



HAL
open science

Réseaux de multicateurs électrochimiques pour la détection du monoxyde d'azote et de l'anion peroxynitrite en solution

Damien Quinton

► **To cite this version:**

Damien Quinton. Réseaux de multicateurs électrochimiques pour la détection du monoxyde d'azote et de l'anion peroxynitrite en solution. Chimie thérapeutique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. Français. NNT: . pastel-00661741

HAL Id: pastel-00661741

<https://pastel.hal.science/pastel-00661741>

Submitted on 20 Jan 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat
de
l'Université Pierre et Marie Curie
École doctorale de Chimie Moléculaire de Paris-Centre

Spécialité
Électrochimie analytique

Présentée par
Damien QUINTON

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

**Réseaux de multicateurs électrochimiques
pour la détection du monoxyde d'azote et de
l'anion peroxydinitrite en solution**

Soutenance prévue le 22 septembre 2011, devant le jury composé de :

M. Stéphane Arbault
M. Pierre Gros
M. Marcel Bouvet
Mme Anna Proust
M. Fethi Bedioui
Mlle Sophie Griveau

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Codirecteur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord Monsieur Daniel Scherman, directeur de recherche à l'INSERM, de m'avoir permis d'entreprendre mes recherches au sein de l'Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique & Imagerie à Chimie ParisTech.

Je tiens également à remercier Monsieur Jean Herscovici de m'avoir accueilli au sein de l'équipe Synthèse Organique, Imagerie et Electrochimie.

Mes remerciements vont également à Messieurs Stéphane Arbault et Pierre Gros, qui ont accepté d'examiner ce travail et d'en être les rapporteurs scientifiques. Je remercie également Madame Anna Proust et Monsieur Marcel Bouvet d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je remercie les personnes qui ont partagé mes manipulations, tout au long de ce travail. Anita qui m'a montré où chaque chose était rangée, et qui a tout de suite rendu la salle de manipulation chaleureuse. Vongani, avec qui j'ai passé deux semaines de travail en binôme très agréables. Et enfin Loan, qui a partagé nombre de détresses et de joies pendant un an, lors du travail sur les réseaux d'électrodes.

Je remercie toutes les personnes ayant participé à la fabrication des dits réseaux d'électrodes, à Rennes. Sans elles, une grande partie de ce travail n'aurait pas été possible. Je remercie en particulier Aurélie Girard, Laurent Griscom et Florence Razan pour ce travail, ainsi que pour leur accueil chaleureux à chacun de mes passages à Rennes.

Mes remerciements vont également à Céline Largeau et Virginie Escriou pour la culture des cellules biologiques et pour leur grande gentillesse et disponibilité.

Je remercie le professeur Tebello Nyokong et tout son laboratoire, qui m'ont donné une leçon d'hospitalité lors de mon séjour en Afrique du Sud. Ce fut une période particulièrement agréable de ma thèse.

Je remercie Laurent Thouin pour avoir gentiment répondu à mes nombreuses questions théoriques concernant la diffusion à la surface des ultramicroélectrodes. Je

remercie également Anna Proust et Anny Jutand pour les conversations agréables et tous leurs bons conseils au cours des réunions du comité de suivi doctoral.

Je souhaite remercier sincèrement toutes les personnes que j'ai côtoyées au sein du laboratoire durant ces trois années, que ce soit des gens de passage ou les permanents. J'ai vraiment apprécié l'ambiance du laboratoire et je m'y suis toujours senti soutenu, y compris par les personnes n'ayant aucun lien avec mon projet de recherche. J'ai particulièrement apprécié tous les goûters en commun autour d'un gâteau.

Je remercie plus particulièrement toutes les personnes ayant partagé mon bureau, avec une mention spéciale pour Claire, qui a été présente depuis le début et m'a donné pleins de petites astuces tout au long de ma thèse.

Je remercie également tous mes amis parisiens qui ont considérablement égayé ces trois années de thèse, en particulier mes colocataires Fred, Elsa et Niteen, les membres de l'association des thésards de l'école et tout le groupe de doctorants avec qui j'ai partagé de nombreuses soirées et autres repas campagnards. Un grand merci à mes deux physiciens préférés, Fred et FR.

Je tiens à finir en remerciant de tout mon cœur les deux personnes qui m'ont encadré au cours de cette thèse, sans qui ce travail n'aurait jamais été possible.

Tout d'abord Sophie Griveau, qui m'a initié à l'électrochimie pour la première fois, montré comment se servir d'un potentiostat et donné de précieuses habitudes concernant le rangement du laboratoire. Elle a toujours été de bon conseil, et je n'ai pas le souvenir d'une expérience qu'elle m'ait suggéré qui n'ait pas été utile par la suite. Mais surtout, grâce à sa gentillesse et sa bonne humeur, elle a rendu le travail au quotidien très agréable.

Enfin, je remercie profondément Fethi Bedioui, mon directeur de thèse. Il a toujours été très présent et répondu rapidement et efficacement à mes questions, lorsque je ne comprenais pas les données expérimentales. Je le remercie de ne jamais m'avoir imposé une expérience, et de m'avoir imposé de la rigueur dans l'organisation de mon travail. Il m'a permis de voyager en Afrique du Sud, et a toujours mis mon travail en avant. C'est enfin un homme avec de grandes qualités humaines.

Un grand merci à tous !

Résumé

Le monoxyde d'azote (NO^\bullet) et l'anion peroxydinitrite (ONOO^-) sont deux molécules jouant un rôle clé dans de nombreuses pathologies dont certains cancers, les maladies de Parkinson et Alzheimer, ainsi que les traumatismes crâniens. Ce travail décrit le développement de capteurs électrochimiques permettant la détection simultanée de ces deux analytes d'intérêt biologique. Pour atteindre cet objectif, des dispositifs intégrant plusieurs réseaux d'ultramicroélectrodes (UMEs) d'or ont été fabriqués, à l'aide de techniques photolithographiques. La caractérisation électrochimique de ces réseaux montre qu'ils permettent d'améliorer la sensibilité des mesures, en comparaison avec des UMEs individuelles. Afin de rendre la mesure de NO^\bullet sélective vis-à-vis des interférents biologiques, nous avons d'abord étudié l'influence de plusieurs types de membranes électropolymérisées à la surface des électrodes. Ceci nous a permis d'identifier une combinaison de membranes de polyeugénol et polyphénol conférant une bonne sélectivité au capteur. Par la suite, nous nous sommes intéressés à la mise au point d'une méthode de détection électrochimique de ONOO^- , basée sur la réduction de son acide conjugué à une électrode d'or non modifiée. À la suite de ces études, la détection électrochimique simultanée de NO^\bullet et ONOO^- a été réalisée dans des solutions synthétiques. Enfin, nous décrivons la détection de NO^\bullet produit par des cellules vivantes, les macrophages RAW 264.7.

Abstract

Nitric oxide (NO^\bullet) and peroxydinitrite (ONOO^-) are involved in several pathologies, including cancer, Parkinson and Alzheimer diseases, and traumatic brain injury. In this work, we describe the development of electrochemical sensors for the simultaneous detection of these two biologically relevant analytes. To meet this goal, we developed a device integrating several arrays of ultramicroelectrodes (UMEs), using photolithographic techniques. In comparison with individual UMEs, these arrays increase the sensitivity of the measurement, as shown by their electrochemical characterization. Several types of membranes, electropolymerized on top of the electrodes, were tested for their ability to enhance the selectivity of NO^\bullet measurement against biological interferents. Those studies allowed us to identify a combination of polyeugenol and polyphenol membranes that improves notably the sensor's selectivity. We also developed a strategy to electrochemically detect ONOO^- , based on the reduction of its conjugated acid on bare gold electrodes. Based on those approaches, the simultaneous electrochemical detection of NO^\bullet and ONOO^- from synthetic solutions was performed. Finally, we describe the detection of NO^\bullet produced by the RAW 264.7 macrophages cell line.

Liste des abréviations

A Aire d'une électrode

AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> (microscopie à force atomique)
Ag/AgCl	Argent recouvert de chlorure d'argent
AgCl	Chlorure d'argent
BH₄	Tétrahydrobioptérine
CaM	Calmoduline
cGMP	Guanosine monophosphate cyclique
C_i	Concentration initiale
CVD	<i>Chemical Vapour Deposition</i> (dépôt chimique en phase vapeur)
d	Distance centre-à-centre entre deux ultramicroélectrodes d'un réseau
D	Coefficient de diffusion
ε	Coefficient d'absorption
ECS	Électrode au calomel saturée
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor (facteur de relaxation dérivé de l'endothélium)
E_{PA}	Potentiel de pic anodique
E_{PC}	Potentiel de pic cathodique
F	Constante de Faraday
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FMN	Flavine mononucléotide
FNOCT	<i>Fluorescent Nitric Oxide cheletropic trap</i>
GC	Guanylate cyclase
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
i_{far}	Intensité du courant faradique
I_S	Intensité du courant stationnaire
K₄[Fe(CN)₆]	Hexacyanoferrate (II) de potassium
KCl	Chlorure de potassium
M	mol.L ⁻¹
n	Nombre d'électrons transférés lors d'une réaction électrochimique
N	Nombre d'ultramicroélectrodes dans un réseau
N₂	Diazote
N₂O	Protoxyde d'azote
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaOH	Hydroxyde de sodium
NO⁺	Cation nitrosonium
NO[•]	Monoxyde d'azote
NO₂⁻	Anion nitrite
NO₂[•]	Dioxyde d'azote
NO₃⁻	Anion nitrate
NOS	NO-synthétase
O₂^{-•}	Anion superoxyde
O₂NOO⁻	Anion peroxytriate
O₃	Ozone
ONOO⁻	Anion peroxytriate
ONOOH	Acide peroxytriate
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Tampon phosphate)
r	Rayon d'une électrode
r₀	Rayon d'une ultramicroélectrode
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RPE	Résonance paramagnétique électronique

rpm	Rotation par minute
R_{RMS}	Facteur de rugosité
[Ru(NH₃)₆]Cl₃	Chlorure d'hexaammineruthénium(III)
SECM	<i>Scanning ElectroChemical Microscopy</i> (Microscopie électrochimique à balayage)
<i>t</i>	Temps
UME	Ultramicroélectrode

Table des matières

Introduction générale	11
Chapitre 1. État de l'art : fonctions biologiques et méthodes de détection de NO[•] et ONOO⁻	13
1.1. Le monoxyde d'azote dans le corps humain	13
1.1.a. Découverte.....	13
1.1.b. Production endogène de NO [•]	15
1.1.c. Les propriétés et fonctions de NO [•] dans le corps humain	17
1.2. Le peroxynitrite dans le corps humain	20
1.2.a. Formation via la réaction de NO [•] avec O ₂ ⁻	20
1.2.b. Décomposition de l'anion peroxynitrite à pH neutre	21
1.2.c. Les effets du peroxynitrite dans l'organisme	22
1.3. Les méthodes de détection de NO[•] et ONOO⁻	24
1.3.a. La fluorescence.....	24
1.3.b. La chimiluminescence.....	28
1.3.c. La spectrophotométrie d'absorbance UV-Visible	30
1.3.d. La résonance paramagnétique électronique	32
1.3.e. Marquage biologique : cas de la tyrosine nitrée.....	33
1.3.f. Les méthodes électrochimiques	34
1.4. La détection électrochimique de NO[•] et ONOO⁻	36
1.4.a. La détection électrochimique de NO [•]	37
1.4.b. Détection opto-électrochimique	44
1.4.c. Détection électrochimique de l'anion peroxynitrite.....	44
1.4.d. Détection simultanée de NO [•] et ONOO ⁻	45
1.5. Conclusion de la partie bibliographique	47
Chapitre 2. Design, fabrication et caractérisation de réseaux d'UMEs	49
2.1. Les différents modes de diffusion pour des réseaux d'UMEs	50
2.1.a. La diffusion à une UME individuelle.....	51
2.1.b. La diffusion à un réseau d'UMEs.....	54

2.2. Fabrication des réseaux d'UMEs	57
2.3. Design des dispositifs capteurs	62
2.4. Conception du support	64
2.5. Caractérisation des réseaux d'UMEs	65
2.5.a. Caractérisation géométrique.....	65
2.5.b. Caractérisation électrochimique	67
2.5.c. L'électrode de référence.....	76

Chapitre 3. Détection électrochimique du monoxyde d'azote et du peroxydinitrite à un réseau d'UMEs

3.1. Détection électrochimique sélective du monoxyde d'azote	79
3.1.a. Introduction	79
3.1.b. La détection de NO^\bullet à une UME de platine non modifiée.....	80
3.1.c. La modification des électrodes.....	86
3.1.d. La sélectivité des membranes	89
3.2. Détection électrochimique sélective du peroxydinitrite	93
3.3. Détection simultanée de NO^\bullet et ONOO^- à l'aide de réseaux d'UMEs	101
3.3.a. Introduction.....	101
3.3.b. Détection sélective de NO^\bullet à un réseau d'UMEs.....	101
3.3.c. Détection sélective de ONOO^- à un réseau d'UMEs.....	108
3.3.d. Détection simultanée de NO^\bullet et ONOO^- à un réseau d'UMEs	109
3.4. Conclusion	111

Chapitre 4. Application des dispositifs capteurs à l'étude de macrophages

4.1. Introduction	113
4.2. Production de NO^\bullet par les macrophages RAW 264.7	113
4.3. Détection électrochimique de NO^\bullet produit par des cultures cellulaires	118
4.3.a. Description des conditions expérimentales.....	118
4.3.b. Mesures électrochimiques.....	120
4.4. Détection électrochimique de ONOO^- produit par des cultures cellulaires	125
4.5. Conclusion	126

Conclusion Générale	127
Liste des publications issues de ce travail	129
Bibliographie	131
Annexe 1. Matériel et méthodes	139
Annexe 2. Synthèse d'une phthalocyanine de manganèse	143

Introduction générale

Le monoxyde d'azote (NO[•]) est une petite molécule gazeuse qui joue de nombreux rôles dans les organismes vivants. Chez l'Homme, il est notamment impliqué dans la régulation de la pression sanguine, la neurotransmission et la réponse immunitaire. La production de NO[•] par les systèmes biologiques a été attestée pour la première fois en 1986 dans le système cardiovasculaire et les chercheurs à l'origine de cette découverte ont été récompensés en 1998 par le prix Nobel de physiologie ou médecine. Depuis, les efforts de recherche autour des fonctions de NO[•] dans le vivant ne cessent de s'intensifier.

En plus de son rôle dans le fonctionnement normal des organismes, il est maintenant connu que NO[•] influe sur de nombreuses pathologies comme l'angine de poitrine, les cancers, des dysfonctions cardiaques, l'impuissance sexuelle, l'ischémie et certaines maladies neurodégénératives dont les maladies d'Alzheimer et Parkinson. Pour un même type de pathologie, NO[•] peut avoir des effets protecteurs ou délétères, et des traitements basés sur la modification de sa concentration dans le corps humain n'ont pu être développés que pour un nombre limité de maladies. Il devient de plus en plus clair que les facteurs qui décident du rôle bénéfique ou délétère de NO[•] sont sa concentration et sa capacité à générer des espèces plus réactives et toxiques, et plus particulièrement l'anion peroxyde (ONOO⁻). *In vivo*, ONOO⁻ est produit par la réaction entre NO[•] et l'anion superoxyde (O₂^{•-}) présent lors d'un stress oxydant. ONOO⁻ est une espèce qui réagit avec de nombreuses molécules biologiques, provoquant des dommages pouvant entraîner la mort cellulaire.

L'objet de la thèse entre dans le cadre général d'un programme ANR destiné au développement de réseaux de microcapteurs électrochimiques, dédiés à la détection de NO[•] et ONOO⁻. Ce type de réseaux, dans lesquels chaque électrode est spécifiquement conçue pour détecter un analyte particulier, s'adapte bien à l'étude du comportement de cultures cellulaires ou de tranches de tissus biologiques, pour analyser leurs réponses à un stimulus chimique ou physique. Ils répondent aux besoins d'étudier les rôles fondamentaux de NO[•] et ONOO⁻ dans la transduction de signaux cellulaires, ou le dysfonctionnement cellulaire. La détection de ces deux espèces représente un réel challenge de par leur courte durée de vie, leur faible concentration et la présence de nombreuses autres molécules potentiellement interférentes dans le milieu. Plusieurs groupes de recherche dans le monde travaillent actuellement à surmonter les limitations techniques pour la détection simultanée de ces espèces. En effet, un

concept analytique permettant la détermination du ratio $\text{NO}^\bullet/\text{ONOO}^-$ est la clé de la compréhension des mécanismes de certaines pathologies, pour la mise au point de thérapies anti-oxydantes. Ainsi, la thèse a pour objectif de participer au développement de capteurs électrochimiques dédiés à la détection sensible, sélective et simultanée de ces deux analytes.

La première partie du manuscrit portera sur la description bibliographique des rôles biologiques et des méthodes de détection existantes, pour NO^\bullet et ONOO^- . Une attention particulière sera apportée aux méthodes de détection basées sur l'électrochimie. Le deuxième chapitre sera consacré à la mise au point de réseaux d'ultramicroélectrodes (UMEs), permettant d'effectuer des mesures électrochimiques avec des cultures cellulaires. Ce chapitre détaillera le design, la fabrication et la caractérisation des réseaux. Le troisième chapitre présentera le travail effectué pour rendre la mesure électrochimique sélective pour NO^\bullet et ONOO^- . Le quatrième chapitre montrera les premières applications des réseaux de capteurs pour la détection dans des cultures cellulaires. Enfin, une conclusion générale clos le manuscrit et décrit quelques perspectives et les suites à donner à ce travail ; elle est suivie des annexes expérimentales. En supplément de ce manuscrit, un article issu d'un travail de synthèse effectué au cours de la thèse, mais non exploité pour la détection de NO^\bullet et ONOO^- , est placé en fin de document (Annexe 2).

Chapitre 1. État de l'art : fonctions biologiques et méthodes de détection de NO[•] et ONOO⁻

1.1. Le monoxyde d'azote dans le corps humain

1.1.a. Découverte

Plus de 10 années de recherches par différents groupes auront été nécessaires pour découvrir la présence de NO[•] dans le corps humain à travers son rôle de régulateur de la pression artérielle. Le premier indice apparut en 1977 lorsque Ferid Murad et ses collègues étudièrent différents composés vasodilatateurs, dont la nitroglycérine, prescrits aux patients souffrant d'angines de poitrine. Ces études ont montré que ces composés libèrent NO[•] après métabolisation par l'organisme et entraînent alors une augmentation de l'activité d'une enzyme appelée guanylate cyclase (GC) [1,2]. C'est le premier exemple de l'action de NO[•] dans le corps, mais produit de façon exogène (c'est-à-dire que la source de production est un élément extérieur au corps humain, comme un médicament par exemple).

La deuxième pièce du puzzle a été apportée par Robert Furchgott en 1980. Pour réguler la pression artérielle, les cellules musculaires lisses des artères se relaxent, entraînant alors une augmentation du diamètre interne du vaisseau sanguin et une réduction de la pression (Figure 1.1). L'équipe de Furchgott a observé que ces cellules musculaires lisses ne se relaxaient jamais si les cellules endothéliales de l'artère étaient enlevées [3]. Ils postulèrent alors l'existence d'un facteur de transmission, libéré par les cellules endothéliales et agissant sur les cellules musculaires lisses, baptisé EDRF (acronyme anglais pour *Endothelium Derived Relaxing Factor*). La nature chimique de ce facteur de relaxation n'était cependant pas encore connue.

Finalement, Louis Ignarro et son groupe montrèrent en 1986 que l'EDRF n'est autre que NO[•], en comparant leurs réactivités chimiques [4]. Cette découverte fut une grande surprise car à l'époque NO[•] était surtout connu comme polluant atmosphérique ; l'idée que

l'organisme puisse synthétiser et utiliser une petite molécule gazeuse pour transmettre des informations était totalement nouvelle.

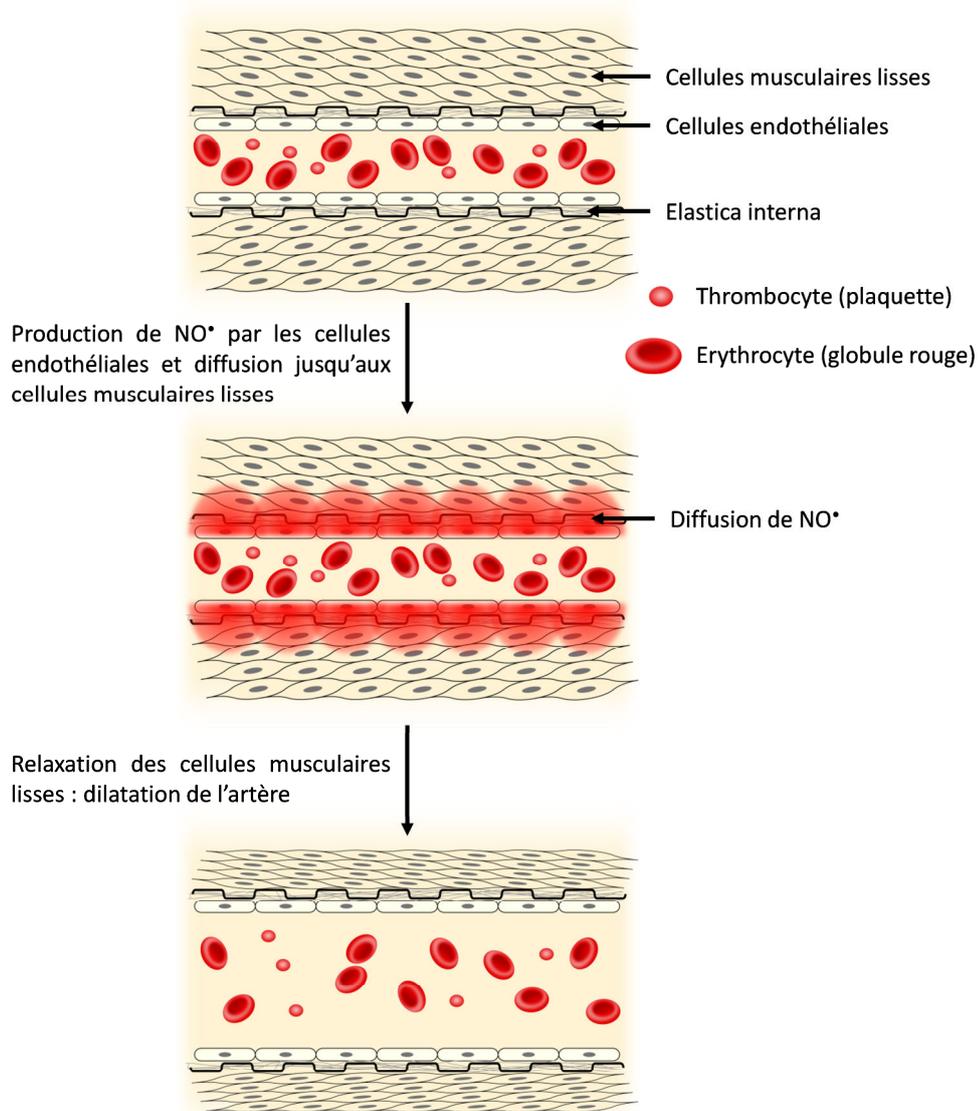


Figure 1.1 Illustration du rôle de NO[•] dans la régulation de la pression artérielle.

Les travaux de Murad, Furchgott et Ignarro leur valurent l'attribution du prix Nobel de physiologie et Médecine en 1998 (Figure 1.2). Suite à ces premières découvertes, l'engouement de la communauté internationale et l'implication de nombreux groupes de recherche ont enrichi les connaissances concernant la production et les fonctions de NO[•] dans les organismes vivants.

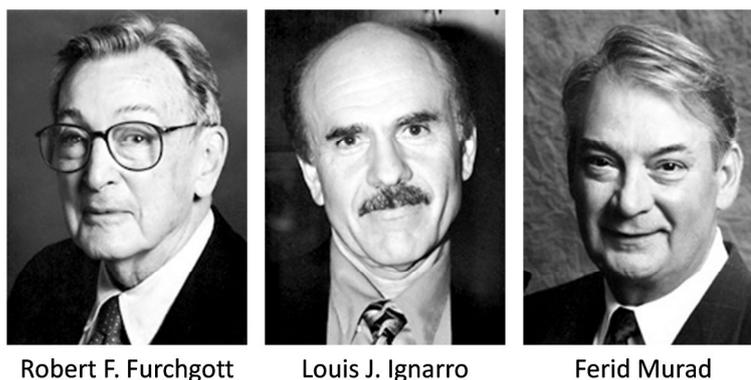


Figure 1.2 Les trois lauréats du prix Nobel de physiologie et médecine en 1998 «pour leurs découvertes concernant le monoxyde d'azote comme molécule de signalisation dans le système cardiovasculaire».

1.1.b. Production endogène de NO•

i) Fonctionnement général des enzymes NO-synthases

Dans le corps humain, NO• est principalement produit grâce à des enzymes appelées NO-synthétases (ou NO-synthases ; NOS). Ces enzymes sont des protéines qui catalysent la réaction de formation de NO• à partir de L-arginine et de dioxygène (O₂), en présence de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) (Figure 1.3) [5-8]. La L-arginine fournit l'atome d'azote de NO•, O₂ l'atome d'oxygène et NADPH les électrons nécessaires à la réaction [9]. La réaction nécessite la présence d'autres molécules qui sont les cofacteurs de l'enzyme NOS : la tétrahydrobioptérine (BH₄), la flavine mononucléotide (FMN), la flavine adénine dinucléotide (FAD), et un groupe hème. FMN et FAD servent à transporter vers le site actif les électrons provenant de NADPH, le groupe hème et la tétrahydrobioptérine catalysent la réaction de la L-arginine avec O₂ [6]. Les NOS doivent aussi s'associer à une autre protéine appelée calmoduline (CaM) qui a pour particularité de réagir à la présence de calcium (voir ci-dessous). Deux de ces dimères de protéine se regroupent alors autour d'un atome de zinc pour former un tétramère capable de produire NO• lorsque tous les cofacteurs sont présents [7].

Le grand nombre de molécules impliquées dans cette biosynthèse signifie qu'il existe plusieurs possibilités pour réguler la production de NO•. Il existe plusieurs types de NOS (voir ci-dessous) et l'organisme utilise en général une seule voie de régulation pour chacun de ces

types. Cependant, le défaut de n'importe quel réactif ou cofacteur peut limiter la formation de NO^\bullet et/ou changer la fonction de la protéine.

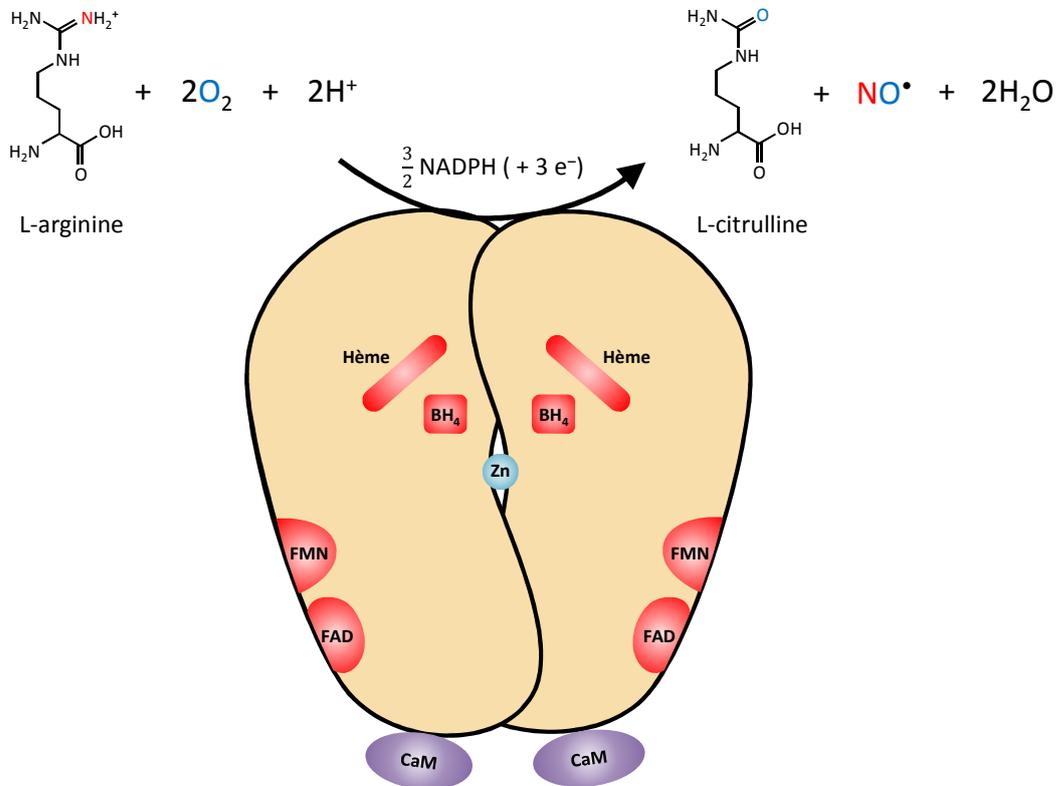


Figure 1.3 Schéma illustrant la biosynthèse de NO^\bullet à partir de la l-arginine grâce à l'action de l'enzyme NOS. Les cofacteurs de l'enzyme sont représentés en rouge, la coenzyme calmoduline en violet et l'atome de zinc favorisant la dimérisation des sous-unités de la NOS en bleu.

ii) Les différents types de NOS

Trois isoformes de la NOS ont été identifiées jusqu'à présent chez les mammifères, codées par des gènes différents : la NOS neuronale (ou NOS-1), la NOS inductible (ou NOS-2) et la NOS endothéliale (ou NOS-3) [5]. L'existence d'une quatrième isoforme appelée NOS mitochondriale [10] fait toujours débat [11].

La NOS neuronale et la NOS endothéliale sont des protéines constitutives, c'est-à-dire qu'elles sont présentes en permanence dans les cellules où elles sont exprimées. La production de NO^\bullet est dans ce cas régulée par l'influx de calcium dans la cellule, et l'intensité de la réponse dépend de la concentration en ions Ca^{2+} . Ces ions se complexent sur la calmoduline et modifient légèrement sa conformation, ce qui permet sa fixation à la NOS [6]. Lorsque la calmoduline n'est pas fixée à la NOS, l'enzyme est inactive et ne produit pas de NO^\bullet ; lors d'un afflux de calcium dans la cellule, la calmoduline se fixe sur la NOS et active la

production de NO•. En général les NOS constitutives produisent rapidement de faibles quantités de NO•, pendant de courtes durées.

Le comportement de la NOS inductible contraste avec les autres types de NOS. Cette isoforme a la calmoduline liée de façon permanente et n'est donc pas dépendante de la présence de calcium pour être fonctionnelle. En revanche elle n'est pas présente en permanence dans la cellule. C'est un stimulus qui va engendrer sa synthèse à partir de l'ADN, elle est donc sous contrôle transcriptionnel. En comparaison avec les autres NOS, la NOS inductible génère d'importantes quantités de NO• sur de longues durées, mais il peut se passer plusieurs heures entre le stimulus et le début de la production de NO• [5].

iii) NO• sans NOS

Il a récemment été suggéré que NO• peut être synthétisé *in vivo* grâce à la réduction de l'ion nitrite (NO_2^-), un de ses métabolites principaux [12]. Cette réduction est possible dans des conditions d'hypoxie, c'est-à-dire lors d'une diminution de la quantité d'oxygène dans les tissus. Cette source potentielle de NO• permet l'exploration de nouvelles voies thérapeutiques basées sur des apports de NO_2^- dans l'alimentation [12,13].

1.1.c. Les propriétés et fonctions de NO• dans le corps humain

Une recherche sur la base de données MEDLINE renvoie, en juin 2011, à plus de 70 000 références avec « nitric oxide » (nom anglais de NO•) dans le titre. Nous avons donc choisi d'exposer les fonctions principales de cette molécule sans être exhaustifs.

Dans un milieu donné, l'effet de NO• dépend fortement de sa concentration. Cette concentration reflète l'équilibre entre, d'une part l'intensité du flux de production, et d'autre part la consommation de NO• *via* sa réaction avec diverses molécules du milieu biologique.

i) Les propriétés physico-chimiques de NO•

La connaissance des propriétés physiques et chimiques de NO• est précieuse pour comprendre ses mécanismes d'action. NO• est une petite molécule, gazeuse et lipophile. Il est capable de traverser les doubles couches lipidiques formant les membranes cellulaires, passant ainsi d'un compartiment à un autre [14]. Il diffuse en trois dimensions autour de son point de production et peut ainsi parcourir des distances représentant plusieurs fois la longueur d'une cellule [15].

NO[•] est une molécule neutre et radicalaire, possédant une réactivité chimique variée. Cependant, toutes les réactions impliquant NO[•] ne sont pas pertinentes *in vivo*. Dans l'organisme, il réagit principalement selon deux voies : les réactions avec des complexes de métaux de transition et les réactions avec d'autres radicaux. Les complexes de métaux de transition sont très présents dans les sites actifs des enzymes, de ce fait NO[•] régule l'activité de plusieurs d'entre elles. Il est par exemple capable de se lier au groupe hème des NOS pour les inactiver, auto-régulant ainsi sa production.

Lorsque NO[•] réagit avec d'autres radicaux, de nouvelles molécules se forment, ayant leur propre réactivité. Deux réactions radicalaires particulièrement importantes dans l'organisme sont les réactions avec le dioxygène (O₂) et l'anion superoxyde (O₂^{•-}).



