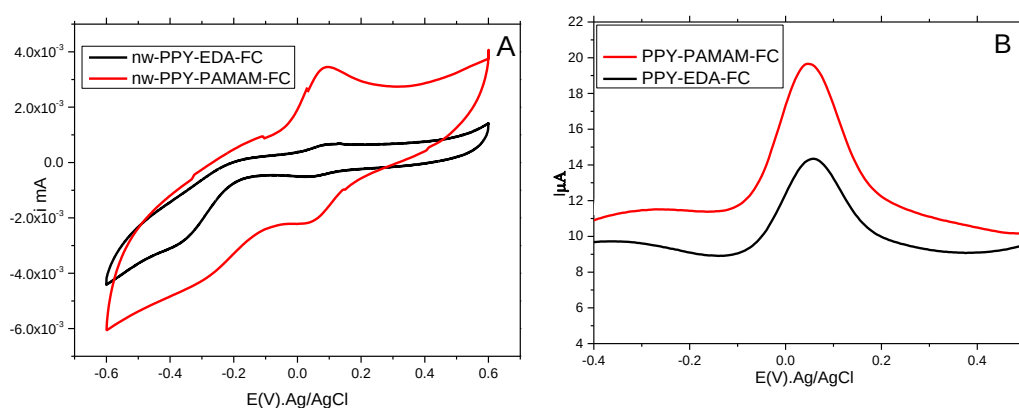


Figure 34(A) Cyclic voltammogram of electrochemical signal of ferrocenyl group (Fc) linked to nw-PPy modified with dendrimers PAMAM and EDA. (B) SWV of electrochemical signal of ferrocenyl group (Fc) linked to nw PPY modified with dendrimers PAMAM and EDA.

Association of ferrocenes redox marker to the nw-PPy-PAMAM and PPy-EDA nanowires was realized to enhance the kinetic of charge transfer within the PPy layer and to study the electron transfer ability as well as the increase of surface/volume ratio that could serve for further functionalization. Ferrocene bearing two activated esters acts also as a linker: one of these groups was attached to amines of PAMAM G2 present on the nw-PPy-PAMAM surface forming nw-PPy-PAMAM-Fc; the second ester will serve to covalently bond the ssDNA probe for biosensor construction, according to the procedure described in Materials and Method section. Covalent attachment of ferrocene groups to nw-PPy-EDA and nw-PPy-PAMAM G2 has been analyzed by CV and square wave voltammetry (SWV). (Figure 34 A) shows characteristic reversible redox signal of ferrocene obtained after their attachment on nw-PPy-PAMAM nanowire, with oxidation peak at 0.09 V (vs. Ag/AgCl) and reduction peak is obtained at 0.05. The variation of anodic and cathodic peak potential gives a value of 0.04 mv which demonstrated non-ideality of reversible redox system. The formal potential measured in SWV is $E_{ox} = 0.05V$ vs. Ag/AgCl which is lower than compared ferrocene attached to other surface and nanomaterials and also the value in solution. The shift toward lower potentials of ferrocene compared to other materials may also explained by the polar layer of nanowires PPy which is known to be high hydrophilic structures.

We can see clearly that PAMAM dendrimers allow increase in the number of amine groups on the surface of nw-PPY and thus binds large numbers of redox markers. In order to demonstrate the advantage of nw-PPy-PAMAM, we compared the redox properties of this system with that of the PPy nanowires modified by ethylene diamine (EDA). SWVs (Fig 34, B) show well-defined peaks of oxidation of ferrocene where the current is much higher when the nw-PPy modified with PAMAM than that modified with EDA. The full-widths at half-maximum (fwhm) of the oxidation peaks could give information about the homogeneity and the distribution of redox molecules on the surface.

The theoretical value of full-widths at half-maximum (fwhm) of redox reversible redox center immobilized on the surface is expected at 91mV at 25°C[43]. In the case of ferrocene immobilized as monolayers on the surface the (fwhm) has calculated 114mV [44]. Analysis of electrochemical characteristic of ferrocene attached to nw-PPy through EDA or PAMAM demonstrate that full width at half-maximum (fwhm) is 146 mV in both case which is higher that the ideally a one-electron transfer and higher of monolayer of ferrocene. The increased of full width at half-maximum (fwhm) could be related to chemical inhomogeneity of the surface or the interaction between neighboring ferrocene. In the case that variation comes from interaction between ferrocene dilutions of

redox site by spacing their attachment leads to decrease of fwhm. In the case of nw-PPy, it appears that the same value is obtained with dense polymers formed with EDA and dispersed ferrocene deposit through PAMAM G2. These underlines prove that the higher value of full width at half-maximum is related to the inhomogeneity of the surface of nw-PPy. Similar report has been demonstrated in the case of ferrocene anchored on nanofiber of carbon where large value has been attributed to the presence of different local environments of the redox couple [45].

The charge exchanged during redox process allows calculation of the surface coverage of ferrocene groups, bonded to the modified nw-PPy, following the equation:

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA}$$

where Q is the charge under the cathodic or anodic waves, n is number of electrons involved in the redox process, F is the Faraday constant, and A is the area of the electrode. Based on equation (1) we calculated the average coverage of the surface for both PPy nanowires modified with EDA and with PAMAM G2 which resumed in table 7.

2.3.4.2. EIS after ferrocene attachment

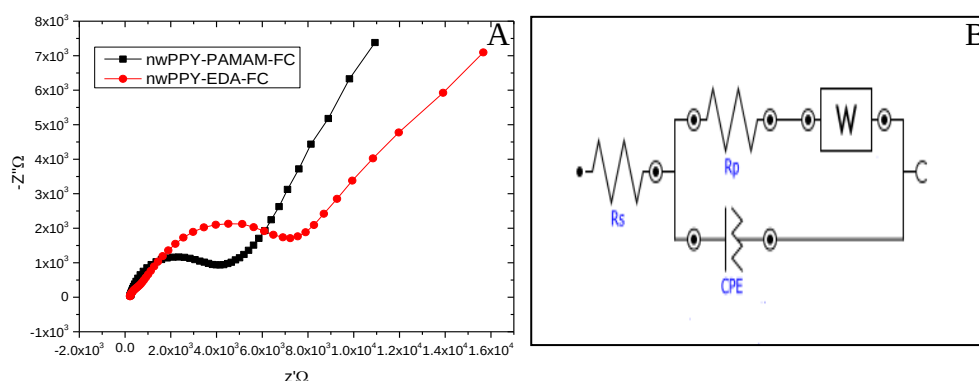


Figure 35 A) Nyquist plots obtained after covalent attachment of ferrocene to the nw-PPy-PAMAM and nw-PPY-EDA modified electrode. The measurements were obtained in PBS buffer, in frequency range from 0.1Hz to 100 kHz at 0.10 V vs. Ag/AgCl by applying DC potential of 10 mV. The symbols are the experimental data, and the solid are the fitted curves using the equivalent circuit in 9B.

EIS performed after covalent attachment of electroactive ferrocene to both of modified electrode with nw-PPy-PAMAM-FC and nw-PPy-EDA-FC shows a decrease in semi-circle of nyquist plot compared to nw-PPy-PAMAM or nw-PPy-EDA, the decrease of charge transfer resistance proved the bonding of the electroactive species to the modified electrode surface. EIS shows a more significant decrease of charge transfer resistance in case of nw-PPy-PAMAM-FC compared to nw-PPy-EDA-FC. This can suggest that the number of ferrocene grafted on the surface of modified electrode is higher in the case of PAMAM immobilization increasing the charge transfer ability

Table 6 Summary of estimated EIS parameters obtained in PBS buffer.

surface	$R_s (\Omega)$	$R_{ct} (k\Omega)$	$CPE_1 (\mu F)$	$W (\mu F)$	χ	n_1	n_2
nw-PPy-EDA-Fc	198.3±1.5	8.71±0.06	2.61±0.03	205.7±3.0	0.008	0.9	0.6
nw-PPy-PAMAM-Fc	197.8±3.1	5.31±0.4	2.86±0.03	212±4.8	0.022	0.8	0.6

2.3.5. Kinetic characterizations of attached ferrocene on PPy nanowire

To understand how the structure of polypyrrole, impact the electron transfer process, we calculated the electron-transfer rate constants from the peak-to-peak separation of CVs using the method of Laviron [46], who used numerical integration of the rate equations to correlate the standard electron-transfer rate constant k_s with the separation between anodic peaks ΔE_p at different scan rates. The rate of heterogeneous electron transfer (k_s) was then determined following the equation with a dimensionless rate constant:

$$k_s = m \left(\frac{F}{RT} \right) n v$$

Where R is universal gas constant, T temperature, n (number of electrons exchanged), and F Farady's constant. As the peak to peak variation at high scan rate is below 200mV could be calculating

from the fit of m^{-1} versus ΔE_p . The rate constant is insensitive to the coefficient of charge transfer α .

The k_s for ferrocene attached on nanowires PPy-PAMAM-Fc was measured and compared to PPy-PAMAM-Fc layer obtained by binding of PAMAM to PPy compact film with the same approach [36]. An increase of k_s value from $(1.67 \pm 0.01) \text{ s}^{-1}$ to $(7.44 \pm 0.03) \text{ s}^{-1}$ was obtained in the case of nanowires PPy-PAMAM-Fc from compact layer to nanowires layer.

A second important variable in monolayer-tethered redox unites is the influence of the chain length of the organic monolayers. To test how the molecular length affects the electron-transfer process, we have also obtained CV data using similar system by using ethylene diamine (EDA) which is a small molecule compared to PAMAM and we calculated the k_s value for this system. The data show that there is significant change in the electron transfer rate constant as the length of the carbon chain is varied from PAMAM to EDA with increasing of k_s value from (7.44 ± 0.03) to (18.77 ± 0.06) . In the same way improvement of k_s is obtained with nanowires PPy modified with linear chain (18 s^{-1}) compared to compact polypyrrole where the value obtained (5 s^{-1}). This improvement of the k_s could be related to the large surface area in case of nanowires PPy and homogeneous distribution of ferrocene on the surface and the chemical properties of the polymer which improve the electron hopping process of ferrocene.

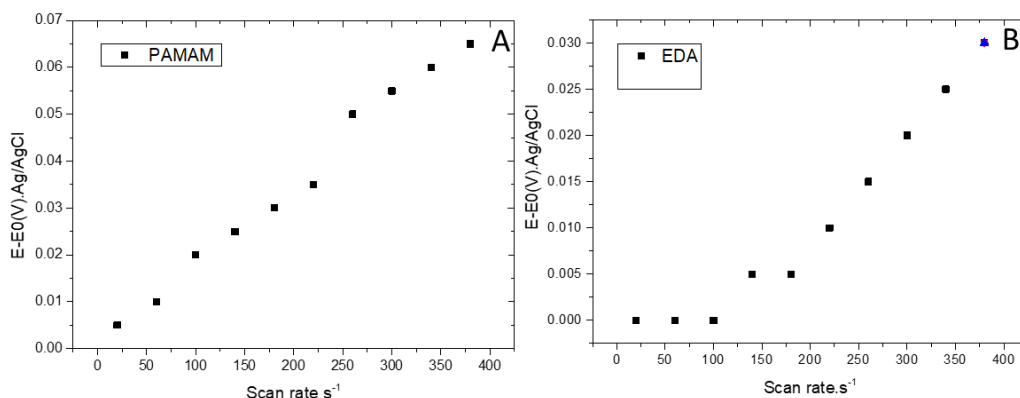


Figure 36_A). The variation the variation of anodic potentials ($E_{pc,a} - E_0$) vs. scan rate for PPy-PAMAM-Fc, B) the variation of anodic potentials ($E_{pc,a} - E_0$) vs. scan rate for PPy-EDA-Fc.

Table 7_ Comparison of parameters of PPy-PAMAM-FC with different structure of transducer.

	Eox (SWV)	$\Gamma(\text{mole.cm}^{-2})$	Ks (s-1)	LOD	References
Nanowires PPy-EDA- FC	0.054	$49.10^{-9} \pm 1.15$	18,7	X	This work
Nanowires PPy- PAMAM- FC	0.05	$64 .10^{-9} \pm 1.02$	7.4	0.36 aM	This work
PPy- PAMAM- FC	0.135	$18.87.10^{-9} \pm 1.14$	1.6	0.4 fM	[47]
PPy- CONH- PAMAM- FC	0.11	$3.0.10^{-9} \pm 0.04$	5.8	0.8 pM	[48]
PPy-CNT- PAMAM- Fc	0.256	$32 10^{-9} \pm 2$	1.90	0.3 fM	[49]

The value of oxidation peak potential of ferrocene in case of nw-PPy-PAMAM is lower than other transducers used and presented in the table. This decreases of value of potential of signal redox can be related to polarity environment because it was demonstrated that the dependence of the redox potentials depend of polar solvent [50], and as known that surface of nw-polypyrrole is super-hydrophilic. This allows to create hydrogen bonds with water and create a polar environment who lead to this shift of potential redox of ferrocene to the lower value.

The average coverage of the surface Γ of ferrocene groups was much higher for nw-PPy compared to other transducers. The increases of surface coverage prove that a large number of PAMAM G2

was grafted and introduces a significant number of available amine groups on the surface which allowed attachment of large quantities of ferrocene and then ssDNA probes.

2.3.6. Properties of biosensors towards DNA detection

The hybridization reaction between ssDNA probe and DNAC target in the concentration range 1aM -100 fM, was analyzed on the changes of current corresponding to redox signal of ferrocene, obtained after incubation of biosensor with each DNAC concentration and monitored using SWV analysis. The redox current of $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ decrease with increasing of DNA target concentrations, this decrease of current is proportional to increasing of DNAC is related to the low electron transfer happened because of attachment of DNAC and the formation of double strand DNA on the surface. The calibration curve was plotted by presenting the average variation versus the logarithmic scale of the concentration. We can see that two regions are observed the first from 1aM to 1fM and other region in larger concentration. The calculated detection limit based on signal-to-noise ratio of 3 and the measuring the standard deviation of the lower concentration measured gives a detection limit of 0.36 aM. The reproducibility was tested by measuring the response with 3 fresh biosensors and standard deviation of 10% is observed. This could be improved by controlling the surface properties of the gold and the geometry of the cell as small variation of the geometry could affect the sensors response. This value is lower than the various biosensors demonstrated in the case of DNA biosensors based on PPy (see table 7) and demonstrate the potential of nanowires polypyrrole formed by electrodeposition as platform for DNA detection.

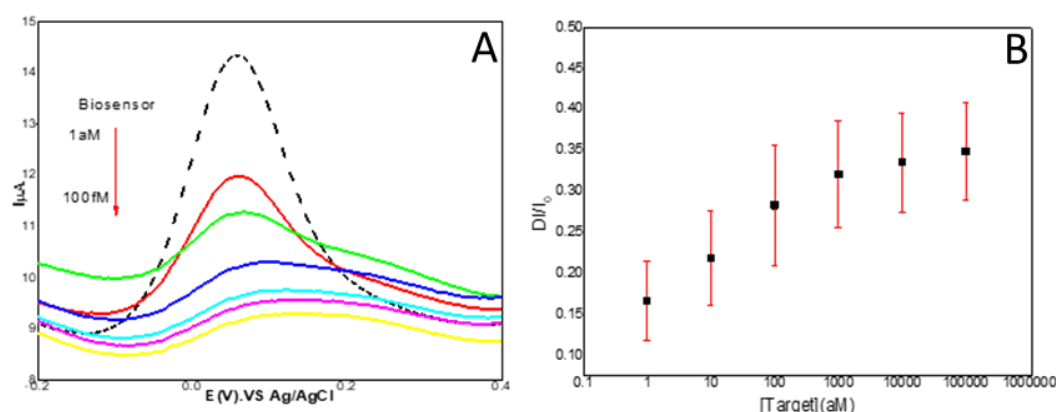


Figure 37 A) SWV of biosensor after incubation of various DNA concentrations (1aM–100 fM) recorded in PBS solution. B) The plot of the relative changes of the current peak vs. concentration of DNA target for the biosensor. $\Delta I = (I_0 - I)$, where I_0 is the peak current and I after incubation of the sensor with certain concentration of target.

The non-specific interactions were studied by incubation of the biosensor with non-complementary DNA_{NC} target of 18 bases. (Figure 38) show the SWV analysis before incubation of electrode in DNA solutions and after incubation in 1 μ M solution of DNA_{NC} target and 1 fM of DNA_C target. There was no decrease of the current corresponding to ferrocene after reaction with DNA_{NC} target, which demonstrates any non-specific interactions, while the incubation with DNA_C target in the lower concentration showed a large variation.

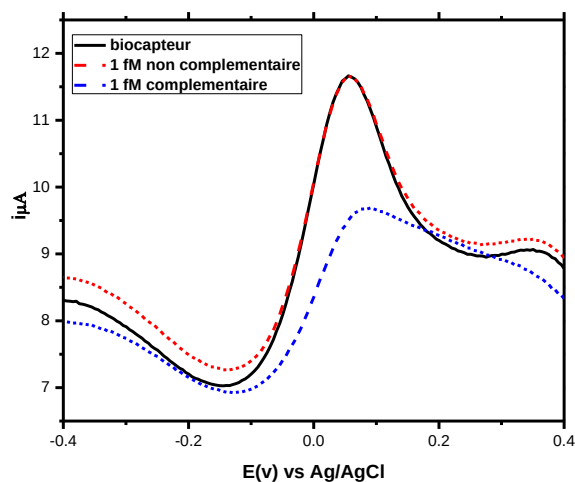


Figure 38_SWV present the results obtained for non-specific interactions compared to specific one.

Black curves show voltammogram of biosensor after formation, red curves show response of biosensor after incubation in solution of 1fM DNA NC target, and blue curves show response of biosensor after incubation in 1fM of DNAC target.

2.3.7. Detection in real sample of M. Tuberculosis and resistant strand

The biosensor was used also for detection of DNA pathogen agent of M. tuberculosis, and was applied to discriminate the single nucleotide polymorphism (SNP) (TCG/TTG) which gives the resistance of M.tuberculosis to rifampicin drug.

The PCR sample were composed of 411 bases of DNA fragment from rpoB gene and called c PCR, and other fragment of DNA with mutation was used and called nc PCR, the specific DNA probe from c PCR products was composed of 18 bases modified with amine group, the hybridization reaction

with complementary and non-complementary sequence was followed by SWV of redox signal of ferrocene.