La cinétique de la réaction (1.1) est de second ordre vis-à-vis de NO[•]. De ce fait, la réaction ne sera significative que pour des concentrations élevées de cette molécule. La réaction (1.2) génère ONOO⁻ dont la toxicité engendre de nombreux dégâts cellulaires. Ceci sera détaillé plus amplement dans le paragraphe 1.2.c.

ii) *La vasodilatation*

Comme nous l'avons vu au début de ce chapitre, le rôle vasodilatateur de NO[•] a été découvert avant même que sa nature chimique ne soit élucidée. Pour réguler la pression artérielle, les cellules endothéliales produisent NO[•] qui diffuse jusqu'à l'intérieur des cellules musculaires lisses. Il se fixe ensuite sur le groupe hème d'une enzyme, appelée guanylate cyclase, au niveau de l'atome de fer. Cette fixation permet d'engendrer une cascade de réactions biochimiques amenant à la relaxation des cellules musculaires lisses [16]. NO[•] effectue ainsi une action de signalisation, ce qui signifie qu'il transmet une information émise depuis une cellule vers un autre type de cellule. Contrairement à d'autres molécules de signalisation comme les hormones, NO[•] n'a pas besoin d'un récepteur spécifique sur la surface externe de la cellule cible. Dans le système vasculaire, NO[•] est synthétisé par la NOS endothéliale et sa concentration est d'environ 10 à 30 nM [17].

iii) La neurotransmission

La neurotransmission est un autre exemple du rôle de signalisation de NO•. Pour propager le message nerveux, NO• est produit par la NOS neuronale puis diffuse et réagit avec la guanylate cyclase, comme lors de la vasodilatation [18]. Dans le système nerveux périphérique, NO• exerce une action de neurotransmetteur dans les organes des systèmes digestif, respiratoire et urogénital. Dans le cerveau, il est associé à l'apprentissage et la formation de la mémoire, le sommeil, la reproduction et les fonctions motrices [19]. Les concentrations générées lors de la neurotransmission pourraient être de seulement 0,2 à 10 nM [19-21].

iv) La réponse immunitaire

NO• est produit par les phagocytes comme agent antimicrobien [22-24]. Les phagocytes sont des cellules du système immunitaire qui protègent l'organisme, en ingérant des bactéries, des cellules mortes ou mourantes et des corps étrangers nocifs. Après la phagocytose, c'est-à-dire l'ingestion de l'élément nocif, ces cellules libèrent un cocktail de molécules pour le détruire. O₂⁻ et NO• font partie de ces « molécules tueuses » [24,25]. Bien que tous les mécanismes impliqués ne soient pas encore élucidés, il semblerait qu'une grande partie du pouvoir antimicrobien de NO• s'exprime à travers sa réaction avec O₂⁻ pour former ONOO⁻ [24,25], capable de nombreuses modifications cellulaires. Les concentrations de NO• observées lors de la réponse immunitaire sont parmi les plus importantes mesurées *in vivo*. Elles sont comprises entre 200 et 1000 nM [26]. Ces concentrations élevées sont atteintes grâce à l'expression de la NOS inductible dans les phagocytes.

v) NO• et les pathologies

En plus de jouer divers rôles dans le fonctionnement normal de l'organisme, NO• influe sur le développement de nombreuses pathologies. En fonction des cas, il peut avoir un effet bénéfique ou délétère sur le développement de la pathologie. Le tableau suivant illustre quelques-uns de ces effets, à titre d'exemple :

Effet bénéfique/protecteur	Effet délétère
<ul style="list-style-type: none"> • Cancer (antiprolifératif)[27] • Ischémie (protection lors de la 	<ul style="list-style-type: none"> • Cancer (favorise l'apparition et la prolifération des cellules cancéreuses)[28] • Ischémie (impliqué dans la mort

reperfusion)[29]

- **Thrombose et athérosclérose** (effet préventif)[30]
- **Infection bactériennes** (suppression des bactéries)[22]
- **Blessure** (aide à la cicatrisation)[32]

neuronale lors d'une ischémie cérébrale)[21]

- **Maladies de Parkinson et Alzheimer**[31]
- **Traumatisme crânien** (mort neuronale)[21]
- **Maladies inflammatoires**[5]

Ainsi, NO^\bullet semble jouer un rôle à la fois bénéfique et délétère dans certaines pathologies, notamment l'ischémie et les cancers. Cette dichotomie est expliquée par un effet de la concentration de NO^\bullet . À faible concentration, il exerce le plus souvent un effet protecteur ; à des concentrations élevées sont associés ses effets délétères [15,28,31,33-35]. De plus, la formation de ONOO^- en présence de $\text{O}_2^{\bullet-}$ pourrait être le déclencheur et le médiateur des effets négatifs de NO^\bullet [18,21,28,30,35-38].

1.2. Le peroxynitrite dans le corps humain

1.2.a. Formation via la réaction de NO^\bullet avec $\text{O}_2^{\bullet-}$

i) Réaction et conditions de formation

Comme mentionné précédemment, ONOO^- est produit dans le corps humain lors de la réaction de NO^\bullet avec $\text{O}_2^{\bullet-}$ (équation (1.2)). Cette réaction très rapide est contrôlée par la diffusion, sa constante de vitesse a été estimée à $(1,6 \pm 0,3) \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ à 298 K [39,40]. Dès que NO^\bullet et $\text{O}_2^{\bullet-}$ sont présents au même endroit dans l'organisme, ONOO^- est donc produit.

Le fait est que NO^\bullet est un radical relativement stable pouvant traverser les membranes biologiques [33], ce qui n'est pas le cas de $\text{O}_2^{\bullet-}$ [14,41]. De plus, la concentration de ce dernier est maintenue à des niveaux faibles par des enzymes appelées superoxyde dismutases [26]. Pour que ONOO^- soit produit, NO^\bullet doit diffuser jusqu'aux sites de formation de $\text{O}_2^{\bullet-}$, ou être produit à proximité [26]. La diffusion de ces trois molécules dans le système cardiovasculaire est illustrée sur la Figure 1.4.

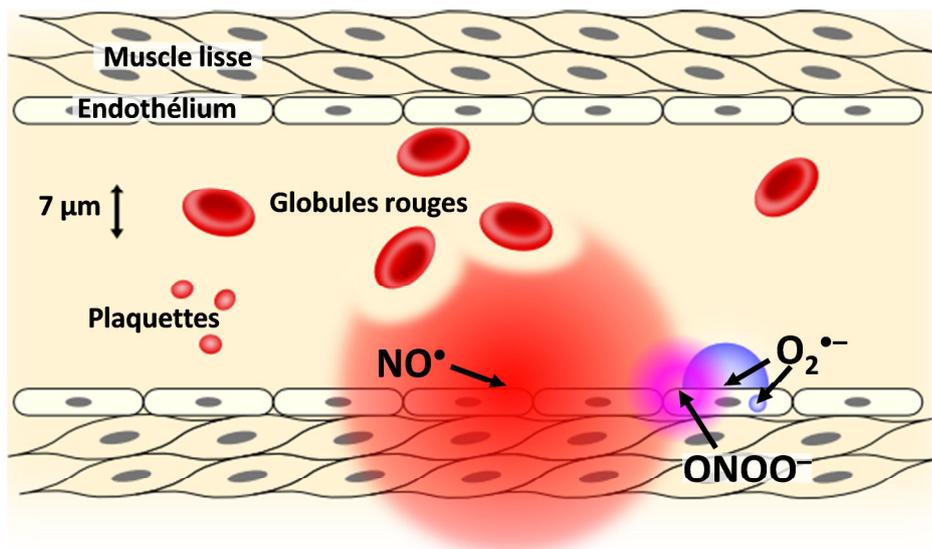


Figure 1.4 Diffusion cellulaire de $\text{NO}\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ et ONOO^- d'après les estimations de leurs temps de demi-vie [38]. Les cercles indiquent l'endroit où la concentration atteint 50 % de la concentration à la source ponctuelle.

1.2.b. Décomposition de l'anion peroxy-nitrite à pH neutre

ONOO^- est stable en solution alcaline et se décompose rapidement à pH neutre. La Figure 1.5 montre des chemins de décomposition possibles en l'absence de cibles biologiques. La réaction entre $\text{O}_2^{\cdot-}$ et $\text{NO}\cdot$ engendre la formation de ONOO^- (Figure 1.5 a). ONOO^- peut être protoné pour former l'acide peroxy-nitrique (ONOOH) (Figure 1.5 b) et le pKa du couple $\text{ONOOH}/\text{ONOO}^-$ est de 6,8 à 25 °C [42]. Pour un pH physiologique de 7,4 il y aura donc environ 20 % de ONOOH et 80 % de ONOO^- . En présence de CO_2 , un adduit ONOOCO_2^- est formé [43] (Figure 1.5 c) avec une constante de vitesse de $(5,8 \pm 0,2) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ à 37 °C [44]. La décomposition de l'adduit aboutit soit à la formation de nitrate (NO_3^- , Figure 1.5 d), soit à la formation des radicaux $\text{NO}_2\cdot$ et $\text{CO}_3^{\cdot-}$ (Figure 1.5 e) [45]. Lorsque ONOO^- réagit avec sa forme protonée, la formation de peroxy-nitrate (O_2NOO^-) est possible (Figure 1.5 f) [46]. O_2NOO^- peut alors se décomposer en radicaux $\text{NO}_2\cdot$ et $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Figure 1.5 g) ou en NO_2^- et O_2 dans l'état singulet (Figure 1.5 h) [47]. Enfin, ONOOH se décompose en NO_3^- (Figure 1.5 i) ou en radicaux $\text{NO}_2\cdot$ et $\text{HO}\cdot$ (Figure 1.5 j) [48].

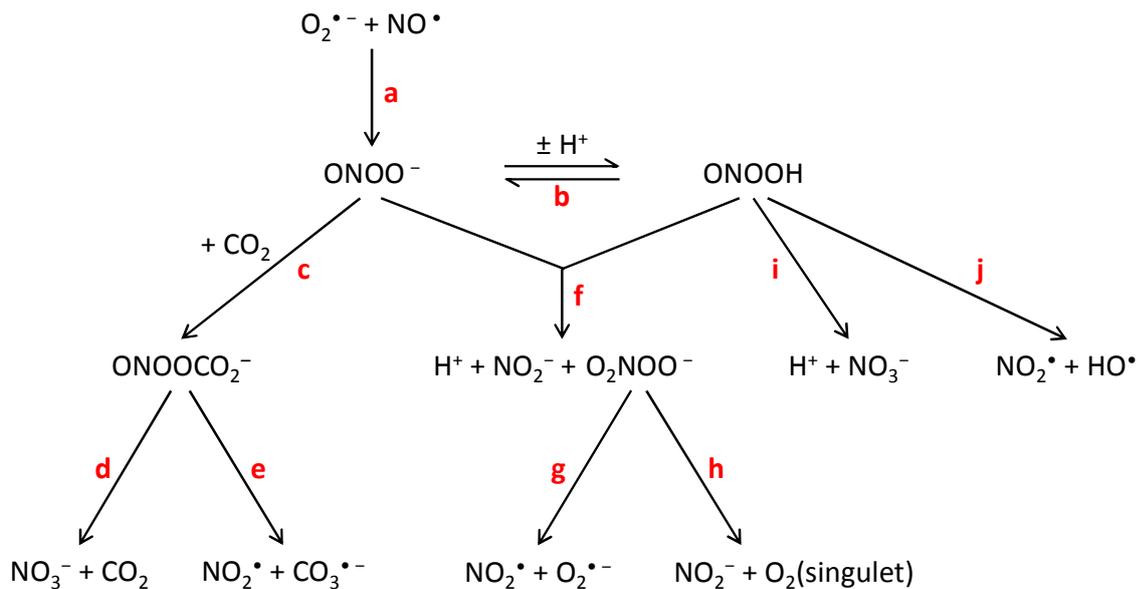


Figure 1.5 Illustration des différentes voies de décomposition de $ONOO^-$ à pH neutre. Chaque réaction est discutée dans le texte.

La faisabilité de chacune de ces voies de décomposition et leurs contributions respectives dans les modèles biologiques font l'objet de controverses. Ce schéma réactionnel illustre néanmoins la grande variété des molécules réactives produites suite à la formation de $ONOO^-$.

1.2.c. Les effets du peroxy-nitrite dans l'organisme

i) Peroxynitrite, anion peroxy-nitrite et acide peroxy-nitreux

Dans l'organisme, les mêmes effets délétères sont attribués à $ONOO^-$ et $ONOOH$. De plus, à pH neutre la présence de l'une de ces molécules ne va pas sans la présence de l'autre, comme l'implique l'équilibre acido-basique existant entre elles. En général, il est difficile de déterminer quelle molécule, parmi celles présentées sur la Figure 1.5, est à l'origine d'un effet physiologique particulier. Aussi nous emploierons le terme « peroxy-nitrite », symbolisé par le couple $ONOOH/ONOO^-$, pour faire référence à l'ensemble des molécules réactives dérivées de l'anion peroxy-nitrite, incluant $ONOO^-$ et $ONOOH$. *A contrario*, les termes « anion peroxy-nitrite » ($ONOO^-$) et « acide peroxy-nitreux » ($ONOOH$) seront utilisés pour décrire une seule molécule.

ii) Réactivité du peroxy-nitrite en milieu biologique

$ONOOH/ONOO^-$ peut modifier différents groupes réactifs de l'ADN, des protéines et des membranes plasmiques (Figure 1.6) [38]. Ces modifications entraînent la perte ou le gain

de fonctionnalité d'une protéine, l'agrégation des protéines, des ruptures dans les brins d'ADN et des perturbations de la signalisation cellulaire [14]. Tous ces changements peuvent avoir des conséquences dramatiques dans l'organisme, comme l'augmentation de l'inflammation ou le déclenchement de l'apoptose (mort cellulaire programmée) et de la nécrose (mort cellulaire non programmée). $\text{ONOOH}/\text{ONOO}^-$ joue ainsi un rôle lors d'une athérosclérose, d'un choc septique, d'une inflammation chronique ou aigue, d'un cancer, d'un accident vasculaire cérébral, de maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer, Huntington, sclérose latérale amyotrophique) et de traumatismes crâniens [38].

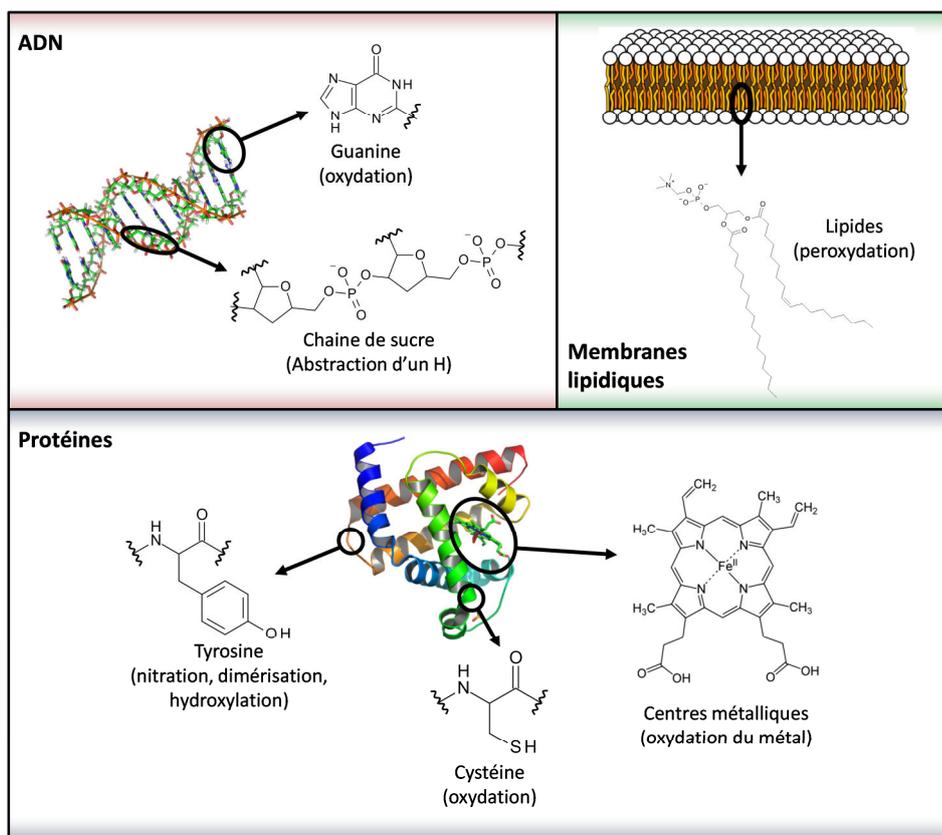


Figure 1.6 Exemples de molécules avec lesquelles $\text{ONOOH}/\text{ONOO}^-$ réagit *in vivo*.

En résumé

$\text{NO}\cdot$ est une petite molécule gazeuse capable de traverser les membranes biologiques, produite par le corps humain. Il y joue de nombreux rôles, notamment lors de la vasodilatation, la neurotransmission et la réponse immunitaire. Sa biosynthèse est effectuée à partir de L-arginine, lors d'une réaction catalysée par des enzymes appelées NOS, dont il existe trois isoformes. La NOS endothéliale et la NOS neuronale sont des protéines constitutives dont l'activité est contrôlée par la fixation de la calmoduline, elles produisent de

faibles quantités de NO^\bullet . La NOS inductible est sous contrôle transcriptionnel et produit des quantités plus importantes de NO^\bullet . ONOO^- est produit par la réaction très rapide entre NO^\bullet et une molécule du stress oxydant, $\text{O}_2^{\bullet-}$. En milieu neutre, ONOO^- est en équilibre avec sa forme protonée, ONOOH . Ces deux molécules sont à l'origine de nombreux types de dommages cellulaires. En conséquence, le rôle bénéfique ou délétère de NO^\bullet dans différentes pathologies dépend de sa transformation en ONOO^- .

1.3. Les méthodes de détection de NO^\bullet et ONOO^-

Étant donné l'importance de NO^\bullet et ONOO^- dans des processus biologiques variés, des efforts substantiels ont été fournis pour mettre au point des méthodes analytiques permettant leur détection. Comme dans toute la littérature concernant NO^\bullet il est difficile d'effectuer une revue exhaustive, nous avons donc choisi de présenter les techniques les plus utilisées et les exemples les plus significatifs. Nous nous limiterons notamment à la détection de NO^\bullet lorsqu'il est dissous en solution aqueuse, la détection en phase gazeuse représentant moins d'applications à la biologie (avec l'exception notable de la détection de NO^\bullet dans l'air expiré). Dans la littérature, les informations relatives à la détection de ONOO^- sont peu nombreuses, en partie parce que l'importance de cette molécule a été identifiée bien après celle de NO^\bullet , et aussi sans doute à cause de sa très grande réactivité chimique. Nous présenterons les principes généraux de chaque méthode analytique puis nous décrirons plus spécifiquement une application représentative pour chacun des analytes (si la méthode est applicable aux deux molécules). Enfin, les méthodes de détection électrochimique de NO^\bullet et de ONOO^- , qui sont l'objet de ce travail, seront décrites plus en détail dans des parties séparées.

1.3.a. La fluorescence

La détection par fluorescence est basée sur la réaction chimique entre une sonde fluorescente et l'analyte d'intérêt ou un sous-produit issu de la décomposition de cet analyte. Dans la majorité des cas, la sonde est une molécule initialement peu ou non fluorescente jusqu'à ce qu'elle réagisse avec la molécule à détecter et qu'elle devienne alors fluorescente (Figure 1.7). L'intensité de la fluorescence à la longueur d'onde d'émission est enregistrée et permet d'évaluer la présence de l'analyte en solution et d'en quantifier la concentration.

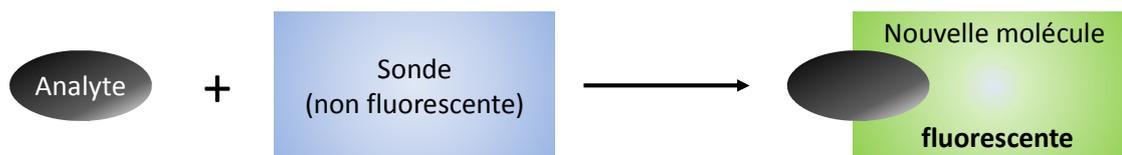
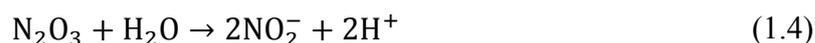


Figure 1.7 Principe général de la détection des molécules NO• et ONOO⁻ par fluorescence.

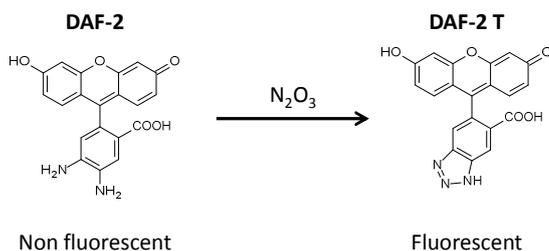
i) Détection de NO• par fluorescence

Les molécules de la famille des diaminofluorescéines sont parmi les plus employées pour détecter NO• en présence de dioxygène (Figure 1.8 a). Ces sondes deviennent fluorescentes après la réaction avec une molécule de N₂O₃ issu de la réaction de NO• avec le dioxygène, équations (1.1) et (1.3) :



Les diaminofluorescéines ne réagissent donc pas directement avec NO• mais plutôt avec un de ses produits de décomposition. Cette méthode présente certains inconvénients : elle est sensible au pH, les molécules réductrices comme l'acide ascorbique peuvent interférer avec la mesure [49], et N₂O₃ peut aussi être produit par l'ion nitrosonium (NO⁺) [50]. D'un autre côté, c'est une méthode particulièrement sensible qui offre une limite de détection de 5 nM *in vitro* [51]. Les FNOCTs (pour *Fluorescent Nitric Oxide Cheletropic Trap*) réagissent directement avec NO• et souffrent de moins d'interférences de la part de ses produits de décomposition (Figure 1.8 b) [52].

a) Diaminofluorescéine



b) FNOCT

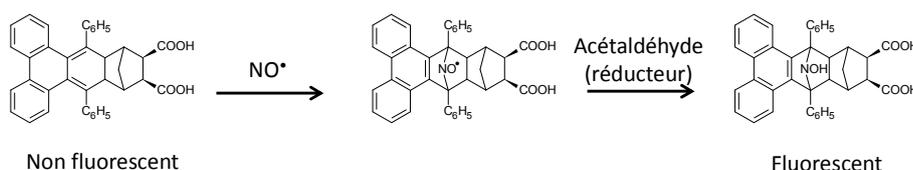


Figure 1.8 Deux exemples de sondes fluorescentes utilisées pour la détection de NO^\bullet . a) Une diaminofluorescéine qui réagit avec N_2O_3 , un produit de décomposition de NO^\bullet . b) Un type de FNOCT (vient de l'anglais *Fluorescent Nitric Oxide Cheletropic Trap*), une sonde sélective à NO^\bullet .

Afin de permettre aux sondes de traverser les membranes cellulaires, une stratégie consiste à ajouter des groupements acétates sur leur structure [51,52]. Après pénétration dans la cellule, ces groupes fonctionnels sont hydrolysés par des enzymes de la classe des estérases, et la structure initiale de la molécule fluorescente est retrouvée (Figure 1.9). Grâce à cette technique, il est possible d'obtenir des images de la répartition de NO^\bullet à l'intérieur d'une cellule unique.

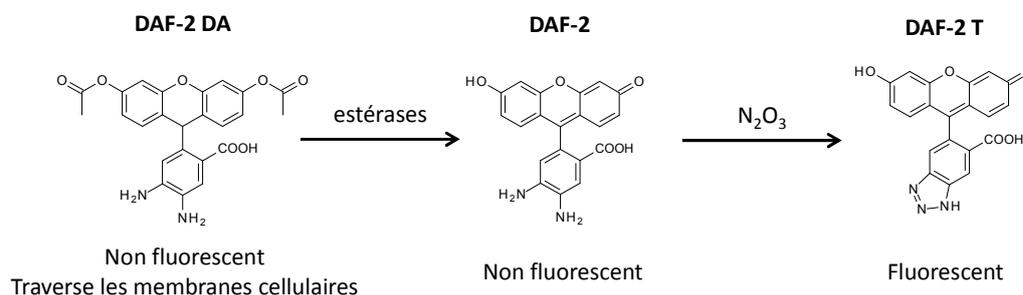


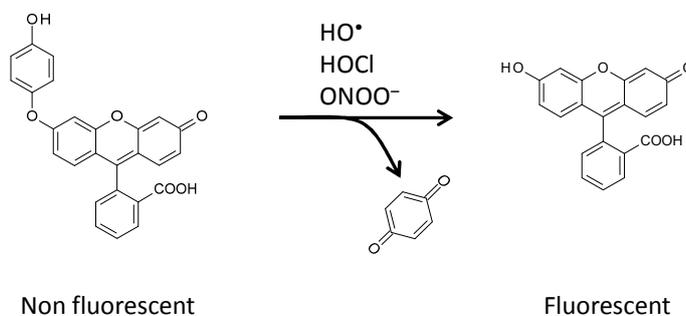
Figure 1.9 Exemple de modification d'une sonde fluorescente pour la détection intracellulaire de NO^\bullet . DAF-2 DA : 4,5-Diaminofluorescéine diacétate. DAF-2 : 4,5-Diaminofluorescéine. DAF-2 T : 4,5-Diaminofluorescéine triazole.

ii) Détection de ONOO^- par fluorescence

Pour détecter ONOO^- par fluorescence, des dérivés de la fluorescéine ont d'abord été employés (Figure 1.10, a) [53,54] mais ces molécules sont sensibles à d'autres espèces

réactives de l'oxygène [54,55]. Leur limite de détection est d'environ 50 nM. Des sondes développées depuis 2010 permettent une détection plus sélective, comme la molécule baptisée HKGreen-2 (Figure 1.10 b) [50].

a) Dérivé de la fluorescéine



b) HKGreen-2

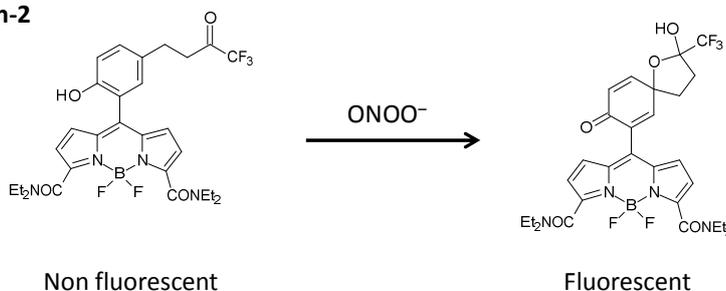


Figure 1.10 Exemples de sondes fluorescentes utilisées pour la détection du ONOO^- .

iii) Conclusion sur la détection par fluorescence

La fluorescence est largement utilisée car elle permet aussi une détection intracellulaire avec de bonnes limites de détection, comprises entre 5 nM et 50 nM. De nombreuses interférences peuvent cependant perturber la mesure. Pour que la détection soit la plus sensible et sélective possible, il faut que la réaction chimique entre la sonde et l'analyte soit la plus rapide possible pour éviter que *i)* d'autres molécules réagissent avec la sonde et augmentent l'intensité du signal, *ii)* l'analyte réagisse avec d'autres cibles, ce qui diminue la concentration pouvant être détectée. De plus, l'absorption et l'excrétion de la sonde par la cellule sont des paramètres particulièrement importants lors des mesures intracellulaires. En général, la réaction entre la sonde et l'analyte n'est pas réversible et la fluorescence permet de suivre en temps réel le flux de production de l'analyte, plutôt que l'évolution de la concentration en solution.

1.3.b. La chimiluminescence

Le principe de la détection par chimiluminescence est similaire à celui de la fluorescence : la réaction chimique entre une sonde et l'analyte d'intérêt engendre l'émission de lumière, qui constitue la grandeur analytique mesurée. Contrairement aux molécules fluorescentes, la sonde de chimiluminescence n'est pas excitée par de la lumière, mais par la réaction chimique avec la molécule à détecter (Figure 1.11). Ainsi, la chimiluminescence est une technique qui donne des informations en temps réel sur la présence de l'analyte d'intérêt.

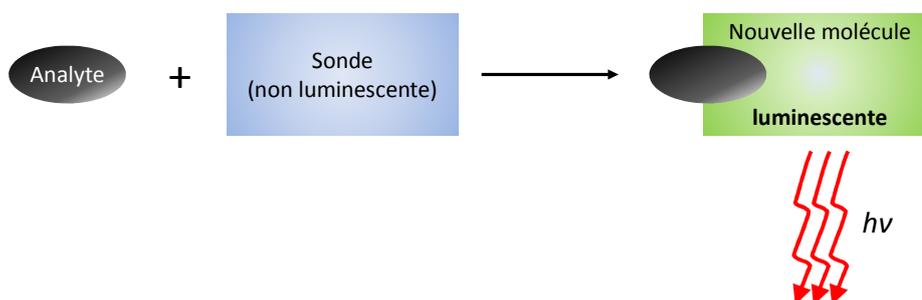


Figure 1.11 Principe général de la détection par chimiluminescence

i) Détection de NO^\bullet par chimiluminescence

La détection de NO^\bullet par chimiluminescence s'effectue en phase gazeuse. Elle est basée sur la réaction de NO^\bullet avec l'ozone (O_3), produisant du dioxyde d'azote (NO_2^\bullet) dans un état excité [56]. Lors du retour à l'état stable, cette molécule émet un photon qui peut être détecté :



Avec O_3 présent en large excès lors de l'analyse, l'intensité de la lumière est directement proportionnelle à la concentration de NO^\bullet . Afin d'analyser des échantillons liquides, NO^\bullet dissous en solution est extrait en phase gazeuse à l'aide d'un barbotage de gaz inerte [56,57]. L'échantillon étudié doit alors être insensible aux perturbations engendrées par ce flux de gaz, ce qui représente un inconvénient pour l'application de cette méthode à certains milieux biologiques.

La détection par chimiluminescence présente une bonne sélectivité pour NO^\bullet , car peu de composés gazeux produisent de la lumière après avoir réagi avec O_3 . Cependant, l'éthylène, le sulfure d'hydrogène, le fer carbonyle et le nickel carbonyle donnent des

réactions de chimiluminescence avec O_3 et peuvent interférer avec la mesure [56]. L'entreprise *GE Analytical Instruments* propose un appareil commercial (appelé NOA 280i) pour la détection de $\text{NO}\cdot$ par chimiluminescence. Ce fabricant indique une limite de détection de 1 nM pour des échantillons en solution.

ii) Détection de ONOO^- par chimiluminescence

Le luminol est une molécule parfois utilisée pour détecter ONOO^- en solution (Figure 1.12) [54,57], avec une excellente limite de détection de 100 fM [58]. Cette méthode n'est pas sensible à la présence de $\text{NO}\cdot$, mais la luminescence peut être générée par de nombreuses espèces réactives comme $\text{HO}\cdot$, $\text{CO}_3^{\cdot-}$, $\text{ClO}_2\cdot$ et $\text{NO}_2\cdot$. Ainsi, la chimiluminescence après réaction avec le luminol n'est pas une méthode fiable pour quantifier ONOO^- dans les milieux biologiques [55].

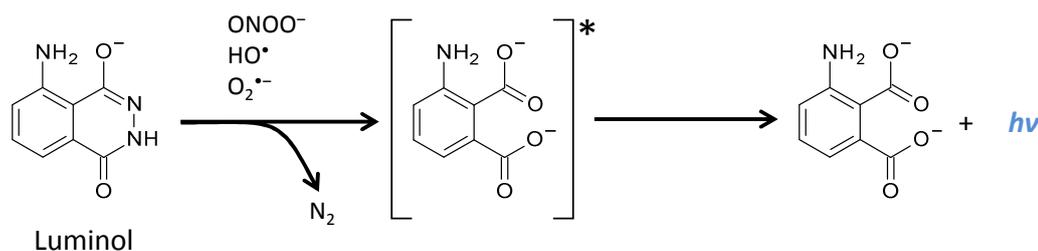


Figure 1.12 Principe de l'utilisation du luminol comme sonde chimiluminescente. La réaction du luminol avec des espèces réactives de l'oxygène produit une molécule excitée qui émet un photon lors du retour à l'état stable.

iii) Conclusion sur la détection par chimiluminescence

La chimiluminescence permet de quantifier en temps réel $\text{NO}\cdot$ avec une limite de détection de 1 nM. Cette technique est particulièrement sélective car les molécules pouvant potentiellement interférer avec la mesure ne sont pas communément présentes dans les systèmes biologiques. De plus, un appareillage optimisé pour la détection de $\text{NO}\cdot$ est disponible commercialement. Cependant, le barbotage de la solution avec un gaz inerte peut perturber le système étudié et limite l'application de cette technique. Bien que la chimiluminescence ait été utilisée par le passé pour détecter ONOO^- , plusieurs auteurs recommandent de ne plus l'employer tant que des sondes plus sélectives que le luminol ne seront pas disponibles.

1.3.c. La spectrophotométrie d'absorbance UV-Visible

i) Détection de NO[•] par spectrophotométrie d'absorbance

La spectrophotométrie d'absorbance a l'avantage d'être facile à mettre en œuvre et de nécessiter du matériel relativement peu coûteux. Elle est largement répandue et souvent utilisée pour détecter NO[•], notamment dans les systèmes biologiques [57]. Les mesures de NO[•] par spectrophotométrie d'absorbance ont d'abord été basées sur sa réaction avec la déoxyhémoglobine qui entraîne une modification du maximum d'absorbance de la protéine de 433 nm à 406 nm [4] (Figure 1.13) :



C'est entre autre grâce à cette méthode qu'il a été possible de montrer que NO[•] était l'EDRF (cf. paragraphe 1.1.a) [4].

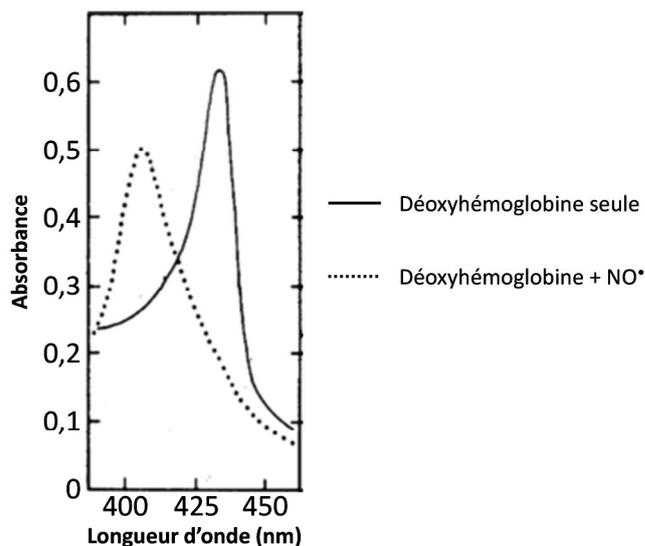


Figure 1.13 Illustration des changements du spectre d'absorption de la déoxyhémoglobine lors de sa réaction avec NO[•]. La figure est adaptée des travaux originaux ayant permis de faire le lien entre NO[•] et l'EDRF [4].

Une version alternative de cette analyse chimique consiste à faire réagir NO[•] avec l'oxyhémoglobine pour former NO₃⁻ [59]. Lors de cette réaction le fer de la protéine est oxydé de manière irréversible :



Le principe de détection est basé sur le suivi du changement d'absorption relatif à la formation de Fe(III).

milieux biologiques, du fait de la forte réactivité de ONOO^- en milieu neutre combinée au manque de sensibilité de la spectrophotométrie d'absorbance UV-Visible.

iii) Conclusion sur la détection par spectrophotométrie d'absorbance

Cette méthode d'analyse est simple d'utilisation et nécessite un appareillage présent dans de nombreux laboratoires de recherche ; elle est donc fréquemment employée pour quantifier NO^\bullet et ONOO^- . En contrepartie, sa sensibilité est relativement faible et ne permet pas d'assurer la détection directe de ONOO^- dans les milieux biologiques. De plus, NO^\bullet n'est pas détecté directement par cette technique, ce sont d'autres produits dont la concentration est mesurée, formés suite à des réactions chimiques initiées par NO^\bullet . Ceci présente un inconvénient s'il existe d'autres sources que NO^\bullet pour les produits détectés.