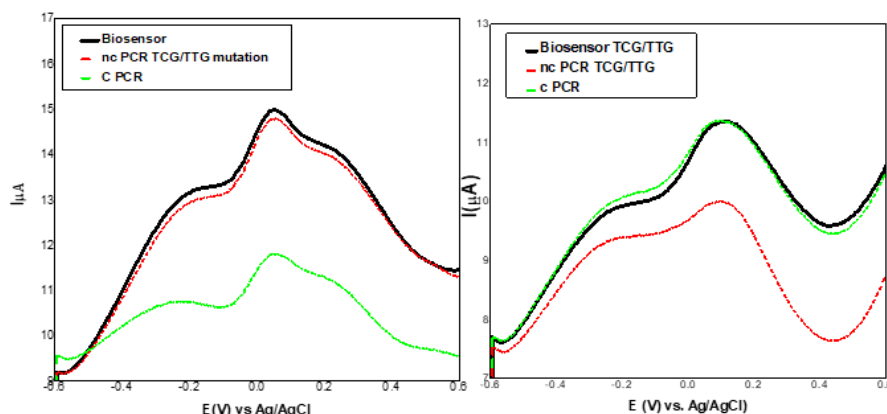


Figure 39 A) SWV show detection of PCR samples of 411 bases with (c PCR) and without (nc PCR) complementary sequence by using a normal biosensor, B) SWV show detection of PCR samples of 411 bases with (c PCR) and without (nc PCR) complementary sequence by using a mutated DNA biosensor.

The hybridization reaction with biosensor bearing DNA probe with sequence specific to white type stand or mutated strand (TCG/TTG) where incubated with PCR sample bearing WT strand and the sample with mutated DNA strand presenting as SNP. The incubation the biosensor bearing WT probe with the PCR sample with the SNP mutation shows small variation in the response of biosensor (Figure 39A, red curve). However, when the biosensors hybridize with specific DNA target WT large variation is obtained (Figure 39A, green curve). The same results were obtained when we used biosensor bearing DNA probe with the mutated TCG/TTG, large variation is obtained with mutated DNA PCR sample and very small variation in the case of WT sample (Figure 39B). These results demonstrate that biosensors based on nw-PPY was able to measure real sample extracted from mycobacterium tuberculosis strains, and this biosensor was able to distinct the SNP mutation by using high analytical performance.

2.4. Conclusion

In this work, we report a novel approach for sensitive amperometric and DNA detection based on nw-PPY formed with free template and conjugated with poly(amidoamine) dendrimers of second generation (PAMAM G2) and ferrocene. We demonstrated that morphology of polypyrrole affects the performance of biosensors. The formation polypyrrole nanowires on the surface of gold electrode leads to increase the active surface area and improves the electrical properties of the layer. The functionalization of nw-PPy layer, with PAMAM G2 onto the polymer surface was performed through electro-oxidation of the amine groups. We have proved that the covalent attachment is performed between carbon β of PPy and amine of PAMAM which maintain conductivity of polypyrrole layer. The advantage of electrochemical patterning method used for PAMAM G2 association is demonstrated by the simplicity of this reaction, without any need of previous chemical modifications of nw-PPy. Additionally, this technic allows obtaining homogenous distribution of amines on the surface and enhances the yield of ferrocene association. The resultant nw-PPy-PAMAM-Fc composite exhibited efficient electron transfer with the reversible redox system. We have shown that the biosensor is very sensitive to detection of DNA target, where detection limits of 0.36 aM was obtained by amperometric measurement and able to measure DNA from complex sample such as PCR. The selectivity of the biosensor was proven by their ability to discriminate white type rpoB gene of *M.Tuberculosis* from mutated with single polymorphism. The developed electrochemical DNA sensor could be generalized for detection of various analytes involving specific bioreceptor by use of the electrical properties of redox marker attached to the surface.

Références:

- [1] V. Gubala, L. F. Harris, A. J. Ricco, M. X. Tan, et D. E. Williams, « Point of Care Diagnostics: Status and Future », *Anal. Chem.*, vol. 84, n° 2, p. 487-515, janv. 2012.
- [2] J. C. Jokerst, J. M. Emory, et C. S. Henry, « Advances in microfluidics for environmental analysis », *Analyst*, vol. 137, n° 1, p. 24-34, 2012.
- [3] Y. T. Atalay *et al.*, « Microfluidic analytical systems for food analysis », *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 22, n° 7, p. 386-404, juill. 2011.
- [4] C. Richad, H. Korri-Yousoufi, et A. Yassar, « The electrochemistry of antibody-modified conducting polymer electrodes », *Synth. Met.*, vol. 121, n° 1, p. 1261-1262, mars 2001.
- [5] A. Ramanavičius, A. Ramanavičienė, et A. Malinauskas, « Electrochemical sensors based on conducting polymer—polypyrrole », *Electrochimica Acta*, vol. 51, n° 27, p. 6025-6037, août 2006.
- [6] H. Peng, L. Zhang, C. Soeller, et J. Travas-Sejdic, « Conducting polymers for electrochemical DNA sensing », *Biomaterials*, vol. 30, n° 11, p. 2132-2148, avr. 2009.
- [7] H. Q. A. Lê, S. Chebil, B. Makrouf, H. Sauriat-Dorizon, B. Mandrand, et H. Korri-Yousoufi, « Effect of the size of electrode on electrochemical properties of ferrocene-functionalized polypyrrole towards DNA sensing », *Talanta*, vol. 81, n° 4, p. 1250-1257, juin 2010.
- [8] H. Korri-Yousoufi, P. Godillot, P. Srivastava, A. El Kassmi, et F. Garnier, « New method of polypyrrole functionalization toward molecular recognition », *Synth. Met.*, vol. 84, n° 1, p. 169-170, janv. 1997.
- [9] D. D. Ateh, H. A. Navsaria, et P. Vадgama, « Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues », *J. R. Soc. Interface*, vol. 3, n° 11, p. 741-752, déc. 2006.
- [10] P. Godillot, H. Korri-Yousoufi, P. Srivastava, A. El Kassmi, et F. Garnier, « Direct chemical functionalization of as-grown electroactive polypyrrole film containing leaving groups », *Synth. Met.*, vol. 83, n° 2, p. 117-123, nov. 1996.
- [11] S. Chebil, M. O. Monod, et P. Fisticaro, « Direct electrochemical synthesis and characterization of polypyrrole nano- and micro-snails », *Electrochimica Acta*, vol. 123, n° Supplement C, p. 527-534, mars 2014.
- [12] R. M. Penner et C. R. Martin, « Controlling the Morphology of Electronically Conductive Polymers », *J. Electrochem. Soc.*, vol. 133, n° 10, p. 2206-2207, oct. 1986.
- [13] T. Yang, L. Niu, Z. Li, et S. Dong, « Applications of scanning probe microscopy in intrinsically conducting polymer research », *Front. Chem. China*, vol. 2, n° 1, p. 1-5, mars 2007.

- [14] I. S. Chronakis, S. Grapenson, et A. Jakob, « Conductive polypyrrole nanofibers via electrospinning: Electrical and morphological properties », *Polymer*, vol. 47, n° 5, p. 1597-1603, févr. 2006.
- [15] J. Zang, C. M. Li, S.-J. Bao, X. Cui, Q. Bao, et C. Q. Sun, « Template-Free Electrochemical Synthesis of Superhydrophilic Polypyrrole Nanofiber Network », *Macromolecules*, vol. 41, n° 19, p. 7053-7057, oct. 2008.
- [16] L. Xia, Z. Wei, et M. Wan, « Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors », *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 341, n° 1, p. 1-11, janv. 2010.
- [17] S. Chebil, M. O. Monod, et P. Fisticaro, « Direct electrochemical synthesis and characterization of polypyrrole nano- and micro-snails », *Electrochimica Acta*, vol. 123, n° Supplement C, p. 527-534, mars 2014.
- [18] A. Nazemi, A. Najafian, et S. A. Seyed Sadjadi, « Aluminium oxide nanowires synthesis from high purity aluminium films via two-step anodization », *Superlattices Microstruct.*, vol. 81, n° Supplement C, p. 1-6, mai 2015.
- [19] I. Sameera, R. Bhatia, V. Prasad, et R. Menon, « Temperature dependent current-voltage characteristics of zinc oxide nanowire/polypyrrole nanocomposite », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 105, n° 23, p. 232112, déc. 2014.
- [20] T. L. Tran *et al.*, « In-channel-grown Polypyrrole Nanowire for the Detection of DNA Hybridization in an Electrochemical Microfluidic Biosensor », *J Nanomater.*, vol. 2015, p. 2:2–2:2, janv. 2015.
- [21] A. Garcia-Cruz *et al.*, « Efficient fabrication of poly(pyrrole)-nanowires through innovative nanocontact printing, using commercial CD as mold, on flexible thermoplastics substrates: Application for cytokines immunodetection », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 255, p. 2520-2530, févr. 2018.
- [22] X. Zhang et S. K. Manohar, « Bulk Synthesis of Polypyrrole Nanofibers by a Seeding Approach », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, n° 40, p. 12714-12715, oct. 2004.
- [23] C. Debiemme-Chouvy, « Template-free one-step electrochemical formation of polypyrrole nanowire array », *Electrochem. Commun.*, vol. 11, n° 2, p. 298-301, févr. 2009.
- [24] S. Aravamudhan et S. Bhansali, « Development of micro-fluidic nitrate-selective sensor based on doped-polypyrrole nanowires », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 132, n° 2, p. 623-630, juin 2008.
- [25] M. Lin, M. Cho, W.-S. Choe, J.-B. Yoo, et Y. Lee, « Polypyrrole nanowire modified with Gly-Gly-His tripeptide for electrochemical detection of copper ion », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, n° 2, p. 940-945, oct. 2010.

- [26] L. Zhang *et al.*, « A novel ammonia sensor based on high density, small diameter polypyrrole nanowire arrays », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 142, n° 1, p. 204-209, oct. 2009.
- [27] H.-H. Yang, S.-Q. Zhang, F. Tan, Z.-X. Zhuang, et X.-R. Wang, « Surface Molecularly Imprinted Nanowires for Biorecognition », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, n° 5, p. 1378-1379, févr. 2005.
- [28] K. Ghanbari, S. Z. Bathaie, et M. F. Mousavi, « Electrochemically fabricated polypyrrole nanofiber-modified electrode as a new electrochemical DNA biosensor », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 23, n° 12, p. 1825-1831, juill. 2008.
- [29] L. Liu, N. Jia, Q. Zhou, M. Yan, et Z. Jiang, « Electrochemically fabricated nanoelectrode ensembles for glucose biosensors », *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 27, n° 1, p. 57-60, janv. 2007.
- [30] H. Jiang, A. Zhang, Y. Sun, X. Ru, D. Ge, et W. Shi, « Poly(1-(2-carboxyethyl)pyrrole)/polypyrrole composite nanowires for glucose biosensor », *Electrochimica Acta*, vol. 70, n° Supplement C, p. 278-285, mai 2012.
- [31] G. D. Sulka, K. Hnida, et A. Brzózka, « pH sensors based on polypyrrole nanowire arrays », *Electrochimica Acta*, vol. 104, n° Supplement C, p. 536-541, août 2013.
- [32] K. Ramanathan, M. A. Bangar, M. Yun, W. Chen, N. V. Myung, et A. Mulchandani, « Bioaffinity Sensing Using Biologically Functionalized Conducting-Polymer Nanowire », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, n° 2, p. 496-497, janv. 2005.
- [33] M. A. Bangar, D. J. Shirale, H. J. Purohit, W. Chen, N. V. Myung, et A. Mulchandani, « Single Conducting Polymer Nanowire Based Sequence-Specific, Base-Pair-Length Dependant Label-free DNA Sensor », *Electroanalysis*, vol. 23, n° 2, p. 371-379, févr. 2011.
- [34] C. Debiemme-Chouvy, « Template-free one-step electrochemical formation of polypyrrole nanowire array », *Electrochem. Commun.*, vol. 11, n° 2, p. 298-301, févr. 2009.
- [35] L. Qu, G. Shi, J. Yuan, G. Han, et F. Chen, « Preparation of polypyrrole microstructures by direct electrochemical oxidation of pyrrole in an aqueous solution of camphorsulfonic acid », *J. Electroanal. Chem.*, vol. 561, n° Supplement C, p. 149-156, janv. 2004.
- [36] A. Miodek, N. Mejri-Omrani, R. Khoder, et H. Korri-Yousoufi, « Electrochemical functionalization of polypyrrole through amine oxidation of poly(amidoamine) dendrimers: Application to DNA biosensor », *Talanta*, vol. 154, n° Supplement C, p. 446-454, juill. 2016.
- [37] M. A. Ghanem, J.-M. Chrétien, A. Pinczewska, J. D. Kilburn, et P. N. Bartlett, « Covalent modification of glassy carbon surface with organic redox probes through diamine linkers using electrochemical and solid-phase synthesis methodologies », *J. Mater. Chem.*, vol. 18, n° 41, p. 4917-4927, 2008.
- [38] J.-M. Chrétien, M. A. Ghanem, P. N. Bartlett, et J. D. Kilburn, « Covalent Tethering of Organic Functionality to the Surface of Glassy Carbon Electrodes by Using

Electrochemical and Solid-Phase Synthesis Methodologies », *Chem. – Eur. J.*, vol. 14, n° 8, p. 2548-2556, mars 2008.

[39] T.-M. Wu, H.-L. Chang, et Y.-W. Lin, « Synthesis and characterization of conductive polypyrrole with improved conductivity and processability », *Polym. Int.*, vol. 58, n° 9, p. 1065-1070, sept. 2009.

[40] C. Apetrei, M. L. Rodríguez-Méndez, et J. A. De Saja, « Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized phosphate-doped polypyrrole film as an immobilization support. Application for detection of phenolic compounds », *Electrochimica Acta*, vol. 56, n° 24, p. 8919-8925, oct. 2011.

[41] J. Wang, M. Jiang, A. Fortes, et B. Mukherjee, « New label-free DNA recognition based on doping nucleic-acid probes within conducting polymer films », *Anal. Chim. Acta*, vol. 402, n° 1, p. 7-12, déc. 1999.

[42] S. Carquigny, J.-B. Sanchez, F. Berger, B. Lakard, et F. Lallemand, « Ammonia gas sensor based on electrosynthesized polypyrrole films », *Talanta*, vol. 78, n° 1, p. 199-206, avr. 2009.

[43] E. Laviron, « Adsorption, autoinhibition and autocatalysis in polarography and in linear potential sweep voltammetry », *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, vol. 52, n° 3, p. 355-393, mai 1974.

[44] J. F. Smalley *et al.*, « Heterogeneous Electron-Transfer Kinetics for Ruthenium and Ferrocene Redox Moieties through Alkanethiol Monolayers on Gold », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, n° 7, p. 2004-2013, févr. 2003.

[45] E. C. Landis et R. J. Hamers, « Covalent Grafting of Ferrocene to Vertically Aligned Carbon Nanofibers: Electron-transfer Processes at Nanostructured Electrodes », *J. Phys. Chem. C*, vol. 112, n° 43, p. 16910-16918, oct. 2008.

[46] E. Laviron, « General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems », *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, vol. 101, n° 1, p. 19-28, juill. 1979.

[47] A. Miodek, N. Mejri-Omrani, R. Khoder, et H. Korri-Yousoufi, « Electrochemical functionalization of polypyrrole through amine oxidation of poly(amidoamine) dendrimers: Application to DNA biosensor », *Talanta*, vol. 154, n° Supplement C, p. 446-454, juill. 2016.

[48] A. Miodek, G. Castillo, T. Hianik, et H. Korri-Yousoufi, « Electrochemical aptasensor of cellular prion protein based on modified polypyrrole with redox dendrimers », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 56, n° Supplement C, p. 104-111, juin 2014.

[49] A. Miodek, N. Mejri, M. Gomgnimbou, C. Sola, et H. Korri-Yousoufi, « E-DNA Sensor of Mycobacterium tuberculosis Based on Electrochemical Assembly of Nanomaterials (MWCNTs/PPy/PAMAM) », *Anal. Chem.*, vol. 87, n° 18, p. 9257-9264, sept. 2015.

[50] D. Bao *et al.*, « Electrochemical Oxidation of Ferrocene: A Strong Dependence on the Concentration of the Supporting Electrolyte for Nonpolar Solvents », *J. Phys. Chem. A*, vol. 113, n° 7, p. 1259-1267, févr. 2009.

Chapitre 3: Biosensor based on polypyrrole nanospheres for DNA detection of M. tuberculosis

Abstract :

The aim of this study was the electrochemical detection of DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* by using DNA biosensors based on a polypyrrole nanosphere synthesized electrochemically and chemically. Polypyrrole nanosphere (ns-PPy) films were obtained by two methods: first by electrochemical polymerization and secondly through chemical oxidative polymerization. The diameters and molecular structures of the PPy nanospheres have been investigated. Polypyrrole nanospheres were chemically modified through an electrochemical patterning approach following that of amine oxidation to obtain amines as functional groups on the surface. Electrochemical studies were carried out after grafting ferrocene and naphthoquinone groups, as seen in sections A and B of this chapter, as electrochemical redox reporters. The electrochemical proprieties were studied using cyclic voltammetry and impedimetric methods to demonstrate the efficient electron transfer of ns-PPy after such modifications. The electrochemical characteristics produced by the hybridization of DNA strands showed a very high sensitivity and selectivity. A detection limit of about atomolar were achieved for these two biosensors. These transducers can be generalized for the sensing of various analytes by the association of specific bioreceptors.

3.1. Introduction

The importance of the polypyrrole nanostructure is described in the introduction of chapter 1 as well as the importance of polypyrrole as a transducer for biosensors. Thus, the nanospheres that are discussed in this section are part of the previously described PPy nanostructures.

PPy nanospheres can be obtained by different ways including growing with or without the use of templates, where Katarzyna Kłucińska et al [1] used the templateless and seedless method by using polyacrylate microspheres to deliver the monomer for the polymerization reaction. The obtained nanospheres have a very high electrochemical activity and can be easily separated from the reaction mixture using simple physical separation (centrifugation) methods, without any special chemical treatment. Chen shen et al [2] report a method to prepare uniform polypyrrole (PPy) nanospheres by using 3-chloroperbenzoic acid as an oxidant, and as a structure-induced reagent and dopant for polymerization of pyrrole without introducing extra acid, template and surfactant.

Many previous reports have focused on biosensors based on nanosphere of polypyrrole coated by chitosan [3]. In this work, we would like to prove that PPy nanospheres, formed by electropolymerizing or chemical polymerizing, could be coated through the electrochemical patterning approach, following amine oxidation to obtain amines as functional groups on the surface. Furthermore, we would like to prove that these PPy nanospheres can be employed as transducers for DNA detection and can be potentially used in biomedical applications in DNA bio-sensing for M. tuberculosis detection.

This chapter contains two sections:

We present two methods for the synthesis of PPy nanospheres with electrochemical and chemical template-free methods to study the impact of the polypyrrole nanomaterial synthesis methods on the sensitivity of our system.

- Section (A) of this chapter presents the amperometric DNA biosensor which is based on electrochemically synthesized polypyrrole nanospheres. We applied the same approach of the modification process through electrochemical patterning to introduce functional

groups. We proceeded using the electrochemical oxidation of its amine groups, with both ethylene diamine and PAMAM G2; thus, forming ns-PPy-EDA and ns-PPY-PAMAM composites. The electron transfer ability of such ppy nanospheres has been studied through the electrochemical processing of ferrocene redox markers attached to the surface of the nanospheres.

- Section (B) of this chapter presents a DNA biosensor based on polypyrrole nanospheres that was synthesized chemically. We report the use of a chemically synthesized PPy nanosphere for DNA biosensors using H_2O_2 as an oxidizing agent [4]. This approach can allow the control of the bulk morphology and permits large scale production of major classes of either conducting polymers, or other precipitation polymerization systems. Their nanometer size and high surface area can facilitate direct and fast electron transfer between the oxido-reduction species, thus making it an efficient transducer. Ns-PPy was monitored by the Dynamic light scattering (DLS), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), scanning electron microscopy (SEM) and EIS. Ns-PPy was modified with 2nd generation poly (amidoamine) dendrimers (PAMAM G2) as scaffolds for attaching naphthoquinone. The study of the electrochemical properties and the kinetic characterizations after the grafting of this redox naphthoquinone probe was carried out. The latter serves as the redox for the DNA probe. Naphthoquinone was used instead of ferrocene here to investigate the role of redox probes in our electrochemical biosensors, and the impact of its potential as a redox marker.

These biosensors allowed us to successfully detect genomic DNA in amplified and unamplified PCR pathogen samples. These devices allowed us to distinguish the nucleotide polymorphism of the mutated ropB gene compared to the wild-type gene. The obtained materials were applied for DNA sensing, sensitivity and selectivity, and were followed using the signal variation of the attached redox markers to the modified surface. The properties of such biosensors formed with PPy nanospheres were compared to other PPy structures.

The materials and instrumentation methods employed in the following two sections, for the formation and characterization of polypyrrole, as well as the formation of the biosensors, are the same as those that were previously detailed in chapter 2. Any methods described, in the following, pertain specifically to the processes used in their respective sections.

3.2. Section A: Synthesis of PPy nanospheres by electrochemical method

3.2.1. Materials and methods

Electrodeposition of polypyrrole nanospheres:

Film of Polypyrrole nanospheres was grown on the gold surface electrode by chronoamperometry method with applied potential of 1.2 V vs Ag/AgCl during in a solution containing pyrrole, 0.6 M of camphor sulfonique acid in distilled water. The time and the concentration of pyrrole were studied to analyze the influence of such parameters in PPy nanospheres morphologies. The concentrations were varied from 10 mM to 1M and the time of polymerization from 10s to 20s. During the electropolymerization, the working and counter electrode were separated in a small volume cell from the reference electrode. After electrodeposition, the electrode was rinsed several times with double distilled water.

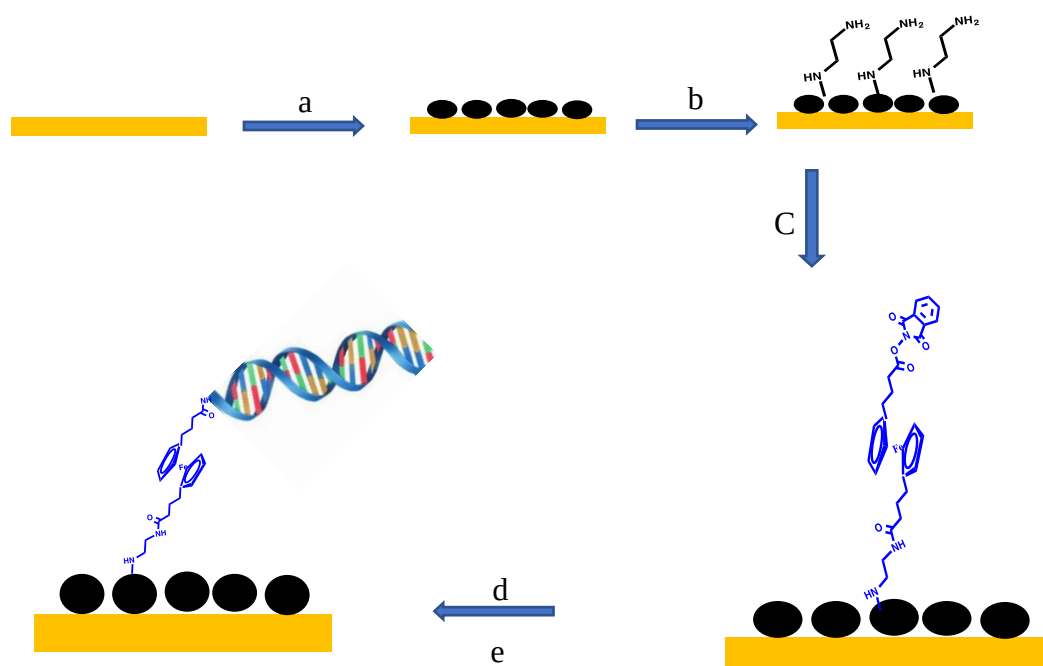


Figure 40 : Representation of DNA sensor based on modified PPy: a) electro polymerization of ns-PPy ; b) electrodeposition of EDA; c) covalent grafting of ferrocene; d) anchoring of ssDNA probe; e) detection of specific target.

3.2.2. Results and Discussion

3.2.2.1. Synthesis of Polypyrrole nanospheres and characterization

SEM characterization

Following the strategy developed in various approaches, the synthesis of the polypyrrole nanostructures could be obtained in absence of templates through the control of conditions of polymerization. We have performed the polymerization of polypyrrole nanospheres by the same strategy developed by Qu and all [2]. The PPy nanospheres could be obtained by potentiometry methods using applied potential of 1.2V/AgCl and high concentration of camphor sulfonic acids as doping ions. The polypyrrole nanospheres has been be obtained with diameter of 100 μ m. In this study the optimization of electrochemical conditions such of concentration of pyrrole and time of polymerization have been studied to analyze such effect in the shape and the size of the nanospheres. It is well known that the conditions of polymerization such as the concentration of pyrrole monomers controls the morphology of polymers formed. In the same way the time of polymerization controls the thickness of the polymers. These two parameters have been studied to analyze the effects on the morphologies of the nanostructures formed. Firstly, the time of polymerization was fixed to 20s and the concentration was varied from 1M to 10mM, and secondly the concentration was fixed, and the time was decreased to 10s. Polypyrrole nanostructure where obtained directly on the surface of gold electrode and characterized by the scanning electron microscopy. SEMs images of PPy with different conditions of polymerization are shown in (Figure 41). The PPy formed with concentration of 1 M and time of polymerization of 20s (figure 41, image a) shows a dense layer of polypyrrole formed on surface of gold electrode with high density of granular shapes with apparent spherical form. The size of spherical granule PPy was larger and is around one to two micrometers. Once the PPy are formed with lower concentration of pyrrole 10mM with the same time of polymerization of 20s (Figure 41, image c), we can see a significant change in morphologies of the formed polymers. The density of deposit nanospheres decreases significantly and the spherical granule size is lower which is around 800 nm. Then when concentration as fixed to 10mM and the polymerization was performed during 10s. SEM image show that the general shape of PPy did not change significantly after modification of the time of polymerisation from 20s to 10s with concentration of 10mM (figure 41, image b), but the average size of the spherical structures decreases significantly. The wide of nanospheres was around 800 nm at 20s compared to ns-PPy formed after 10s where the wide of nanospheres is much lower. This is demonstrated that the formed nanospheres are formed since the first step of

polymerization and conducting PPy growth on the formed PPy nanospheres. To analyze the size and morphologies of such nanospheres within the time of polymerization AFM images have been performed.

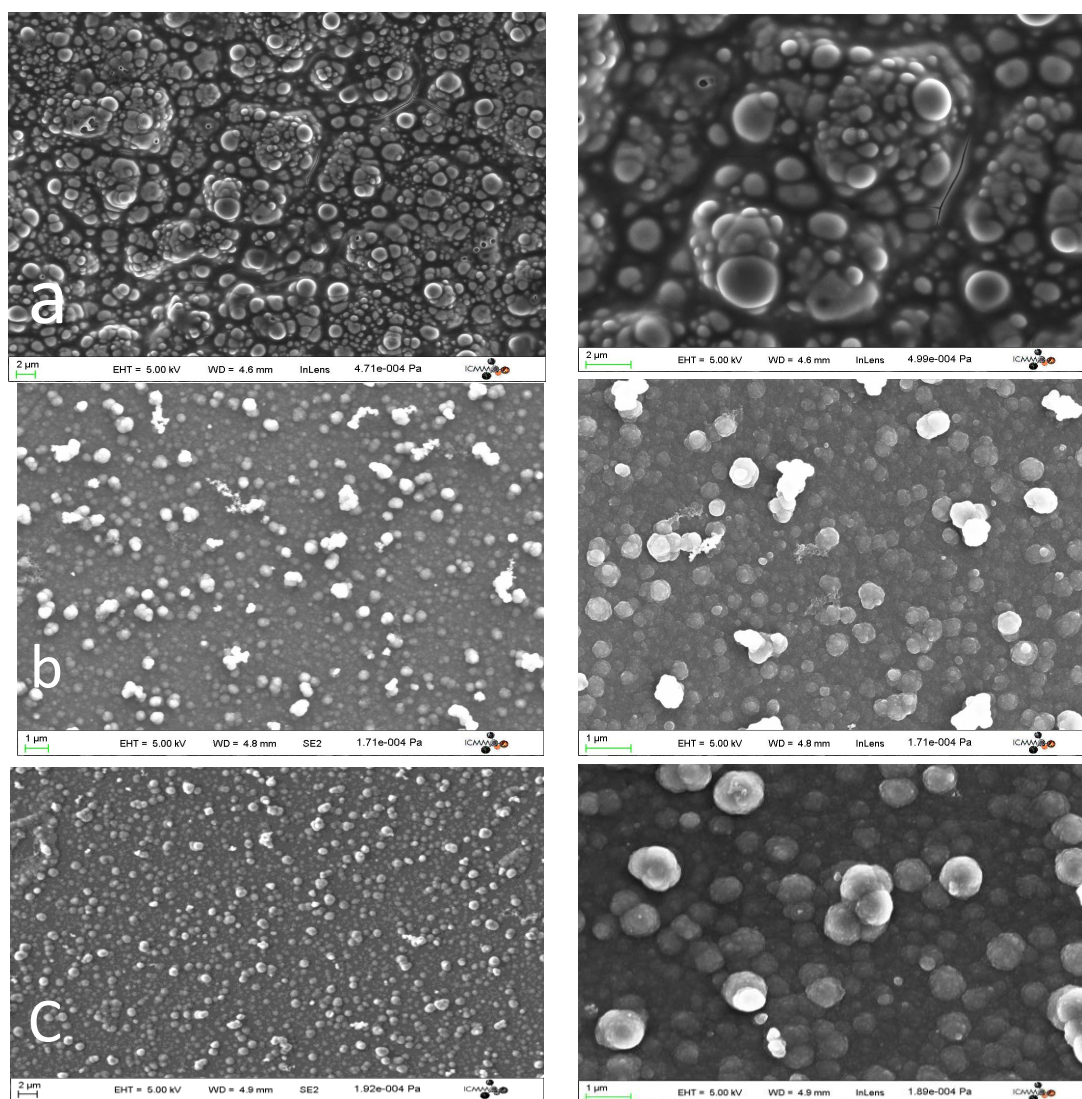


Figure 41: SEM images of gold surface covered by ns-PPy with different scale
a) $[Py]=1\text{ M}$, $t=20\text{s}$ b) $[Py]=10\text{mM}$, $t=10\text{s}$, c) $[Py]=10\text{mM}$, $t=20\text{s}$

Analyze the morphologies of PPy nanospheres by AFM

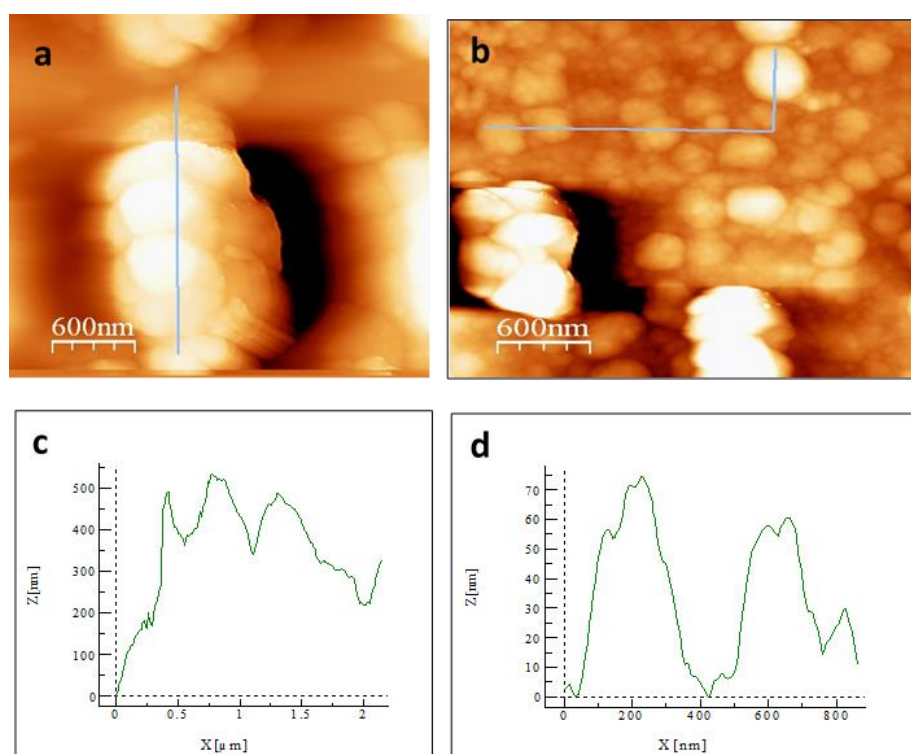


Figure 42 AFM images of ns-PPy (a) time of polymerization 20s and (b) time of polymerization 10s ; and (c), (d) line cross-section analysis of the AFM images respectively

AFM is an important physical technique for studying the morphology of nanoparticles. Quantitative information from individual nanoparticles can be generated from software-based image processing of AFM data.

To further characterize the nanomaterials and their morphologies, AFM images were performed for ns-PPy formed with concentration of pyrrole 10mM and time of polymerization 10s and 20S. Figure (42) shows the images obtained and cross section analysis of each image. AFM image of PPy obtained after time of polymerization 20s is shown in (Figure 42, image a and curve c).and shows a morphology of PPy with not well-defined microspheres. The structure is in more oval shape which look like ellipse. The cross section (see Figure 42, curve c) shows that the size is around 500 nm of lower diameter and 2 μm for larger diameter. In the case of the PPy formed with a time of polymerization of 10s, nanoparticles with nanospheres shape are observed with regular distribution on the surface (Figure 42, image b). The size could be measured from the cross section and showed very small size of around 50 to 100nm.

The formation of nanostructure of polypyrrole film without using a template has challenge for a long time. This method allows the formation of nanospheres directly on the surface of electrode. To explain the mechanism of such formation, Qu and all groups supposes that the formation of self-assembled gas bubble on the surface of anode is the origin of the formation of the microstructure and they demonstrates the size of the gas bubbled on the surface is the same size as the diameter of the nanosphere obtained of 50 μ m. However, they observe by DSL measurement of solution of pyrrole and camphor sulfonic acid, that pyrrole and surfactant forms micelle with diameter of about 50 nm. They exclude that the formation of microstructure by micelle template mechanism as the diameter of micelle is very small compared to obtained microstructures. From this study we cannot exclude that the mechanism of formation of nanostructures is related to the micelles template formation, which deposit on the surface and them the polymerization grown from this template. The decrease of the concentration of pyrrole from 50mM to 10mM in this study could decrease also the size of micelles and them the diameter of nanostructures.

XPS characterization

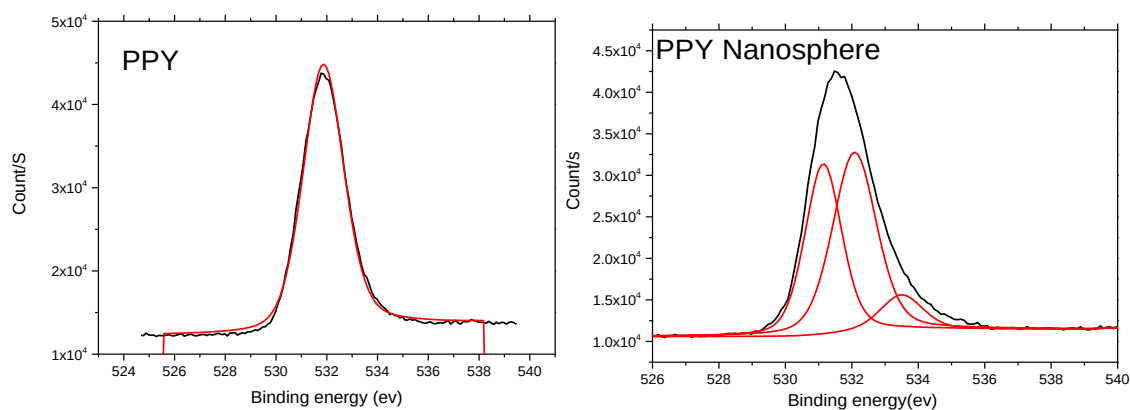


Figure 43 spectra of PPy layer in oxygen region.

Table 8 Summary of XPS results for PPy compact film.

Table 9 Summary of XPS results for ns-PPy.