1.3.d. La résonance paramagnétique électronique

i) Détection de NO^\bullet par résonance paramagnétique électronique

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une technique spectroscopique qui permet d'obtenir des informations sur la nature et l'environnement d'espèces ayant un ou plusieurs électrons non appariés. Le principe de fonctionnement de la RPE est semblable à celui de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), la principale différence étant qu'en RMN les spins nucléaires sont excités alors qu'en RPE ce sont les spins électroniques. Cette technique permet de détecter des espèces paramagnétiques comme les radicaux libres, dont fait partie NO^\bullet .

En pratique il est très difficile de détecter directement NO^\bullet dans les milieux biologiques avec la RPE, pour plusieurs raisons. Premièrement, le radical détecté doit être présent à des concentrations supérieures à la limite de détection de la technique (10-100 nM) et avoir un temps de vie relativement long [63]. Or, la réactivité de NO^\bullet en milieu biologique empêche souvent la réalisation de ces deux conditions. De plus, le signal RPE de NO^\bullet en phase liquide est décrit comme «large et peu sensible» [64]. Pour pallier ce problème, les groupes de recherche utilisent des piègeurs de spin (*spin traps*), molécules qui réagissent avec NO^\bullet pour former des radicaux plus stables pouvant être analysés plus facilement [65]. Les piègeurs de spin les plus communément utilisés pour détecter NO^\bullet appartiennent à la famille des dithiocarbamates de fer [57], dont un exemple est présenté sur la Figure 1.15.

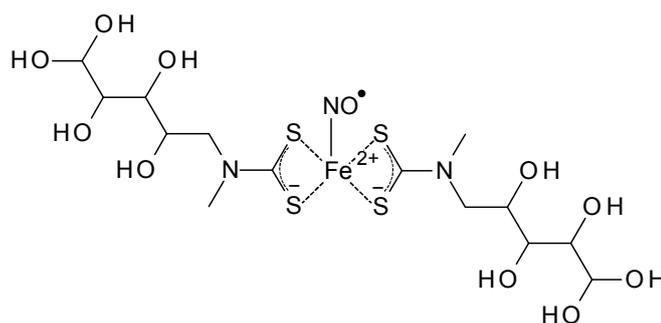


Figure 1.15 Structure d'un dithiocarbamate employé pour créer un radical plus stable que $\text{NO}\cdot$ lors de sa détection par RPE.

Avec la RPE, il est possible de différencier les signaux provenant de différents isotopes de l'azote, cette technique a donc été largement utilisée pour l'élucidation de mécanismes réactionnels faisant intervenir $\text{NO}\cdot$ [64]. De plus, la détection par RPE n'est pas gênée par l'opacité et la turbidité du milieu, ce qui permet d'effectuer des mesures sur de nombreuses matrices biologiques. Enfin, l'imagerie RPE permet de cartographier la distribution spatiale de $\text{NO}\cdot$ chez l'animal [63]. Cependant, la RPE présente certains inconvénients en comparaison avec d'autres techniques : elle offre des limites de détection moyennes, nécessite un appareillage relativement coûteux et fournit des données expérimentales dont l'interprétation par des non spécialistes n'est pas aisée.

ii) Détection de ONOO^- par résonance paramagnétique électronique

ONOO^- n'a pas d'électron non apparié et ne peut pas être détecté par RPE, mais sa décomposition engendre souvent des radicaux libres pouvant être détectés en utilisant des *spins traps* [66]. Cette méthodologie est cependant sujette à de nombreuses interférences, elle est donc rarement employée pour observer la présence de ONOO^- .

1.3.e. Marquage biologique : cas de la tyrosine nitrée

L'identification de la tyrosine nitrée est une méthode spécifiquement utilisée pour détecter la présence de ONOO^- dans les milieux biologiques, de manière qualitative. En effet, la tyrosine est un acide aminé qui subit des réactions de nitration en présence de $\text{ONOOH}/\text{ONOO}^-$. Cette modification chimique est irréversible et représente une « trace » laissée par ONOO^- . Elle peut être détectée par différentes techniques d'analyse biochimique, dont la méthode immuno-enzymatique ELISA, le transfert de protéines (aussi appelé western blot) et la cytométrie de flux [54]. Ainsi, la forte réactivité de ONOO^- , qui rend sa détection directe délicate, est mise à profit pour obtenir des preuves indirectes de sa formation dans les

milieux biologiques. Cette stratégie a l'avantage d'utiliser des appareillages et techniques très répandus dans les laboratoires de biologie ; elle ne permet cependant pas la quantification absolue de ONOO^- car il est difficile de relier la quantité de tyrosine nitrée à la quantité de ONOO^- présente initialement dans le milieu biologique. De plus, la nitration de la tyrosine peut parfois être observée en absence de ONOO^- , limitant ainsi la sélectivité de ce test [54].

1.3.f. Les méthodes électrochimiques

La détection électrochimique d'un analyte est basée sur son oxydation ou sa réduction à la surface d'une électrode, elle est donc applicable à n'importe quelle molécule en solution à condition que celle-ci soit électroactive, ce qui est le cas de NO^\bullet et ONOO^- . La réaction électrochimique entre l'analyte d'intérêt et l'électrode génère un courant électrique, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en analyte (Figure 1.16).

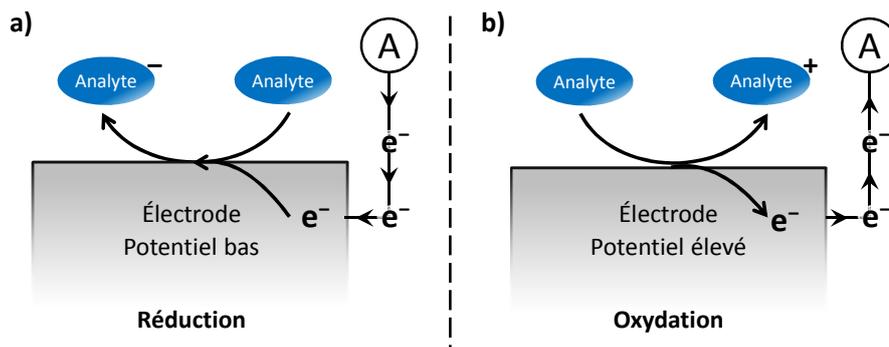


Figure 1.16 Principe de la détection électrochimique. a) Réduction de l'analyte b) oxydation de l'analyte.

Lorsqu'elle est appliquée à la détection de NO^\bullet , l'électrochimie est une méthode de détection directe, qui n'implique pas de réaction chimique de l'analyte avec d'autres molécules avant la mesure. Elle offre ainsi une mesure rapide, avec un temps de réponse compris dans l'échelle de temps de la milliseconde, ce qui permet de suivre en temps réel l'évolution de la concentration en analyte [67]. Elle présente de bonnes limites de détection et permet d'analyser des molécules électroactives dont la concentration est faible (quelques nanomolaires). De plus, il est possible d'améliorer la sélectivité et la sensibilité à travers la modification de l'électrode et/ou le potentiel appliqué [68]. C'est aussi une des rares méthodes pouvant être directement appliquée *in vivo*, grâce à la miniaturisation des électrodes qui permet leur implantation chez l'animal. Enfin, les équipements nécessaires aux mesures électrochimiques sont peu onéreux, mais rarement présents dans les laboratoires de biologie.

L'électrochimie doit aussi faire face au problème de sélectivité et il est nécessaire de prendre des précautions importantes pour obtenir des résultats fiables [57].

Grâce à tous ses avantages, l'électrochimie s'est imposée comme la méthode analytique principale pour la détection de NO• dans les systèmes biologiques [57,69]. Elle est en revanche très peu employée pour l'analyse de ONOO⁻ probablement parce qu'il est difficile d'étudier le comportement électrochimique de cette molécule à pH neutre. Les principes et méthodologies électrochimiques spécifiques à la détection de NO• et ONOO⁻ seront détaillés dans la section suivante.

En résumé

L'importance du rôle de NO• et ONOO⁻ en milieu biologique a encouragé le développement de méthodes de détection de ces deux molécules. Le

Tableau 1.1 récapitule les caractéristiques, avantages et inconvénients des méthodes principalement employées. Le choix d'une technique particulière dépend du milieu de l'étude, de l'information recherchée et du matériel à disposition des chercheurs ; plusieurs techniques peuvent être utilisées pour obtenir des informations qui se complètent. Toutes les méthodes sont sujettes à des interférences et doivent être utilisées en prenant des précautions, afin de s'assurer que le signal mesuré provient bien de l'analyte cible. L'électrochimie est souvent employée car elle présente de nombreux avantages, notamment l'obtention d'informations en temps réel et *in situ*, avec une bonne résolution spatiale.

Tableau 1.1 Résumé des techniques utilisées pour mesurer NO• et ONOO⁻ dans les échantillons biologiques

Technique	Analyte cible	Limite de détection	Principales sources d'interférences	Inconvénients principaux	Avantages principaux

Fluorescence	NO^{\bullet}	5 nM	Acide ascorbique, NO^+	Sensible au pH, besoin d'ajouter des réactifs	Mesure intracellulaire
	ONOO^-	50 nM	HO^{\bullet} , HOCl		
Chimiluminescence	NO^{\bullet}	1 nM	Éthylène, H_2S , carbonyles	Besoin d'extraire NO^{\bullet} en phase gazeuse	Très sensible
	ONOO^-	100 fM	HO^{\bullet} , $\text{CO}_3^{\bullet-}$, ClO_2^{\bullet} , NO_2^{\bullet}	Nombreuses interférences	
Spectrophotométrie d'absorbance UV-Visible	NO^{\bullet}	430 nM	Réservoirs de NO_2^-	Sensibilité faible	Simple, très répandue
	ONOO^-				
Résonance paramagnétique électronique	NO^{\bullet}	10-100 nM	HNO , NO_2^- , S-nitrosothiol	Sensibilité faible, appareillage coûteux, besoin d'expertise	Sensible aux isotopes, détection dans des milieux non transparents
Détection de la tyrosine nitrée	ONOO^-	-	Composés nitrant autres que ONOO^-	Non quantitatif	Facile à mettre en place
Électrochimie	NO^{\bullet}	Gamme nanomolaire	H_2O_2 , acide ascorbique, NO_2^- , dopamine	Fortement dépendant de la température	Détection directe, en temps réel
	ONOO^-				

1.4. La détection électrochimique de NO^{\bullet} et ONOO^-

Les électrodes les plus utilisées actuellement pour la détection en milieu biologique, en particulier celle des espèces réactives de l'azote, sont les ultramicroélectrodes (UMEs). Ce sont des électrodes de petites dimensions (typiquement inférieures ou égales à 50 μm), adéquates pour effectuer des mesures locales. L'intérêt d'utiliser les UMEs, plutôt que des électrodes « conventionnelles » de plus grande taille (appelées macroélectrodes), ne se limite pas à une réduction de l'encombrement de la sonde de mesure. En effet, les propriétés électrochimiques des UMEs se démarquent de celles des macroélectrodes. Grâce à leurs petites dimensions, elles possèdent une faible capacitance interfaciale et peuvent être utilisées dans des environnements très résistifs [70]. Elles permettent aussi d'obtenir des courants stationnaires sans convection forcée ; ces courants sont plus faciles à analyser et interpréter

que les courants transitoires obtenus sur les macroélectrodes en régime de diffusion pure. Ainsi, la fin de ce chapitre sera dédiée aux stratégies employées pour adapter ces électrodes à la détection de NO• et ONOO⁻, avec une emphase particulière sur la sélectivité des mesures.

1.4.a. La détection électrochimique de NO•

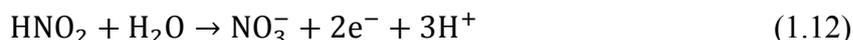
i) Principe de base

NO• peut être détecté électrochimiquement soit par réduction, soit par oxydation. En fonction du matériau d'électrode et du pH de la solution, l'application d'un potentiel allant de -0,5 à -1,4 V (vs Ag/AgCl) permet la réduction à un électron de NO• pour former l'anion nitrosyl (NO⁻) :



NO⁻ est très instable en solution aqueuse et subit une série de réactions chimiques aboutissant à la formation de protoxyde d'azote (N₂O). Celui-ci peut ensuite être réduit en diazote (N₂). Bien qu'il existe quelques exemples de détection électrochimique de NO• par réduction dans la littérature, cette stratégie souffre de la présence d'oxygène moléculaire dans les systèmes biologiques. En effet, l'électroréduction de celui-ci interfère avec celle de NO•. De plus, la sensibilité des capteurs fonctionnant par réduction est souvent faible et cette méthode a rapidement été abandonnée au profit de l'électrooxydation [71].

L'oxydation électrochimique de NO• a lieu selon un mécanisme impliquant le transfert de trois électrons, à des potentiels d'électrode allant de 0,7 à 1 V vs Ag/AgCl dans des solutions aqueuses à pH 7,4 :



La difficulté majeure de cette approche provient de la valeur élevée du potentiel d'électrode nécessaire à l'électrooxydation de NO•. En effet, un grand nombre de composés chimiques sont oxydables dans cette gamme de potentiels de 0,7-1 V ; ils contribuent au courant faradique mesuré s'ils sont présents dans la solution électrolytique étudiée. Nous appellerons « analyte interférent » toute molécule oxydable (ou réductible) au potentiel opérationnel pour la détection d'une espèce. Par exemple, NO₂⁻ est oxydé

électrochimiquement en NO_3^- , au potentiel utilisé lors de l'électrooxydation de NO^\bullet (équation (1.12)). Par conséquent, NO_2^- produit de manière endogène (c'est-à-dire par le système biologique étudié) est une source significative d'interférences électrochimiques. Un capteur efficace doit alors être capable de masquer le signal relatif à l'oxydation de NO_2^- , typiquement présent à des concentrations plus de 10 fois supérieures à celles de NO^\bullet [71].

Si les interférences proviennent des composés utilisés pour induire la production de NO^\bullet , celles-ci peuvent être minimisées en introduisant ces composés dans le milieu au début de l'expérience. Leur réponse électrochimique sera alors incluse dans la ligne de base du signal (pour des expériences à potentiel constant et si leur concentration ne change pas de manière significative pendant l'expérience). En revanche, les interférences issues de l'oxydation d'espèces produites en même temps que NO^\bullet , ou lors de son métabolisme, sont particulièrement gênantes. Dans ce cas, NO^\bullet est à l'origine même de la création des signaux interférents. Le Tableau 1.2 liste les analytes interférents les plus communément rencontrés lors de la détection de NO^\bullet dans les systèmes biologiques, ainsi que leurs gammes de concentrations.

Tableau 1.2 Analytes pouvant interférer lors de la détection électrochimique de NO^\bullet par oxydation

Composé	Localisation	Gamme de concentration	Réf.
Acide ascorbique	sang (plasma)	34-144 μM	[71]
	Cerveau	100-500 μM	[72]
Nitrite	Sang (plasma)	< 20 μM	[71]
	Tissu du cerveau	< 20 μM	[73]
Acide urique	Sang (sérum)	150-470 μM	[71]
	Fluide extracellulaire du cerveau	5-50 μM	[74]
Peroxyde d'hydrogène	Fluide extracellulaire du cerveau	1-3 μM	[75]
Dopamine	Sang (plasma)	< 2,0 nM	[71]
	Fluide extracellulaire du cerveau	6,35-9,40 nM	[76]
Norépinéphrine	Sang (plasma)	0,35-2,96 nM	[71]
Sérotonine	Sang	0,28-1,14 μM	[71]
DOPAC^a	Sang (plasma)	5,28-23,10 nM	[71]
5-HIAA^b	Sang (sérum)	18,31-695,91 nM	[71]

^aDOPAC, acide 3,4-dihydroxyphenylacetic. ^b5-HIAA, 5-hydroxyindole-3-acide.

Enfin, certaines espèces non électroactives sont capables de réagir avec NO^\bullet et modifient sa concentration. Bien que ces composés n'influent pas sur la mesure elle-même,

les changements dans la concentration de $\text{NO}\cdot$ qu'ils provoquent peuvent expliquer les différences observées lors d'expériences dans différents milieux.

Afin de remédier au problème des analytes interférents, plusieurs stratégies ont été élaborées dont les plus significatives sont exposées ci-dessous.

ii) Capteurs à base de membranes

L'utilisation de membranes sélectives a été proposée dès 1990, pour réduire le courant faradique issu de l'oxydation d'analytes interférents lors de l'électrooxydation de $\text{NO}\cdot$. Ces membranes agissent comme des barrières pour limiter l'accès à la surface de l'électrode des espèces interférentes. Ainsi, la première électrode pour des mesures physiologiques de $\text{NO}\cdot$ a été développée par Shibuki en adaptant l'électrode de Clark utilisée pour mesurer l'oxygène (Figure 1.17) [77]. Ce capteur comprend une micropipette remplie d'électrolyte dans laquelle sont insérés un fil de platine et un fil d'argent, servant d'électrode de travail et d'électrode de référence respectivement. Une fine membrane de chloroprène présente à la pointe de la micropipette laisse passer les petits composés gazeux comme O_2 et $\text{NO}\cdot$ tout en excluant les molécules de plus grande taille. Cette électrode permet la détection de $\text{NO}\cdot$ avec une bonne sélectivité par rapport à NO_2^- , un des principaux analytes interférents dans les milieux biologiques. Cependant, les mesures sont peu reproductibles [68,69] et la présence d'une solution interne limite les possibilités de miniaturisation [71].

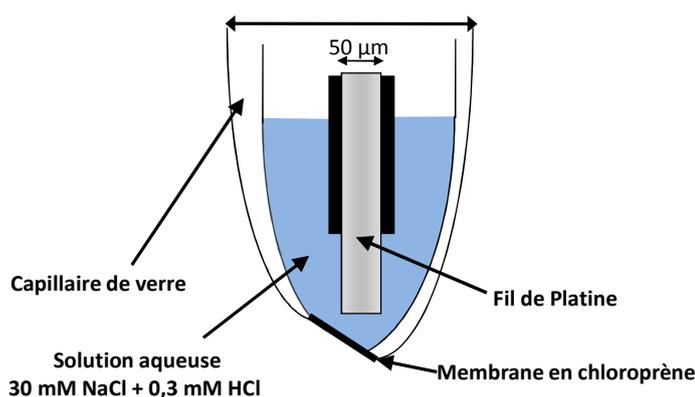


Figure 1.17 Schéma de la première électrode utilisée pour détecter $\text{NO}\cdot$, développée par Shibuki. La membrane sélective est séparée de l'électrode par une solution.

Plusieurs capteurs électrochimiques ont été développés à la suite de ce premier design, la plupart supprimant la solution interne, avec une membrane sélective déposée directement à la surface de l'électrode (Figure 1.18).

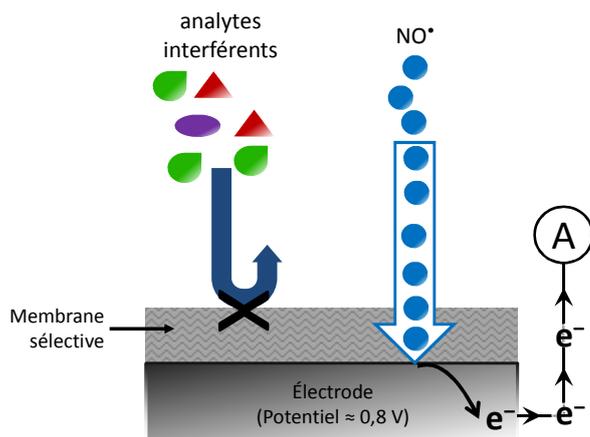


Figure 1.18 Principe de l'exclusion des molécules interférentes à l'aide d'une membrane directement déposée à la surface d'une électrode.

La sélectivité des membranes dépend de la perméabilité de celles-ci aux molécules électroactives présentes dans le milieu de l'étude. Cette perméabilité dépend de la morphologie et du traitement thermique des couches, de la nature du solvant, du type d'électrolyte support et de la structure des molécules électroactives ; la compréhension du rôle de ces paramètres permet d'optimiser les capteurs [67]. Par exemple les couches à fort caractère hydrophobe tirent parti de l'hydrophobicité de NO^\bullet pour favoriser son accumulation préférentielle dans la couche par rapport à la phase aqueuse, et augmenter ainsi la sensibilité du capteur [67,71].

Le Nafion® est un polymère fluoré échangeur de cations, chargé négativement à pH neutre (Figure 1.19). Il repousse efficacement les espèces anioniques, *via* des interactions électrostatiques, c'est pourquoi il est souvent employé pour améliorer la sélectivité des électrodes, notamment envers NO_2^- et l'ascorbate. Cependant, ce polymère est peu efficace vis-à-vis des espèces neutres ou cationiques [71]. Parmi les membranes les plus citées et utilisées, il est important de mentionner le polyéugénol et la polyortho-phénylènediamine qui peuvent être électrodéposés à la surface des électrodes. De manière générale, une seule membrane n'est pas toujours suffisante pour exclure toutes les espèces indésirables à cause des différences de taille et de charge entre ces interférents. Il est alors possible de combiner différents types de membranes pour adapter la sélectivité à une application biologique donnée. Cette approche est cependant limitée par la diminution de la sensibilité du capteur lors de l'accumulation de couches sélectives à sa surface, du fait du ralentissement de la diffusion de NO^\bullet au sein des différents matériaux.

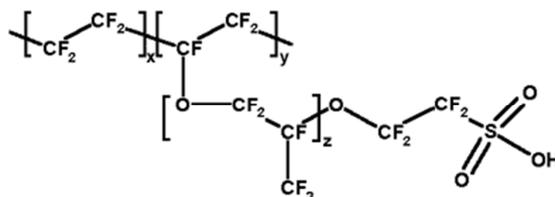


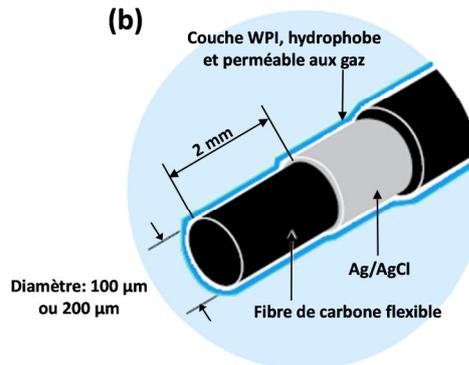
Figure 1.19 Structure chimique du Nafion®

Les compagnies *World Precision Instruments (WPI)* et *Innovative Instruments Inc.* se sont inspirées de certains des travaux cités précédemment pour développer des capteurs à NO•. Les capteurs sont commercialisés en plusieurs tailles, avec des dimensions d'électrodes allant de 0,1 μm à 2,0 mm (Figure 1.20). Ils sont basés sur le principe de l'« électrode combinée », où l'électrode de travail et l'électrode de référence sont intégrées au sein d'une même gaine faisant office de cage de Faraday. Ce design, qui a pour but de minimiser l'influence du bruit environnant, est associé exclusivement à l'utilisation de l'ampérométrie simple. Les fabricants affirment que les capteurs ont des performances « excellentes » et « discriminent efficacement » envers NO_2^- , la dopamine, la sérotonine, l'acide ascorbique et H_2O_2 . Ces caractéristiques sont attribuées à l'arrangement des électrodes, en conjonction avec des membranes perméables aux gaz et/ou des multicouches spécialement développées. Cependant, aucune indication n'est fournie quant à la nature des membranes et leur mécanisme d'action, qui est probablement basé sur des effets d'exclusion de charge et de taille. WPI indique une limite de détection de 1 nm pour ses capteurs.

(a) www.wpiinc.com



(b)



(c) www.2in.com



Figure 1.20 Photos et dessin schématique de microcapteurs à NO• commercialisés par (a ; b) WPI et (c) Innovative instruments.

iii) *Capteurs à base de catalyseurs*

Les capteurs incorporant des médiateurs redox représentent une approche alternative pour augmenter la sensibilité et la sélectivité de la mesure de NO^\bullet . La présence du médiateur redox à la surface de l'électrode permet de catalyser l'électrooxydation de NO^\bullet , abaissant ainsi le potentiel de travail tout en augmentant l'intensité du courant (Figure 1.21).

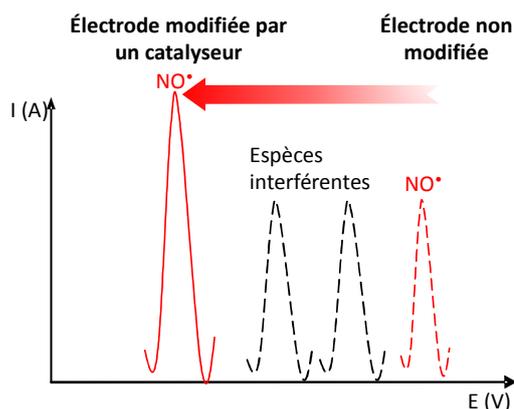


Figure 1.21 Représentation schématique de l'effet de la modification de la surface de l'électrode pour abaisser le potentiel d'oxydation de NO^\bullet .

Les catalyseurs communément employés pour remplir ce rôle sont représentés sur la Figure 1.22. Ce sont généralement des complexes de type métal-porphyrine, phtalocyanine ou salen. Dans la plupart des cas, ils permettent d'abaisser le potentiel d'oxydation de NO^\bullet d'environ 0,15 V tout en multipliant l'intensité du courant par environ 2 ou 3, en comparaison avec des électrodes conventionnelles non modifiées [78]. En général, l'abaissement du potentiel travail n'est pas suffisamment important pour s'affranchir de toutes les interférences ; ces molécules catalytiques sont souvent employées en association avec des membranes sélectives pour améliorer encore la sélectivité globale du capteur. Le premier capteur développé sur ce principe a été présenté en 1992, il est basé sur l'utilisation d'une porphyrine de nickel en conjonction avec le nafion® [79]. Sa sensibilité et sa conception facilement compréhensible permettent son adaptation à différents types de systèmes biologiques, de ce fait c'est un des capteurs les plus communément employés pour détecter NO^\bullet [69].

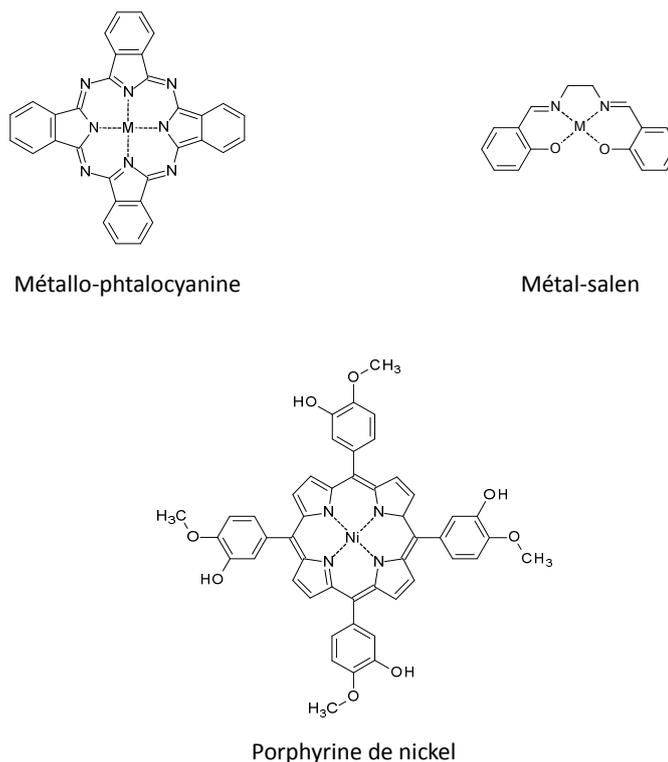


Figure 1.22 Structures de médiateurs rédox communément employés dans les capteurs électrocatalytiques pour la détection de $\text{NO}\cdot$.

La Figure 1.23 récapitule les différentes stratégies employées pour améliorer la sélectivité et la sensibilité des capteurs à $\text{NO}\cdot$.

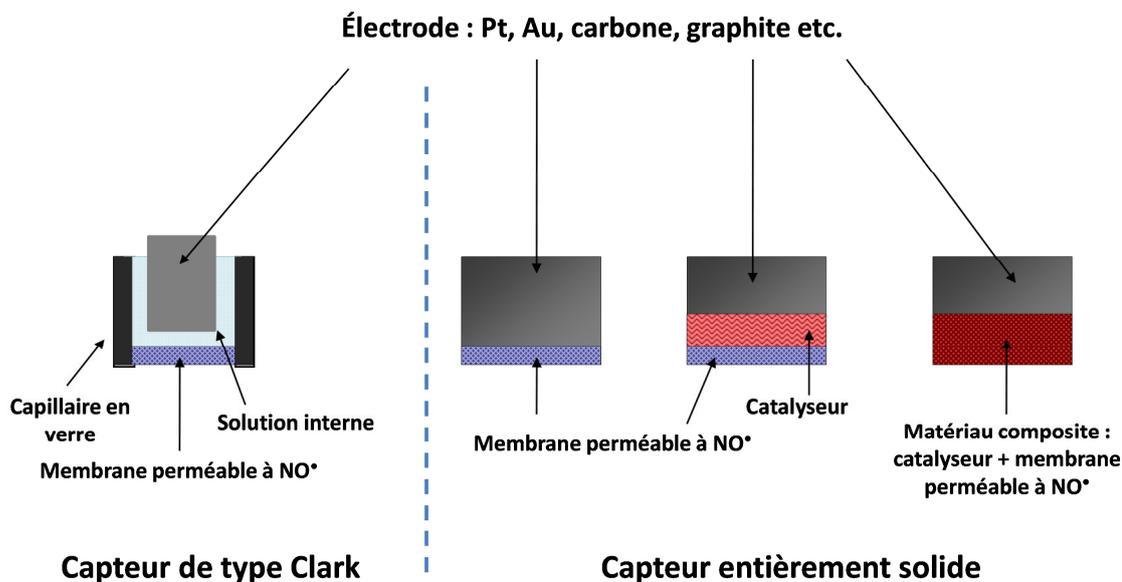


Figure 1.23 Représentation schématique des différents types de capteurs électrochimiques à $\text{NO}\cdot$ développés au cours des 20 dernières années.

1.4.b. Détection opto-électrochimique

L'électrochimie ne permet pas d'effectuer des mesures intracellulaires. C'est pourquoi cette technique a été couplée à la détection par fluorescence qui permet d'obtenir des informations sur la présence de NO^* à l'intérieur des cellules [80]. Le montage utilise des électrodes d'or ou de carbone pour détecter NO^* extracellulairement et une sonde diaminofluorescéine pour détecter la production intracellulaire. Ce système combine avantageusement la résolution temporelle de l'électrochimie avec la résolution spatiale de la fluorescence, afin d'obtenir des informations complémentaires sur le modèle biologique étudié.

1.4.c. Détection électrochimique de l'anion peroxynitrite

Si l'électrochimie s'est imposée comme une technique de choix pour la détection de NO^* , la situation est différente concernant ONOO^- et les capteurs électrochimiques pour cette molécule sont rares. La plupart des capteurs décrits sont basés sur l'électroréduction de ONOO^- . Un des premiers exemples utilise une électrode modifiée avec une phtalocyanine de manganèse pour détecter ONOO^- libéré par des cellules de myocarde néonatales [81]. Le capteur est étalonné en milieu neutre avec des solutions synthétiques de ONOO^- qui ne devraient pas être stables pendant la durée de l'expérience, amenant des doutes quant à l'identité de l'espèce détectée. Un autre capteur a été utilisé pour détecter ONOO^- dans des cellules endothéliales isolées ou dans le système vasculaire de rats [37] mais aucune donnée n'est disponible dans la littérature concernant la méthode de fabrication et la validation de cet outil. Un troisième exemple décrit la fabrication et l'étalonnage en milieu basique d'un capteur constitué d'un film de phtalocyanine de manganèse déposé sur une UME de platine [82]. Le potentiel de travail nécessaire à la réduction de ONOO^- permet aussi de réduire O_2 ce qui pose un problème d'interférences pour des applications biologiques. Récemment un nouveau capteur utilisant un complexe de manganèse pour catalyser la réduction de ONOO^- a été décrit [83], mais, de nouveau, les données utilisées pour l'étalonnage en milieu neutre ne sont pas compatibles avec la faible durée de vie de ONOO^- à $\text{pH} = 7$. Dans une autre approche, une électrode de carbone modifiée avec une cyanocobalamine a été utilisée pour oxyder ONOO^- . Bien que le potentiel d'oxydation soit relativement élevé ($\approx 0,75 \text{ V vs ECS}$) le capteur affiche une certaine sélectivité vis-à-vis de nombreux interférents biologiques [84]. Enfin, l'oxydation électrochimique de ONOO^- a aussi été réalisée à l'aide de fibres de

carbone modifiées par un polymère conducteur, le poly(3,4-éthylènedioxythiophène), incorporant une porphyrine de fer. La mesure est effectuée à 0,75 V vs Ag/AgCl et le capteur est sélectif vis-à-vis de NO_2^- et NO_3^- [85].

1.4.d. Détection simultanée de $\text{NO}\cdot$ et ONOO^-

Dans une approche se démarquant des précédentes, l'équipe Arbault-Amatore a montré qu'il était possible de détecter et quantifier plusieurs espèces réactives de l'oxygène (H_2O_2) et de l'azote ($\text{NO}\cdot$, $\text{NO}_2\cdot$, ONOO^-) libérées par des cellules isolées [86,87]. Dans cette stratégie, plutôt que d'essayer de masquer ou supprimer le signal des espèces interférentes, la concentration de chaque molécule est déterminée *via* un algorithme, permettant ainsi d'obtenir plus d'informations sur le système. Dans le protocole expérimental mis en place, les mesures électrochimiques sont effectuées à plusieurs potentiels, or comme chaque espèce s'oxyde à un potentiel différent, il est ainsi possible de quantifier la contribution de chaque molécule au signal total (Figure 1.24). Ce protocole est le plus abouti en ce qui concerne la détection électrochimique de ONOO^- et a été utilisé dans plusieurs types de systèmes biologiques [88-91]. Cette méthode implique d'effectuer plusieurs centaines de mesures sur des cellules différentes pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. La présence d'une seule espèce électroactive non identifiée rend le modèle non applicable et son utilisation n'est donc pas possible dans certains milieux biologiques complexes.