Peak Fit Table : O1s ppy nanosphere								
Ref.	Name	Peak BE	Height CPS	Height Ratio	Area CPS.eV	Area Ratio	FWHM fit parameter	L/G Mix (%) Sum
J	O1s Point 1 E3 A	531.14	20578.75	0.95	31827.21	0.8	1.3	30
							1.3 : 1.5	fixed
K	O1s Point 1 E3 B	532.08	21630.49	1	39873.72	1	1.56	30
							1.36 : 1.56	fixed
L	O1s Point 1 E3 C	533.5	4203.68	0.19	7479.87	0.19	1.5	30
							1.3 : 1.5	fixed
Peak Fit Table : O1s PPY								
Ref.	Name	Peak BE	Height CPS	Height Ratio	Area CPS.eV	Area Ratio	FWHM fit parameter	L/G Mix (%) Sum
N	O1s Point 1 E1 A	531.86	31826.21	1	71279.23	1	1.9	30
							1.8 : 1.9	fixed

The ns-PPy chemical composition was investigated by analyzing the XPS spectra of the deposited film. The XPS of the films obtained from the oxidation of an aqueous solution containing pyrrole and LiClO₄ since this technique is widely used to control the elemental composition of a solid film. The XPS analyses confirm the presence of PPy, incorporating ClO₄⁻ doping agents, on the gold surfaces. In this case, the O_{1s} core level peak centered at 531.89 eV is not very informative. It is not possible to separate the contribution of the oxidized polypyrrole sites from that due to oxygen atoms in perchlorate anions.

The XPS spectrum in case of PPy nanospheres the films obtained from the oxidation of an aqueous solution containing pyrrole and CSA. The XPS analyses of PPy, incorporating CSA⁻ doping agents, on the gold surfaces show 3 peaks at 531.14, 532.08 and 533.5. The signal at 531.14 can be attributed to carbonyl C=O, and the signals at 532.08 and 533.5 are related to C-O in sp structure. The presence of C=O and C-O suggest that overoxidation of ns-PPy occurs to the β carbon of PPy rings [5].

3.2.2.2. Electrodeposition of Ethylene diamine and PAMAM

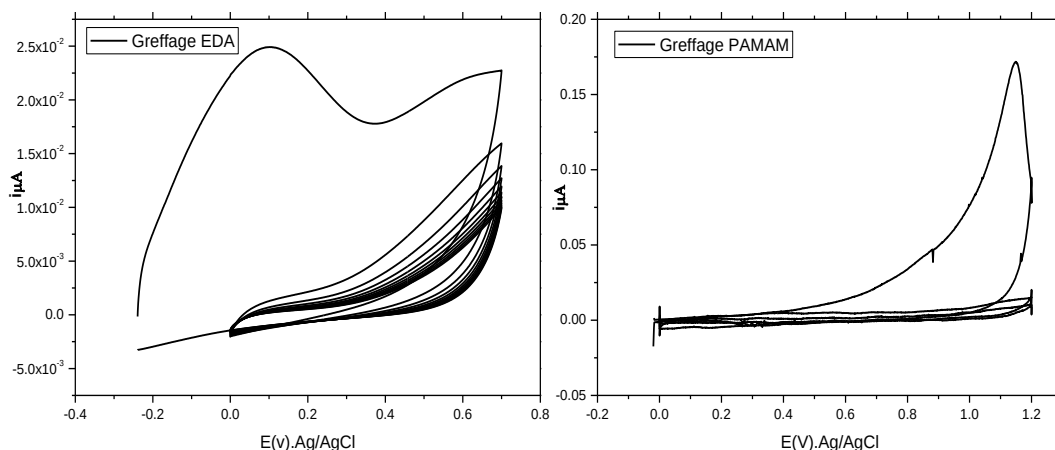


Figure 44 Electrografting by oxidation of amine group A) EDA grafting, B) PAMAM grafting.

To functionalize PPy with amine chemical groups, covalent bonding of ethylene diamine on the modified electrode with ns-PPy was performed in H₂O containing 0.5 M LiClO₄ by scanning the potential from 0 to 0.7 V vs. Ag/AgCl as a reference electrode during 10 cycles until saturation with the scan rate 50 mV.s⁻¹. EDA could be attached to PPy surface through amine electro-oxidation and formation of film layer where the others amine groups could serve for further functionalization. Another functionalization was done by using groups dendrimers PAMAM of second generation. The surface of PPy nanospheres film was modified with dendrimers PAMAM of second generation (PAMAM G2). The modification was performed by scanning the potential between 0 and 1.2 V during 3 cycles until saturation of the surface. This two functionalisation by EDA and PAMAM was done to investigate their effects on the quantity of immobilized biomolecules and the electron-transfer process.

EIS measurements represent the characterization of electrical properties of the surfaces modified with ns-PPy-PAMAM and ns-PPy-EDA composites, the Nyquist plots show that when EDA were grafted onto the ns-PPy surface, the charge transfer resistance was smaller than the resistance seen in the tests where PAMAM was used. This is hypothesized to be due to the big volume of dendrimer PAMAM G2 which cause blocking effects for charge transfer. Another EIS analysis was performed

after the grafting of ferrocene to get information about the effect of grafting EDA or PAMAM on ns-PPy surfaces.

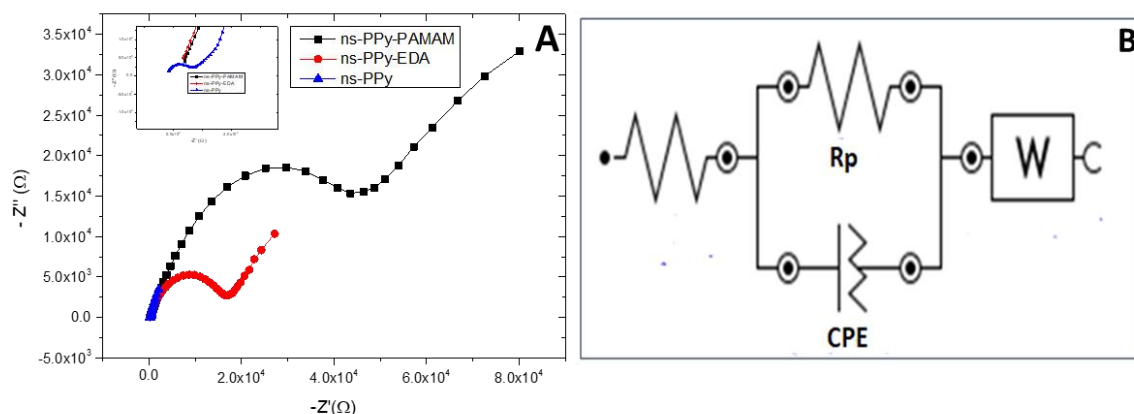


Figure 45 (A) Nyquist plots obtained after modifications of gold electrode with ns-PPy-EDA and ns-PPy-PAMAM the measurements were obtained in PBS buffer, in frequency range from 0.1Hz to 100 kHz at 0.10 V vs. Ag/AgCl by applying DC potential of 10 mV. The symbols are the experimental data, and the solid lines are the fitted curves using the equivalent circuit showed in (B).

Table 10 Summary of estimated EIS parameters obtained in PBS buffer.

molecule	$R_s (\Omega)$	$R_{ct} (k\Omega)$	$CPE_1 (\mu F)$	$W/ CPE_2 (\mu F)$	χ	n_1
Ns-PPY-PAMAM	198.48 ± 5.2	41.6 ± 0.1	1.61 ± 0.1	80.5 ± 5.5	0.003	0.8
ns-PPY-EDA	172.4 ± 0.82	20.70 ± 0.17	2.05 ± 0.05	106.09 ± 1.6	0.0022	0.8

3.2.2.3. Association of ferrocene to PPy nanospheres and characterization of the electrode surface

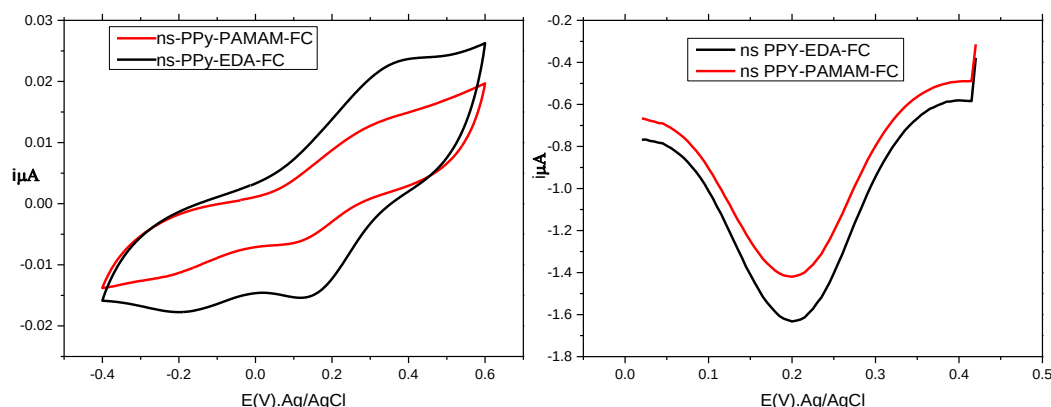


Figure 46 (A) Cyclic voltammogram of electrochemical signal of ferrocenyl group (Fc) linked to ns-PPy modified with dendrimers PAMAM and EDA, (B) SWV of electrochemical signal of ferrocenyl group (Fc) linked to ns-PPy modified with dendrimers PAMAM and EDA.

While PAMAM's sphere-like geometric structure is expected to allow the grafting of large quantities of ferrocene markers, the EDA linear chain's structure allows the bonding of only one ferrocene marker. Testing this hypothesis, we compared the redox properties of ns-PPy modified with PAMAM with that of ns-PPy modified by EDA. As seen in (figure 46) above, the amplitude of redox peaks for ns-PPy-EDA-Fc is larger in comparison with that for ns-PPy-PAMAM-Fc.

The charges exchanged during redox waves allows the calculation of an average coverage of 54 nmol.cm^{-2} of the Fc groups grafted onto EDA and 42 nmol.cm^{-2} of the Fc groups grafted onto PAMAM. This result clearly demonstrates higher coverage of Fc with EDA, containing only a single amino group, in comparison with the dendrimers' (PAMAM) surface. This result proves that the number of ferrocenes attached to the surface, does not only depend on the size or the number of amino-group terminals found on the PAMAM and EDA molecules. Other unknown factors appear to play a role here. We hypothesize that perhaps, the quantity of ferrocene grafting also depends on the quantity and distribution of the attached EDA or PAMAM molecules on the surfaces of the ns-PPy. Further studies can be made on the role of the geometric shapes of the used molecules on the grafting efficiency. The structural and morphological properties the EDA and PAMAM molecules may cause different levels of nanospheres-molecular compatibility, where the morphologic compatibility issues restrict the number of accessible amines on the surface.

Analysis of electrochemical characteristic of ferrocene attached to ns-PPy through EDA or PAMAM demonstrate that full width at half-maximum (fwhm) is 131 mv in case ns-PPy-PAMAM-FC and 137 mv in case of ns-PPy-EDA-FC which is higher than the ideal value (91mv). As we have already discussed in chapter 2, this large value can be attributed to interactions between neighboring redox-active molecules, leading to a range of redox potentials, or inhomogeneity in the molecular layer and variations in the local chemical environment of different ferrocene molecules [6].

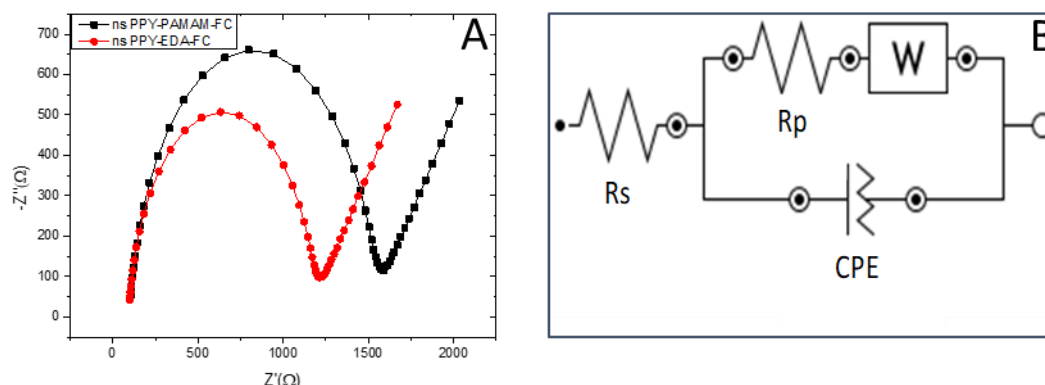


Figure 47: A) Nyquist plots obtained after covalent attachment of ferrocene to the ns-PPy-PAMAM and ns-PPy-EDA modified electrode. The measurements were obtained in PBS buffer, in frequency range from 0.1Hz to 100 kHz at 0.10 V vs. Ag/AgCl by applying DC potential of 10 mV. B) The symbols are the experimental data, and the solid are the fitted curves using the equivalent circuit.

Modification of the ns-PPy-PAMAM and ns-PPy-EDA surface by ferrocene leads to the contraction of the semi-circle Nyquist plot. EIS shows a more significative decrease of charge transfer resistance in case of ns-PPy-EDA-FC compared to ns-PPy-PAMAM-FC. This result confirms what we had obtained in voltammetry cyclic and square wave. Using of ns-PPy-EDA increase the presence of redox-accessible ferrocene molecules. EIS data were fitted by Randles equivalent circuit model where R_s is the electrolyte resistance, R_{ct} is the electron transfer resistance, Z_w is the Warburg impedance, while the double layer capacitance (C_{dl}) is replaced by constant phase element (CPE).

Table 11 Summary of estimated EIS parameters obtained in PBS buffer.

molecule	R_s (Ω)	R_{ct} (k Ω)	CPE_1 (μF)	W/ CPE_2 (μF)	χ	n_1	n_2
ns-PPY-PAMAM-Fc	196.33 $\pm$ 1.5	1.6 $\pm$ 0.04	1.81 $\pm$ 0.05	213.7 $\pm$ 2.3	0.008	0.8	0.6
ns-PPY-EDA-Fc	196.11 $\pm$ 3.1	1.2 $\pm$ 0.03	2.16 $\pm$ 0.02	219 $\pm$ 3.2	0.0022	0.9	0.6

Kinetic characterizations of attached ferrocene on PPy nanowires

By following this equation $k_s = m \left(\frac{F}{RT} \right) n v$, we Calculated the Ks to test how the molecular length affects the electron-transfer process. The data show that there is significant change in the electron transfer rate constant as the length of the carbon chain is varied from PAMAM to EDA with increasing of Ks value from (7.24 $\pm$ 0.02) in case of ns-PPy-PAMAM-FC to (11.73 $\pm$ 0.03) in case of ns-PPy-EDA-FC.

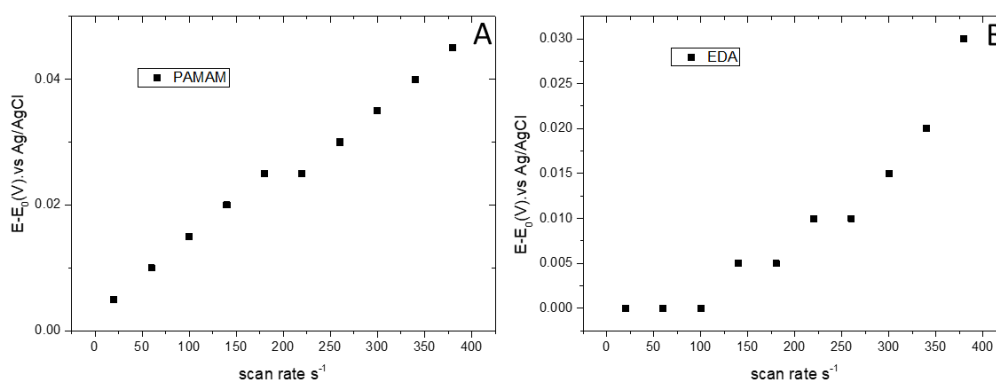


Figure 48 A). the variation of anodic potentials ($E_{pc,a} - E_0$) vs. Scan rate for ns-PPy-PAMAM-FC, B). the variation of anodic potentials ($E_{pc,a} - E_0$) vs. Scan rate for ns-PPy-EDA-FC.

3.2.2.4. Properties of biosensors towards DNA detection

The hybridization reaction between ssDNA probe and DNAC target in the concentration range 1aM -1 pM, was analyzed on the changes of current corresponding to redox signal of ferrocene, obtained after incubation of biosensor with each DNAC concentration and monitored using SWV analysis. The currents recorded before and after incubation of the bioelectrode in the DNA solution varies linearly with the concentration of DNA range between 1 aM to 1pM, this decrease of current

Université Paris-Saclay

Espace Technologique / Immeuble Discovery

Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France



is proportional to increasing of DNAC is related to the low electron transfer happened because of attachment of large DNAC. The calibration curve was plotted by presenting the average variation versus the logarithmic scale of the concentration. The calculated detection limit was 6.2 aM, value deduced from the formulas $3 \times S/M$ where 'S' is the standard deviation of the current of the lower concentration corresponding to 3 measurements, and 'M' the slope of the calibration curve. The reproducibility was tested by measuring the response with 3 fresh biosensors.

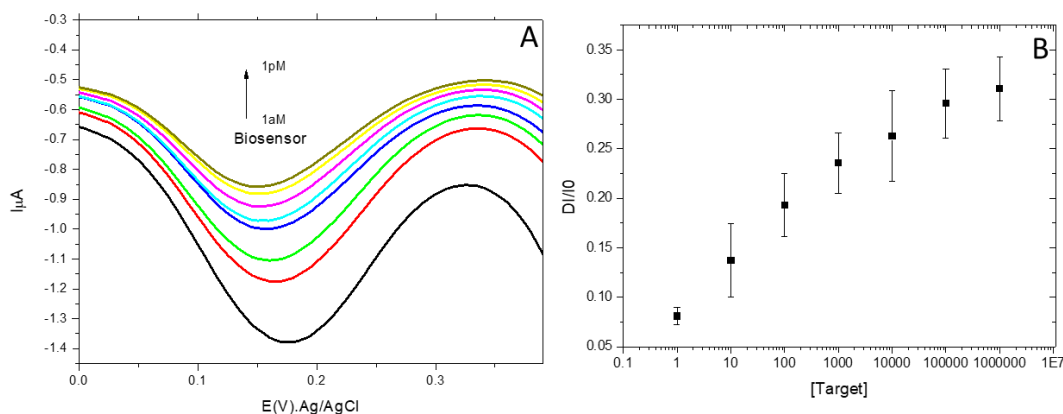


Figure 49 SWV of biosensor after incubation of various DNA concentrations (1aM–1 PM) recorded in PBS solution. B) The plot of the relative changes of the current peak vs. concentration of DNA target for the biosensor. $\Delta I = (I_0 - I)$, where I_0 is the peak DNA target and I after incubation of the sensor with certain concentration of target.