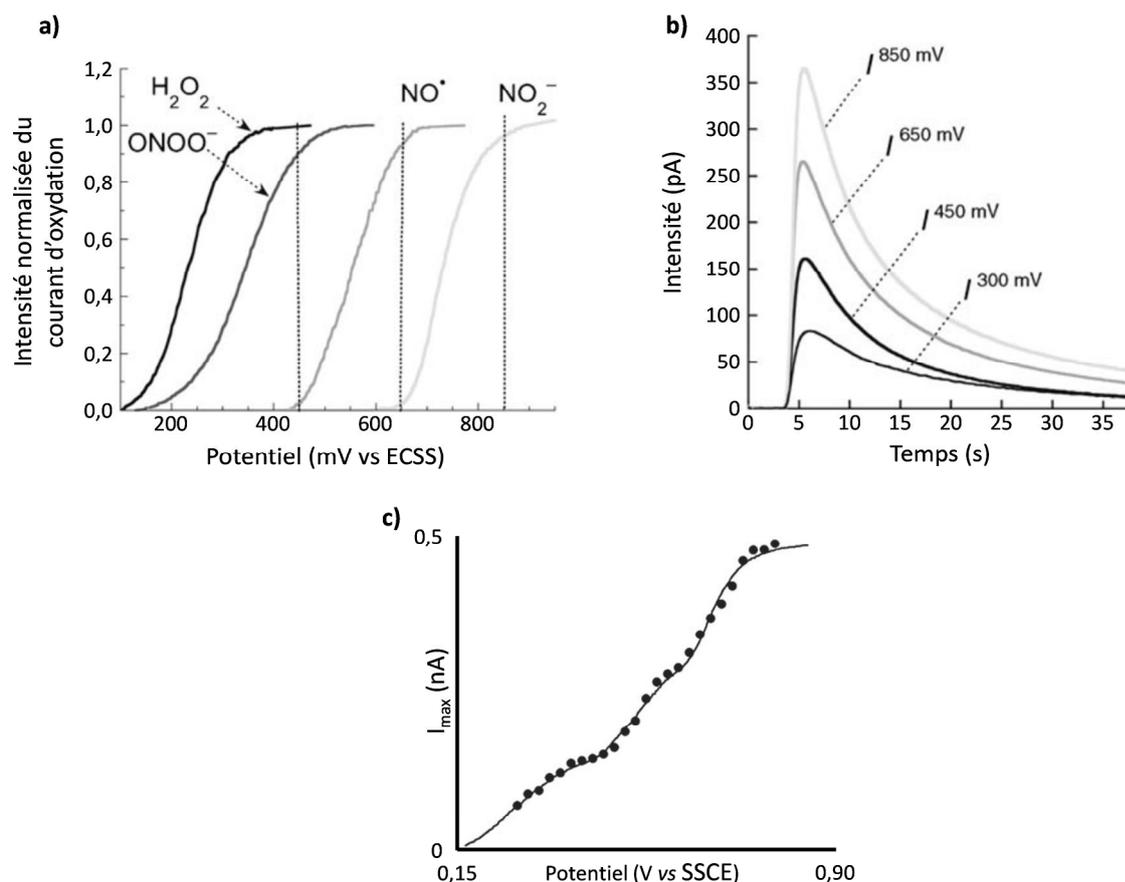


Figure 1.24 a) Illustration des différents potentiels d'oxydation de 4 espèces réactives de l'azote et de l'oxygène. b) Lorsque le potentiel de travail est augmenté le nombre d'espèces oxydées est plus important et l'intensité du courant augmente. c) Variation, en fonction du potentiel, de l'intensité maximale du courant enregistrée après stimulation de fibroblastes humains, lorsque l'électrode est positionnée à 5 μm au-dessus des cellules. Figures adaptées de [92] et [93].

En résumé

L'électrooxydation de NO^\bullet s'est imposée comme l'une des méthodes analytiques principales pour sa détection. L'utilisation de couches sélectives permet d'empêcher les analytes interférents d'accéder à la surface de l'électrode, le Nafion® étant le polymère le plus utilisé pour remplir ce rôle. La modification de la surface des électrodes par des complexes métalliques, dont la pophyrine de nickel est l'exemple type, augmente la sensibilité du capteur tout en abaissant le potentiel opérationnel. Ces deux approches, i.e. permselective et électrocatalytique, sont souvent utilisées conjointement. La détection électrochimique de ONOO^- est moins développée que celle de NO^\bullet ; elle est effectuée grâce à des électrodes modifiées par des complexes métalliques, fonctionnant en réduction ou en oxydation. Enfin, l'application de plusieurs potentiels, en conjonction avec la connaissance de tous les analytes électroactifs du milieu étudié, permet de développer des modèles autorisant la quantification de ces espèces électroactives, dont NO^\bullet et ONOO^- .

1.5. Conclusion de la partie bibliographique

Au-delà de ses différentes actions dans le fonctionnement normal de l'organisme, NO• est impliqué dans de nombreuses pathologies jouant tantôt un rôle bénéfique, tantôt un rôle délétère. La plupart des effets délétères de NO• semblent être liés à la génération de ONOO⁻ lorsqu'il réagit avec O₂⁻. Malgré les intenses efforts de recherche dans le domaine, il existe très peu de thérapies basées sur la modulation de NO• et/ou ONOO⁻ car les mécanismes d'action de ces deux molécules dans diverses pathologies ne sont pas encore entièrement élucidés. Une meilleure compréhension de ces mécanismes d'action passe par l'utilisation d'un outil analytique fiable, permettant de détecter simultanément la présence de ces deux espèces. L'électrochimie s'est imposée comme l'une des méthodes les plus utiles pour quantifier NO• dans des modèles biologiques, mais elle est encore peu utilisée pour l'analyse de ONOO⁻ bien qu'elle puisse en théorie présenter les mêmes avantages que pour la détection de NO•.

Chapitre 2. Design, fabrication et caractérisation de réseaux d'UMEs

Les UMEs sont des outils polyvalents pour l'étude de processus électrochimiques d'intérêt analytique (cf. section 0). Leur petite taille autorise leur utilisation dans des volumes confinés ou des régions spatiales d'accès difficile, ce qui en fait des outils de choix pour les études *in vivo* [94]. En outre, leurs propriétés électrochimiques sont avantageuses en comparaison avec celles des macroélectrodes (électrodes de taille millimétrique). Grâce à leur faible capacitance interfaciale, le rapport signal/bruit des UMEs est amélioré. De plus, ces électrodes permettent d'obtenir des courants stationnaires sans convection forcée [70]. Ces différences de comportement sont expliquées et détaillées ci-après (paragraphe 2.1.a).

En dépit de toutes ces propriétés avantageuses, la petite taille des UMEs est la source d'un inconvénient : les courants enregistrés avec ces électrodes sont généralement de faible intensité, de l'ordre de quelques nanoampères voire moins [94]. La mesure de ces courants nécessite une instrumentation sensible et une bonne isolation électrique du dispositif expérimental. Les appareils commerciaux se sont adaptés et il n'est pas rare de trouver des potentiostats pouvant mesurer des courants de quelques picoampères. Néanmoins, la diminution du courant reste une source de difficultés expérimentales.

Les réseaux d'électrodes dans lesquels plusieurs UMEs sont connectées simultanément offrent une alternative attractive aux UMEs individuelles [94]. Ils peuvent produire une réponse en courant de magnitude similaire à celle de macroélectrodes en régime de convection forcée, mais avec considérablement moins de courant capacitif. Dans certaines conditions, explicitées ci-après, les courants enregistrés à chaque UME individuelle sont additifs, et il est possible d'améliorer la sensibilité de plusieurs ordres de grandeur. De plus, le grand nombre d'électrodes permet de moyennner certaines fluctuations du signal, notamment celles provenant de l'état de surface de l'UME. Ainsi, une expérience avec un réseau de N électrodes donne la même reproductibilité que N expériences avec une seule électrode (si l'électrode est la source majoritaire des fluctuations du signal).

Ces réseaux apparaissent alors comme un outil de choix pour la détection électrochimique de molécules faiblement concentrées, d'intérêt biologique. Ils peuvent être

fabriqués de manière similaire à des circuits imprimés, grâce aux techniques photolithographiques développées avec l'essor de la microélectronique. Les dispositifs intégrant ces réseaux sont généralement trop volumineux pour envisager de les implanter *in vivo*, mais ils sont bien adaptés à l'étude de cultures cellulaires ou de tranches de tissus.

En outre, la technologie employée pour fabriquer les réseaux d'UMEs autorise la conception de dispositifs dans lesquels plusieurs électrodes, ou groupes d'électrodes, sont adressables à des potentiels différents. Ceci présente un avantage certain dans le cas particulier de la détection simultanée de deux analytes, comme NO^{\bullet} et ONOO^{-} . Chaque électrode peut ainsi être polarisée à un potentiel adapté à la détection d'un analyte particulier. Dans la suite de ce travail, nous appellerons « réseau d'UMEs » un groupe de plusieurs UMEs connectées simultanément (court-circuitées) et « dispositif capteur » un dispositif contenant plusieurs électrodes (UMEs, réseaux d'UMEs, électrode de référence, etc.) adressables séparément.

La distance séparant le centre de deux UMEs individuelles est le paramètre ayant le plus d'influence sur les propriétés électroanalytiques d'un réseau d'UMEs. Ceci peut être expliqué en étudiant les profils de diffusion se développant au contact des réseaux d'UMEs lors d'une électrolyse.

2.1. Les différents modes de diffusion pour des réseaux d'UMEs

Dans cette section, nous nous focaliserons sur les propriétés des réseaux d'UMEs de forme disque, sans récession par rapport au plan du matériau isolant (Figure 2.1). En effet, ces électrodes ont souvent été étudiées d'un point de vue théorique et représentent une bonne approximation des électrodes fabriquées au cours de ce travail.

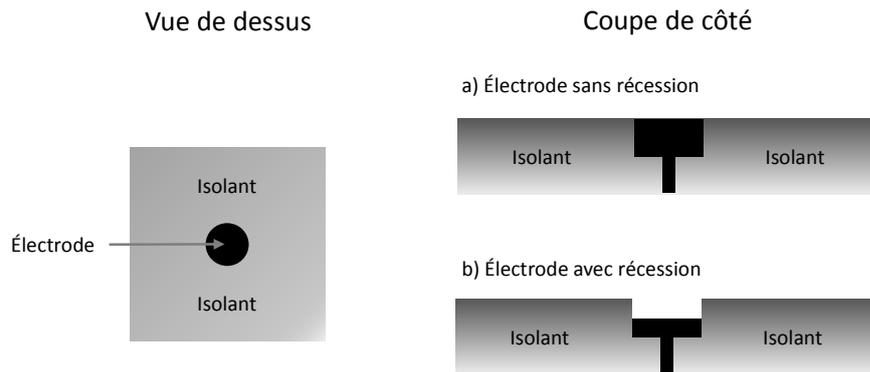


Figure 2.1. Représentation schématique d'une électrode en forme de disque a) sans récession par rapport au plan de l'isolant b) avec une récession par rapport au plan de l'isolant. Ces électrodes sont appelées électrodes disque plan.

2.1.a. La diffusion à une UME individuelle

Lors d'une électrolyse, l'espèce dissoute impliquée dans la réaction électrochimique est consommée à l'interface électrode/solution. Ceci entraîne la formation d'un gradient de concentration auquel est associé un flux de diffusion de l'espèce électroactive. Dans le cas d'une macroélectrode disque plan, le flux de diffusion est orienté perpendiculairement à la surface de l'électrode, la diffusion est qualifiée de « plane ». À une UME plane, les effets de bord introduisent dans le flux de diffusion une composante sphérique, la diffusion est qualifiée de « hémisphérique » (Figure 2.2).

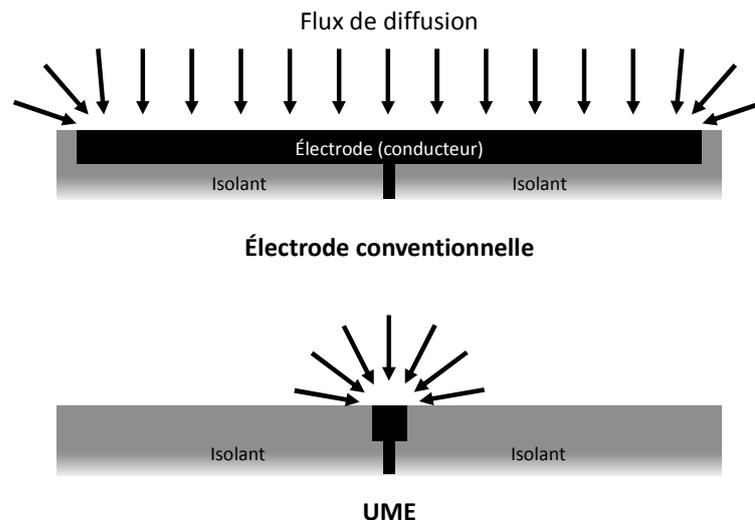


Figure 2.2 Illustration de la différence de forme des flux de diffusion entre des électrodes disque plan de dimensions différentes.

La Figure 2.3 illustre l'influence de ce changement de régime de diffusion sur la forme d'un voltampérogramme, dans le cadre d'une réaction électrochimique contrôlée par la diffusion. Lorsque l'électrode est suffisamment petite (donc lors de l'utilisation d'une UME), le courant observé est indépendant du temps pour des potentiels suffisamment élevés (surpotentiel ≥ 60 mV), on parle alors de régime stationnaire.

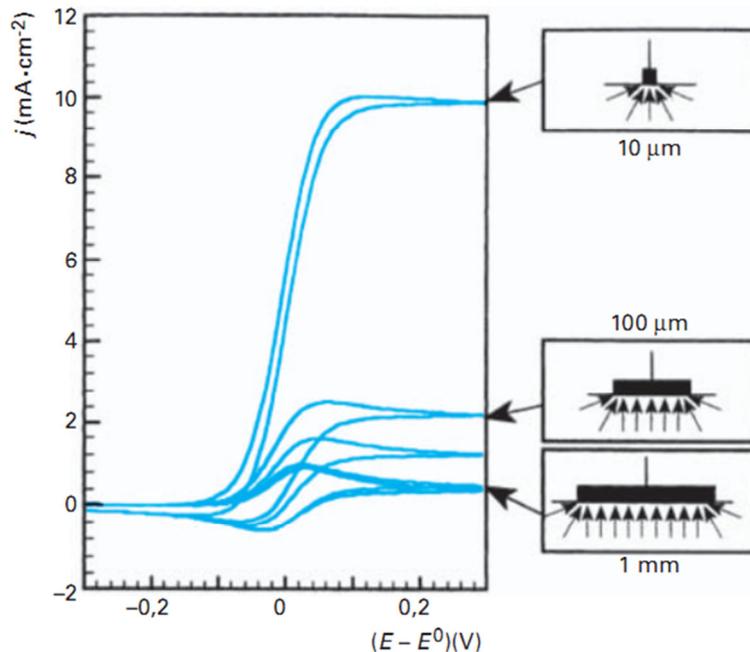


Figure 2.3 Effet de la taille d'une électrode disque sur l'allure du voltampérogramme en régime de diffusion pure, figure adaptée de [95].

La résolution des équations de la diffusion (équations de Fick) permet d'évaluer l'intensité du courant traversant la surface, pour une réaction électrochimique limitée seulement par la diffusion. Lors d'une chronoampérométrie à une électrode disque plan millimétrique, sans agitation de la solution, l'intensité du courant est exprimée par l'équation (2.1) (appelée équation de Cottrell) pour une diffusion plane applicable à une électrode conventionnelle, et par l'équation (2.2) (parfois appelée relation de Saito) pour une diffusion hémisphérique, applicable à une UME.

Diffusion plane
(macroélectrode)

$$i_{\text{far}} = \frac{nFA\sqrt{D}C_i}{\sqrt{\pi}\sqrt{t}} \quad (2.1)$$

Diffusion hémisphérique
(UME disque)

$$i_{\text{far}} = 4nFrDC_i \quad (2.2)$$

Avec :

i_{far} : Intensité du courant faradique

n : Nombre d'électrons transférés lors de la réaction électrochimique
 F : Constante de Faraday correspondant à la charge d'une mole d'électrons
 A : Aire de l'électrode
 r : Rayon de l'électrode
 D : Coefficient de diffusion de l'espèce électroactive (l'analyte)
 C_i : Concentration initiale de l'espèce électroactive
 t : Temps

Dans les deux cas, l'intensité du courant dépend de la concentration en analyte, ce qui permet d'obtenir des informations quantitatives lors de la détection électrochimique d'une molécule. Cependant, cette intensité décroît au cours du temps lorsque la diffusion est plane, alors qu'elle est indépendante du temps pour une diffusion hémisphérique. C'est ainsi que les UMEs permettent d'obtenir des courants stationnaires, sans avoir besoin d'agiter mécaniquement la solution analysée. Il faut noter que l'obtention du régime de diffusion hémisphérique à une UME n'est pas immédiate, et l'équation (2.2) n'est valable que pour des temps d'électrolyse suffisamment « longs » (typiquement quelques dizaines de millisecondes [96]).

Le second avantage des UMEs est la réduction du courant capacitif. Lors d'une expérience où l'on impose le potentiel en mesurant le courant, deux types de courants peuvent circuler dans la cellule électrochimique : le courant faradique (i_{far}) et le courant capacitif (i_{cap}) ; le signal enregistré correspond à la somme de ces courants. Le courant faradique implique un transfert d'électron à travers l'interface électrode/solution, il est généré par la réaction électrochimique. Le courant capacitif apparaît à la suite de l'accumulation de charges de chaque côté de l'interface électrode/solution (cette accumulation de charge provenant elle-même de la différence de potentiel existant entre l'électrode et la phase liquide). Lors du passage de ce courant d'origine électrostatique, la cellule électrochimique se comporte comme un condensateur. Or, dans les expériences électrochimiques réalisées pour détecter les espèces électroactives, le courant capacitif ne fournit pas d'information utile concernant les analytes, à l'opposé du courant faradique. Il est donc intéressant de pouvoir maximiser le rapport $i_{\text{far}}/i_{\text{cap}}$. Pour une UME disque, le courant faradique est proportionnel au rayon de l'électrode alors que le courant capacitif est proportionnel à l'aire de la surface de l'électrode, donc plus le rayon de l'électrode diminue, plus le rapport $i_{\text{far}}/i_{\text{cap}}$ augmente. Dans le cas d'une macroélectrode les deux types de courant sont proportionnels à l'aire de la surface et le rapport $i_{\text{far}}/i_{\text{cap}}$ est alors plus faible.

2.1.b. La diffusion à un réseau d'UMEs

Si les UMEs d'un réseau sont suffisamment proches les unes des autres, de nouveaux régimes de diffusion peuvent apparaître. Ces régimes sont classés en quatre catégories, illustrées sur la Figure 2.4, pour un réseau d'UMEs disque plan régulièrement espacées et une réaction électrochimique contrôlée seulement par la diffusion [97-100].

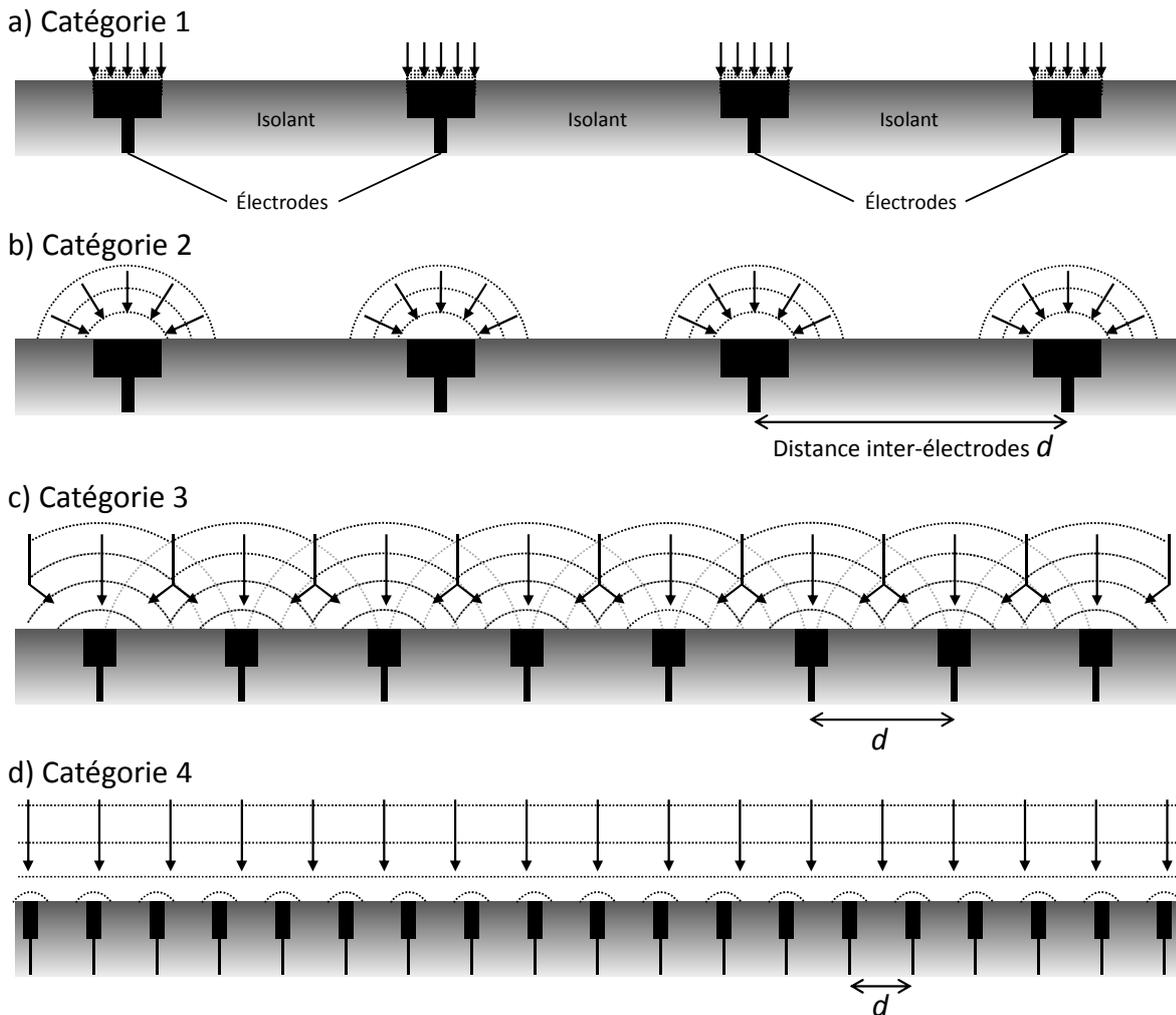


Figure 2.4 Description schématique des différents modes de diffusion possibles à la surface de réseaux d'UMEs. Les flèches indiquent la direction des flux de diffusion et les pointillés représentent les lignes d'isoconcentration de l'espèce électroactive consommée/produite par la réaction électrochimique. a) Diffusion plane aux temps courts b) Diffusion hémisphérique c) Diffusion mixte d) Diffusion plane sur toute la surface du réseau aux temps longs.

À des temps d'électrolyse courts, chaque UME est infiniment grande comparée à l'épaisseur de la couche de diffusion (catégorie 1). Alors, la diffusion est plane. Lorsque l'épaisseur de la couche de diffusion devient comparable à la taille de l'électrode, la diffusion devient hémisphérique (catégorie 2). C'est le type de diffusion le plus communément associé

aux réseaux d'UMEs, qui engendre le ratio courant faradique/courant capacitif le plus important. En effet, les réseaux d'UMEs sont généralement conçus et fabriqués avec cette propriété présente à l'esprit. La réponse électrochimique des réseaux de la catégorie 2 est simplement la réponse d'une UME individuelle multipliée par le nombre total d'électrodes dans le réseau. Par conséquent, les courants enregistrés avec les réseaux de cette catégorie ont des caractéristiques stationnaires. Si le temps d'électrolyse augmente encore, et si les UMEs du réseau sont suffisamment proches les unes des autres, les couches de diffusion adjacentes peuvent interagir/se chevaucher (catégorie 3). Lorsque les zones de diffusion se recouvrent, les UMEs adjacentes appauvrissent la même région de la solution, amenant à une diminution du courant. Finalement, l'évolution de cette situation entraîne un recouvrement total des zones de diffusion et un régime de diffusion plane (catégorie 4).

Lorsque la diffusion est plane (catégories 1 et 4), la situation est similaire à celle rencontrée avec une macroélectrode. Le courant faradique est proportionnel à $t^{-1/2}$, en analogie avec la relation de Cottrell établie pour les macroélectrodes (équation (2.1)) [101]. Dans la catégorie 2, le courant est stationnaire, indépendant du temps. Il obéit à la même relation qu'une UME individuelle (équation (2.2)), son intensité étant multipliée par le nombre d'électrodes du réseau.

Lors d'une chronoampérométrie en solution aqueuse, le régime de diffusion hémisphérique (catégorie 2) est atteint en 80 ms environ pour des électrodes de 25 μm de diamètre, et en 13 ms environ pour des électrodes de 10 μm de diamètre [96]. Ces temps sont négligeables pour des expériences de plusieurs minutes. Ainsi, à moins de travailler à des temps très courts, le premier régime de diffusion observé est le régime de diffusion hémisphérique. Comme ce comportement est celui généralement recherché lors de l'utilisation de réseaux d'UMEs, leur design doit être pensé pour que ce régime dure le plus longtemps possible, avant que la diffusion ne devienne de nouveau plane. Plus les UMEs sont rapprochées, plus vite les couches de diffusion individuelles se recouvrent. D'un autre côté, plus les UMEs sont espacées, plus le nombre d'électrodes disponibles pour la détection ainsi que la sensibilité du réseau sont faibles. Le paramètre utilisé pour quantifier l'espacement des UMEs est le rapport d/r_0 , d représentant la distance centre-à-centre entre deux UMEs, et r_0 le rayon d'une UME.

La Figure 2.5 montre le profil de concentration simulé, à une UME disque, lorsque l'état stationnaire est atteint [70]. À la surface de l'électrode, la concentration en analyte est

nulle car celui-ci est consommé par la réaction électrochimique en cours. La ligne d'isoconcentration 0,9 indique, par exemple, les points où la concentration de la solution est égale à 90 % de sa valeur initiale, avant l'application d'un potentiel et le début de la réaction électrochimique. Du fait de la géométrie à deux dimensions du disque, la couche de diffusion s'étend légèrement plus dans le plan horizontal (axe r) que selon l'axe vertical (z). À l'état stationnaire, l'étendue de la couche de diffusion est infinie. Cependant, la majorité du gradient de concentration est concentré à proximité de l'électrode (les lignes d'isoconcentration sont plus rapprochées près de l'électrode).

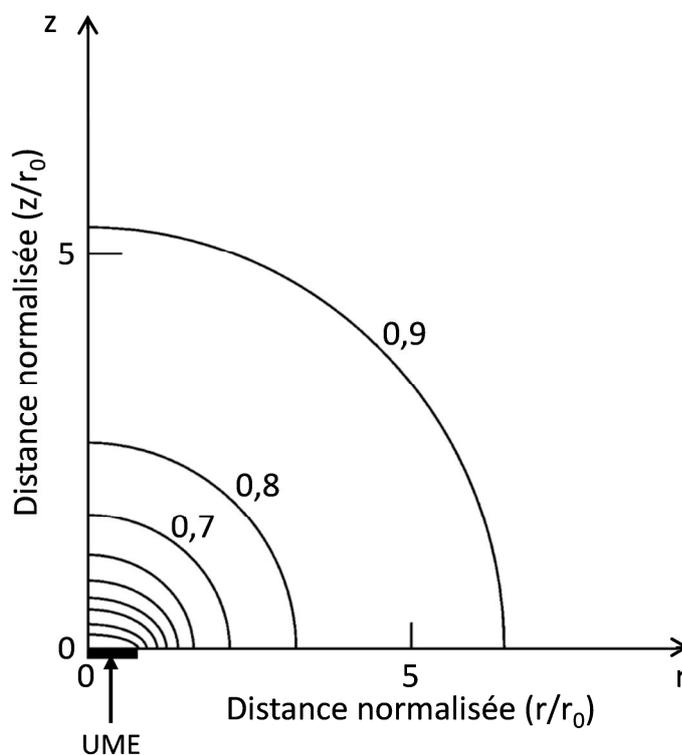


Figure 2.5 Profil de concentration 2D à une UME disque plan, en régime stationnaire, avec des lignes d'isoconcentration allant de $C/C_0 = 0,1$ à $C/C_0 = 0,9$. C_0 indique la concentration initiale en espèce électroactive, avant le début de la réaction électrochimique. Les distances sont normalisées par rapport au rayon de l'électrode, r_0 . Figure adaptée de [70].

Pour ce projet, nous avons choisi d'espacer les UMEs individuelles des réseaux d'une distance d égale à 20 fois leur rayon r_0 . Les zones de diffusion se rencontrent à équidistance entre deux électrodes, à $d/2$, ce qui représente $10 r_0$ dans notre cas (Figure 2.6). À cette distance, la concentration de la solution est diminuée de moins de 10 % par rapport à la concentration initiale. Nous faisons alors l'hypothèse que ces quelques pour cents ne perturberont pas de manière significative les diffusions individuelles des UMEs, évitant ainsi la catégorie 4.

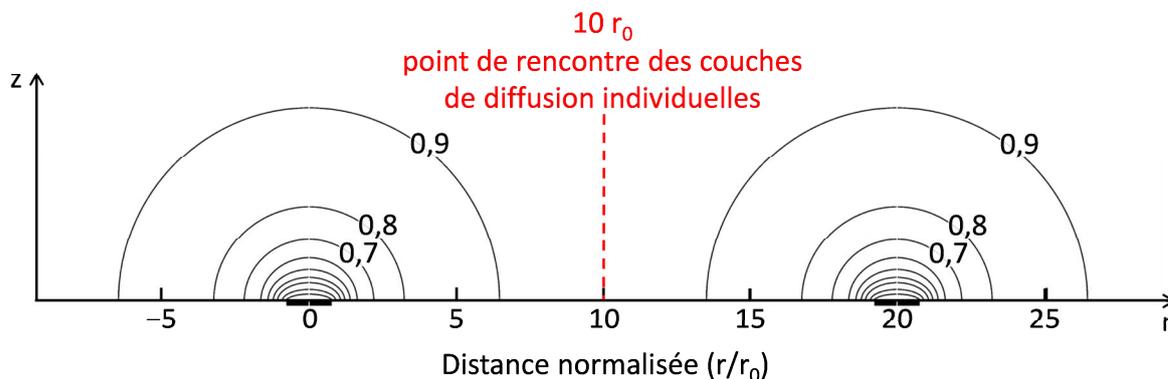


Figure 2.6 Profil de concentration stationnaire à deux UMEs disque plan, séparées d'une distance égale à 20 fois leur rayon r_0 , avec des lignes d'isoconcentration allant de $C/C_0 = 0,1$ à $C/C_0 = 0,9$. C_0 indique la concentration initiale en espèce électroactive, avant le début de la réaction électrochimique. Les distances sont normalisées par rapport au rayon de l'électrode, r_0 . Figure adaptée de [70].

2.2. Fabrication des réseaux d'UMEs

Les dispositifs capteurs intégrant les réseaux d'UMEs disque plan ont été fabriqués par l'Équipe BIOMIS (L. Griscom, F. Razan), du laboratoire SATIE (UMR 8029) à l'ENS Cachan – Bretagne, sur le campus de Ker Lann près de Rennes. Ils ont été élaborés par photolithographie, dans une salle blanche pour satisfaire aux strictes conditions de pureté nécessaires pour une détection électrochimique sensible.

Ces dispositifs sont constitués d'électrodes en or sur un substrat en verre. Ils intègrent des réseaux d'UMEs, ainsi que des électrodes millimétriques destinées à servir d'électrode de référence et de contre-électrode, afin d'obtenir une cellule électrochimique complète. Les dimensions de ces dispositifs capteurs ont été choisies pour s'adapter à la surface d'un puits de culture cellulaire (plaque 24 puits), en vue d'un transfert ultérieur de la technologie à des plaques de culture cellulaire. Le processus de fabrication est détaillé sur le Tableau 2.1.

Au début de ce projet j'ai eu la possibilité de participer à certaines phases de ce procédé de fabrication, qui comporte quatre étapes principales :

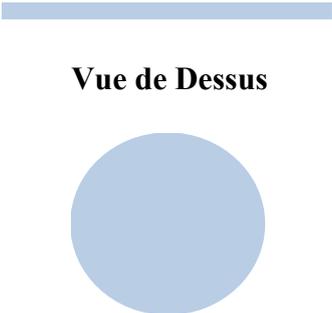
- (1) Dans un premier temps, l'or du réseau est déposé sur un substrat en verre.

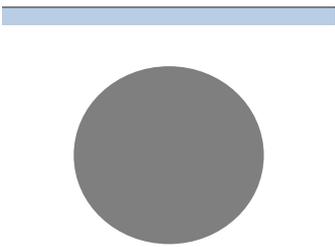
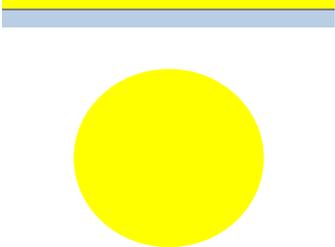
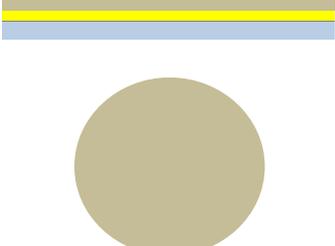
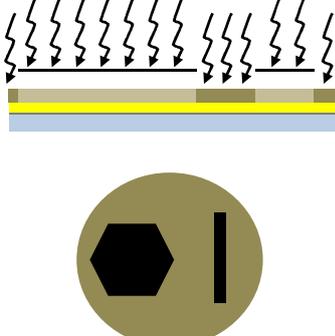
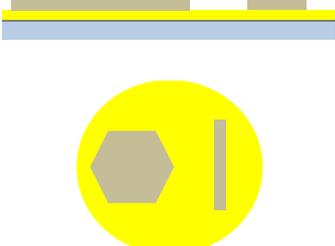
- (2) Il est ensuite gravé par des techniques photolithographiques, pour faire apparaître la géométrie des électrodes et des différentes « pistes » permettant d'établir le contact électrique.
- (3) La surface entière est recouverte d'une couche isolante de parylène-C.
- (4) Enfin, cette couche passivante est sélectivement enlevée au-dessus des électrodes et des pads de contact (zones destinées à effectuer le contact électrique entre le potentiostat et les électrodes).

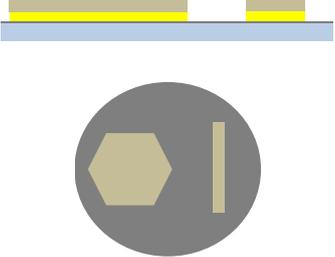
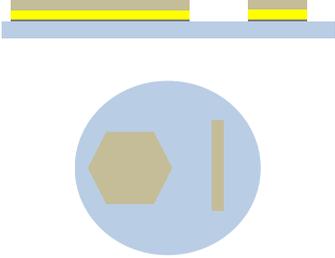
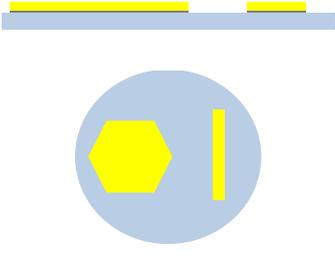
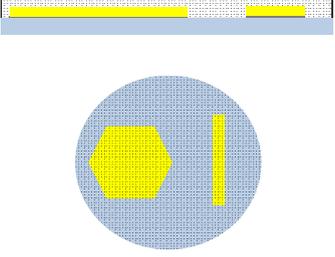
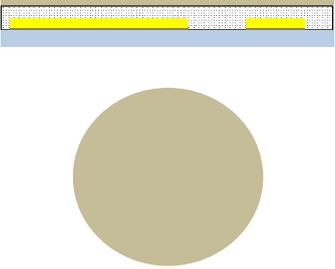
Le parylène-C a été choisi pour sa résistance chimique et sa biocompatibilité. De plus, le procédé de gravure au plasma garantit des surfaces d'électrode propres. Dans les premiers prototypes, la passivation des électrodes était effectuée en utilisant la résine photosensible SU-8, car elle est souvent utilisée pour les réseaux de microélectrodes commerciaux. Cependant, cette résine s'est révélée non appropriée dans le cas présent, car elle provoquait la pollution de la surface des électrodes et se dégradait au contact d'une solution de phénol, utilisée pour améliorer la sélectivité du capteur vis-à-vis de NO^{*} (cf. chapitre 3).

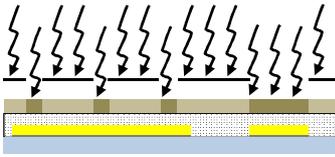
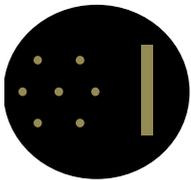
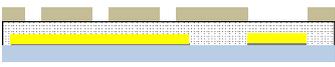
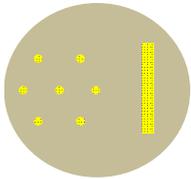
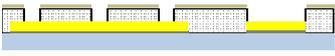
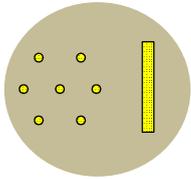
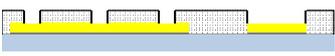
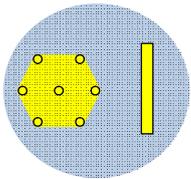
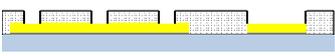
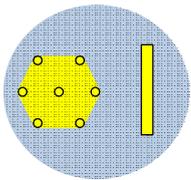
La fabrication d'un dispositif capteur par le procédé décrit demande environ 7 jours, et 10 à 20 dispositifs peuvent être fabriqués à la fois.

Tableau 2.1 Description et représentation schématique du processus de fabrication de réseaux d'UMEs.

Étape n°	Opération effectuée	Vue de Côté
1	<p>Nettoyage du substrat en verre.</p> <p>Détails expérimentaux Diamètre du substrat 50 mm. Nettoyage par sonication pendant 2h dans une solution d'Hellmanex ® 1 % à 40 °C.</p>	<p>Vue de Dessus</p> 

2	<p>Dépôt par évaporation thermique d'une couche de titane (30 nm), permettant de favoriser l'adhésion de l'or.</p>	
3	<p>Dépôt par évaporation thermique d'une couche d'or (200 nm).</p>	
4	<p>Dépôt par enduction centrifuge (<i>spin coating</i>) d'une résine photosensible positive.</p> <p>Résine S1818 de Shipley, déposée à 3000 rpm pendant 30 s. Épaisseur $\approx 2 \mu\text{m}$.</p>	
5	<p>Insolation à travers un masque. La forme du masque définit la future forme des électrodes en or.</p> <p>Longueur d'onde de la lumière : 405 nm. Irradiation à 18 mW/cm^2 pendant 6 à 7,5 s.</p>	
6	<p>Développement de la résine.</p> <p>Développement avec <i>Microposit 351 Developer Concentrate</i> de Shipley (solution de soude et borate de sodium) pendant 30 à 40 s.</p>	

7	<p>Gravure chimique de l'or. Gravure avec solution KI/I₂.</p>	
8	<p>Gravure chimique du titane. Gravure avec <i>titanium etch</i> de Sotrachem Technic France.</p>	
9	<p>Retrait de la résine. Utilisation de <i>Remover Shipley 5m</i>. Rinçage avec acétone et isopropanol.</p>	
10	<p>Dépôt chimique en phase vapeur (CVD) d'une couche de parylène-C, isolante et transparente. Pré-étape d'activation par silanisation pour favoriser l'accroche du parylène. Épaisseur de la couche déposée $\approx 1 \mu\text{m}$.</p>	
11	<p>Dépôt par enduction centrifuge (<i>spin coating</i>) d'une résine photosensible positive. Résine S1818 de Shipley, déposée à 3000 rpm pendant 30 s. Épaisseur $\approx 2 \mu\text{m}$.</p>	

<p>12</p>	<p>Insolation à travers un masque. Les trous dans le masque définissent les endroits de l'or qui seront exposés pour prendre le contact électrique, ou pour effectuer les mesures électrochimiques.</p> <p>Longueur d'onde de la lumière : 405 nm. Irradiation à 18 mW/cm² pendant 6 à 7,5 s.</p>	 <p>The diagram shows a cross-section of a substrate with a photoresist layer and a gold layer. Light rays (represented by zig-zag arrows) pass through a mask with rectangular openings, exposing the gold layer in those areas.</p>  <p>The top-down view shows a circular substrate with a grid of small gold dots and a vertical gold bar, corresponding to the mask openings.</p>
<p>13</p>	<p>Développement de la résine.</p> <p>Développement avec <i>Microposit 351 Developer</i> de Shipley (solution de soude et borate de sodium) pendant 30 à 40 s.</p>	 <p>The diagram shows a cross-section where the photoresist has been removed from the exposed areas, leaving the gold layer exposed.</p>  <p>The top-down view shows the circular substrate with the gold dots and bar now clearly visible, and the unexposed areas covered by a clear resist layer.</p>
<p>14</p>	<p>Gravure ionique réactive avec un plasma O₂. Cette gravure attaque le parylène et la résine.</p> <p>Temps de gravure : 20 min.</p>	 <p>The diagram shows a cross-section where the photoresist and the underlying parylene layer have been etched away, leaving the gold layer exposed.</p>  <p>The top-down view shows the circular substrate with the gold dots and bar, and the surrounding areas now being a flat, etched surface.</p>
<p>15</p>	<p>Retrait du reste de résine.</p> <p>Utilisation de <i>Remover Shipley 5m</i>. Rinçage avec acétone et isopropanol.</p>	 <p>The diagram shows a cross-section where the remaining photoresist has been removed, leaving the gold layer exposed.</p>  <p>The top-down view shows the circular substrate with the gold dots and bar, and the surrounding areas now being a flat, etched surface.</p>
<p>16</p>	<p>Nettoyage plasma du réseau.</p> <p>Plasma air pendant 10 min.</p>	 <p>The diagram shows a cross-section where the remaining photoresist has been removed, leaving the gold layer exposed.</p>  <p>The top-down view shows the circular substrate with the gold dots and bar, and the surrounding areas now being a flat, etched surface.</p>

2.3. Design des dispositifs capteurs

Le design des dispositifs a évolué avec l'avancement du projet, pour s'adapter à chaque étape de développement du capteur. Les trois types de dispositifs capteurs fabriqués sont présentés sur la Figure 2.7.

Le design 1 a été utilisé pour mettre au point le procédé de fabrication. Sept UMEs disque individuellement adressables sont incluses sur ces supports. Elles sont disposées selon un arrangement hexagonal pour maximiser la densité d'électrodes. Le diamètre d'une électrode individuelle est $50\ \mu\text{m}$ la distance centre-à-centre entre chaque UME est $500\ \mu\text{m}$ ($= 20 r_0$, rayon de l'électrode). Ce capteur permet d'étudier la réponse individuelle de chaque UME, mais aussi la réponse de tout le groupe d'électrodes en court-circuitant les UMEs au niveau de la prise de contact électrique.

Le design 2 a été utilisé pour la mise au point de la détection électrochimique des deux analytes, NO^{\bullet} et ONOO^{-} . Ce design contient un nombre beaucoup plus important d'électrodes, afin de bénéficier de la sensibilité accrue d'un réseau d'UMEs. Il est constitué de deux parties symétriques contenant chacune un set de réseaux d'UMEs, une contre-électrode et une électrode de référence. Comme pour le design 1, les électrodes de travail ont un diamètre de $50\ \mu\text{m}$ et sont disposées tous les $500\ \mu\text{m}$ dans une maille hexagonale. Sept réseaux de 7 UMEs court-circuitées et un réseau de 61 UMEs court-circuitées sont présents sur chaque moitié du substrat. Les contre-électrodes ont la forme de 2 demi-cercles de $14\ \text{mm}$ de diamètre, entourant les électrodes de travail. La largeur de ces électrodes est de $500\ \mu\text{m}$, pour une aire de $9,9\ \text{mm}^2$. Les électrodes qui seront ensuite modifiées en électrodes de référence sont deux rectangles de $5 \times 0,25\ \text{mm}$ avec une aire de $1,25\ \text{mm}^2$ chacune, et sont situées au centre.

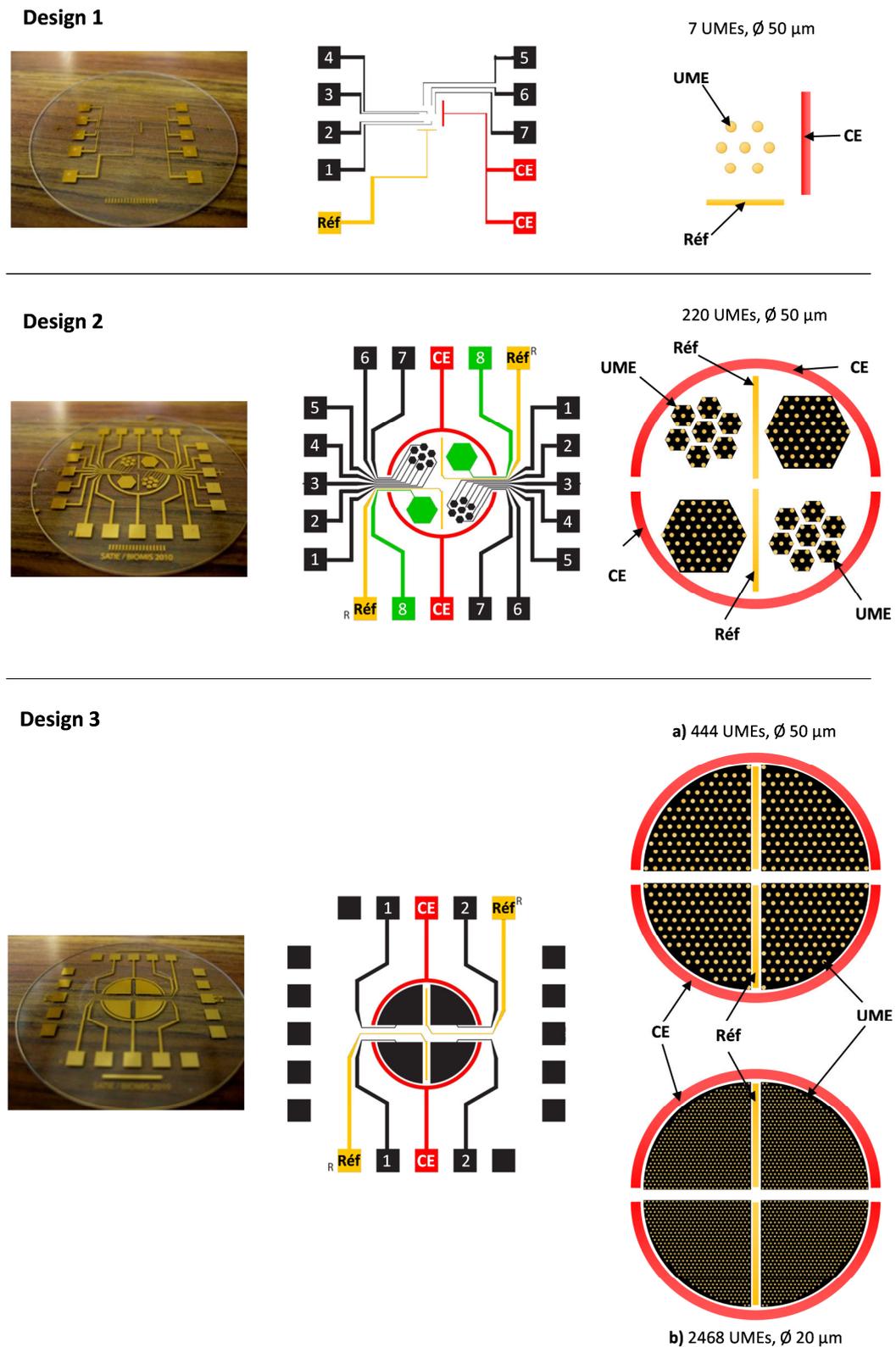


Figure 2.7 Présentation des différents dispositifs capteurs fabriqués par l'équipe BIOMIS. À gauche : photographie d'un dispositif. Au milieu : disposition et design du dispositif, comprenant les connexions électriques. À droite : schéma des électrodes de la partie centrale. Les connexions électriques avec les électrodes sont réalisées à l'aide de 20 pads situés à la périphérie. Les pads numérotés 1 à 7 (design 1 et 2) et 1 et 2 (design 3) sont connectés aux électrodes de travail. CE : contre-électrode. Réf : électrode de référence.

Dans les designs 3a et 3b, le nombre d'électrodes court-circuitées est encore plus important, et le schéma des connections est simplifié. Ce type de réseaux est destiné aux expériences avec les cultures cellulaires. Comme dans le design 2, le réseau est composé de deux parties symétriques. Les contre-électrodes et les électrodes de références sont les mêmes que celles du design 2. Cette fois les UMEs sont réparties sur des quarts de disque. Dans le design 3a, chaque quart est un réseau de 111 UMEs court-circuitées, de 50 μm de diamètre chacune. Le design 3b comprend des UMEs de 20 μm de diamètre, permettant d'obtenir l'état stationnaire plus rapidement. Chaque quart possède 617 UMEs réparties tous les 200 μm .

2.4. Conception du support

Un support spécifique a été fabriqué pour pouvoir effectuer aisément des mesures électrochimiques avec les réseaux d'électrodes. Sa conception a été pensée avec l'équipe BIOMIS qui s'est chargée de sa fabrication. Il est composé de deux parties : un socle en aluminium pour poser le dispositif capteur, et un couvercle avec les contacts électriques et un espace destiné à recevoir la solution électrochimique ou l'échantillon à analyser (Figure 2.8). Le couvercle en Téflon est attaché au socle grâce à 4 vis. Il possède un trou cylindrique en son centre, formant un puits d'environ 2 mL de volume. L'étanchéité est assurée par un joint torique placé entre le couvercle et le réseau d'UMEs. Le diamètre interne de ce puits est le même que celui des plaques de culture cellulaire à 24 puits (15 mm). Ces dimensions ont été choisies afin de se rapprocher des conditions classiques de biologie cellulaire. Les contacts électriques entre les électrodes du dispositif capteur et le potentiostat sont réalisés grâce à 20 « pointes de touche » à ressort, traversant le couvercle en Téflon pour venir s'appuyer sur les pads de contact du réseau. Ces pointes sont recouvertes d'or pour une meilleure conduction électrique.

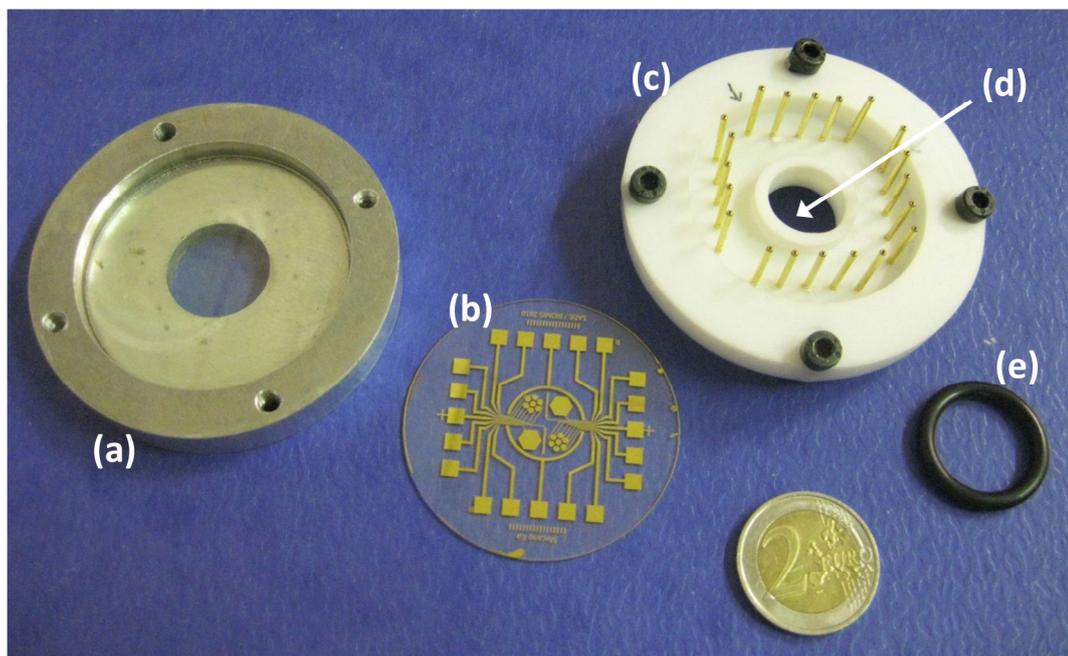


Figure 2.8 Photographie de la cellule en deux parties : socle en aluminium (a) supportant le réseau d'électrodes (b) et la partie supérieure en téflon (c) contenant des points assurant les contacts électriques et le puits (d), dont l'étanchéité est assurée par un joint torique (e).

2.5. Caractérisation des réseaux d'UMEs

Dans un premier temps, la géométrie et les dimensions des réseaux d'électrodes fabriqués ont été caractérisées en utilisant la photographie optique, la profilométrie de surface et la microscopie à force atomique (AFM). L'étude du comportement électrochimique des UMEs a été réalisée en utilisant l'hexacyanoferrate (II) de potassium ($K_4[Fe(CN)_6]$), en solution aqueuse. La réponse des électrodes en présence de ce composé a été étudiée par microscopie à balayage électrochimique (SECM) et par voltampérométrie cyclique.

2.5.a. Caractérisation géométrique

La Figure 2.9 montre les photographies optiques d'un groupe de 7 UMEs et d'une partie d'un groupe de 61 UMEs, prises sur un réseau avec le design 2. L'aire géométrique des électrodes est définie par des trous laissés dans la couche isolante de parylène-C après le processus de gravure. Des irrégularités sont légèrement discernables dans la forme de ces UMEs de $25\ \mu\text{m}$ de rayon, elles sont indicatrices de la limite de résolution du procédé de fabrication utilisé. Dans cette méthode photolithographique, la résolution est dictée par celle des masques employés lors de l'étape d'insolation (cf. étape 12 du Tableau 2.1).

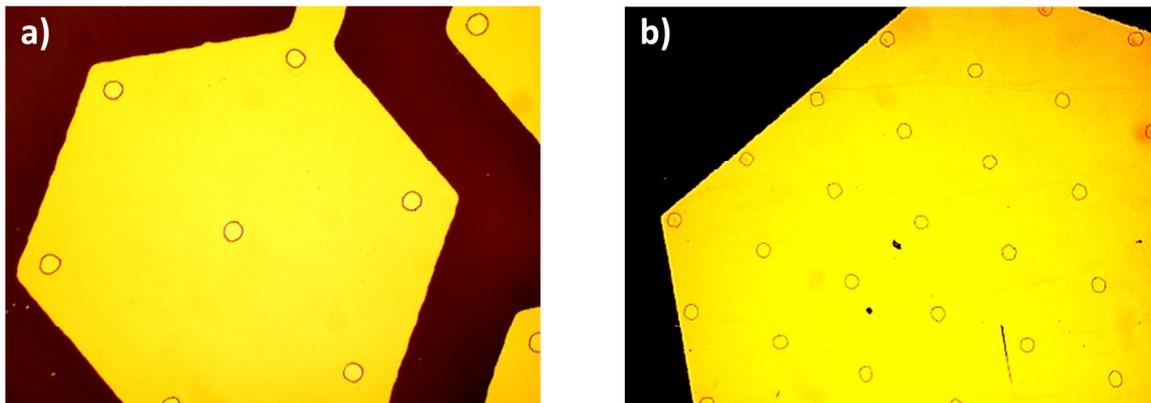


Figure 2.9 Photographies de groupes d'électrodes de 50 µm de diamètre, séparées de 500 µm. a) Un groupe de 7 électrodes. b) Un groupe de 61 électrodes.

Les mesures de profilométrie (Figure 2.10) indiquent que l'épaisseur de la couche de parylène est de $(1,2 \pm 0,1) \mu\text{m}$; elle correspond à la hauteur de récession des électrodes. Cette hauteur est faible au regard du diamètre des électrodes (50 et 20 µm). Les modèles décrivant le comportement de réseaux d'électrodes planes, au même niveau que la couche isolante, peuvent alors s'appliquer à ces réseaux [99].

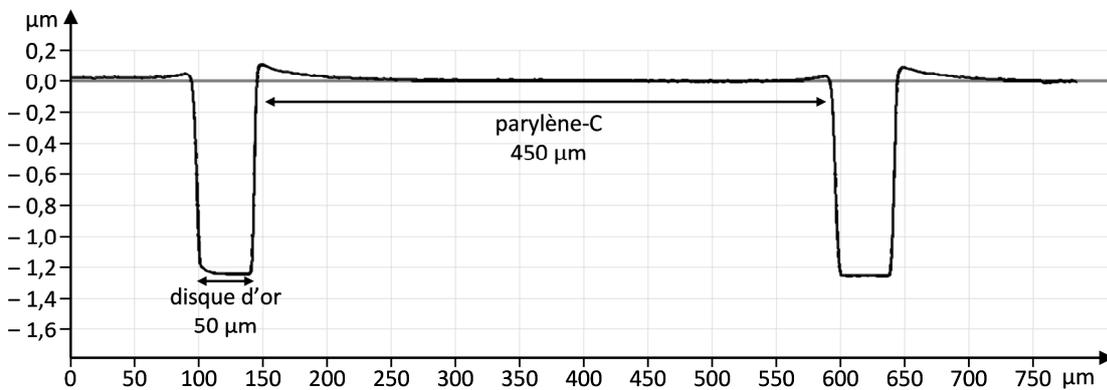


Figure 2.10 Profil de surface d'un réseau d'UMEs de 50 µm de diamètre. Le profil est enregistré sur une distance de 800 µm et montre l'emplacement de 2 UMEs du réseau.

La Figure 2.11 montre des images AFM enregistrées à différents emplacements sur les réseaux d'électrodes. La première image (Figure 2.11 a) a été enregistrée après le dépôt et la gravure de l'or et avant le dépôt du parylène-C. Cette image révèle que l'épaisseur totale de la couche d'accroche de titane plus celle de la couche d'or (Ti+Au) est de 0,13 µm.

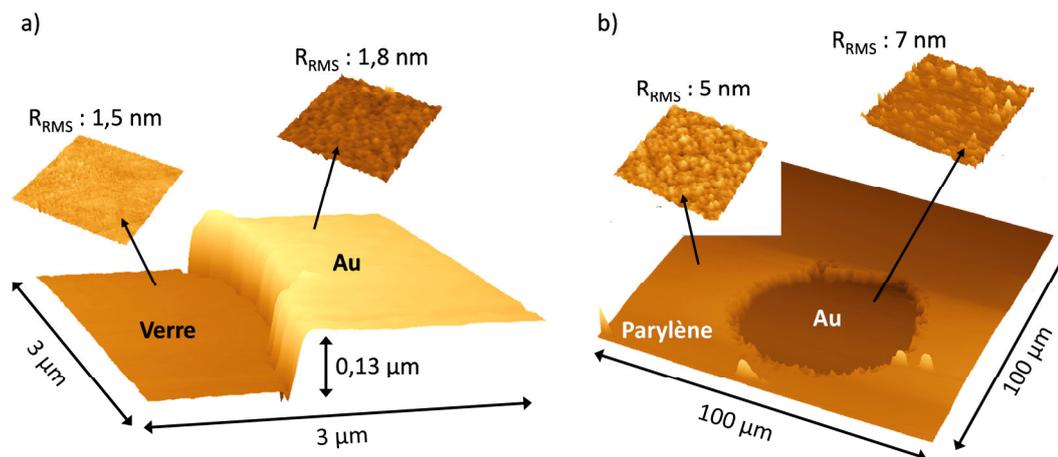
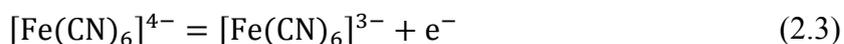


Figure 2.11 Images AFM a) de la surface de verre et l'or déposé par évaporation thermique b) d'une électrode d'or (diamètre 50 μm) entourée de la couche isolante de parylène-C. Images enregistrées par l'équipe BIOMIS.

Le facteur de rugosité R_{RMS} quantifie les déviations du profil de la surface, par rapport au plan moyen, en effectuant la moyenne quadratique des écarts au plan moyen. Avant le dépôt de la couche de parylène, l'or et le verre ont des rugosités similaires, de 1,8 et 1,5 nm respectivement. Après le dépôt de parylène et sa gravure, l'or a une rugosité de 7 nm (Figure 2.11 b). Cette augmentation de la rugosité pourrait être provoquée par le plasma réactif d'oxygène utilisé lors de la gravure de l'or. À l'échelle micrométrique, les différentes surfaces apparaissent essentiellement planes. Ces résultats permettent de confirmer que l'UME d'or a un diamètre de 50 μm .

2.5.b. Caractérisation électrochimique

$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a été utilisé pour caractériser le comportement électrochimique des réseaux d'UMEs. En solution aqueuse, ce complexe de fer peut subir une oxydation réversible, à un électron, selon l'équation (2.3).



Ce composé a été choisi car le transfert électrochimique de l'électron est très sensible à l'état de surface des électrodes ; c'est un bon outil pour vérifier l'absence d'espèces adsorbées pouvant gêner le comportement électrochimique attendu. Il a été utilisé pour les expériences de microscopie électrochimique à balayage (SECM) et pour la voltampérométrie cyclique.

i) *SECM*

Pour caractériser les réseaux, la SECM a été utilisée en mode feedback. Cette technique est basée sur les changements de courant faradique à une UME disque (appelée « sonde » ou « pointe »), en mouvement au-dessus de la surface d'un échantillon (Figure 2.12). Lorsque la pointe est loin de la surface de l'échantillon à analyser, la réaction électrochimique ayant lieu à la surface de l'électrode-sonde n'est pas affectée par la présence de l'échantillon (Figure 2.12 a). Le courant mesuré correspond alors à l'oxydation du médiateur rédox $K_4[Fe(CN)_6]$. Lorsque la sonde se rapproche suffisamment de la surface de l'échantillon, la diffusion des espèces est gênée. Dans ce cas, si la surface est isolante le courant diminue car le transport de matière vers l'électrode est empêché (Figure 2.12 b). En revanche, si la surface est conductrice elle va permettre la réalisation de la réaction électrochimique inverse (réduction du produit formé à la pointe dans ce cas). Ceci augmente localement le flux de la forme réduite, bien que la diffusion soit toujours gênée. En conséquence, l'intensité du courant généré par la réaction d'oxydation augmente (Figure 2.12 c).

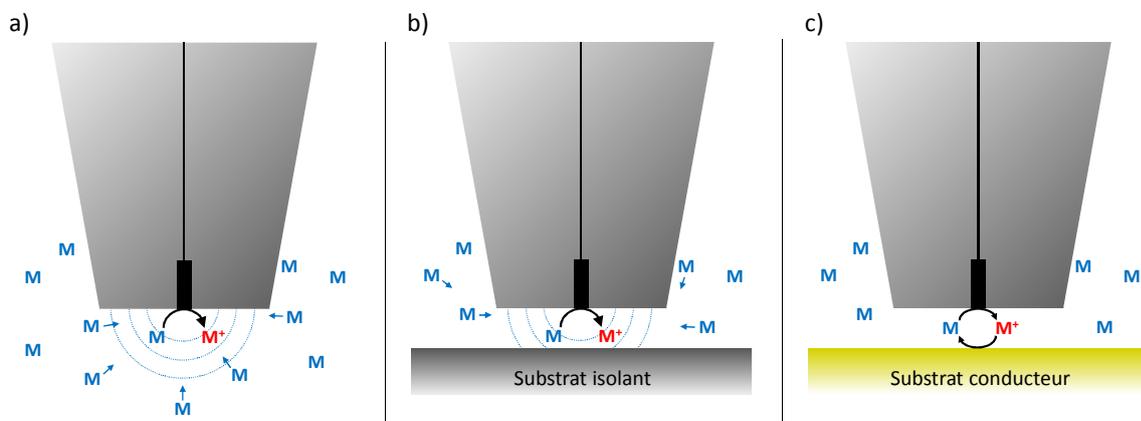


Figure 2.12 Représentation schématique du principe de la SECM en mode feedback, avec un médiateur rédox oxydable. a) L'application d'un potentiel à une UME pointe permet l'oxydation de M (molécule électroactive) en M^+ , engendrant un régime de diffusion hémisphérique et un courant stationnaire. b) À proximité d'une surface isolante, la diffusion de M vers l'UME est gênée, le courant enregistré diminue. c) M est régénéré grâce à la réduction de M^+ à proximité d'une surface conductrice. Le cycle catalytique formé entraîne l'augmentation du courant enregistré, malgré la diffusion limitée.

Le courant mesuré à la pointe dépend donc de deux paramètres : la distance entre l'échantillon et la pointe et la nature conductrice ou isolante de cet échantillon. L'enregistrement de l'intensité du courant en fonction de la distance entre la pointe et l'échantillon est appelé « courbe d'approche ». La Figure 2.13 montre les courbes d'approche obtenues au-dessus de zones isolantes ou conductrices sur les réseaux fabriqués.

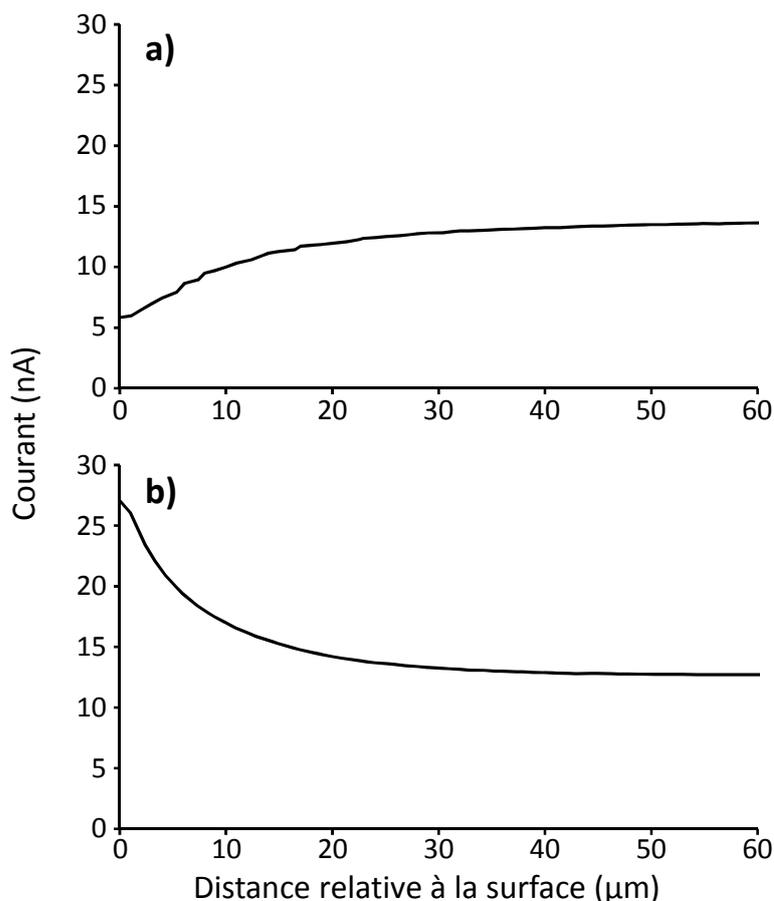


Figure 2.13 Courbes d'approche d'une pointe de platine, de 25 μm de diamètre, portée à 0,4 V vs Ag/AgCl dans une solution de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mM dans du tampon phosphate (PBS 0,1 M, pH 7,4). a) Approche au-dessus de la couche de parylène b) Approche au-dessus d'une UME d'or du réseau. Taille du pas lors de la descente : 1 μm .

Lorsque la pointe s'approche du parylène-C, le courant correspondant à l'oxydation de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ diminue, ce qui confirme le caractère isolant de ce polymère. A l'opposé, le courant augmente quand la pointe s'approche d'une UME d'un réseau, indiquant un transfert d'électron entre $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ et l'or.

Des images révélant la topographie et la conductivité de la surface peuvent être obtenues en balayant la sonde à proximité de la surface de l'échantillon, dans un plan parallèle à celle-ci. La Figure 2.14 montre de telles images enregistrées en analysant les réseaux fabriqués. Elles révèlent l'aire électroactive accessible, et pas uniquement des caractéristiques géométriques. Cette figure montre les différences attendues de courant ampérométrique, mesuré au-dessus de la zone isolante en parylène-C et des UMEs conductrices. Comme la pointe est balayée à hauteur constante, la « marche » entre le

parylène et l'or peut modifier le courant mesuré à la pointe. En se basant sur les courbes d'approche, cette hauteur de récession de 1,2 μm modifierait le courant de 1 à 2 nA. Cette contribution est faible par rapport aux variations de courant observées, et l'image représente principalement la cartographie des zones électroactives du réseau.