To verify the reliability of our DNA sensors, it is very important to test the response in the presence of non-complementary DNA strands under the optimal conditions of analysis (Figure 49). Biosensors were incubated in solution containing 1fM concentration of ssDNA non-complementary target, results were compared to the hybridization with the same concentration of DNA complementary target. It clearly shows for the non-complementary strands, no variation of the redox signal was observed, where is a clear decrease of the signal is observed with the complementary DNA strands. We can conclude that there was no non-specific response and detection with this biosensor is very selective.

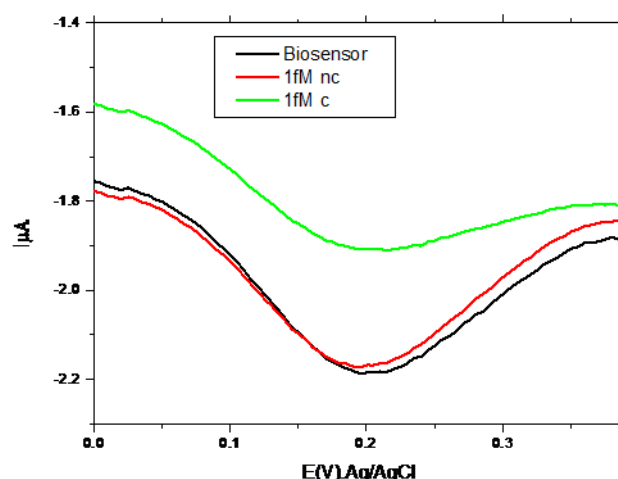


Figure 50 SWV present the results obtained for non-specific interactions compared to specific one.

Black curves show voltammogram of biosensor after formation, red curves show response of biosensor after incubation in solution of 1fM DNA NC target, and green curves show response of biosensor after incubation in 1fM of DNAC target.

3.2.2.5. Detection in real sample of *M. Tuberculosis* and resistant strand

PCR products were composed of 411 bases in which complementary sequence was inserted. The incubation was performed in the same conditions as for short complementary target. (Figure 51) show a series of voltammograms recorded before and after hybridization of the wild-type probe or non-amplified mutant probe. Hybridization of the wild-type probe with wild-type (Wt) genomic DNA results in a significant decrease in ferrocene reduction peak current, while mutant genomic DNA does not cause any change. In contrast, if the mutant DNA-based probe is used, only incubation of the bioelectrode with mutant genomic DNA causes a significant decrease in peak current. The results obtained during detection of PCR products shows that the biosensor platform can potentially be applied for diagnostics and DNA sensors.

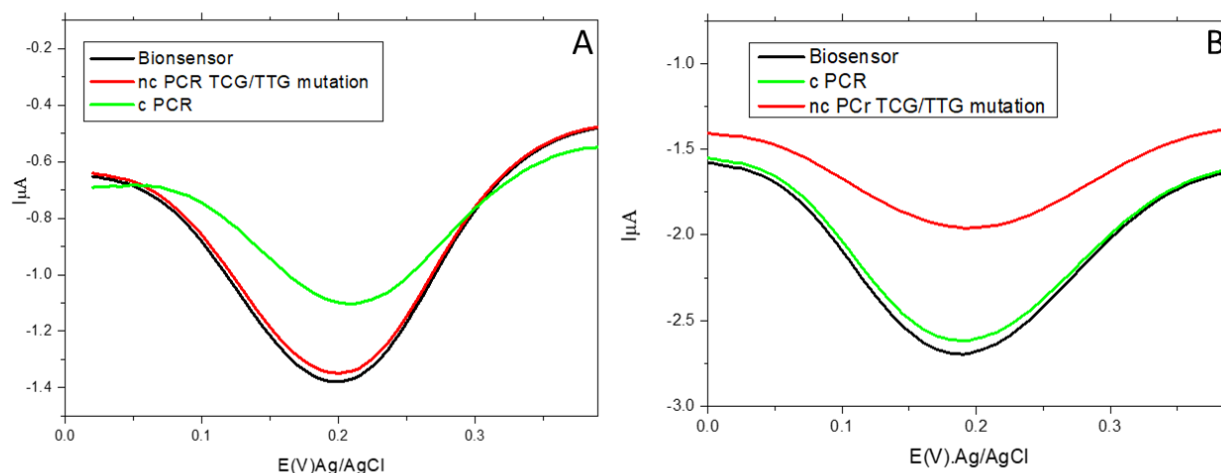


Figure 51 SWV show detection of PCR samples of 411 bases with (c PCR) and without (nc PCR) complementary sequence by using a normal biosensor, B) SWV show detection of PCR samples of 411 bases with (c PCR) and without (nc PCR) complementary sequence by using a mutated DNA biosensor.

3.3. Section B: Chemical syntheses of PPy nanospheres

3.3.1. Materials and methods

3.3.1.1. *Synthesis of polypyrrole nanospheres:*

Synthetic approach was carried out by adding 0.1 g FeCl₂ to 60 mL DI water, where 1 mL of pyrrole had already been pre-dispersed. After the addition of H₂O₂ to the pyrrole/FeCl₂/H₂O mixture, pyrrole polymerization was initiated. The dark precipitated PPy was filtered off and washed with copious amounts of DI water (3 x100 mL) and acetone (3 x 100 mL) after 12 h reaction. The powder was then freeze-dried for another 12 h.

3.3.1.2. *Preparation of covered ns-PPy electrode:*

The gold electrode surface was covered using a drop-coating method with ns-PPy dispersed in water 0.5 M LiClO₄ (0.10g AOT), the electrode was drying at room temperature.

3.3.1.3. *Association of naphthoquinone and DNA Probe:*

This step is carried out by immersing the modified electrode PPY-PAMAM in a solution of water containing 1μM naphthoquinone modified by carboxyl acid during 1h at room temperature. The electrode was then rinsed several times with water and double distilled water to remove not attached quinone. The grafting of the probe oligonucleotide on the surface of the electrode is carried out in two steps. Firstly, the electrode is incubated in a 1% aqueous solution of glutaraldehyde for 10 min at room temperature in order to be able to convert the terminal amines into aldehydes that can bind to the specific attachment sites of the DNA itself having an amine termination in the 5' position. Indeed, glutaraldehyde has two aldehyde functions at both ends, the first will react with the amines of the dendrimer and the other with that of the DNA.

For the second step the electrode was then immersed for one hour in a solution of PBS containing 1μM of DNA probe modified by amine group in 5' end position. The reaction was performed at room temperature for one hour. The electrode was then rinsed with double-distilled water and PBS buffer.

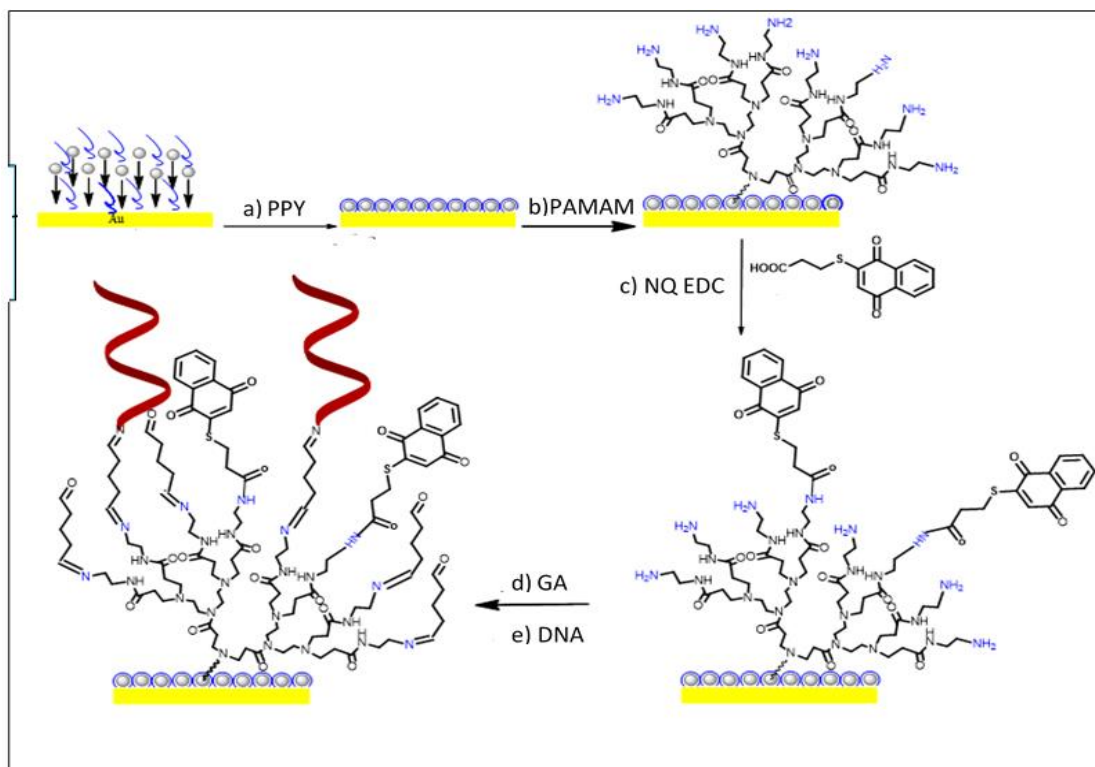


Figure 52 representation of DNA sensor based on modified ns-PPy: a) deposition of PPy film; b) electrodeposition of PAMAM G2; c) covalent grafting of naphthoquinone; d) covalent grafting of glutaraldehyde; e) anchoring of ssDNA probe.

3.3.2. Results and discussion:

3.3.2.1. Particle Size measurement of the prepared polypyrrole nanospheres by DLS

The particle sizes of the as-prepared nanospheres were measured by a DLS Particle Sizer in the dispersions of AOT surfactants: dioctyl sulfosuccinate sodium (AOT). A typical testing process is described as follows: a certain amount of surfactant was added into 50 mL distilled water (0.10g AOT), which was stirred continuously at 80°C, until the surfactant was fully dissolved, and the solution became transparent. Desired amount of polypyrrole nanospheres were added into the as-prepared surfactant solution at 60°C and stirred for around 10 min. And then the dispersions were placed in water bath and ultrasonicated for 30 min. Finally, the obtained dispersions with PPy nanospheres with 3 concentrations (3mg/ml, 2mg/ml, 1mg/ml) were prepared and were added

to the test cell of NICOMP 380 ZLS Particle Sizer and their particle sizes were measured subsequently. Figure 53 show the DLS particle size of the dispersions for AOT surfactant, in the range of 500 to 200 nm, size on particle decrease by decreasing the concentration of as-prepared nanosphere. According to the DLS results for the particle size distribution of the PPy nanospheres, we can disperse the as-prepared nanospheres in aqueous surfactant solutions, forming stable dispersions.

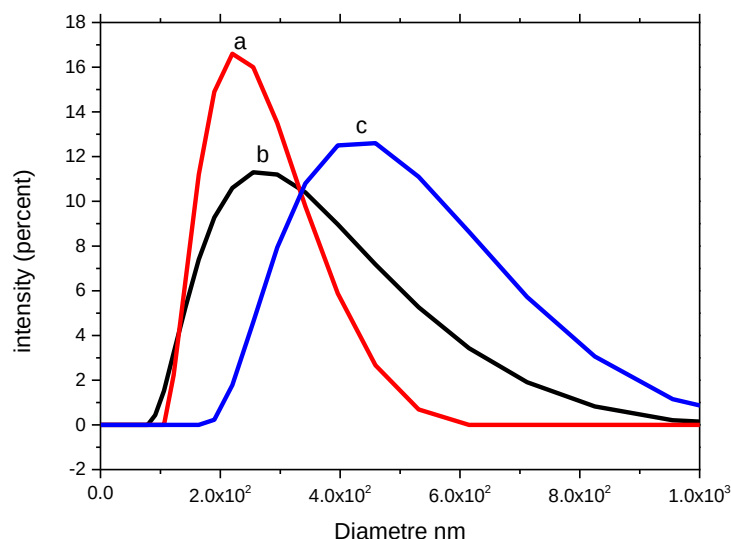


Figure 53 Dynamic light scattering test for particle size distribution of PPy nanospheres dispersed in (A) AOT surfactant. Concentrations from a-c (1mg/ml, 2mg/ml, 3mg/ml).

3.3.2.2. Characterization by SEM:

According to the DLS results, we used a concentration of 1mg/ml in the 50 mL of distilled water with 0.10g of AOT (which was the lowest concentration used in our tests) for the deposition on the surface of the gold electrode, so we can generate the smallest nanospheres possible. The morphology of the obtained film was characterized by SEMs image (figure 54). The scanning electron microscopy (SEM) image of Au/ns-PPy showed that the majority of the nanospheres had diameters in the range of 400–500 nm.

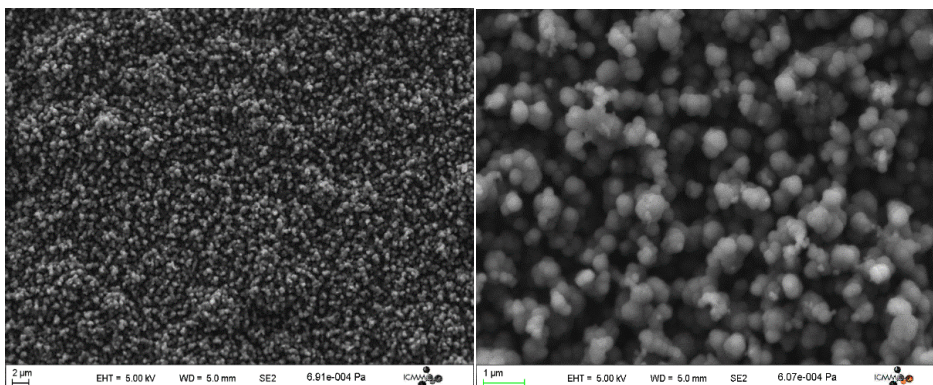


Figure 54 SEM images of gold surface covered by ns-PPy

3.3.2.3. Electrochemical characterization by EIS

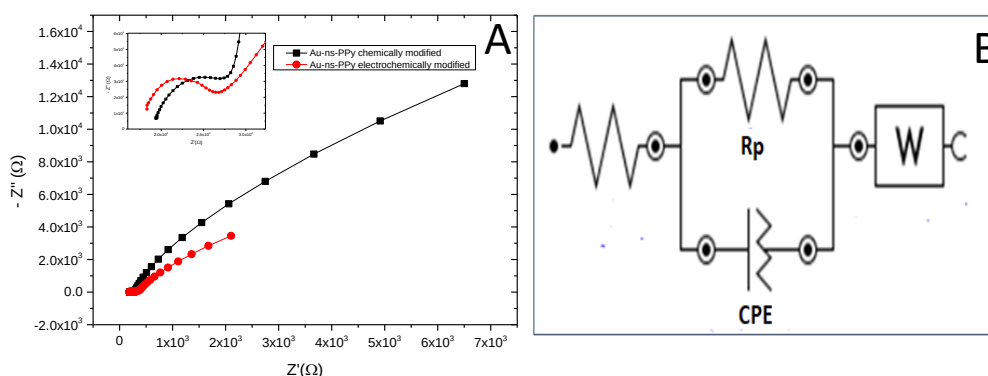


Figure 55 Nyquist plots obtained after modifications of gold electrode with ns-PPy electrochemically and ns-PPy chemically, the measurements were obtained in PBS buffer, in frequency range from 0.1 Hz to 100 kHz at 0.10 V vs. Ag/AgCl by applying DC potential of 10 mV. The symbols are the experimental data, and the solid lines are the fitted curves using the equivalent circuit showed in (B).

To verify the conductivity of the surfaces chemically modified by ns-PPy synthesis, EIS measurements were done for characterization of electrical properties.

Nyquist plots of electrochemically modified Au-ns-PPy and chemically modified Au-ns-PPy showed the characteristics of being conducting surfaces. The Rct values are found to be have similar magnitudes. The EIS data were fitted by a Randles equivalent circuit model.

Table 12 Summary of estimated EIS parameters obtained in PBS buffer.

Molecule	$R_s (\Omega)$	$R_{ct} (\Omega)$	CPE(μF)	W(μF)	χ	n
ns-PPy electrochemical	193.2±0.32	122±0.28	1.13±0.008	212.09±1.9	0.0045	0.9
Ns-PPy chemical	212.2±0.61	101±0.21	1.07±0.023	226.38±1.1	0.0021	0.8

3.3.2.4. Association of naphthoquinone to PPy nanospheres and characterization and Electrochemical characterization:

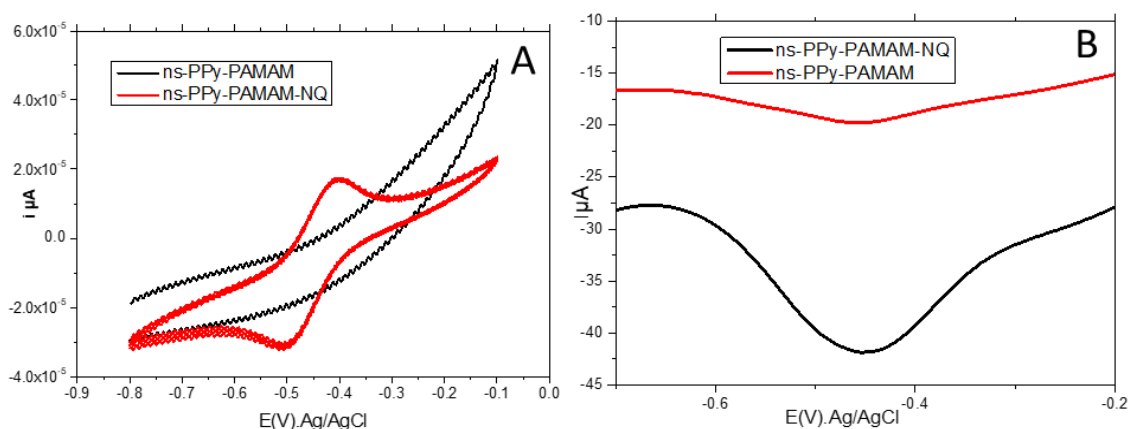


Figure 56 Cyclic voltammograms of ns-PPy-PAMAM layer before and after attachment of NQ groups in 10 mM PBS solution at pH 7.4, scan rate of 100 mV s⁻¹.