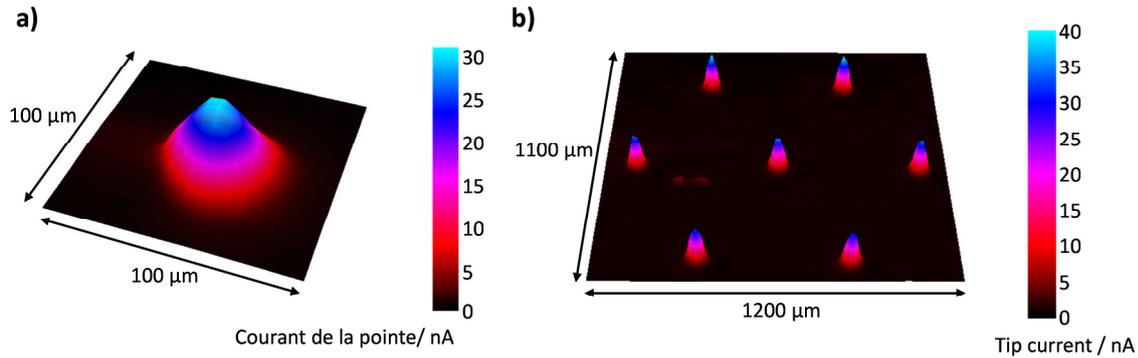


Figure 2.14 Image SECM de a) une UME de 50 μm de diamètre, taille du pas 5 μm b) un groupe de 7 UMEs de 50 μm de diamètre, taille du pas 15 μm . Images enregistrées avec une pointe de platine de 25 μm de diamètre à 0,4 V vs Ag/AgCl, dans du tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4) contenant $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mM. L'échantillon analysé n'est pas polarisé.

ii) Voltampérométrie cyclique

En plus de la SECM, la voltampérométrie cyclique a été utilisée pour caractériser le comportement électrochimique des réseaux d'UMEs. La Figure 2.15 montre les voltampérogrammes cycliques d'une UME individuelle dans une solution de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, à 10 et 50 mV/s. Quand le potentiel devient supérieur au potentiel formel du couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, l'ion $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ est oxydé en $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, générant un courant. À la vitesse de balayage de 10 mV/s ce courant d'oxydation est constant au-delà de 0,30 V vs ECS, signe que l'état stationnaire est atteint. À 50 mV/s l'allure de la courbe est modifiée et des pics commencent à être observés, indiquant que la couche de diffusion n'a pas le temps de se développer suffisamment pour atteindre l'état stationnaire.

La différence entre les potentiels de pics anodiques et cathodiques $E_{PA} - E_{PC}$ est de (140 ± 20) mV. Cette valeur est proche de celle obtenue avec une UME d'or de type pointe, fabriquée au laboratoire (130 mV). Elle est cependant différente de la valeur théorique de 59 mV, le système est donc légèrement plus lent qu'un système purement réversible. En ce

qui concerne l'oxydation de $K_4[Fe(CN)_6]$, les UMEs de ce projet se comportent donc comme des UMEs classiques (UMEs « pointes », enchâssées dans un fin capillaire de verre).

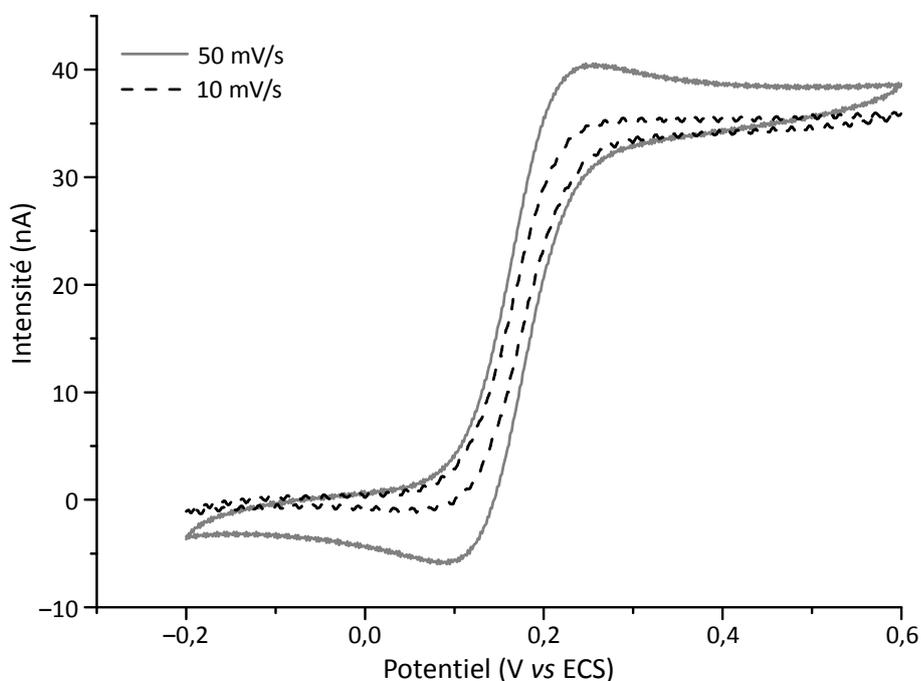


Figure 2.15 Voltampérogrammes cycliques à une UME d'or, enregistrés à différentes vitesses de balayage en solution aqueuse contenant $K_4[Fe(CN)_6]$ à 5 mM et KCl à 0,1 M.

La Figure 2.16-a montre les voltampérogrammes cycliques d'une UME et de réseaux de 7, 49, 61 et 110 UMEs dans une solution aqueuse de $K_4[Fe(CN)_6]$, enregistrés grâce à des dispositifs capteurs des designs 1 et 2. L'augmentation du nombre d'UMEs dans les réseaux ne modifie pas la forme du voltampérogramme enregistré, seule l'intensité du courant varie. La Figure 2.16-b montre la variation linéaire de l'intensité du courant (mesurée à 0,6 V) avec le nombre d'UMEs connectées. Ceci indique que le comportement de chaque UME n'est pas affecté par celui de ses voisines (les couches de diffusion des UMEs ne se recouvrent pas). Ce comportement peut être désigné par la terminologie « indépendance diffusionnelle ».

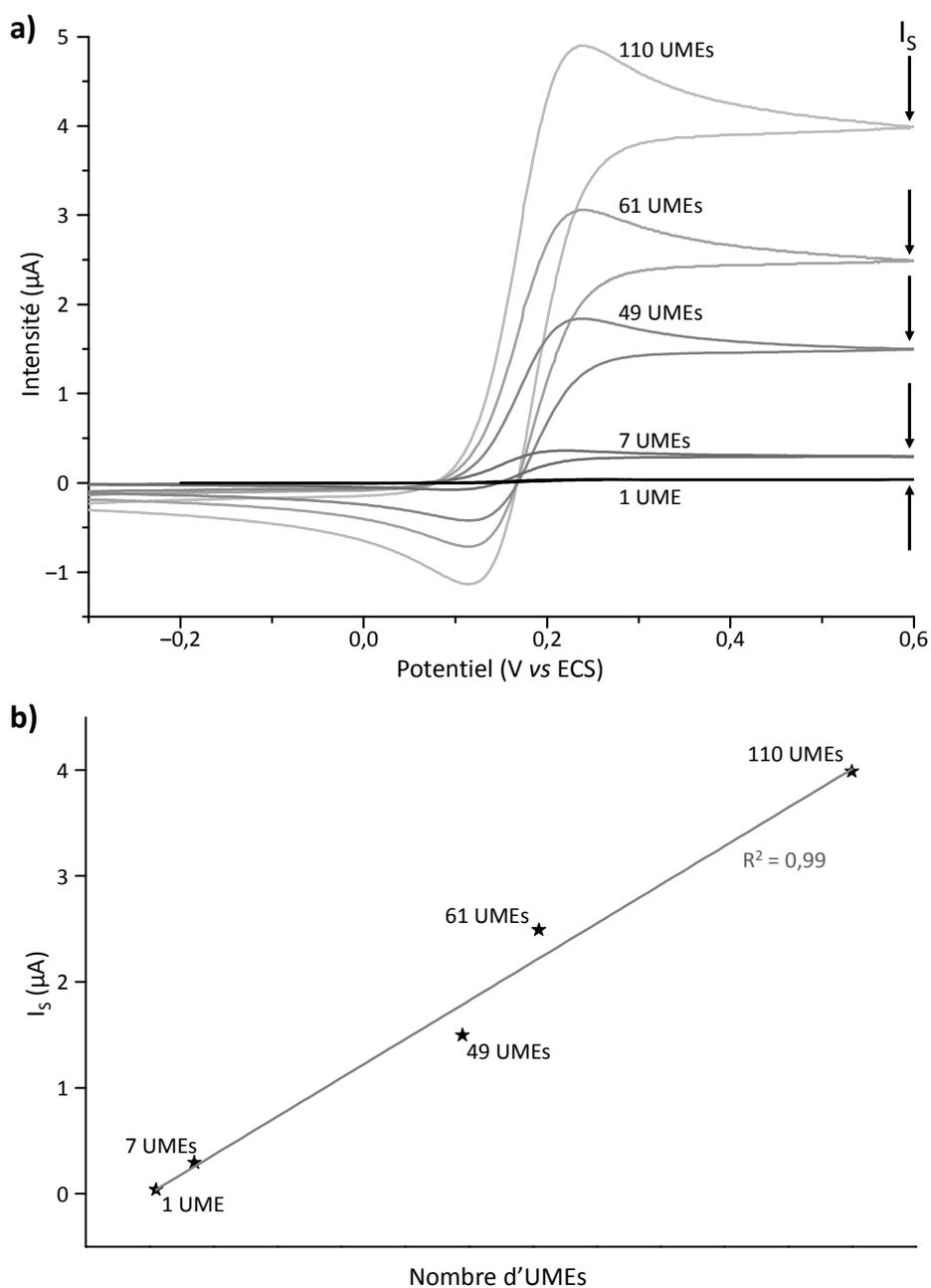


Figure 2.16 a) Voltampérogrammes cycliques (vitesse de balayage : 50 mV s^{-1}) à des réseaux de 1, 7, 49, 61 et 110 UMEs de $50 \mu\text{m}$ de diamètre, dans une solution aqueuse contenant $K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mM) ; b) variation linéaire du courant stationnaire (I_s) en fonction du nombre d'UMEs court-circuitées.

L'indépendance diffusionnelle observée par voltampérométrie cyclique est confirmée par l'enregistrement de voltampérogrammes à différentes vitesses de balayage (Figure 2.17). Lorsque la vitesse de balayage diminue, les « pics » sont moins visibles et le plateau devient bien défini. En effet, la couche de diffusion dispose de plus de temps pour se développer et atteindre une forme hémisphérique, synonyme de courants stationnaires. Si les couches de

diffusion individuelles se recouvraient, les pics deviendraient plus marqués avec des vitesses de balayage plus lentes. Ceci confirme que chaque UME du réseau se comporte de manière indépendante de sa voisine au cours de ces expériences.

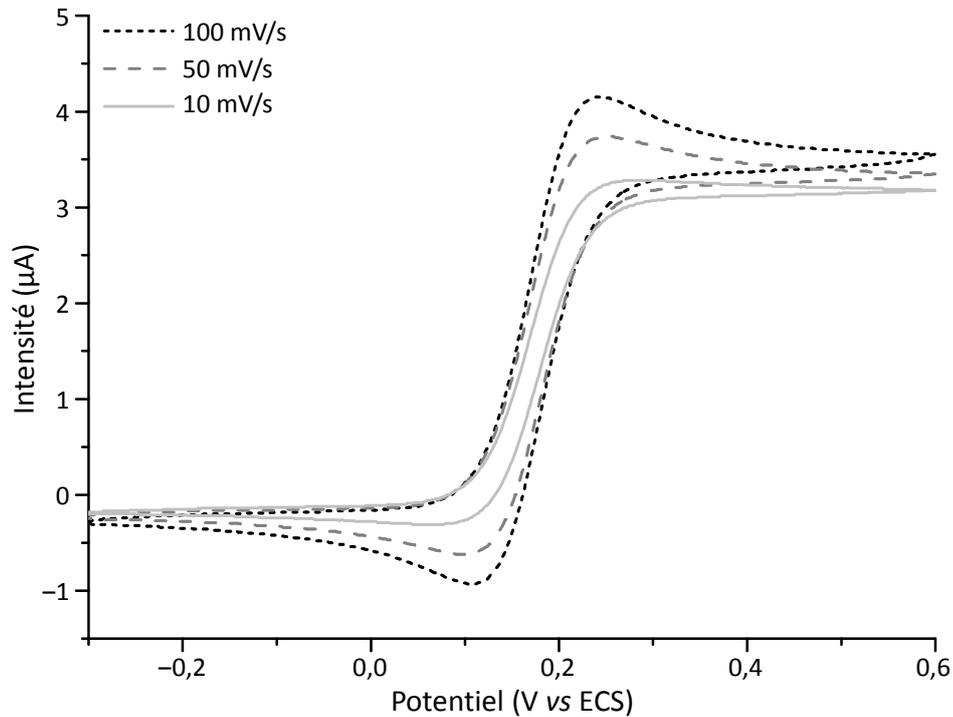


Figure 2.17 Voltampérométrie cyclique à un réseau d'UMEs d'or (Design 3a, diamètre des UMEs 50 µm), à différentes vitesses de balayage. Solution aqueuse contenant $K_4[Fe(CN)_6]$ à 5 mM.

La Figure 2.18 montre les voltampérogrammes cycliques enregistrés à un réseau d'UMEs de 20 µm de diamètre (design 3b). Quelle que soit la vitesse de balayage, le voltampérogramme ne présente pas de pics. Comme les UMEs formant le réseau sont plus petites que précédemment, les courants stationnaires sont atteints plus rapidement et des plateaux sont observés. Pour ce design également, il n'y a pas d'interférences entre les couches de diffusion des différentes UMEs du réseau au cours des expériences réalisées.

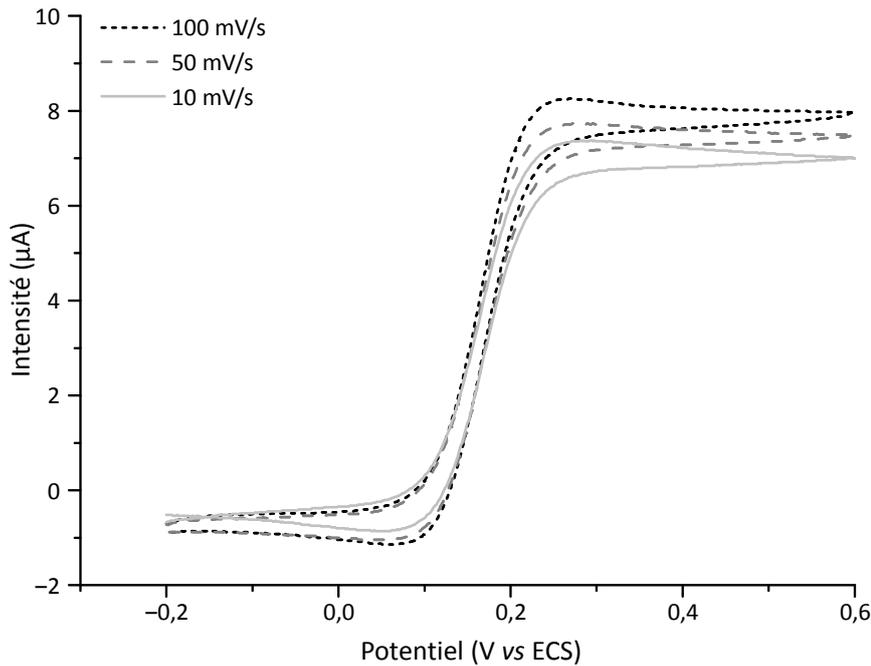


Figure 2.18 Voltampérométrie cyclique à un réseau d'UMEs d'or (design 3b, diamètre des UMEs 20 μm), à différentes vitesses de balayage. Solution aqueuse contenant $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ à 5 mM.

Dans les conditions d'indépendance diffusionnelle, l'intensité théorique du courant à un réseau d'UMEs en régime stationnaire est donnée par l'équation (2.4), pour un processus limité seulement par la diffusion :

$$i_{\text{far}} = N4nFrDC_i \quad (2.4)$$

où N représente le nombre d'UMEs du réseau connectées.

Cette relation correspond à la réponse d'une UME individuelle (équation (2.2)) multipliée par le nombre d'UMEs connectées. En utilisant la valeur de $6,32 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ pour le coefficient de diffusion de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ à 25 °C [102], et une concentration de 5 mM, le courant théorique d'un réseau de 617 UMEs de 20 μm de diamètre (design 3b) est de 7,5 μA . La valeur expérimentale de ce courant, mesurée à 0,6 V sur un voltampérogramme enregistré à 10 mV/s, est de 7,0 μA , soit un écart de 7 % entre valeur expérimentale et théorique.

Plusieurs interprétations peuvent être données au faible écart entre les intensités des courants théorique et mesuré. D'une part, il est possible que le rayon des UMEs fabriquées soit légèrement plus petit que 10 μm . Dans ce cas, l'intensité mesurée correspond à un « rayon moyen » de 9,3 μm . D'autre part, certaines UMEs du réseau peuvent être inactives

(par exemple si la couche isolante de parylène n'a pas été gravée entièrement). L'intensité du courant mesurée correspond alors à un réseau de 574 UMEs fonctionnelles, ce qui représente 93 % du nombre total d'électrodes. Enfin, il est possible qu'une partie de la surface de certaines UMEs soit passivée, ce qui diminuerait alors l'intensité du courant mesuré. L'influence de ce phénomène est cependant difficile à quantifier. Ces considérations montrent que la voltampérométrie cyclique est un outil de choix pour caractériser de manière rapide les réseaux d'UMEs fabriqués ; elle permet de prendre en compte, pour chaque réseau, de légères modifications du comportement électrochimique.

Malgré toutes les précautions prises lors de la fabrication (travail en salle blanche, nombreux nettoyages des réseaux), il s'est avéré que les électrodes en or devaient être « activées » lors de leur première utilisation. La Figure 2.19 montre en effet les voltampérogrammes cycliques enregistrés sur des réseaux d'UMEs, avant et après le processus d'activation que nous avons été amenés à mettre au point. En effet, avant l'étape d'activation, la forme du voltampérogramme cyclique indique que l'électrooxydation de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ est ralentie. Après activation, la forme du voltampérogramme cyclique devient typique d'un transfert d'électrons rapide.

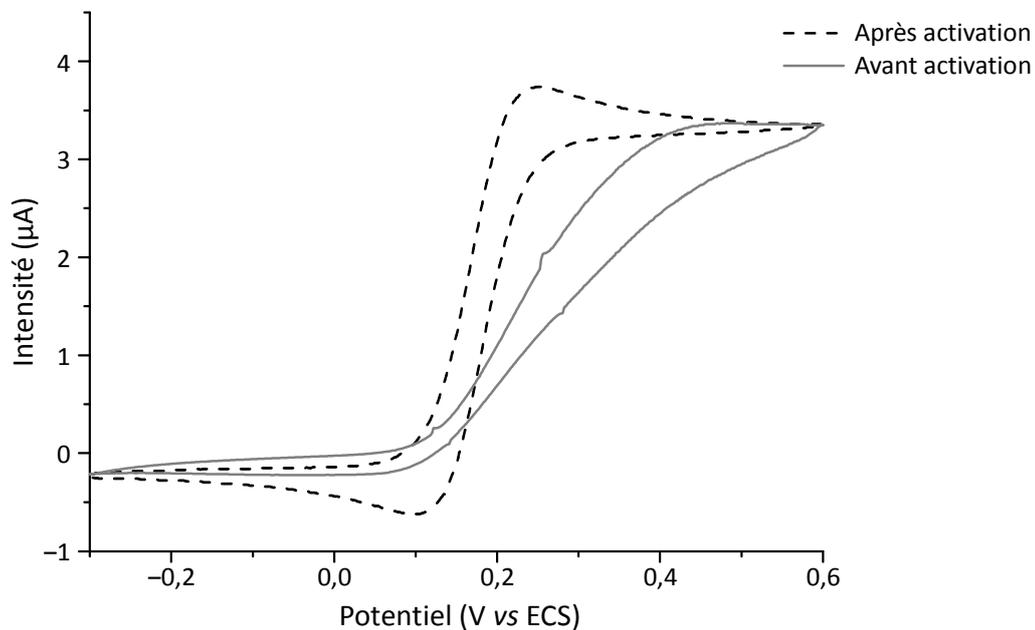


Figure 2.19 Voltampérométrie cyclique à un réseau d'UMEs d'or (Design 3a, diamètre des UMEs 50 µm) avant et après activation électrochimique. Solution aqueuse contenant $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ à 5 mM.

En effet, la surface de l'or en couche mince peut devenir moins conductrice suite à son oxydation (lors de l'application de potentiels élevés, en présence d'oxydants chimiques, etc.)

[103]. Dans notre cas, les réseaux rencontrent des conditions oxydantes lors de l'étape de gravure de la couche de parylène-C, qui utilise un plasma réactif d'oxygène. Il n'est pas possible alors de supprimer cette couche d'oxyde par un polissage mécanique, car cela endommagerait les dispositifs capteurs. L'activation de la surface des UMEs que nous avons adoptée a été réalisée par voltampérométrie cyclique, dans une solution aqueuse de KCl 0,1 M. Le potentiel est cyclé deux fois de 0,2 V à -0,6 V vs ECS, à 10 mV/s. Ces conditions permettent de réduire électrochimiquement les oxydes d'or. Cette opération est réalisée en présence d'un médiateur rédox relativement insensible à l'état de la surface, le chlorure d'hexaamineruthénium(III) ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$). Si la forme des voltampérogrammes obtenus avec ce médiateur diffère de la forme théorique, ceci indique un défaut dans la forme géométrique des électrodes, plutôt qu'une surface oxydée ou la présence d'espèces organiques adsorbées. Ainsi, les défauts de fabrication peuvent être identifiés dès l'étape d'activation. Cette méthode d'activation a été choisie suite à de nombreux tests effectués dans des conditions d'électrolytes différents. Elle est plus douce que celles employées dans la littérature, qui impliquent soit l'utilisation de solutions corrosives comme le mélange « piranha », soit la réduction du solvant et un dégagement gazeux à l'électrode [104,105].

2.5.c. L'électrode de référence

Les mesures électrochimiques réalisées avec les réseaux d'UMEs fabriqués nécessitent, en plus du réseau utilisé comme électrode de travail, une contre-électrode et une électrode de référence. Lors de l'utilisation d'UMEs individuelles, les courants mesurés sont peu intenses et dans la plupart des cas une seule électrode peut alors remplir les rôles d'électrode de référence et de contre-électrode. Avec des réseaux d'UMEs, les courants qui traversent le circuit deviennent plus importants et affectent le potentiel de l'électrode de référence s'ils traversent cette dernière. Une contre-électrode séparée est alors utilisée ; le potentiel est imposé entre l'électrode de travail et l'électrode de référence, le courant circule entre l'électrode de travail et la contre-électrode. Afin d'intégrer une électrode de référence sur le même support que les réseaux d'UMEs, une bande d'or est modifiée et recouverte d'une couche d'argent. Une partie de l'argent est oxydé en chlorure d'argent (AgCl) pour former une pseudo-référence Ag/AgCl. À la différence d'une électrode de référence conventionnelle, le potentiel de cette électrode n'est pas totalement indépendant du milieu

dans lequel elle se trouve. Cependant ce potentiel ne varie pas dans un milieu donné, à condition que la concentration en ions Cl^- reste constante.

Dans un premier temps, nous avons essayé de déposer l'argent par évaporation thermique, de manière similaire à la couche d'accroche de titane et à la couche d'or. Ceci compliquait considérablement le processus photolithographique, certaines étapes interférant avec d'autres (par exemple, l'étape de gravure de l'argent changeait les propriétés de surface de l'or). Suite à ces observations, l'argent a été déposé électrochimiquement. Le dépôt est réalisé en imposant le passage d'une densité de courant de $-200 \mu\text{A}/\text{mm}^2$ entre l'électrode à modifier et un fil de platine, pendant 15 min. Il est réalisé dans une solution acide contenant AgNO_3 0,2 M, HNO_3 0,1 M et de l'acide citrique 0,015 M. L'acide citrique forme un complexe avec les ions Ag^+ présents en solution et permet d'obtenir des dépôts plus compacts et homogènes [106]. Il est intégré dans la structure du dépôt. Une partie de l'argent est ensuite oxydée en AgCl en appliquant un potentiel de +1,5 V vs Pt, dans une solution aqueuse saturée en KCl .

La Figure 2.20 montre la voltampérométrie cyclique de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ à un réseau d'UMEs, en utilisant une référence classique au calomel saturé (ECS) ou la pseudo-référence interne, Ag/AgCl . En utilisant la référence interne la forme du voltampérogramme ne change pas, mais le potentiel de l'électrode Ag/AgCl est décalée de -75 mV par rapport à celui de l'ECS, dans une solution de KCl 0,1 M.

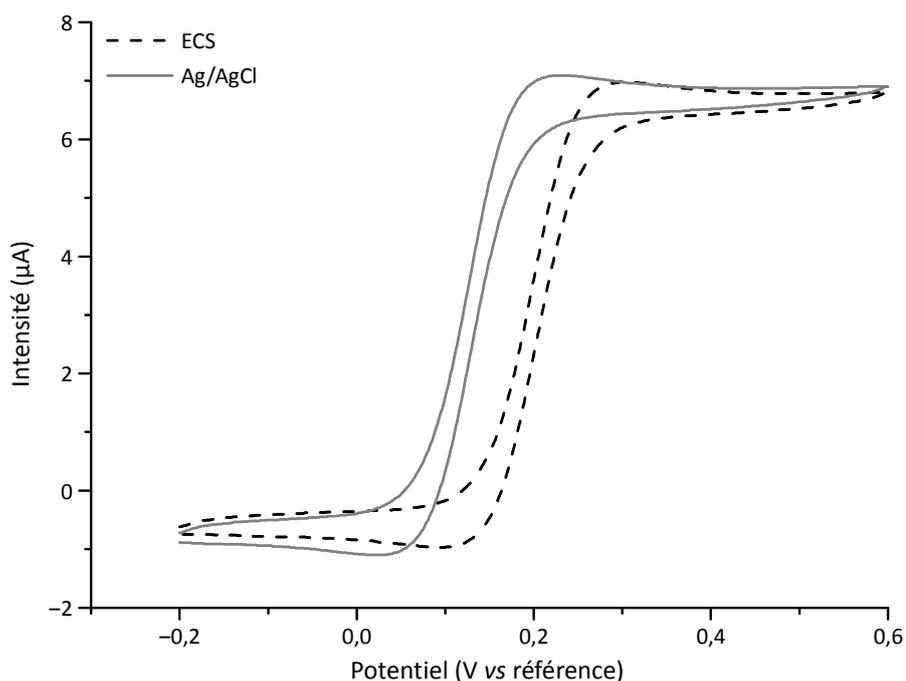


Figure 2.20 Voltampérométrie cyclique à un réseau d'UMEs d'or (Design 3a) à 50 mV/s. Voltampérogrammes enregistrés en utilisant deux types d'électrodes de référence. Solution aqueuse contenant $K_4[Fe(CN)_6]$ à 5 mM et KCl 0,1 M.

En résumé

Un procédé de fabrication a été mis au point avec le groupe BIOMIS et réalisé à l'antenne de Bretagne de l'ENS-Cachan. Il a permis la fabrication de réseaux à 7, 61, 111 et 617 UMEs en or, sur des dispositifs intégrant une ou plusieurs électrodes de référence et contre électrodes. Les différentes caractérisations montrent que les réseaux fabriqués dans le cadre de ce travail sont pleinement fonctionnels, et que leur UMEs individuelles sont actives électrochimiquement et ne souffrent pas d'interférences diffusionnelles pendant l'échelle de temps des expériences.

Chapitre 3. Détection électrochimique du monoxyde d'azote et du peroxydinitrite à un réseau d'UMEs

3.1. Détection électrochimique sélective du monoxyde d'azote

3.1.a. Introduction

La détection électrochimique de NO^\bullet , réalisée en oxydation, est particulièrement sensible aux interférences de la part de diverses molécules électroactives, à cause de la forte surtension nécessaire à cette réaction. Lors du développement de nouveaux capteurs, l'objectif principal est souvent d'améliorer la sélectivité de la mesure électrochimique à travers la modification de surface de l'électrode. Dans ce domaine, le Nafion® a apporté une grande contribution (cf. paragraphe 1.4.a). Ce polymère échangeur d'ions repousse efficacement de nombreuses espèces chargées négativement, dont NO_2^- (produit par la réaction entre NO^\bullet et O_2). Le Nafion® est particulièrement simple d'utilisation : une goutte de solution alcoolique est déposée sur l'électrode, lorsque la goutte s'évapore le Nafion® reste adsorbé à la surface.

Le Nafion® n'est cependant pas une bonne alternative pour remplir nos objectifs de détection simultanée de NO^\bullet et ONOO^- avec des réseaux d'UMEs. En effet, les électrodes dédiées à la détection de chaque analyte sont situées à proximité les unes des autres, mais elles doivent être modifiées sélectivement, en fonction de l'analyte cible. Or, il est difficile d'être suffisamment précis lors du dépôt de Nafion® pour ne modifier que les électrodes destinées à détecter NO^\bullet . De plus, le Nafion® n'apporte que peu de sélectivité envers les interférents cationiques. Nous avons donc choisi d'étudier des alternatives au Nafion® pour rendre les électrodes sélectives à NO^\bullet . Afin de ne fonctionnaliser que les réseaux d'UMEs servant à la détection de NO^\bullet , seules des couches pouvant être déposées électrochimiquement ont été privilégiées. En effet, lors d'un électrodépôt, la modification de surface n'a lieu que sur les électrodes auxquelles un potentiel est appliqué, ce qui permet de sélectionner les électrodes à fonctionnaliser.

Les réseaux d'UMEs fabriqués par photolithographie en couche mince ne peuvent pas être polis mécaniquement pour renouveler la surface des électrodes. Ceci signifie qu'après modification de la surface d'une UME avec des espèces insolubles, il est difficile de régénérer cette surface et un nouveau réseau doit être utilisé pour tester de nouvelles conditions. Comme la fabrication des dispositifs capteurs nécessite plusieurs étapes et prend plusieurs jours, le nombre de conditions pouvant être testées avec ces électrodes est limité. C'est pourquoi les premiers essais de mise au point des conditions d'obtention de couches sélectives ont été réalisés avec des électrodes pouvant être polies : des UMEs disque plan de type « pointe », fabriquées au laboratoire. Ces électrodes sont constituées d'un fil de métal enchâssé dans un fin capillaire en verre. L'extrémité du capillaire est polie pour laisser apparaître un disque de métal, dont le diamètre est égal à celui du fil. Au moment de ces premiers essais, la technique utilisée au laboratoire pour fabriquer ce type d'électrodes ne permettait pas d'obtenir des UMEs d'or. Nous avons alors utilisé des électrodes de platine, d'un diamètre de 50 μm . Les dépôts ont par la suite été adaptés aux réseaux d'UMEs d'or.

3.1.b. La détection de NO^\bullet à une UME de platine non modifiée

i) Utilisation d'un donneur de NO^\bullet

NO^\bullet réagit avec de nombreuses espèces en solution, dont O_2 . Pour obtenir une solution stable de NO^\bullet , il faut désaérer le solvant en faisant barboter un gaz inerte comme N_2 ou l'argon, pour éliminer O_2 dissous. Ces conditions s'éloignent notablement des conditions physiologiques aérobies. Les composés donneurs de NO^\bullet sont une bonne alternative pour obtenir des concentrations connues de NO^\bullet , en solution oxygénée. Parmi ces composés, les diazéniumdiolates (NONOates) ont été développés dans les années 1990 [107,108]. Ces molécules stables en milieu basique se décomposent en milieu neutre ou acide pour donner NO^\bullet , selon une réaction catalysée par le proton [109,110]. Le temps de demi-vie lors de la décomposition du NONOate dépend de la structure de la molécule, du pH et de la température [111]. Au cours de ce travail, nous avons utilisé le diéthylammonium (Z)-1-(N,N-diéthylamino)-diazén-1-ium-1,2-diolate (DEA-NONOate, Figure 3.1), dont le temps de demi-vie est de 16 min à 25 °C et pH 7,4 ([112]) et qui peut donc être considéré comme un donneur de NO^\bullet assez rapide à température ambiante.

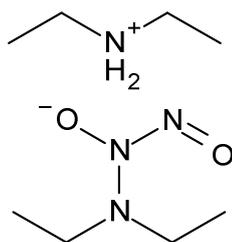
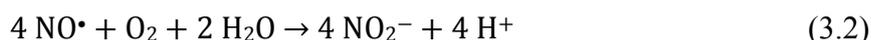


Figure 3.1 Structure du diéthylammonium (Z)-1-(N,N-diéthylamino)-diazén-1-ium-1,2-diolate (DEA-NONOate)

Lors d'un ajout de NONOate en solution neutre, la concentration en NO^\bullet est déterminée par la compétition entre deux réactions : la réaction de décomposition du NONOate (équation (3.1)) et la réaction entre NO^\bullet et O_2 (équation (3.4)) :



La Figure 3.2-a montre l'évolution théorique de la concentration en NO^\bullet en fonction du temps, lors d'un ajout de DEA-NONOate dans une solution aqueuse. Au départ, la réaction (3.1) domine et la concentration en NO^\bullet augmente jusqu'à atteindre un maximum. Après ce maximum, la réaction (3.2) devient prépondérante et la concentration diminue. La Figure 3.2-b montre l'évolution du courant mesuré à une UME de platine en fonction du temps, lors de l'ajout de DEA-NONOate. La forme de la courbe est semblable à l'évolution théorique de la concentration en NO^\bullet , ce qui signifie que l'intensité du courant d'oxydation est un indicateur de la quantité de NO^\bullet en solution. Ces expériences sont réalisées dans une solution tamponnée à pH 7,4, le pH est alors proche de celui de nombreux systèmes biologiques. La préparation de la solution tampon phosphate (PBS) est décrite en annexe.

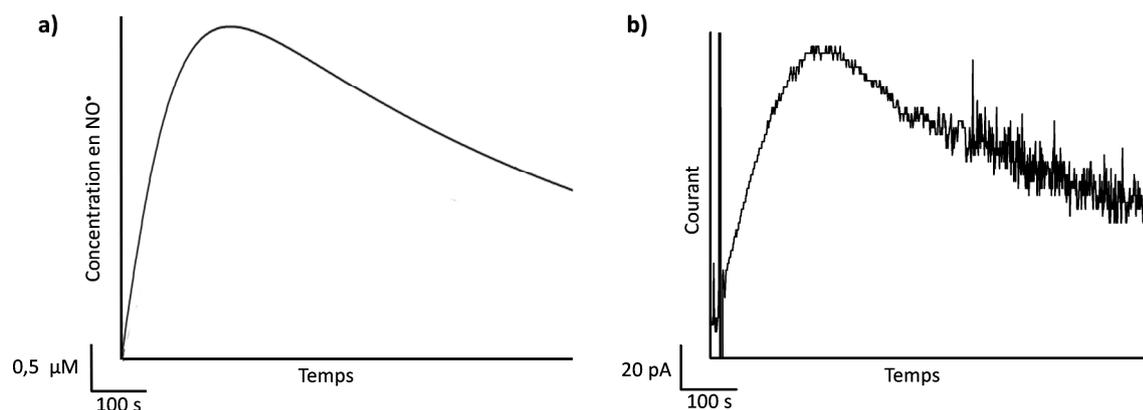


Figure 3.2 a) Évolution théorique de la concentration en NO• en fonction du temps lors d'un ajout de DEA-NONOate à 10 μM dans une solution aqueuse aérobie à pH 7,4, d'après [111]. b) Chronoampérogramme à 0,8 V vs Ag/AgCl d'une UME de platine (diamètre 50 μm), lors d'un ajout de DEA-NONOate à 10 μM dans une solution de PBS à pH 7,4.

ii) Les espèces interférentes

Lors de la détection électrochimique de NO•, la nature des espèces pouvant interférer avec la mesure dépend fortement du milieu de l'étude. Il y a donc quasiment autant d'interférences potentielles que de mesures et de conditions biologiques, et il paraît impossible de tester l'intégralité des molécules présentes dans les divers milieux biologiques. Au cours de ce travail, nous avons sélectionné certaines molécules qui interviennent dans de nombreux milieux biologiques pour étudier leur influence sur la détection de NO• : NO₂⁻, H₂O₂, l'acide ascorbique et la dopamine (Figure 3.3). Les molécules choisies sont électroactives au potentiel de travail de la détection de NO• et sont présentes dans de nombreux milieux biologiques produisant cet analyte :

- L'acide ascorbique possède 4 stéréoisomères dont la vitamine C, qui est une molécule largement utilisée par l'organisme comme antioxydant. À pH neutre, l'acide ascorbique est déprotoné (sous forme ascorbate) et chargé négativement.
- NO₂⁻ est produit à la suite de la réaction entre NO• et O₂, il sera donc présent dans la plupart des systèmes (bio)synthétisant NO•.
- Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est une molécule neutre et de petite taille, caractéristiques qu'elle partage avec NO•. C'est une molécule produite lors du stress oxydant, elle a donc de fortes chances d'être présente en même temps que NO•, en particulier dans les conditions permettant la formation de ONOO⁻.

- La dopamine est un neurotransmetteur de la famille des catécholamines, chargé positivement à pH neutre. Elle peut être présente lors d'études sur le rôle de NO[•] dans le cerveau.

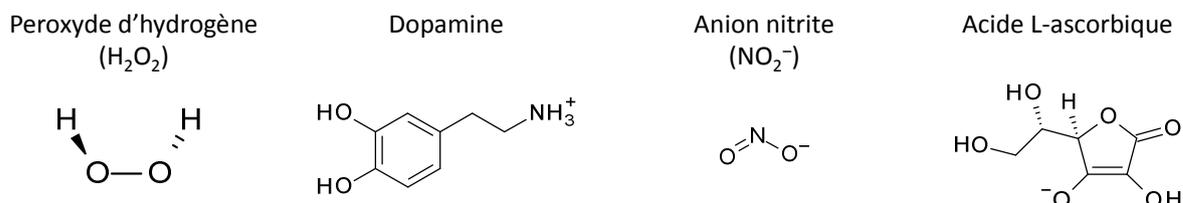


Figure 3.3 Structure des molécules électroactives pouvant interférer avec la mesure de NO[•], étudiées au cours de ce travail.

La sélection de ces molécules permet de valider la sélectivité d'un capteur, dans des conditions où ce sont les seuls interférents. Cependant, comme leurs propriétés sont très variées que ce soit au niveau de la charge ou de la taille, une membrane déposée à la surface de l'électrode et capable de repousser efficacement toutes ces molécules devrait être sélective envers de nombreux autres interférents, dont certains ne sont peut-être pas encore identifiés.

La Figure 3.4 montre des exemples de chronoampérogrammes à une UME de platine non modifiée. Lorsque les molécules interférentes sont ajoutées dans la solution, elles sont oxydées et le courant augmente. Les analytes ajoutés sont stables dans la solution de PBS utilisée (pH 7,4), au moins pendant la durée de l'expérience. En conséquence, le courant après chaque ajout est stationnaire. Son intensité dépend de la concentration en analyte, du potentiel de travail et de la sensibilité de l'électrode pour l'analyte.

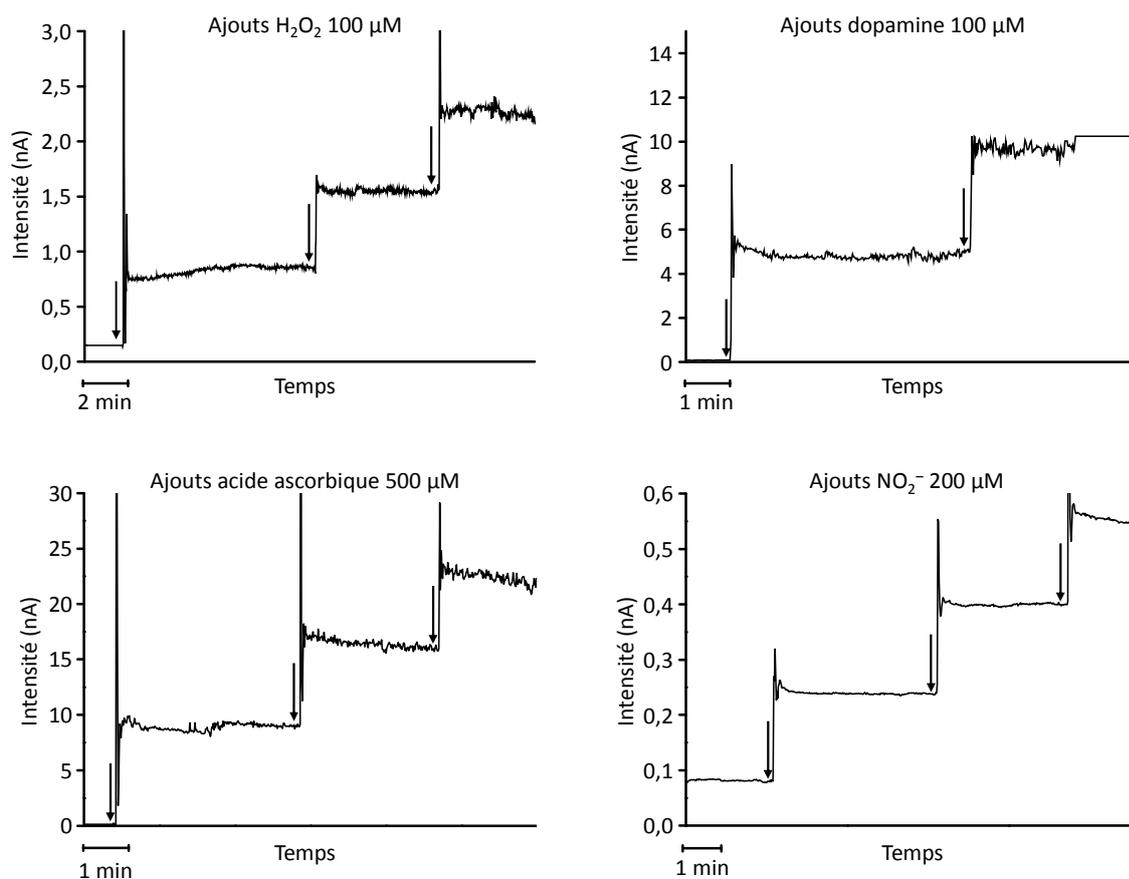


Figure 3.4 Chronoampérométrie enregistrée à une UME de Pt de 50 µm de diamètre à 0,8 V vs ECS. Les flèches indiquent des ajouts d'interférents dans la solution de PBS (pH 7,4). Le type d'interférent ajouté et sa concentration sont indiqués au-dessus des courbes.

La sensibilité d'un capteur est définie comme étant la pente de la droite qui représente la variation linéaire du courant avec la concentration de l'analyte d'intérêt (droite d'étalonnage). Des droites d'étalonnage ont ainsi été tracées pour l'acide ascorbique, NO₂⁻ et H₂O₂, comme le montre la Figure 3.5. Le courant mesuré varie linéairement avec la concentration en analyte, sur l'intervalle de concentrations 5 µM-3,5 mM. Ceci signifie que la sensibilité est constante sur cette gamme de concentrations. Afin d'opérer les tests plus rapidement, chaque analyte a par la suite été testé à une seule concentration, et la sensibilité des différents types d'électrodes a été calculée à partir de l'augmentation du courant correspondant à cette concentration. Pour chaque analyte, la concentration a été choisie en fonction de la concentration maximale attendue *in vivo* (Tableau 3.1).

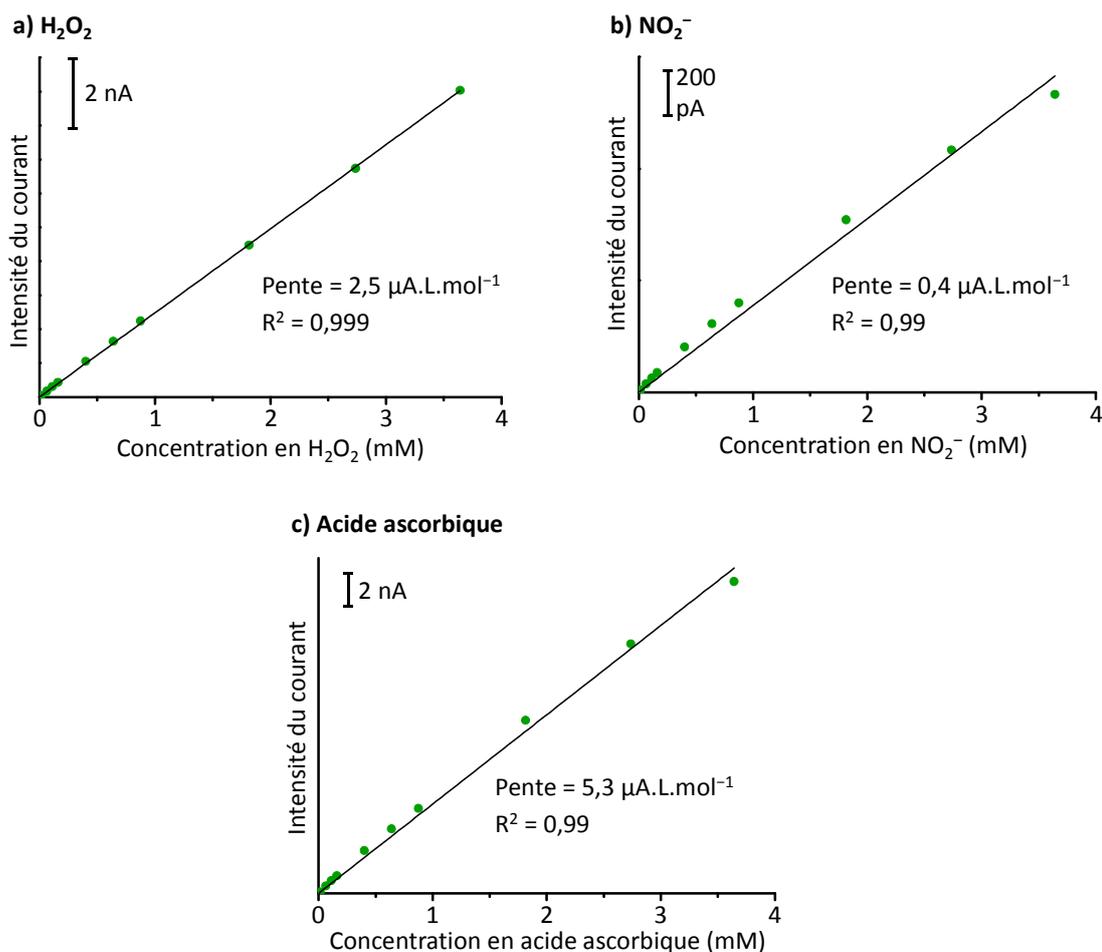


Figure 3.5 Courbes d'étalonnage de a) H₂O₂, b) NO₂⁻ et c) l'acide ascorbique, obtenues à une UME de Pt (50 μm de diamètre) à 0,9 V vs Ag/AgCl.

Tableau 3.1 Concentrations en NO[•] et espèces interférentes utilisées lors des tests de sélectivité des électrodes.

composé	Concentration (μM)
NO [•]	3,5
H ₂ O ₂	100
NO ₂ ⁻	200
Acide Ascorbique	500
Dopamine	100

Grâce aux résultats de chronoampérométrie, il est possible de comparer la sensibilité d'une électrode en fonction des molécules électroactives testées. La Figure 3.6 montre la sensibilité d'une UME de platine non modifiée vis-à-vis de NO[•] et des différentes molécules interférentes testées, à un potentiel de 0,8 V vs ECS. À ce potentiel de travail, l'UME de platine est moins sensible à NO[•] qu'à la dopamine, l'acide ascorbique et H₂O₂. En revanche, elle est peu sensible à NO₂⁻. La surface de l'UME a alors été modifiée par des couches

électropolymérisées, pour rendre l'électrode la plus sélective possible en « filtrant » ces espèces interférentes.

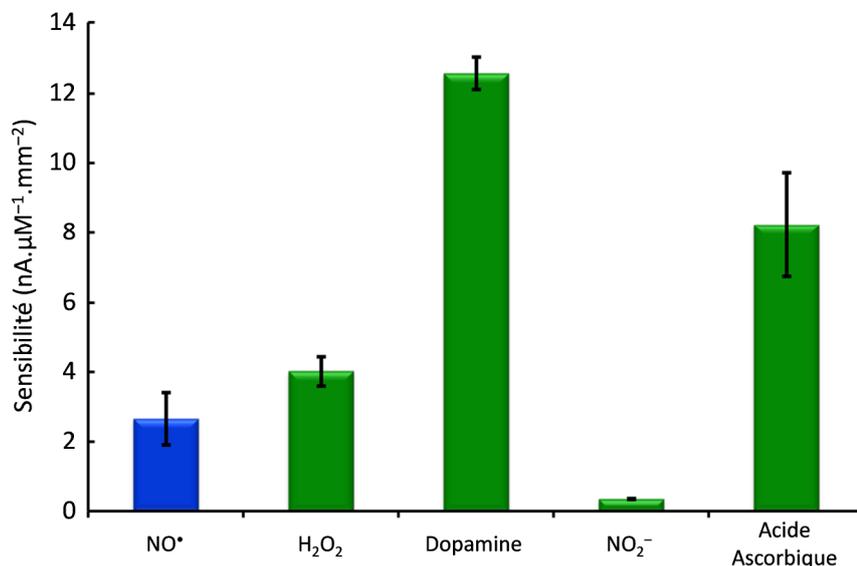


Figure 3.6 Sensibilité d'une UME de platine non modifiée (diamètre = 50 μm) à l'égard de NO• et des analytes interférents (H₂O₂, dopamine, NO₂⁻ et acide ascorbique), à 0,8 V vs ECS.

3.1.c. La modification des électrodes

La Figure 3.7 montre la structure des monomères utilisés pour l'électrodépôt de membranes sélectives. L'ortho-phénylènediamine (oPD) et l'eugénol ont été choisis sur la base d'études antérieures ayant montré que ces molécules apportent une certaine sélectivité aux capteurs à NO•, vis-à-vis de l'acide ascorbique, la dopamine et NO₂⁻ [113,114]. L'aniline et le phénol ont été choisis car ces couches permettent de bloquer partiellement le passage de H₂O₂, comme cela a été montré dans des travaux visant à développer des capteurs à glucose [115,116].

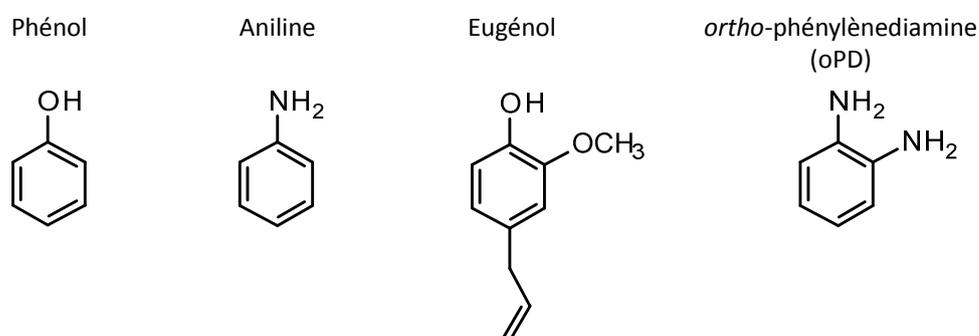


Figure 3.7 Structure des monomères utilisés au cours de ce travail pour former électrochimiquement des couches sélectives à la surface des électrodes.

Le principe général de l'électrodépôt de ces membranes est basé sur l'électrooxydation des monomères, induisant la polymérisation électrochimique. La couche électropolymérisée formée n'est pas conductrice et empêche l'oxydation de nouveaux monomères en solution, et la polymérisation s'arrête d'elle-même. Ceci permet au processus d'électrodépôt d'être auto-régulé. Nous avons étudié la polymérisation en solution aqueuse de ces 4 monomères sur une UME de Pt, comme illustré sur la Figure 3.8. Les solutions ont été réalisées dans le PBS à pH 7,4 lorsque cela était possible. La solution d'eugénol a été réalisée en milieu alcalin (NaOH) pour des raisons de solubilité.

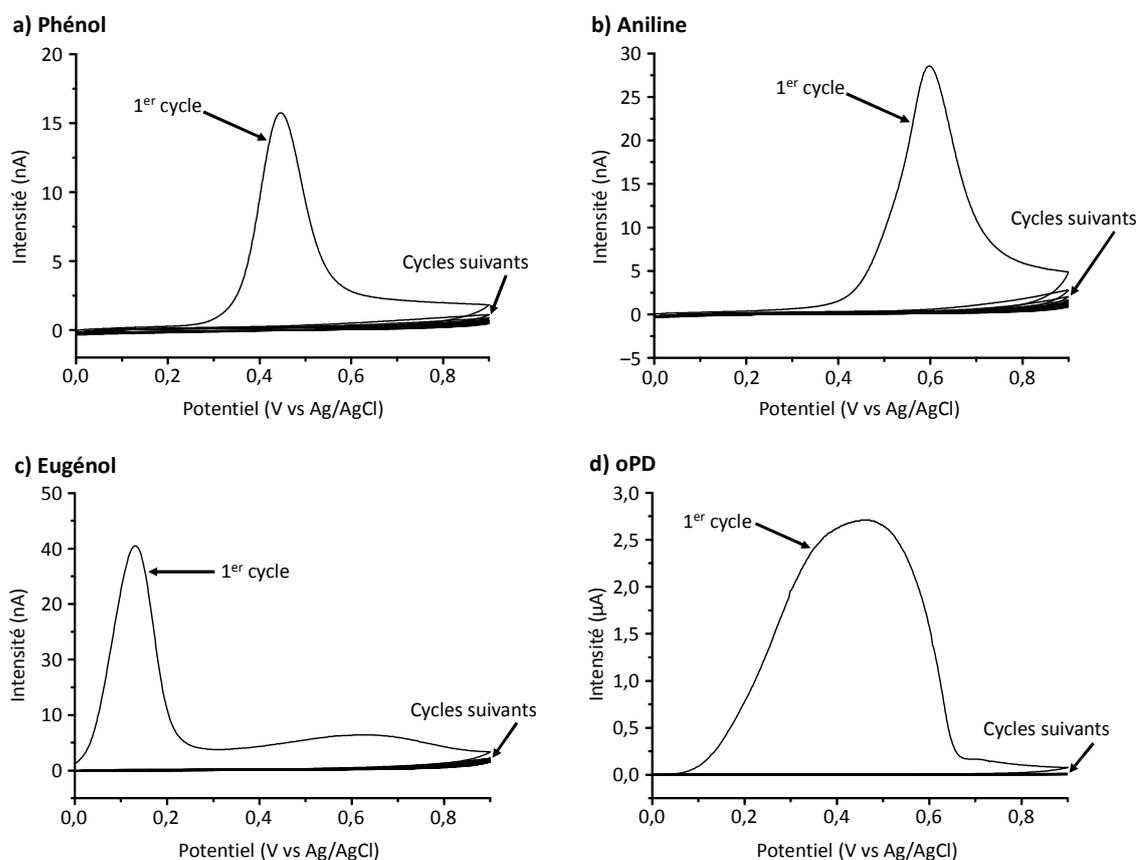


Figure 3.8 Voltampérogrammes cycliques obtenus lors de l'électropolymérisation de couches sélectives à la surface d'une UME de platine de 50 μm de diamètre. Potentiel cyclé 10 fois entre 0 et 0,9 V vs Ag/AgCl, à 10 mV/s. a) Solution de phénol 0,5 M dans PBS pH 7,4. b) Solution d'aniline 3 mM dans PBS pH 7,4. c) Solution d'eugénol 10 mM dans NaOH 0,1 M. d) Solution d'oPD 0,3 M dans PBS pH 7,4.

Quel que soit le monomère utilisé, un pic d'oxydation est observable lors du premier cycle, dont la position dépend de la nature du monomère et du pH de la solution. L'obtention d'un pic plutôt qu'un plateau indique que la surface se passive au cours du premier cycle, grâce à la formation d'un dépôt. Il n'y a pas de pic de réduction lors du balayage retour, l'oxydation du monomère est donc irréversible. L'absence de pic lors des cycles suivants

confirme que la surface de l'électrode est passivée par le dépôt formé lors du premier cycle de balayage.

La Figure 3.9 montre à titre d'exemple le mécanisme proposé pour l'électropolymérisation du phénol. Le processus débute par l'oxydation de l'anion phénolate pour former le radical correspondant. Deux de ces radicaux réagissent ensuite entre eux pour former un dimère. Ce dimère est à son tour oxydé et la polymérisation continue jusqu'à ce que le film formé empêche tout autre transfert d'électrons.

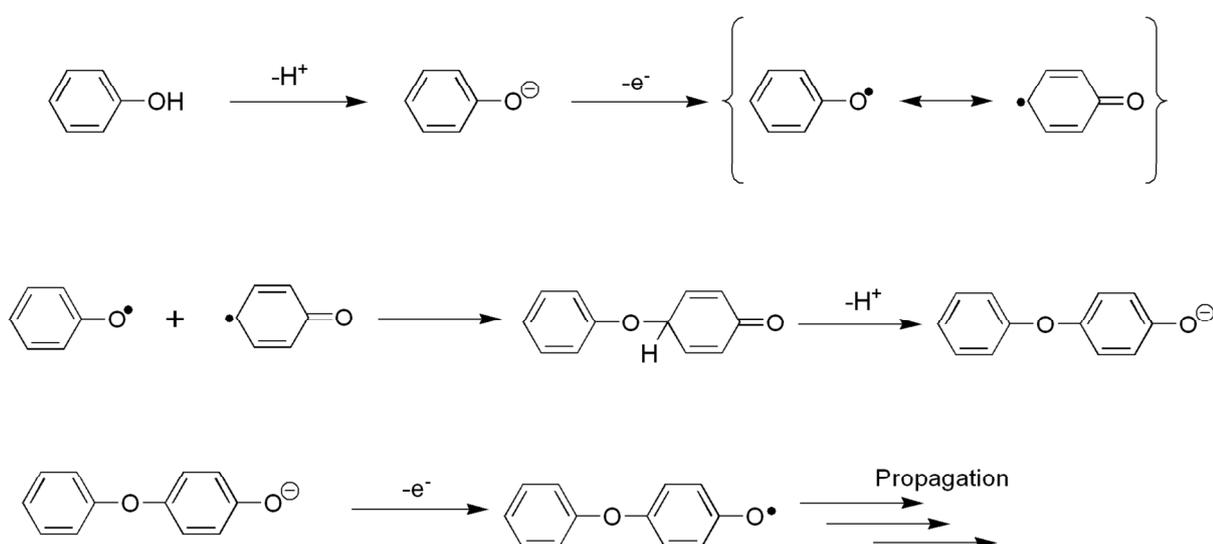


Figure 3.9 Mécanisme proposé de l'électropolymérisation du phénol en solution aqueuse. D'après réf [117].

Après chaque dépôt, les électrodes sont abondamment rincées avec de l'eau. À la suite de ce rinçage, la présence du dépôt à la surface des électrodes peut être mise en évidence en utilisant le médiateur rédox $K_4[Fe(CN)_6]$. La Figure 3.10 montre les voltampérogrammes d'une électrode de platine avant et après modification par les quatre types de couches. Le signal présent sur la surface non fonctionnalisée est totalement absent lorsque la surface est modifiée, indiquant que la présence de la couche à la surface a un effet bloquant sur les ions $Fe(CN)_6^{4-}$, et confirmant ainsi la présence des dépôts.

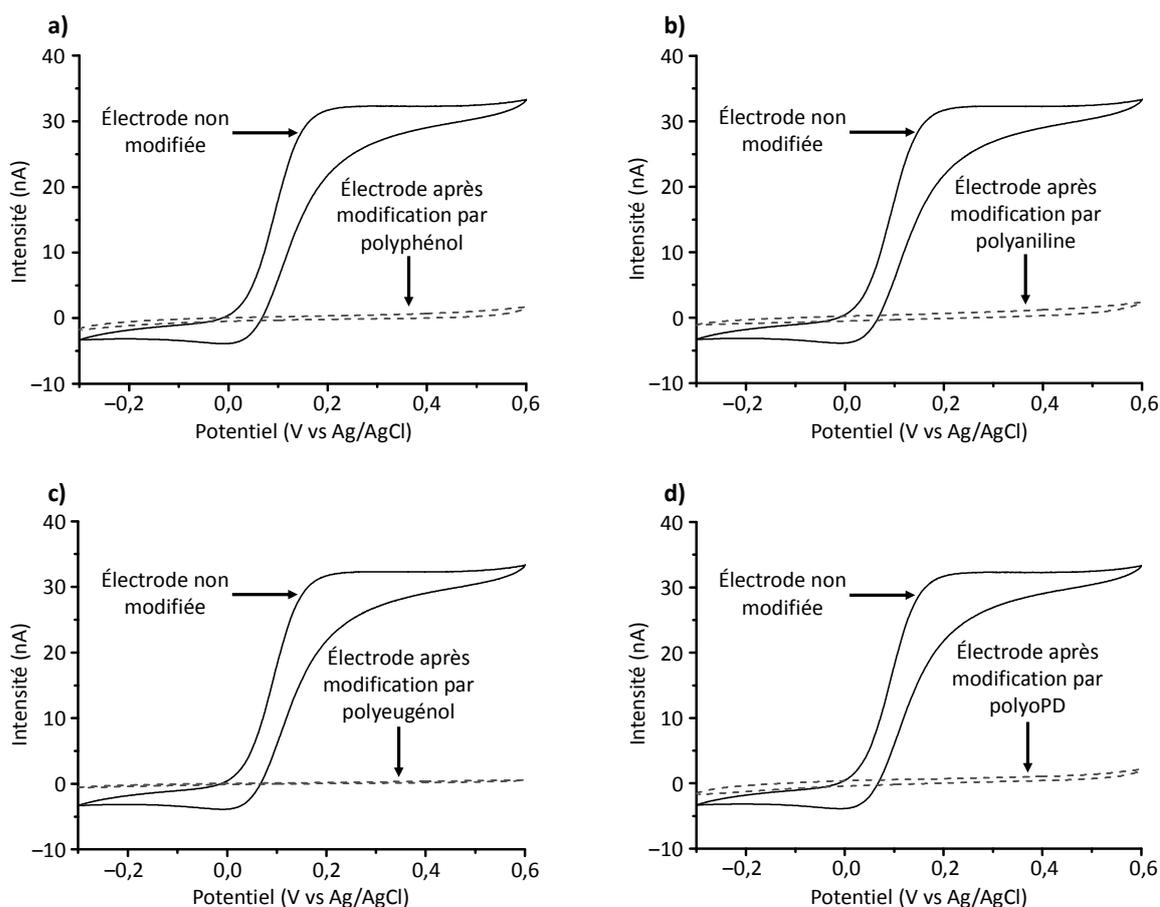


Figure 3.10 Illustration du blocage des ions $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ par les couches électrodéposées : voltampérommes cycliques d'une UME de platine dans $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mM dans PBS pH 7,4. Comparaison entre les voltampérommes d'une électrode non modifiée et d'une électrode après modification par oxydation de a) phénol b) aniline c) eugénol d) oPD.

3.1.d. La sélectivité des membranes

La Figure 3.11 montre la sensibilité des électrodes de platine modifiées vis-à-vis de NO^* , H_2O_2 , la dopamine, l'acide ascorbique et NO_2^- . Ces graphes permettent d'établir la sélectivité des différents types d'électrodes. La sélectivité d'une électrode vis-à-vis d'un analyte interférent peut être définie comme le rapport entre la sensibilité de l'électrode vis-à-vis de l'analyte d'intérêt et la sensibilité de l'électrode vis-à-vis de l'analyte interférent considéré ($\text{Sélectivité} = S_{\text{NO}} / S_{\text{interfèrent}}$). Ce rapport doit être supérieur à 1 pour considérer l'électrode comme sélective à NO^* .

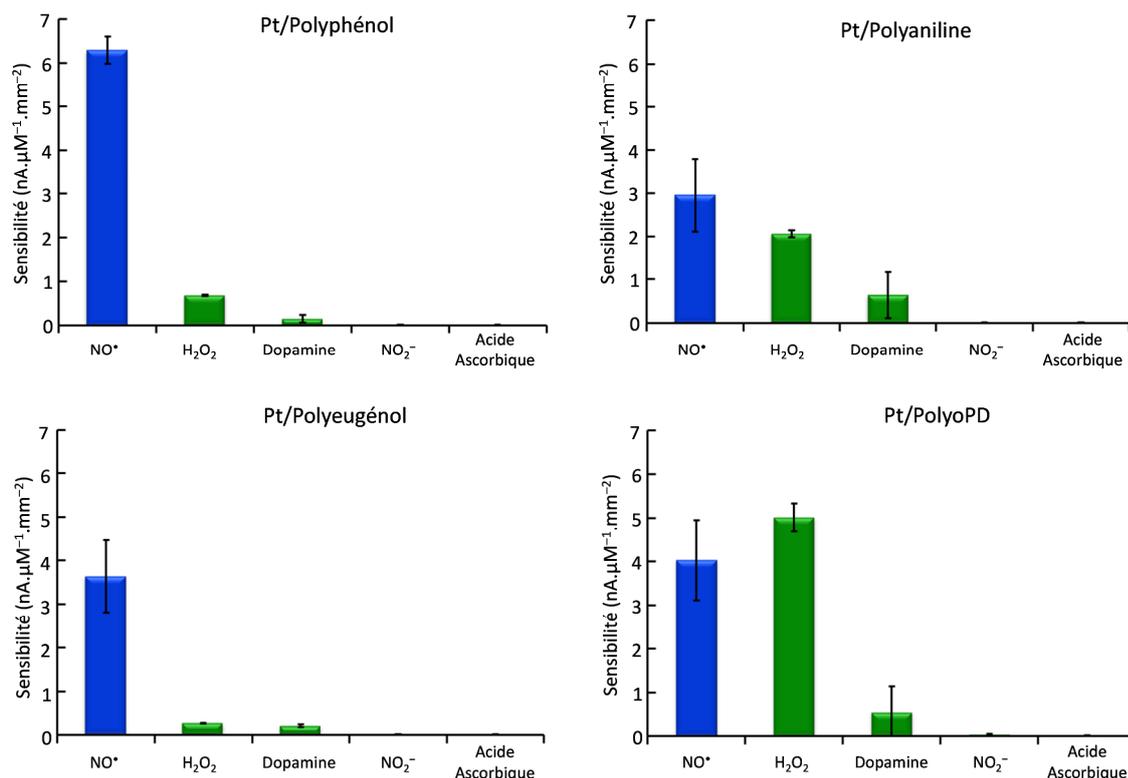


Figure 3.11 Comparaison de la sensibilité des UMEs de Pt modifiées vis-à-vis de NO⁺ et des analytes interférents (H₂O₂, dopamine, NO₂⁻ et acide ascorbique), à 0,8 V vs ECS.

Les graphes montrent clairement que toutes les membranes électropolymérisées jouent un rôle bénéfique de barrière contre les analytes indésirables, tout en permettant une mesure sensible de NO⁺. En effet, les UMEs modifiées par les membranes testées possèdent une sensibilité vis-à-vis de NO⁺ égale ou supérieure à celle d'une électrode non modifiée (Figure 3.12). Ceci peut s'expliquer par le caractère hydrophobe des membranes et de NO⁺, ce qui engendre une surconcentration de NO⁺ à la surface de l'électrode.

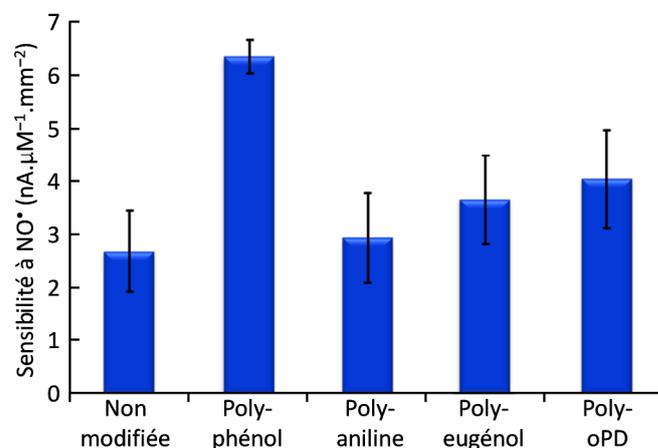


Figure 3.12 Comparaison de la sensibilité vis-à-vis de NO⁺ d'UMEs de Pt (diamètre 50 µm), modifiées ou non par des couches électrodéposées. Mesures effectuées à 0,8 V vs ECS.