After functionalizing ns-PPy with amine chemical groups, by Covalent bonding of PAMAM, Redox probe based on naphthoquinone whose redox potential is in the cathodic potentials was fixed on the surface of electrode modified by Au/ns-PPy-PAMAM.

We characterized the modified surfaces by using CV methods. Figure 56 shows the cyclic voltammograms of an Au/ns-PPy-PAMAM after the covalent grafting of naphthoquinone. Although modifying electrodes with ns-PPy-PAMAM shows no significant peaks, the grafting of NQ naphthoquinone reveals the clear oxidation and reduction peaks at -0.49V and -0.405V versus

Ag/AgCl; thus, demonstrating that the covalently linked naphthoquinone is electrochemically active.

Average surface coverage of NQ is 51 nmole.cm^{-2} this value agrees, with the previous work shown in part A, on the ns-PPy-EDA-FC systems.

For ns-PPy-PAMAM surfaces with naphthoquinone attached to amine groups, the fullwidth at half-maximum (fwhm) of 138mv was observed. Who can prove that method of synthesis of ns-PPy and deposition on the surface of gold electrode didn't change the homogeneity of the surface. This value is always higher than ideal (91mv) who related to the inhomogeneity of the surface.

3.3.2.5. Kinetic characterizations of attached naphthoquinone on PPy nanosphere

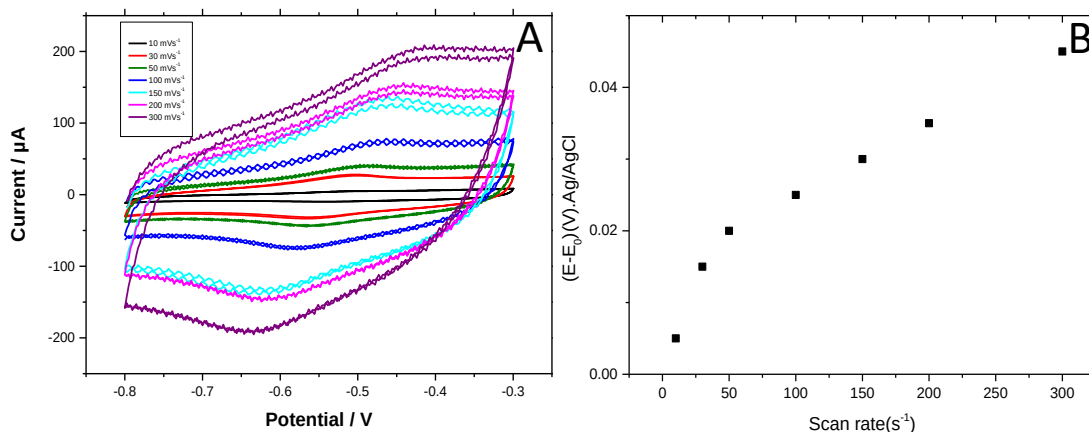


Figure 57 a) CVs of a gold electrode covered by ns-PPy-PAMAM-NQ at various scan rate in the range (10mv-300mv). s⁻¹ b) the variation of anodic anodic potentials (Epc,a – E0) vs. Scan rate

The charge transfer coefficient, so the rate constants were calculated directly from Laviron's working curves of $m-1$ versus $n\Delta E_p$. The k_s for naphthoquinone attached on nanospheres PPy-PAMAM is 10.7 ± 0.02 ; this value agrees with the k_s value in the case of ns-PPy-PAMAM-Fc and improves the k_s value when compared to the 2D-PPy-PAMAM, which is related to the large surface area that improves the electron hopping between adjacent naphthoquinone units.

3.3.2.6. Properties of biosensors towards DNA detection

The analytical performance of the biosensor was explored using different concentrations of the complementary target. DNA concentration ranging from 1 aM to 100 fM was used for the target DNA calibration curve. The peak current in the SWV response probe increases with the increase in the complementary target DNA concentration. The results indicated that the biosensor exhibited a satisfactory linear range and very high sensibility, where detection limits was 9.1 attomolar.

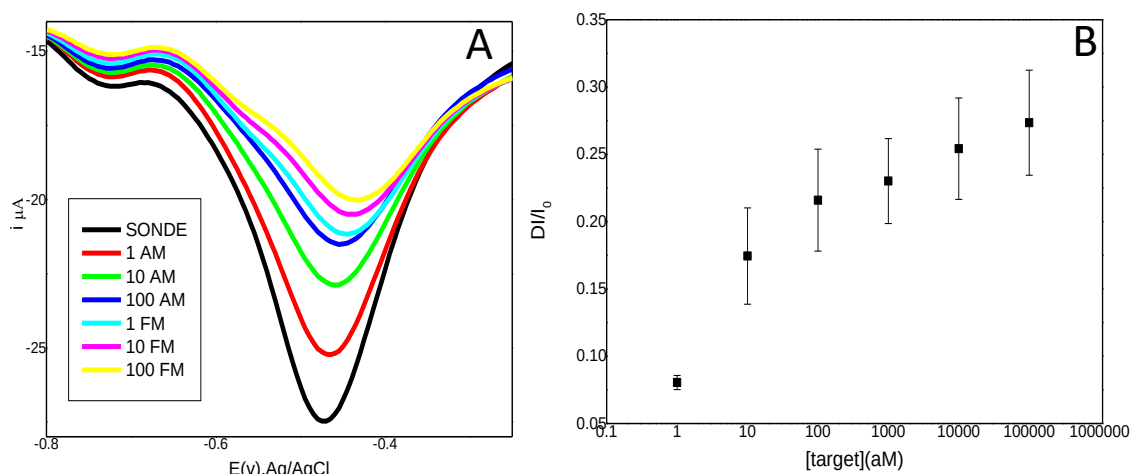


Figure 58A) SWV of biosensor after incubation of various DNA concentrations (1 aM–100 fM) recorded in PBS solution. B) The plot of the relative changes of the current peak vs. concentration of DNA target for the biosensor. $\Delta I = (I_0 - I)$, where I_0 is the peak DNA target and I after incubation of the sensor with certain concentration of target

To show the selectivity of biosensor, DNA targets, including complementary, non-complementary were used in this work. There was no decrease of the current corresponding to NQ after reaction with DNAC target, which demonstrates any non-specific interactions, while the incubation with DNAC target in the lower concentration showed a large variation.

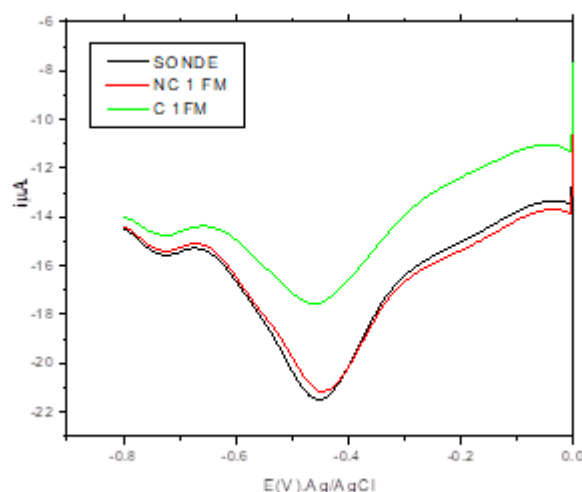


Figure 59 SWV present the results obtained for non-specific interactions compared to specific one. Black curves show voltammogram of biosensor after formation, red curves show response of biosensor after incubation in solution of 1fM DNA NC target, and green curves show response of biosensor after incubation in 1fM of DNAC target.

3.3.2.7. Detection in real sample of *M. Tuberculosis* and resistant strand

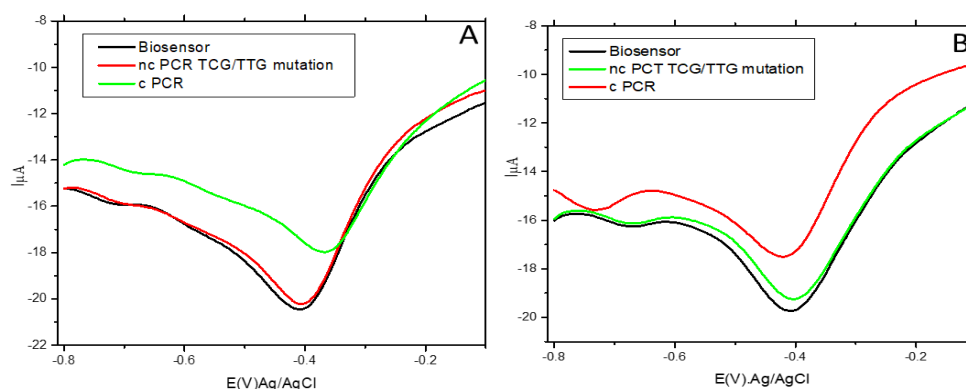


Figure 60 A) SWV show detection of PCR samples of 411 bases with (c PCR) and without (nc PCR) complementary sequence by using a normal biosensor, B) SWV show detection of PCR samples of 411 bases with (c PCR) and without (nc PCR) complementary sequence by using a mutated DNA biosensor.

The hybridization reaction with biosensor bearing sequence specific DNA or DNA probe mutated TCG/TTG, to white type stand or mutated strand with one mismatch TCG/TTG, show a very high selectivity. Biosensors based on ns-PPy-PAMAM-NQ was able to measure real sample extracted

from mycobacterium tuberculosis and demonstrated high selectivity with single base mismatch discrimination.

Table 13 comparison of sensibility of different morphology of polypyrrole used like transducer for detection of DNA of tuberculose.

Materials	Detection limit (fM)	references
Poly-pyrrole nanowires	0.00036	Previous work (chapitre1)
Poly-pyrrole compact 2-D film	0.4	[7]
Nanotubes de carbones	0.3	[8]
Poly-pyrrole nanospheres (electrochemical synthesis)	0.0062	This work (section A)
Polypyrrole nanospheres (chemical synthesis)	0.0091	This work (section B)

This table show the different LOD for different biosensors based on different morphology of PPy. We can see that in case nanostructure the LOD value decrease compared to other structure. the nanostructure layer's surface morphology lead to an increase in surface area compared to a flat surface. Due to this morphology and excellent conducting properties, the nanostructure layer exhibited ultrasensitive performance with excellent specificity on DNA target of PCR sample. This result confirms that using nanostructure as transducer materials lead to improve the performance of biosensors.

3.4. Conclusion:

The performance of these biosensors based on polypyrrole nanospheres for DNA detection shows a sensitivity level comparable to those of nanowires with a high sensitivity on the order of attomolar. A high selectivity and a high capacity to discriminate the gene rpoB M. tuberculosis gene mutated with a unique polymorphism was reported. Nevertheless, it has not been demonstrated that there is a large difference in sensitivity between these two types of biosensors according to the nanosphere synthesizing methods. It is however interesting to note that whatever the redox potential of the probe, the electron transfer properties through the polypyrrole are unmodified. This may be related to the conductivity range of the polypyrrole or to the conductive nature of polypyrrole over a wide range of potential.

References:

- [1] K. Kłucińska, E. Jaworska, P. Gryczan, K. Maksymiuk, et A. Michalska, « Synthesis of conducting polymer nanospheres of high electrochemical activity », *Chem. Commun.*, vol. 51, n° 63, p. 12645-12648, 2015.
- [2] C. Shen, Y. Sun, W. Yao, et Y. Lu, « Facile synthesis of polypyrrole nanospheres and their carbonized products for potential application in high-performance supercapacitors », *Polymer*, vol. 55, n° 12, p. 2817-2824, juin 2014.
- [3] Y. Li, G. Li, H. Peng, et K. Chen, « Facile synthesis of electroactive polypyrrole–chitosan composite nanospheres with controllable diameters », *Polym. Int.*, vol. 60, n° 4, p. 647-651, avr. 2011.
- [4] Z. Liu, Y. Liu, S. Poyraz, et X. Zhang, « Green-nano approach to nanostructured polypyrrole », *Chem. Commun.*, vol. 47, n° 15, p. 4421-4423, mars 2011.
- [5] S. Carquigny, J.-B. Sanchez, F. Berger, B. Lakard, et F. Lallemand, « Ammonia gas sensor based on electrosynthesized polypyrrole films », *Talanta*, vol. 78, n° 1, p. 199-206, avr. 2009.
- [6] E. C. Landis et R. J. Hamers, « Covalent Grafting of Ferrocene to Vertically Aligned Carbon Nanofibers: Electron-transfer Processes at Nanostructured Electrodes », *J. Phys. Chem. C*, vol. 112, n° 43, p. 16910-16918, oct. 2008.
- [7] A. Miodek, N. Mejri-Omrani, R. Khoder, et H. Korri-Yousoufi, « Electrochemical functionalization of polypyrrole through amine oxidation of poly(amidoamine) dendrimers: Application to DNA biosensor », *Talanta*, vol. 154, n° Supplement C, p. 446-454, juill. 2016.
- [8] A. Miodek, N. Mejri, M. Gomgnimbou, C. Sola, et H. Korri-Yousoufi, « E-DNA Sensor of Mycobacterium tuberculosis Based on Electrochemical Assembly of Nanomaterials (MWCNTs/PPy/PAMAM) », *Anal. Chem.*, vol. 87, n° 18, p. 9257-9264, sept. 2015.

Conclusion Générale:

L'objectif des travaux de thèse présentés dans ce manuscrit fut de développer des biocapteurs sensibles afin de détecter l'ADN de diverses maladies infectieuses, telles que la tuberculose et l'hépatite C. Ces biocapteurs ont été formés à base de nanostructures de polypyrrole et qui jouent le rôle de transducteur moléculaire. L'utilisation de ce matériau a pour but l'immobilisation des biomolécules, le transfert d'électrons et la quantification de cette réaction. Dans les travaux effectués, nous avons étudiés plusieurs aspects. D'une part, la synthèse et la caractérisation de différentes structures de polypyrroles conducteurs avec différentes morphologies nanofils et nanosphère. D'autre part, l'étude de la fonctionnalisation de ces nanostructures par électro-greffage par oxydation d'amine de différentes chaîne linéaire et ramifiée pour introduire des sondes redox le ferrocène ou la naphthoquinone. Ces deux sondes se caractérisent par des systèmes réversibles et des potentiels redox différents qui sont respectivement 0.2 et -0.3 V/ECS. Ces sondes redox ont permis de suivre les cinétiques de transfert d'électrons dans les différentes nanostructures formées et d'évaluer les propriétés électriques des couches formées. Nous avons ainsi montré que la sonde redox ferrocène liée aux polypyrrole avec la structure nanofils possède un potentiel redox plus bas de 85 mV par rapport aux films de polypyrrole compact. De même la constante de transferts d'électrons est 5 fois plus importante dans le cas des nanofils par rapport aux films de polypyrrole compact.

Dans le cas des polypyrroles synthétisés sous forme de nanosphère, l'impact de la méthode de synthèse sur la taille des particules formées a été étudié. La synthèse par voie électrochimique permet d'obtenir des nanoparticules de tailles plus importantes déposées directement sur la surface de l'électrode. Les nanoparticules synthétisées par voie chimiques présentent des tailles plus faibles et sont obtenus sous forme de dispersion en solution et déposé par la suite sur la surface.

Ces études ont permis de montrer que les propriétés électriques des nanosphères de polypyrroles obtenues après fonctionnalisation sont également améliorées par rapport aux structures compacts du polypyrrole.

La construction de biocapteur basé sur ces nanostructures de polypyrrole conducteur a été effectuée et comparée par rapport au film compact. Le biocapteur à base de nanofils de polypyrrole a montré une meilleure sensibilité que celui du biocapteur à base de polypyrrole couche compact la limite de détection est passé de 1fM au 36 atomolaire dans le cas des biocapteurs formées avec les

nanofils. La cause de cette augmentation de sensibilité est expliquée par la surface du biocapteur basé sur des nanofils de polypyrrole qui possède une plus grande surface spécifique ce qui permet d'avoir une plus grande quantité de biomolécules d'ADN sondes immobilisées. On peut également penser que les propriétés superhydrophile de polypyrrole nanofils, peuvent améliorer la réaction d'hybridation qui a lieu à l'interface, où un environnement hydrophile favorise la diffusion des oligonucléotides cible à la surface du polypyrrole, contrairement aux films de polypyrrole compacte.

L'impact de la taille de la nanosphère et de la méthode de synthèse sur la quantité de molécules immobilisées et l'effets sur les performances des biocapteurs sont analysées et discutées.

Le premier biocapteur est réalisé à base de nanosphère de polypyrrole synthétisé par voie électrochimique en utilisant le ferrocène comme sonde redox. Le second à base de nanosphère de polypyrrole synthétisé chimiquement et en fonctionnalisant avec la naphthoquinone comme sonde redox. Les résultats sur leurs performances pour la détection de l'ADN montrent des sensibilités comparables à ceux des nanofils avec une grande sensibilité de l'ordre de atomolaire, une grande sélectivité et une grande capacité à discriminer le gène *rpoB* de *M. Tuberculosis* du gène muté avec un polymorphisme unique. Néanmoins, il n'a pas été démontré qu'il existe une grande différence de sensibilité entre ces deux types de biocapteurs selon la méthode de synthèse des nanosphères ou de la sonde redox associée. Il est cependant intéressant de noter que quelque soit le potentiel redox de la sonde les propriétés de transfert d'électron à travers le polypyrrole sont non modifiées. Ceci peut être liée à la gamme de conductivité du polypyrrole ou son caractère conducteur sur une large gamme de potentiel.

Nous avons donc, montré à travers ces études l'influence de la morphologie sous forme de nanostructures sur ses propriétés électriques et sur sa capacité à utiliser toute sa surface pour immobiliser des molécules et biomolécules. On a pu démontrer que la morphologie nanostructure du polypyrrole (nanofils, nanosphère) joue un rôle important dans la sensibilité du biocapteur du fait de l'accroissement de la surface active et de son caractère superhydrophile. Cependant aucune variation notable dans la sensibilité des biocapteurs n'est obtenue entre les nano-sphère et les nano-fils.

De tels biocapteurs sont capables de détecter avec succès l'ADN génomique dans les échantillons contenant des agents pathogènes de *M. Tuberculosis* après amplification de l'ADN du *rpoB* gène par PCR. Cette étude nous a également permis de démontrer la sélectivité de ce biocapteur ce qui rend possible de détecter et de différencier entre des souches sauvages et les souches



résistantes qui ne diffèrent que par une seule mutation. Nous avons de surcroît démontré que la sélectivité potentielle de ce biocapteur électrochimique se déploie à la fois dans le diagnostic des pathogènes et dans le fait de pouvoir détecter une mutation responsable de la résistance aux traitement antibiotique.

En perspective, il serait intéressant d'effectuer une étude systématique sur la taille optimale de nanofils de PPy en utilisant d'autre approches de synthèse de nanostructures de polypyrroles qui permettent un meilleur contrôle de la taille des nanofils et leurs organisations en surfaces tels que les méthodes par nano-impression. L'impact de l'utilisation de différentes sondes redox sur la sensibilité des différents biocapteurs chaque biocapteur avec différentes morphologies.

List of abbreviations

aM	: atomolair
C	: Complementary
CPE	: Constant Phase Element
CV	: Cyclic Voltammetry
EDA	: Ethylenediamine
EIS	: Electrochemical Impedence Spectroscopy
Fc	: Ferrocene
fM	: Femtomolair
FT-IR	: Fourier Transform infrared spectra
fwhm	: Full width at half-maximum
Ks	: Rate of heterogeneous electron transfer
LOD	: Limite of detection
NQ	: Naphtoquinone
Ns-PPy	: Polypyrrole nanospheres
Nw-PPy	: Polypyrrole nanowires
PAMAM	: Poly-(amidoamine)
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PPy	: Polypyrrole
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
SWV	: Square wave
Wt	: Wild-type
XPS	: X ray photoelectron spectroscopy
<i>I</i>	: Surface coverage

APPENDIX : Experimental techniques

1. Electrochemical methods

1.1. Cyclic voltammetry (CV)

The general principle of cyclic voltammetry is to obtain a signal (current) from the system studied to the constraint responsible for the production of electrochemical reaction(s) by imposing and gradually varying the electrode potential E (potential sweep). This technique allows to identify and quantitatively measure a large number of compounds (cations, some anions, organic compounds), and also to study chemical reactions including these compounds.

Cyclic voltammetry measurements are carried out by performing linear potential sweeps around a given position and any apparition and/or disappearances of electrochemical reactions (oxidation and/or reduction) are noted. Some parameters such as scanning speed, can account for the reversibility of some reactions. In other words, as illustrated by the shape of the potential (Figure 1), the potential scan that follows produces a peak current for all analytes that can be reduced in the range of the potential sweep. The current increases when the potential reaches the oxidation potential of the analyte, then drops as the concentration of the analyte is declining around the surface of the electrode. When the applied potential is reversed, it will reach the potential that will reduce the product formed in the first oxidation reaction, and produce a current of reverse polarity at the next scan.

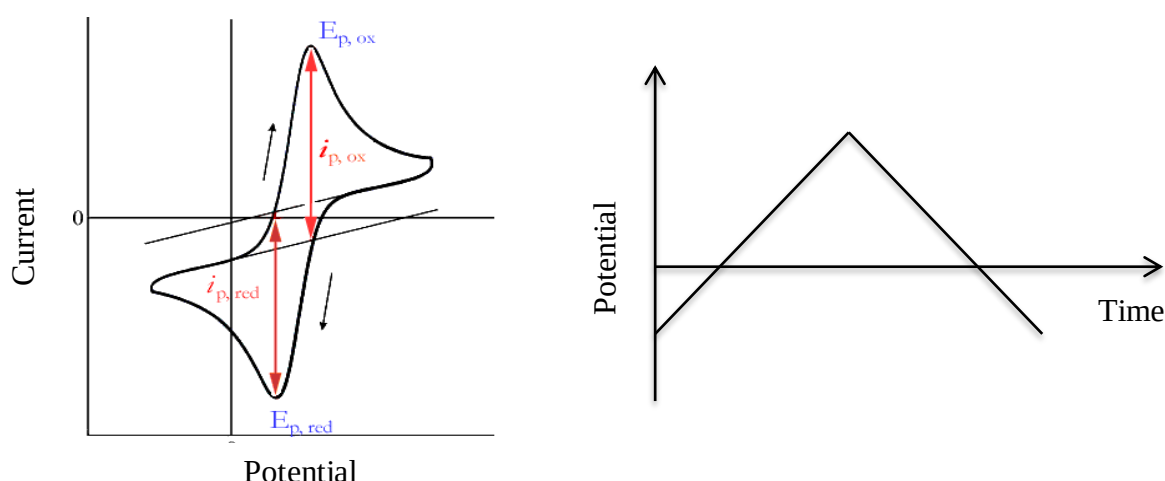


Figure 1. Voltamogramme of a redox reaction diffusing in solution (left); Shape of the potential imposed by cyclic voltammetry $E = f(t)$ (right)

The current, I , in the circuit is measured either continuously or at specific times. This current corresponds to the electronic transfer allowing reduction of metal ions on the surface of the electrode (cathode) and is mainly the sum of two distinct currents: faradic current, I_f , and capacitive current, I_c :

$$I = I_f + I_c$$

I_f results from the redox reactions of the analytes at the electrode/ solution interface and is the major component for quantitative analysis of test compounds. I_f can be influenced by the speed of various processes, in particular:

The mass transfer rate (diffusion) of the oxidized electroactive species in the solution towards the electrode (and vice versa for a reduced species);

The rate of electron transfer at the electrode / solution interface;

The rate of the chemical reactions preceding or following the electron transfer.

The slowest process determines the flow rate of faradic current. It is important to consider the relative rates of these processes compared to the rate at which the system is disturbed experimentally (scan rate of $E = f(t)$). Thus, the current I is not only a function the potential E , but also of time, t . I_c is due to the charge of the capacitor represented by the interface between the surface layer of the electrode and the adjacent layer of the solution. The capacitive current depends on the surface of the electrode, the rate of change of potential with time and the composition of the medium, but not on the concentration of the test compound.

1.2. Square Wave Voltammetry

The excitation signal in square wave voltammetry consists of a symmetrical square wave pulse of amplitude E_{sw} superimposed on a staircase wave of step height ΔE and period t , where the forward pulse of the square wave coincides with the staircase step. The net current, i_{net} , is obtained by taking the difference between the forward and reverse currents ($i_{tot} - i_{rev}$) and is centered on the redox potential (Figure 3). The peak height is directly proportional to the concentration of the electroactive species.

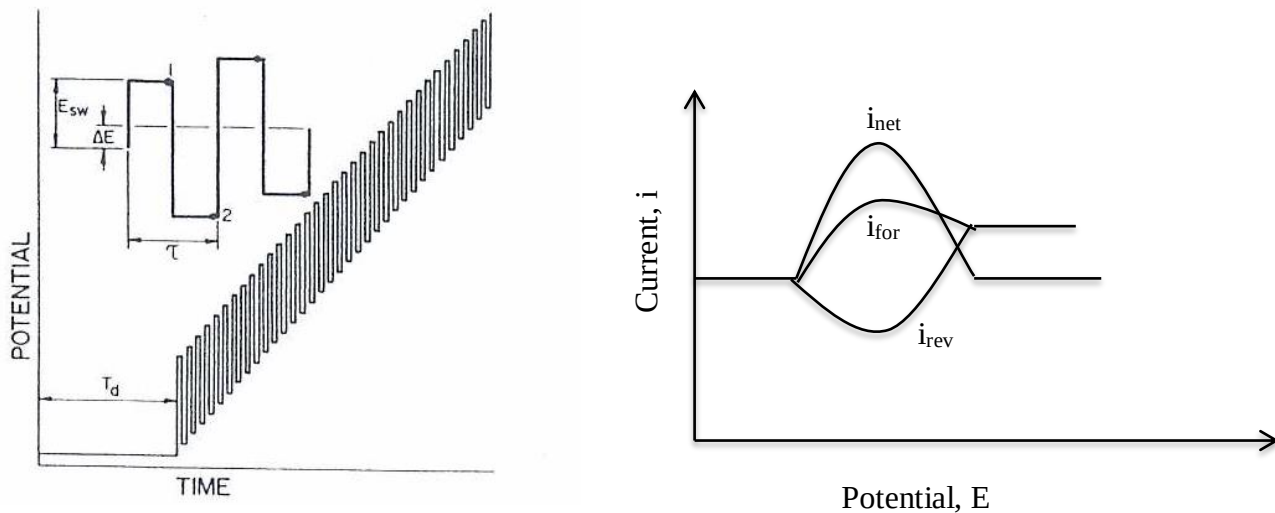


Figure 3. SWV: Potential variation profile, $E=f(t)$ (left) ; Current variation voltammogram profile, $i=f(E)$ (right)

1.3. Chronoamperometry

Chronoamperometry consists in monitoring the current as a function of time when the system is subject to a surge voltage. At fixed potential, the change in current density as a function of time $i = f(t)$ leads to the technique called chronoamperometry (Figure 4). When the voltage is high enough, $i = f(t)$ is expressed by the Cottrell equation:

$$I_{lim} = \frac{nFAC_0D}{\pi t}$$

where I_{lim} is the current diffusion limit, n is the number of electrons, F is the Faraday constant, A is the area of the electrode (cm^2), C_0 is the initial concentration of the analyte and D is the diffusion coefficient.

If an electroactive species is oxidized or reduced at the applied potential, a variation in the current density is observed with time. The area under the curve $I = f(t)$ represents the total electricity (Q) passing through the interface. This charge, expressed in coulomb, is related to the amount of species consumed during electrolysis.

$$Q = \int_0^t I(t)dt$$

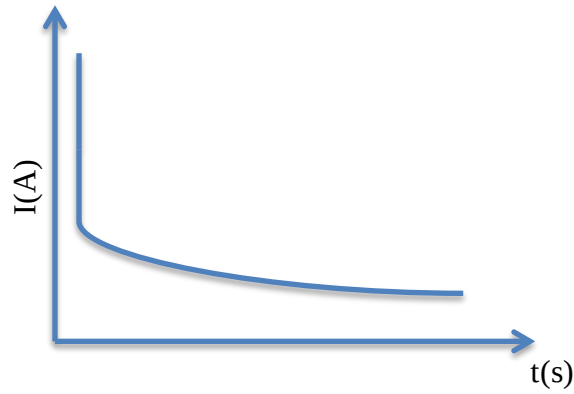


Figure 4. Chronoamperometry: Profile of the variation of the current density i in function of time t

1.4. Electrochemical impedance spectroscopy

The basic principle of electrochemical impedance is to apply to a system a stationary potential with a low amplitude sinusoidal disturbance with fixed frequency modulation. The electrochemical system now in stable condition and this low level disturbance makes it possible to separate the different reactions having different kinetics.

Most electrochemical systems usually have a nonlinear characteristic current-voltage curve. However, we can consider that we have a linear relationship between current and voltage when working only on a small portion of this curve. Therefore, applying to the system a low amplitude sinusoidal perturbation ΔE around a stationary potential E_s , the current also will be sinusoidal of low amplitude ΔI around a stationary value I_s .

By definition, for a linear system, there is a linear relation between ΔV and ΔI . We can then introduce the transfer function $\frac{\Delta E}{\Delta I}(\omega)$ called electrochemical impedance $Z(\omega)$ where $\omega = 2\pi f$ is the angular frequency and f is the frequency. The electrochemical impedance $Z(\omega)$ is a complex number that can be represented either in polar coordinates ($|Z|, \varphi$) or Cartesian coordinates ($\text{Re } Z, \text{Im } Z$).

$$Z(\omega) = |Z|e^{j\varphi} = \text{Re } Z + j \text{Im } Z$$

where $\text{Re } Z = |Z| \cos \varphi$ and $\text{Im } Z = |Z| \sin \varphi$

$|Z| = \frac{\Delta E}{\Delta I}$; j is the complex number ($j^2 = -1$); ϕ is the phase difference between ΔE and ΔI ; $\text{Re } Z$ and $\text{Im } Z$ are the real and imaginary parts of $Z(\omega)$ respectively.

Spectroscopic methods

2.1. Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATF - FTIR)

Infrared spectroscopy has been a workhorse technique for materials analysis in the laboratory for over seventy years. An infrared spectrum represents a fingerprint of a sample with absorption peaks, which correspond to the frequencies of vibrations between the bonds of the atoms making up the material. Because each different material is a unique combination of atoms, no two compounds produce the exact same infrared spectrum. Therefore, infrared spectroscopy can result in a positive identification (qualitative analysis) of every different kind of material. In addition, the size of the peaks in the spectrum is a direct indication of the amount of material present. With modern software algorithms, infrared is an excellent tool for quantitative analysis.

Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectrometry was developed in order to overcome the limitations encountered with dispersive instruments. The main difficulty was the slow scanning process. A method for measuring all of the infrared frequencies simultaneously, rather than individually, was needed. A solution was developed which employed a very simple optical device called an interferometer. The interferometer produces a unique type of signal, which has all of the infrared frequencies “encoded” into it. The signal can be measured very quickly, usually on the order of one second or so. Thus, the time element per sample is reduced to a matter of a few seconds rather than several minutes. Most interferometers employ a beamsplitter which takes the incoming infrared beam and divides it into two optical beams. One beam reflects off of a flat mirror which is fixed in place. The other beam reflects off of a flat mirror which is on a mechanism which allows this mirror to move a very short distance (typically a few millimeters) away from the beamsplitter. The two beams reflect off of their respective mirrors and are recombined when they meet back at the beamsplitter. Because the path that one beam travels is a fixed length and the other is constantly changing as its mirror moves, the signal which exits the interferometer is the result of these two beams “interfering” with each other. The resulting signal is called an interferogram which has the unique property that every data point (a function of the moving mirror position) which makes up the signal has information about every infrared frequency which comes from the source. This means

that as the interferogram is measured, all frequencies are being measured simultaneously. Thus, the use of the interferometer results in extremely fast measurements.

Because the analyst requires a frequency spectrum (a plot of the intensity at each individual frequency) in order to make an identification, the measured interferogram signal can not be interpreted directly. A means of “decoding” the individual frequencies is required. This can be accomplished via a well-known mathematical technique called the Fourier transformation. This transformation is performed by the computer which then presents the user with the desired spectral information for analysis.

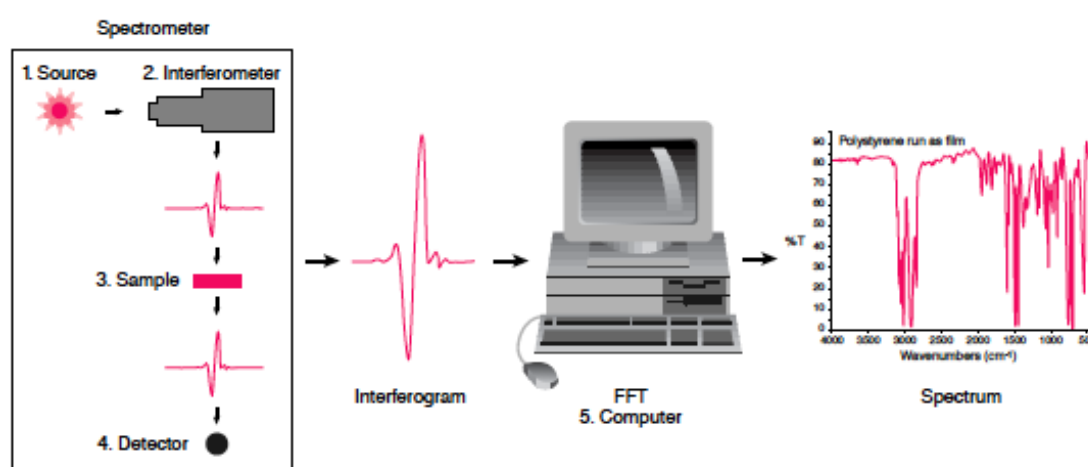


Figure 8. Analysis process of a sample by FTIR and application of Fast Fourier Transform (FFT) algorithm to interferogram

Attenuated total reflectance (ATR) is a sampling technique used in conjunction with FTIR spectroscopy which enables the study of thin films, powders, surface of bulk materials, polymers, and strongly absorbing solutions. The main distinction of ATR-FTIR from other spectroscopic techniques is that it depends on total internal reflection and attenuation of a total reflection.

The basic principle is shown in Figure 9. The ATR crystal comprises an IR transparent material with a high refractive index and polished surfaces.

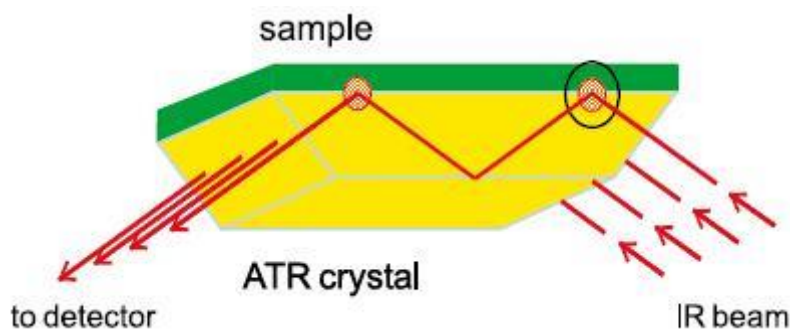


Figure 61. Attenuated Total Reflectance (ATR) principle

As shown in the image, the infrared beam enters the ATR crystal at an angle of typically 45° (relative to the crystal surface) and is totally reflected at the crystal to sample interface. Because of its wave-like properties, the light is not reflected directly by the boundary surface but by a virtual layer within the optically less dense sample (Goos-Hänchen effect, Figure 10). The fraction of light reaching into the sample is known as evanescent wave. Its penetration depth depends on the wavelength, the refractive indices of the ATR crystal and the sample and the angle of the entering light beam. It is typically of the order of a few microns (ca. $0.5 - 3 \mu\text{m}$). In the spectral regions where the sample absorbs energy, the evanescent wave is attenuated. After one or several internal reflections, the IR beam exits the ATR crystal and is directed to the IR-detector.

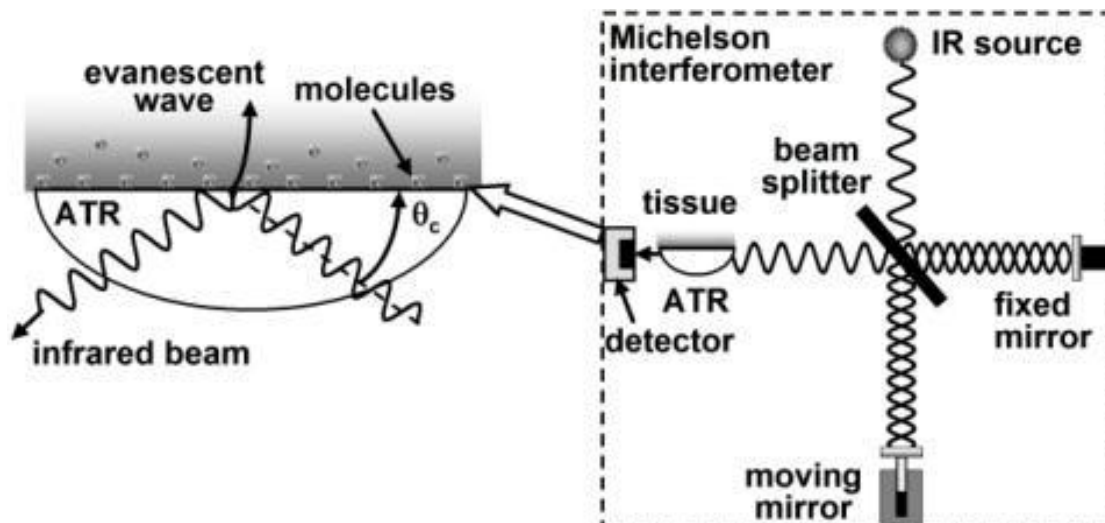


Figure 9. ATR effect (left) and detection of reflected IR beam by FTIR (right)

2.2. X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)

Photoelectron spectroscopy utilizes photo-ionization and analysis of the kinetic energy distribution of the emitted photoelectrons to study the composition and electronic state of the surface region of a sample.

Traditionally, when the technique has been used for surface studies it has been subdivided according to the source of exciting radiation into:

X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) - using soft x-rays (with a photon energy of 200-2000 eV) to examine core-levels.

Ultraviolet Photoelectron Spectroscopy (UPS) - using vacuum UV radiation (with a photon energy of 10-45 eV) to examine valence levels.

In XPS the photon is absorbed by an atom in a molecule or solid, leading to ionization and the emission of a core (inner shell) electron. The relationship governing the interaction of a photon with a core level is:

$$KE = h\nu - BE - e\Phi$$

where KE = Kinetic Energy of ejected photoelectron

$h\nu$ = characteristic energy of X-ray photon

BE = Binding Energy of the atomic orbital from which the electron originates.

$e\Phi$ = spectrometer work function

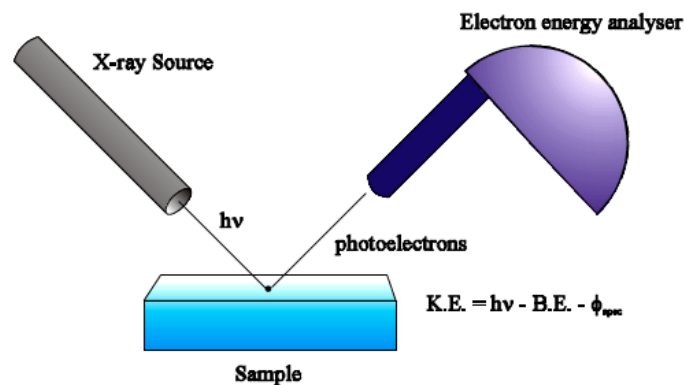


Figure 10. Analysis by XPS

For each and every element, there will be a characteristic binding energy associated with each core atomic orbital i.e. each element will give rise to a characteristic set of peaks in the photoelectron spectrum at kinetic energies determined by the photon energy and the respective binding energies. The presence of peaks at particular energies therefore indicates the presence of a specific element in the sample under study - furthermore, the intensity of the peaks is related to the concentration of the element within the sampled region. Thus, the technique provides a quantitative analysis of the surface.

The most commonly employed x-ray sources are those giving rise to:

Mg $K\alpha$ radiation : $h\nu = 1253.6$ eV and Al $K\alpha$ radiation : $h\nu = 1486.6$ eV

The emitted photoelectrons will therefore have kinetic energies in the range of ca. 0 - 1250 eV or 0 - 1480 eV.

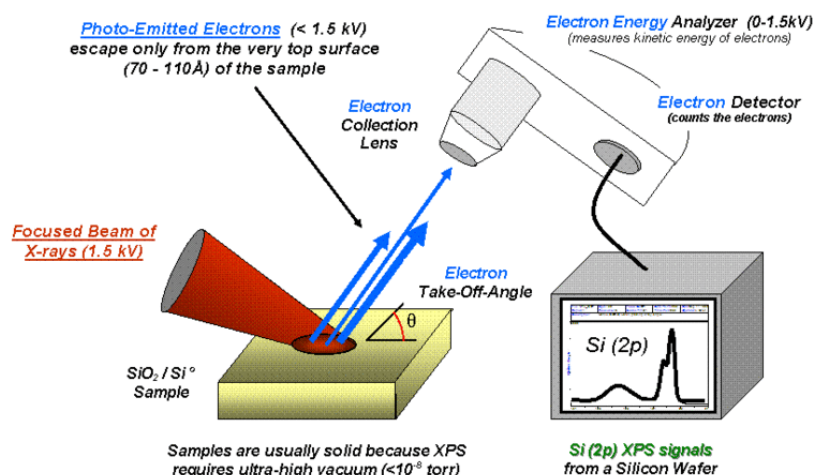


Figure 11. Basic components of a XPS system

2.3. Dynamic Light Scattering (DLS)

Dynamic Light Scattering (DLS), also called Quasi-Elastic Light Scattering (QELS) or Photon-Correlation Spectroscopy (PCS), is a widely used, non-invasive technique to measure the size and size distribution of proteins, particles and other molecules in solution. In DLS light intensity fluctuations taking place at microsecond or millisecond scales are measured. Those fluctuations are a measure of the diffusion constant (Brownian motion) of the molecules and are related to the hydrodynamic radius (size of molecule) of a molecule. The Stokes-Einstein relation that connects diffusion coefficient measured by dynamic light scattering to particle size:

$$D_h = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_t}$$

where D_h = the hydrodynamic diameter

D_t = the translational diffusion coefficient (we find this by dynamic light scattering)

k_B = Boltzmann's constant (we know this)

T = thermodynamic temperature (we control this)

η = dynamic viscosity (we know this)

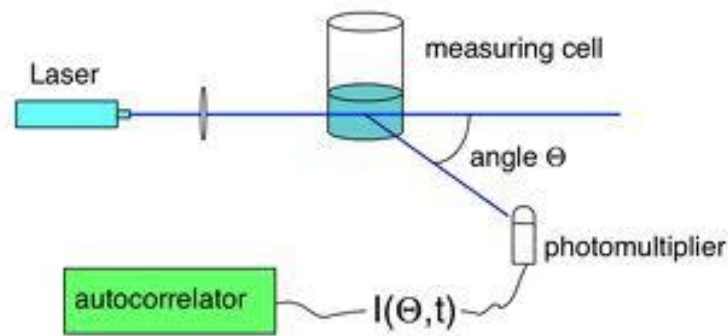


Figure 12. Schematic diagram of DLS

3. Microscopic methods

3.1. Atomic Force Microscopy

The atomic force microscope (AFM) (Figure 15) is one kind of scanning probe microscopes (SPM). SPMs are designed to measure local properties, such as height, friction, magnetism, with a probe. To acquire an image, the SPM raster-scans the probe over a small area of the sample, measuring the local property simultaneously.

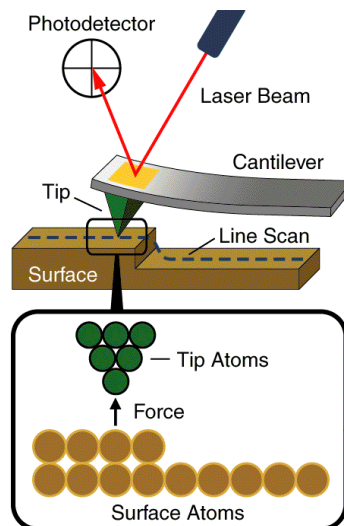


Figure 14. Principle of AFM

AFMs operate by measuring force between a probe and the sample. Normally, the probe is a sharp tip, which is a 3-6 μm tall pyramid with 15-40nm end radius (Figure 16). Though the lateral resolution of AFM is low ($\sim 30\text{nm}$) due to the convolution, the vertical resolution can be up to 0.1nm.

To acquire the image resolution, AFMs can generally measure the vertical and lateral deflections of the cantilever by using the optical lever. The optical lever operates by reflecting a laser beam off the cantilever. The reflected laser beam strikes a position-sensitive photo-detector consisting of four-segment photo-detector. The differences between the segments of photo-detector of signals indicate the position of the laser spot on the detector and thus the angular deflections of the cantilever (Figure 16).

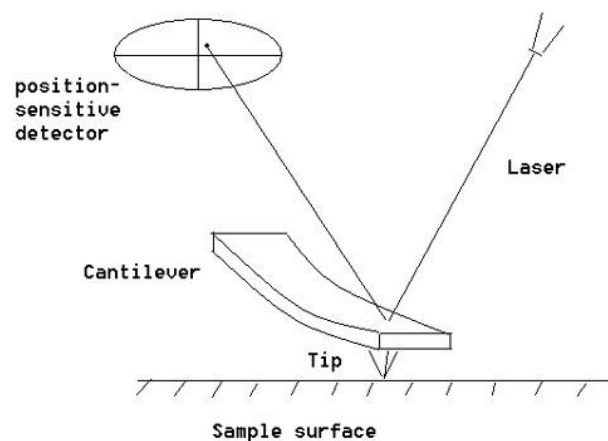


Figure 15. AFM working with an optical lever

Piezo-ceramics position the tip with high resolution. Piezoelectric ceramics are a class of materials that expand or contract when in the presence of a voltage gradient. Piezo-ceramics make it possible to create three-dimensional positioning devices of arbitrarily high precision.

In contact mode, AFMs use feedback to regulate the force on the sample. The AFM not only measures the force on the sample but also regulates it, allowing acquisition of images at very low forces. The feedback loop consists of the tube scanner that controls the height of the tip; the cantilever and optical lever, which measures the local height of the sample; and a feedback circuit that attempts to keep the cantilever deflection constant by adjusting the voltage applied to the scanner. A well-constructed feedback loop is essential to microscope performance (Figure 18).

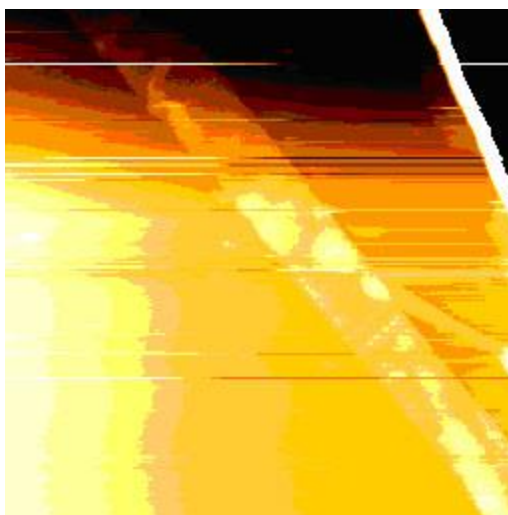


Figure 16. AFM images of ZnO nanobelt

3.2. Scanning Electron Microscope (SEM)

The scanning electron microscope (SEM) uses a focused beam of high-energy electrons to generate a variety of signals at the surface of solid specimens. The signals that derive from electron-sample interactions reveal information about the sample including external morphology (texture), chemical composition, and crystalline structure and orientation of materials making up the sample. In most applications, data are collected over a selected area of the surface of the sample, and a 2-dimensional image is generated that displays spatial variations in these properties. Areas ranging from approximately 1 cm to 5 microns in width can be imaged in a scanning mode using conventional SEM techniques (magnification ranging from 20X to approximately 30,000X, spatial resolution of 50 to 100 nm). The SEM is also capable of performing analyses of selected point locations on the sample; this approach is especially useful in qualitatively or semi-quantitatively determining chemical compositions, crystalline structure, and crystal orientations.

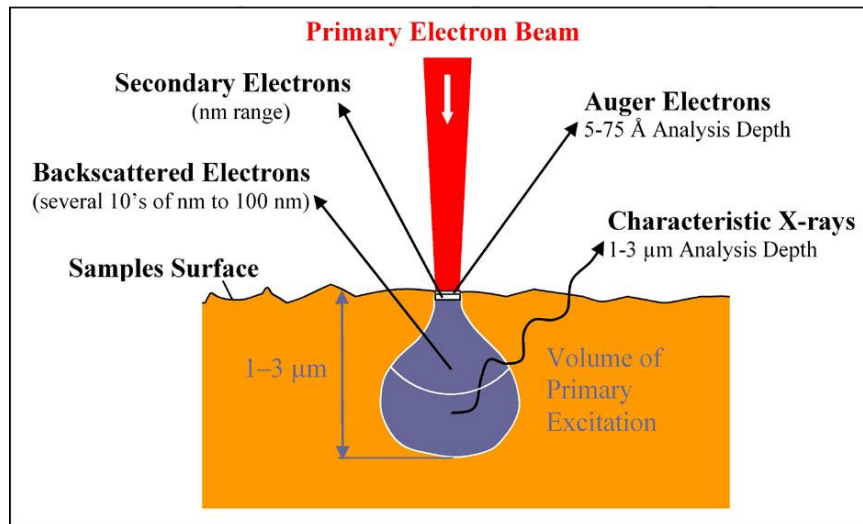


Figure 17. Radiation emitted by the atoms under the influence of an electron beam

Titre : Elaboration de biocapteurs électrochimiques d'ADN à base de nano-structure de polypyrrole pour le diagnostic de la tuberculose

Mots clés : Biocapteur, Mycobacterium tuberculosis, ADN, nanostructure

Resume: La tuberculose est une maladie contagieuse qui s'attaque habituellement aux poumons, mais parfois aussi à d'autres parties du corps, comme les reins, les ganglions et les os. La tuberculose tue près 1,8 millions de personnes chaque année dans le monde. Il y a par conséquent un besoin urgent de mettre des moyens analytiques pour détecter l'ADN de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis*, responsable de la propagation de la tuberculose. La recherche développée dans le cadre de cette thèse consiste en l'élaboration d'un outil de diagnostic pour la détection d'ADN génomique de bactérie *M. Tuberculosis* après la lyse et amplification par PCR. Dans cette perspective, nous nous sommes intéressés au développement des biocapteurs basés sur des différentes morphologies de polypyrrole comme transducteur pour la détection électrochimique d'ADN du gène *rpob* de *Mycobacterium tuberculosis*. Une étude de l'impact des différentes morphologies sur les propriétés électriques des matériaux et également sur les performances des biocapteurs électrochimiques d'ADN a été effectuée. Nous avons aussi étudié l'effet de la fonctionnalisation par différentes chaîne linéaire et ramifiée sur la structure des nanomatériaux de polypyrroles et leurs effets sur la quantité de biomolécules immobilisées. La stratégie adoptée pour le développement de ces matériaux est une construction du biocapteur réalisée étape par étape. Les différentes couches le constituant ont été caractérisées par différentes techniques de surface, telles que les techniques électrochimiques et optiques, la microscopie électronique à balayage et la microscopie électronique à force atomique.

Les propriétés des biocapteurs ont été suivies à travers des différentes propriétés redox des groupes ferrocényles et naphthoquinone. La détection électrochimique de l'ADN cible évaluée avec ces biocapteurs à base de polypyrrole nanostructure montre une sensibilité de détection plus élevée que celle du biocapteur à base de polypyrrole couche compacte. Cela démontre le potentiel d'utilisation de la surface élevée des nanostructures polypyrrole comme transducteur et l'utilisation des approches de modification douce. Les biocapteurs ont été appliqués à la détection de l'ADN dans des échantillons réels d'ADN génomique de *Mycobacterium tuberculosis* et de l'ADN muté présentant la résistance de la rifampicine. Les biocapteurs basés sur des nanostructures de polypyrrole démontre une application potentielle dans la détection d'ADN et la capacité à discriminer le gène *rpoB* du mutant et pourrait être utilisé comme plate-forme dans la technologie des biocapteurs.

Title : Elaboration of electrochemical DNA biosensors based on polypyrrole nano-structure for the diagnosis of tuberculosis

Keywords : Biosensors, DNA, Mycobacterium tuberculosis, nanostructure.

Abstract: Tuberculosis is a contagious disease that usually attacks the lungs but can sometimes reach other parts of the body such as the kidneys, ganglia and bones. This disease is responsible for killing nearly 1.8 million people each year worldwide. Therefore, we have an urgent need to put analytical means to detect the DNA of the bacterium Mycobacterium tuberculosis, responsible for the spread of tuberculosis. The research developed in this thesis consists in the development of a diagnostic tool for the detection of genomic DNA of M.Tuberculosis bacteria after lysis and amplification by PCR.

In this perspective, we focused on the development of biosensors based on different polypyrrole morphologies as transducers for the electrochemical detection of DNA of the rpoB gene of Mycobacterium tuberculosis. A study of the impact of different morphologies on the electrical properties of materials as well as the performance of electrochemical DNA biosensors was carried out. We also studied the effect of the functionalization by different linear and branched chains on the structure of polypyrrole nanomaterials and their effects on the number of immobilized biomolecules. The strategy adopted for the development of these materials is a biosensor construction carried out step by step. The various layers constituting it have been characterized by different surface techniques such as electrochemical and optical techniques, scanning electron microscopy and atomic force electron microscopy.

The properties of the biosensors were monitored through the redox properties of the ferrocenyl groups. The electrochemical detection of the target DNA evaluated with these biosensors based on polypyrrole nanostructure compared to the results obtained with a biosensor based on polypyrrole compact layer shows a higher detection sensitivity. This demonstrates a potential for using the high surface area of polypyrrole nanostructures as a transducer and the use of soft modification approaches. The biosensors were applied to the detection of DNA in real samples of genomic DNA of Mycobacterium tuberculosis and mutated DNA with resistance to rifampicin. The biosensors based on polypyrrole nanostructures demonstrate potential application in DNA detection and the ability to discriminate the mutant rpoB gene and could be used as a platform in biosensor technology.