Parmi les quatre membranes testées, les couches de polyeugénol et polyphénol confèrent les meilleures sélectivités aux électrodes, en particulier vis-à-vis de H_2O_2 . Ces deux membranes ont été retenues pour les études ultérieures, visant à optimiser les conditions de dépôt pour améliorer la sélectivité, tout en conservant une sensibilité vis-à-vis de NO^* suffisante. En effet, plusieurs paramètres peuvent être ajustés durant les expériences d'électrodépôt par voltampérométrie cyclique : la vitesse de balayage, la fenêtre de potentiel, le nombre de cycles et la concentration de la solution de monomère. Ces paramètres contrôlent la structure et les propriétés finales de la couche polymère, et doivent être optimisés pour obtenir les meilleures propriétés pour une application donnée.

La Figure 3.13 montre l'évolution de la sensibilité d'une électrode recouverte de polyeugénol, en fonction des conditions du dépôt (changement de la vitesse de balayage du potentiel et de la concentration en monomère). La comparaison des sensibilités vis-à-vis de NO^* et des analytes interférents permet de déterminer la sélectivité des différents types d'électrodes. La vitesse de balayage du potentiel n'affecte pas significativement la sélectivité de la couche de polyeugénol électropolymérisée. En revanche, la concentration en monomère a un effet notable. Lors du passage d'une concentration de 1 mM à 10 mM, la sélectivité est améliorée mais lorsque la concentration augmente à 100 mM, la sélectivité diminue de nouveau. L'augmentation de la sélectivité avec l'augmentation de la concentration en monomère de 1 à 10 mM peut être expliquée par la formation d'une couche plus dense. La faible sélectivité pour une concentration en eugénol encore plus élevée est inattendue, mais deux raisons peuvent expliquer ce résultat. Premièrement, la solution à 100 mM a été réalisée dans NaOH 1 M au lieu de 0,1 M, pour des raisons de solubilité. Ceci modifie le pH de la solution et peut avoir un impact sur le processus de dépôt. D'autre part, une augmentation de la concentration en monomère peut favoriser une croissance plus rapide de la couche, ce qui peut engendrer des couches inhomogènes et plus perméables.

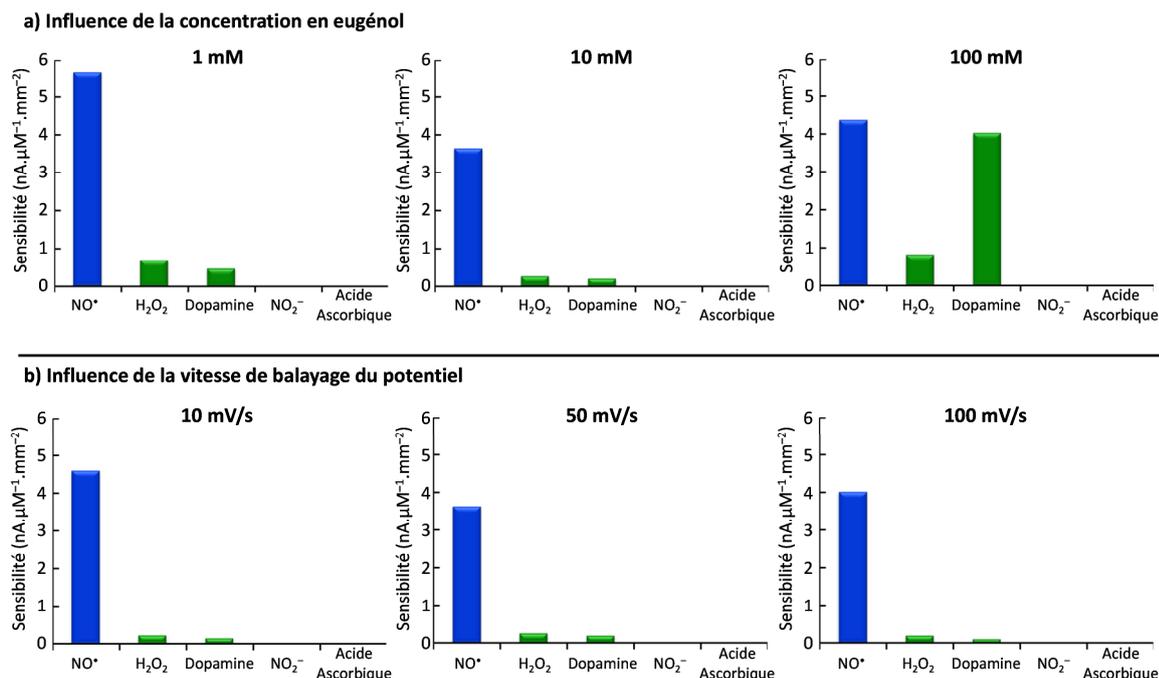


Figure 3.13 Étude de l'influence des paramètres de dépôt sur la sensibilité d'une électrode de Pt modifiée avec du polyphénol, par voltampérométrie cyclique entre 0 et 0,9 V vs Ag/AgCl pendant 10 cycles. a) vitesse de balayage du potentiel 50 mV/s, la concentration en eugéno varie. Les solutions à 1 mM et 10 mM sont préparées dans NaOH 0,1 M, la solution à 100 mM est préparée dans NaOH 1 M. b) Solution d'eugéno à 10 mM dans NaOH 0,1 M, la vitesse de balayage du potentiel varie.

Ce travail d'optimisation des dépôts a été poursuivi par ailleurs dans une étude menée en parallèle au laboratoire. L'étude a porté sur les conditions de dépôt par voltampérométrie cyclique et par chronoampérométrie. Enfin, l'effet de bicouches polyeugéno/polyphénol sur la sélectivité a lui aussi été étudié. Il ressort de ce travail que la sélectivité maximale est obtenue pour une électrode recouverte de deux couches. La première est une couche de polyeugéno, déposée par chronoampérométrie à 0,15 V vs Ag/AgCl pendant 15 min, dans une solution contenant le monomère à 10 mM dans NaOH 0,1 M. La seconde couche, déposée à la suite de la première, est composée de polyphénol déposé par voltampérométrie cyclique, en faisant varier le potentiel entre 0 et 0,7 V, à une vitesse de 10 mV/s pendant 10 cycles, dans une solution de PBS 0,1 M (pH 7,4) contenant du phénol à 0,5 M.

En résumé

La mise au point d'une méthode de détection sélective de NO^\bullet a été effectuée sur des UMEs disque plan de type pointe, en platine. Nous avons comparé la sélectivité de différentes membranes préparées à partir de l'électropolymérisation oxydante de l'aniline, l'oPD, le phénol et l'eugénol. Il ressort de cette étude qu'une bicouche polyeugénol/polyphénol permet de créer un capteur avec une bonne sélectivité pour NO^\bullet vis-à-vis de H_2O_2 , l'acide ascorbique, la dopamine et NO_2^- . Cette bicouche sera par la suite adaptée aux réseaux d'UMEs d'or en couche mince.

3.2. Détection électrochimique sélective du peroxydinitrite

Il existe très peu d'exemples de la détection électrochimique de ONOO^- , bien que ses rôles délétères dans l'organisme soient bien documentés. Plusieurs approches différentes ont été reportées. La première décrit la réduction électrochimique de ONOO^- avec des électrodes modifiées par des phtalocyanines ou des porphyrines de manganèse [37,81-83]. Cependant, le potentiel de travail est souvent trop cathodique pour éviter les interférences dues à la réduction de l'oxygène dissous. Des travaux récents ont été publiés au cours de ce travail de thèse, affirmant pouvoir détecter ONOO^- par réduction, en milieu neutre [83]. À la lecture de la publication, il est apparu que la stabilité de ONOO^- à pH neutre n'a pas été prise en compte par les auteurs, et l'espèce détectée lors de cette étude peut ne pas être ONOO^- .

La seconde approche, proposée par l'équipe Arbault-Amatore, est basée sur l'oxydation directe de ONOO^- à des UMEs de carbone platiné [87]. Cette approche, ayant permis la première détection voltampérométrique de ONOO^- , est restreinte à des milieux biologiques bien définis car elle peut souffrir d'interférences si des espèces électrooxydables non identifiées sont présentes.

Une autre stratégie est basée sur l'oxydation d'une électrode de mercure par ONOO^- , en solution alcaline [118], mais les auteurs reconnaissent la nécessité d'étudier les effets d'éventuelles interférences. Enfin, des travaux parus en 2010 décrivent l'oxydation de ONOO^- avec des électrodes modifiées par des complexes porphyriniques de fer ou de cobalt

[84,85]. Ces capteurs ont été étalonnés en solution basique, dans des conditions qui sont donc éloignées des milieux biologiques.

Afin de développer un capteur pour ONOO^- , nous avons dans un premier temps cherché à déterminer les potentiels d'oxydation et de réduction de ONOO^- , à des électrodes d'or en milieu neutre. Ces expériences ont été réalisées dans le but de déterminer le potentiel optimal pour la détection de ONOO^- dans les milieux biologiques. Les principales difficultés proviennent de la très courte durée de vie de cet analyte à pH neutre. En effet, alors que ONOO^- est stable en solution alcaline, il se décompose rapidement dans les solutions tampon physiologiques, notamment à travers l'isomérisation de son acide conjugué, ONOOH [46]. En conséquence, les études voltampérométriques en milieu neutre sont difficiles. Pour contourner ce problème, nous avons utilisé la chronoampérométrie à une électrode d'or tournante. En enregistrant les chronoampérogrammes hydrodynamiques à différentes valeurs du potentiel, il devient possible de reconstituer la courbe intensité/potentiel de ONOO^- à pH neutre.

La Figure 3.14 a-c montre des chronoampérogrammes, enregistrés à trois potentiels différents, typiquement obtenus lors de l'addition de ONOO^- ($140 \mu\text{M}$). Ces courbes sont enregistrées à une électrode tournante d'or (vitesse de rotation = 2000 rpm), dans une solution de PBS à pH 7,1. Les ajouts de ONOO^- sont réalisés à partir d'une solution mère alcaline (la synthèse de la solution de peroxy-nitrite est décrite en annexe). Dès l'addition de ONOO^- un courant anodique ou cathodique est enregistré, en fonction du potentiel imposé. Ce courant disparaît rapidement, il peut être relié à la présence de ONOO^- se décomposant dans la solution neutre. Les injections de solution aqueuse de NaOH n'engendrent pas de réponse électrochimique (Figure 3.14 d). L'emploi d'une électrode tournante permet d'homogénéiser rapidement la solution après les ajouts de ONOO^- .

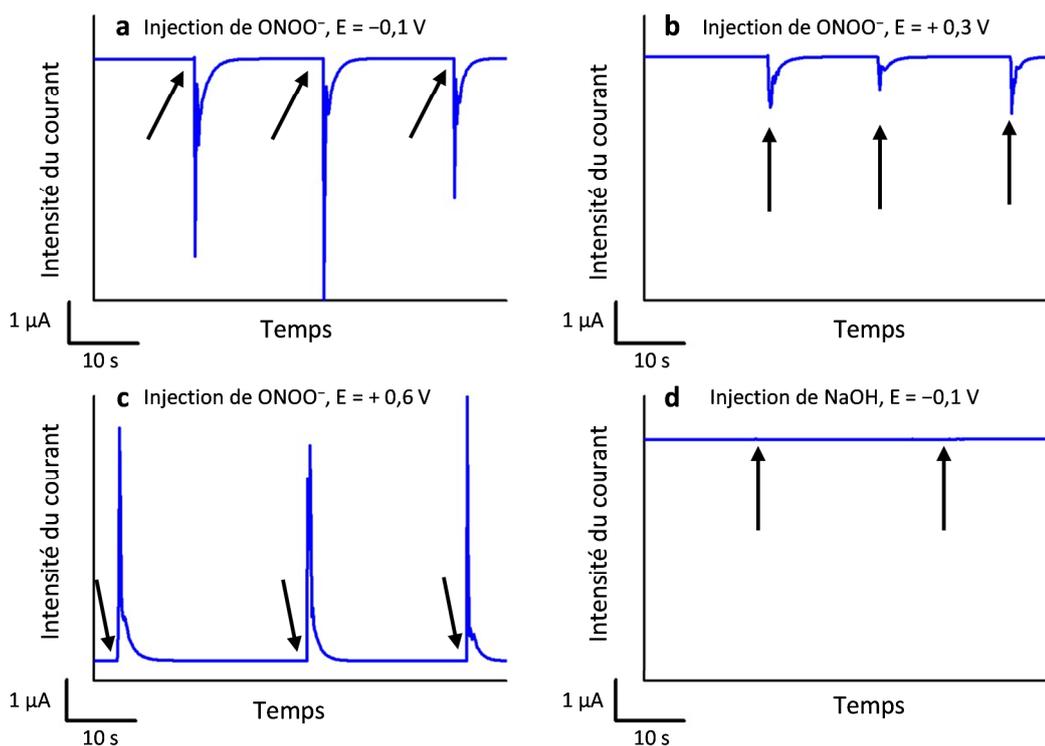


Figure 3.14 Ampérométrie à une électrode disque en or, tournant à 2000 tours/min, dans 5 mL de PBS (pH = 7,1) à différents potentiels. Les flèches indiquent des injections de 100 μL d'une solution alcaline contenant ONOO^- à 140 μM . a) $E = -0,1 \text{ V vs ECS}$, (b) $E = 0,3 \text{ V vs ECS}$, (c) $E = 0,6 \text{ V vs ECS}$, (d) pas de ONOO^- ; $E = -0,1 \text{ V vs ECS}$.

En fonction du potentiel appliqué, le courant mesuré à la suite des ajouts de ONOO^- est soit positif, soit négatif, correspondant respectivement à une oxydation et une réduction. La Figure 3.15-a montre le « voltampérogramme reconstitué » de ONOO^- dans le PBS à pH 7,1. Il a été construit en traçant l'intensité du courant mesurée 1,5 s après l'addition, en fonction du potentiel appliqué. La Figure 3.15-b montre comment l'échantillonnage du courant a été réalisé. Pour des durées inférieures à 1,5 s, le courant mesuré est perturbé par l'injection, amenant à une mauvaise reproductibilité entre les expériences. À des temps supérieurs à 1,5 s, la valeur du courant devient faible à cause de la décomposition totale de ONOO^- , et la sensibilité des mesures diminue.

La Figure 3.15-a indique clairement qu'un processus d'oxydation est observé à des valeurs de potentiel supérieures à 0,4 V vs ECS. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par l'équipe Arbault-Amatore sur des fibres de carbone platinées, dans des solutions alcalines [87].

Lorsque la valeur du potentiel est inférieure à 0,4 V, des courants de réduction sont enregistrés. Le potentiel auquel ce processus de réduction débute est très différent du potentiel

de réduction de ONOO^- en solution basique (environ $-0,3 \text{ V vs ECS}$ sur des électrodes de platine modifiées [82]). Ce résultat est similaire à celui reporté par le groupe de Koppenol, qui a montré que ONOOH peut être réduit de manière irréversible à une électrode d'or, par voltampérométrie à $\text{pH} = 5,6$ [119]. Le potentiel de la réduction n'est pas sensible au pH , et il est compatible avec la réduction observée dans notre cas sur le voltampérogramme reconstitué. Les courants mesurés peuvent donc être expliqués par la réduction de ONOOH , l'acide conjugué de ONOO^- . À une valeur de pH donnée, la quantité relative de ONOOH par rapport à ONOO^- peut être calculée grâce au pKa du couple ($\text{pKa} = 6,8$ [42]). À $\text{pH} 7,1$, la quantité maximum attendue de ONOOH représente donc à tout moment $\approx 33 \%$ de la quantité totale de $\text{ONOOH}/\text{ONOO}^-$. Ces données suggèrent qu'il est possible de détecter électrochimiquement la présence de $\text{ONOOH}/\text{ONOO}^-$, en milieu neutre, à travers la réduction de ONOOH qui débute dès $0,4 \text{ V vs ECS}$.

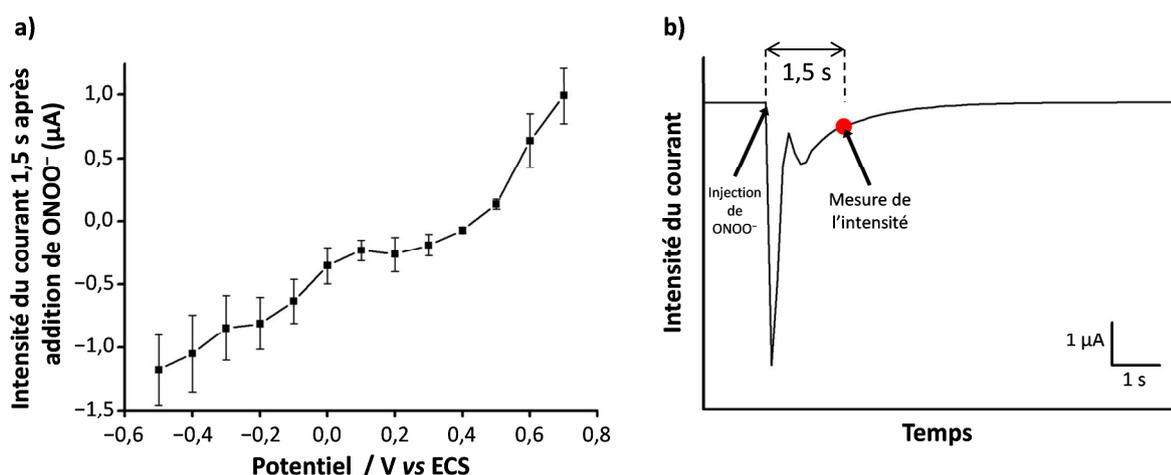


Figure 3.15 a) Voltampérogramme reconstitué de ONOO^- dans du PBS ($\text{pH} = 7,1$) à une électrode millimétrique d'or. Le courant est échantillonné à partir des chronoampérogrammes, 1,5 s après l'addition de ONOO^- ($140 \mu\text{M}$), et reporté en fonction du potentiel. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur au moins neuf mesures. b) Exemple d'un chronoampérogramme à une électrode d'or tournante (2000 tours/min) à $E = -0,1 \text{ V vs ECS}$, utilisé pour mesurer le courant utilisé pour le voltampérogramme reconstitué.

La Figure 3.16 montre les voltampérogrammes des analytes potentiellement interférents, enregistrés à une électrode d'or tournante, dans une solution de PBS ($\text{pH} = 7,1$). Les espèces interférentes testées sont l'acide ascorbique, la dopamine, H_2O_2 , NO_2^- , et le glutamate. Parmi elles, NO_2^- est présent dans la solution mère de ONOO^- utilisée lors de ces expériences. En effet, il fait partie des réactifs de départ dans la méthode de synthèse de ONOO^- employée (voir partie expérimentale en annexe), et les molécules n'ayant pas réagi ne sont pas séparées de la solution à la fin de la réaction. H_2O_2 peut aussi être présent dans la

solution mère car il est produit par la lente décomposition de ONOO^- , pouvant avoir lieu lors du stockage de la solution (moins d'un mois, à $-20\text{ }^\circ\text{C}$). Les voltampérogrammes montrent que les analytes interférents testés ne sont pas électroactifs dans une fenêtre de potentiel comprise entre $-0,3$ et 0 V . La comparaison de ces voltampérogrammes avec celui reconstitué pour ONOO^- indique que le potentiel optimal pour détecter la réduction de ONOOH est $-0,1\text{ V}$. En effet, à des valeurs de potentiel plus négatives, le courant de réduction est sensible à la variation de la concentration en oxygène dans la solution. À des valeurs plus positives, l'acide ascorbique commence à être oxydé.

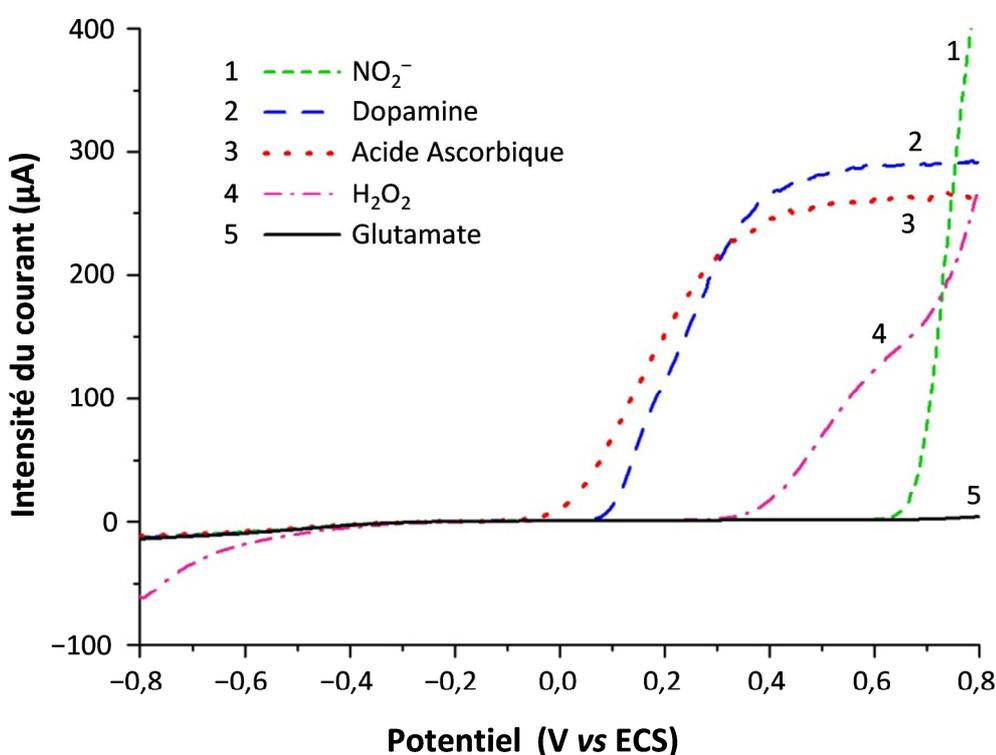


Figure 3.16 Voltampérogrammes à une électrode d'or tournante (2000 tours/min) de $-0,8$ à $0,8\text{ V vs ECS}$ dans du PBS ($\text{pH} = 7,1$) contenant (1) du nitrite de sodium (10 mM) (2) de la dopamine (10 mM), (3) de l'acide ascorbique (10 mM), (4) du peroxyde d'hydrogène (10 mM) et (5) du glutamate (10 mM).

La Figure 3.17 montre des exemples d'ampérogrammes enregistrés à $-0,1\text{ V}$ à une électrode disque tournante. Ceci confirme que l'électrode d'or est seulement sensible à la présence de ONOO^- , sans produire de signal lors de l'addition des composés interférents examinés. Toutes les expériences ont été réalisées séparément pour éviter d'éventuelles réactions chimiques entre les analytes.

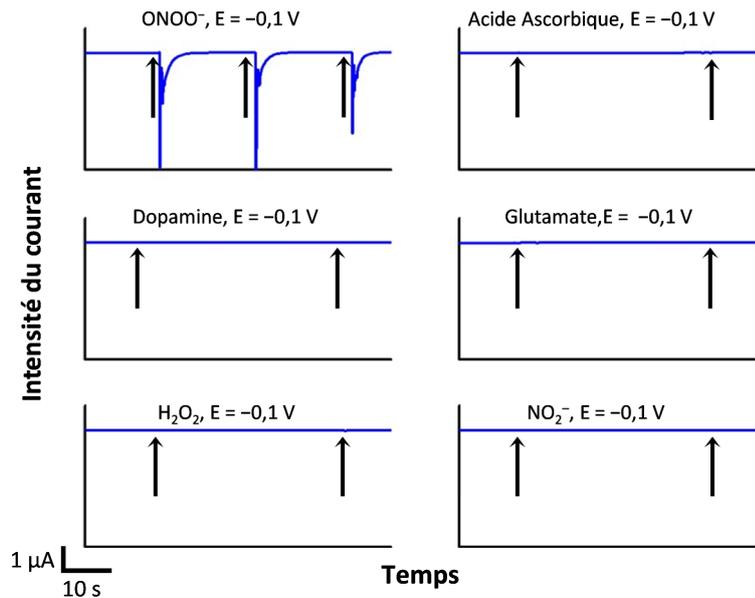


Figure 3.17 Ampérogrammes à une électrode d'or tournante (2000 tours/min) dans 5 mL de PBS (pH = 7,1) à $-0,1$ V vs ECS. Les flèches indiquent des injections de $100 \mu\text{L}$ de ONOO^- ($140 \mu\text{M}$) et d'autres espèces ($200 \mu\text{M}$ chacune).

Bien que ces expériences nous aient permis d'identifier le potentiel de travail optimal pour la détection de ONOO^- , nous n'avons pas réussi à déterminer la sensibilité de l'électrode. L'étalonnage du capteur demande en effet la connaissance de la concentration de ONOO^- en solution. Cette concentration n'est connue qu'au moment de l'ajout, avant que $\text{ONOOH}/\text{ONOO}^-$ ne se décompose. Malheureusement, les perturbations engendrées par l'ajout ne permettent pas d'obtenir une valeur du courant correspondant à cette concentration initiale. Pour déterminer l'évolution de la concentration de ONOO^- en solution neutre, il faut connaître la loi cinétique régissant le processus de décomposition. Si elle suit une cinétique de premier ordre, celle-ci sera de la forme :

$$-\frac{d[\text{ONOO}^-]}{dt} = k_1[\text{ONOO}^-] \quad (3.3)$$

Avec :

$[\text{ONOO}^-]$: Concentration en ONOO^-

k_1 : Constante de vitesse de premier ordre

t : Temps

L'intégration de l'équation (3.3) permet de relier la concentration de ONOO^- à la concentration initiale, $[\text{ONOO}^-]_0$:

$$[ONOO^-] = [ONOO^-]_0 \times e^{-k_1 t} \quad (3.4)$$

Pour une cinétique de décomposition de second ordre, l'expression sera :

$$-\frac{d[ONOO^-]}{dt} = k_2 [ONOO^-]^2 \quad (3.5)$$

Avec k_2 : Constante de vitesse de second ordre.

Après intégration :

$$\frac{1}{[ONOO^-]} = \frac{1}{[ONOO^-]_0} + k_2 t \quad (3.6)$$

Ni l'équation (3.2), ni l'équation (3.6) ne s'ajustent aux données expérimentales, quel que soit le potentiel de la mesure. Ceci confirme que la décomposition de $ONOO^-$ en milieu neutre est un processus plus complexe qu'une simple réaction de premier ou second ordre, car il existe de nombreuses voies de décomposition possibles (voir paragraphe 1.2.b). Plusieurs modèles ont été développés dans la littérature pour décrire cette décomposition [40,120,121], et bien que l'un d'entre eux prenne en compte jusqu'à 117 réactions possibles [40], un consensus ne semble pas encore s'être dégagé quant aux réactions effectivement impliquées.

Afin de s'approcher d'une situation « biologique », où $ONOO^-$ est produit par la réaction entre NO^\bullet et $O_2^{\bullet-}$, des mesures de chronoampérométrie ont été réalisées pour détecter $ONOO^-$ produit *in situ*. Ces expériences ont été effectuées dans une solution de PBS contenant du DEA-NONOate (composé donneur de NO^\bullet). La concentration maximale en NO^\bullet est ainsi atteinte après 30 s [111]. Afin de former $ONOO^-$ *in situ*, des aliquotes d'une solution alcaline de DMSO, saturée en KO_2 , ont été ajoutées dans la cellule électrochimique. La première addition de $O_2^{\bullet-}$ est effectuée 1 min après l'introduction du donneur de NO^\bullet . La courbe 1 de la Figure 3.18 montre un chronoampérogramme typique enregistré à $-0,1$ V à une électrode disque tournante en or. Lors de l'injection, un courant de réduction transitoire est observé. À ce potentiel, la présence de NO^\bullet ne peut pas interférer avec la détection de $ONOO^-$. En effet, en fonction du type d'électrode et du pH de la solution, NO^\bullet peut subir une réduction à un électron pour former l'anion nitrosyl, à des potentiels allant de $-0,5$ à $-1,4$ V (vs Ag/AgCl ou ECS) ; son oxydation se produit aux alentours de $0,8$ V [67,71]. Quand $O_2^{\bullet-}$

est ajouté après la décomposition totale du donneur de NO^\bullet (il n'y a plus de NO^\bullet présent en solution), aucun courant transitoire de réduction n'est observé (courbe 2 de la Figure 3.18). Ceci permet de dire que le signal de réduction observé dans le premier cas ne peut pas être dû à $\text{O}_2^{\bullet-}$ lui-même. Il n'est pas non plus dû au produit d'une réaction hypothétique entre $\text{O}_2^{\bullet-}$ et les molécules stables issues de la décomposition du NONOate (principalement des amines secondaires et NO_2^-). Le signal est donc généré par ONOOH , produit à la suite de la réaction entre NO^\bullet et $\text{O}_2^{\bullet-}$. De plus, la forme de l'ampérogramme est très similaire à celle observée quand ONOO^- lui-même est ajouté.

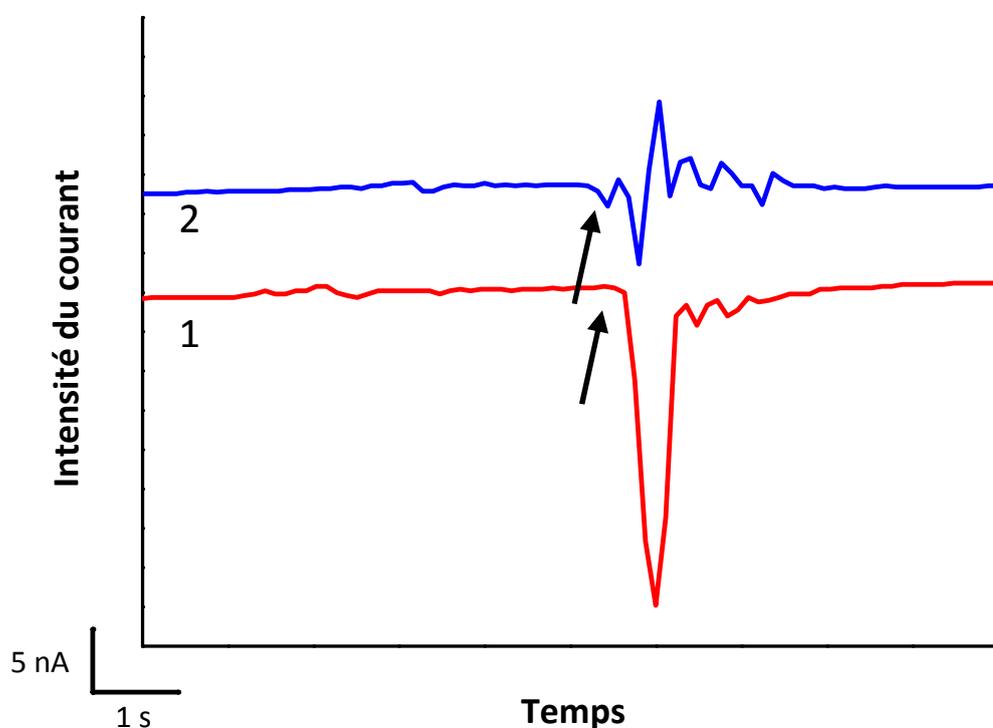


Figure 3.18 Ampérogrammes à une électrode d'or tournante (2000 tours/min). Les flèches indiquent des injections d'une solution alcaline de DMSO saturée en KO_2 (100 μL), dans 5 mL de PBS contenant (1) du DEA-NONOate (1 mM) ajouté 1 min auparavant et (2) du DEA-NONOate totalement décomposé. La courbe 2 a été décalée (en ordonnée) pour plus de clarté.

En résumé

En solution neutre (pH = 7,1), nous avons montré que la présence de ONOO^- engendre un signal électrochimique à $-0,1 \text{ V vs ECS}$, à une électrode d'or non modifiée. Le courant mesuré est généré par la réduction de l'acide conjugué ONOOH . Le potentiel de travail ($-0,1 \text{ V}$) permet une mesure sélective et le signal électrochimique n'est pas affecté par

la présence de O_2 , H_2O_2 , NO_2^- , la dopamine, l'acide ascorbique et le glutamate. En se basant sur le pKa du couple $ONOOH/ONOO^-$, la quantité de $ONOOH$ attendue au pH physiologique de 7,4 représente 20 % de la quantité totale de peroxydinitrite. Bien que la sensibilité de l'électrode d'or à l'égard de la réduction de $ONOOH$ ne puisse pas être facilement déterminée, à cause de la nature évanescence du peroxydinitrite, cette approche permet de détecter qualitativement la présence de $ONOO^-$ en solution neutre.

3.3. Détection simultanée de NO^\bullet et $ONOO^-$ à l'aide de réseaux d'UMEs

3.3.a. Introduction

Dans le chapitre 2, nous avons décrit la conception et la caractérisation de nouveaux réseaux d'UMEs en or, qui sont pleinement fonctionnels et permettent d'obtenir en même temps une bonne sensibilité et des courants stationnaires. La première partie de ce chapitre a été dédiée à la mise au point de la détection sélective de NO^\bullet avec des UMEs de platine. La seconde partie du chapitre a présenté l'étude du comportement électrochimique de $ONOO^-$ en milieu neutre, à des macroélectrodes d'or « classiques », ce qui a permis de développer une nouvelle stratégie de détection de $ONOO^-$. La dernière partie de ce chapitre présente un travail dont le but est de mettre à profit et regrouper tous ces résultats, pour réaliser la détection simultanée de NO^\bullet et $ONOO^-$ avec les réseaux d'UMEs.

3.3.b. Détection sélective de NO^\bullet à un réseau d'UMEs

i) Dépôts

Le dépôt de couches sélectives de polyeugénol et polyphénol a été mis au point grâce à des UMEs de platine, alors que les réseaux d'électrodes sont en or. Comme le métal change, il est nécessaire de vérifier que *i)* l'eugénol et le phénol peuvent être déposés sur de l'or et que *ii)* ces couches apportent toujours la sélectivité souhaitée lors de la détection électrochimique de NO^\bullet . Les travaux menés sur les UMEs de platine ont montré que la sélectivité optimale est obtenue pour une double couche de polyeugénol et polyphénol, polymères électrodéposés à la surface de l'électrode. La Figure 3.19 montre l'évolution de l'intensité du courant en fonction

du temps, lors d'un dépôt de polyeugénol par chronoampérométrie, sur un réseau de 110 UMEs d'or. Lors de l'application du potentiel de 0,15 V, un courant transitoire apparaît dont l'intensité décroît rapidement pour tendre vers zéro. Cette oxydation permet la polymérisation de l'eugénol à la surface de l'électrode. Le dépôt ainsi formé passive la surface et bloque l'oxydation de nouveaux monomères, d'où la chute rapide du courant. Afin d'obtenir un dépôt le plus compact possible, le potentiel est appliqué pendant 15 min, bien que 90 % de la charge totale échangée le soit pendant les deux premières minutes.

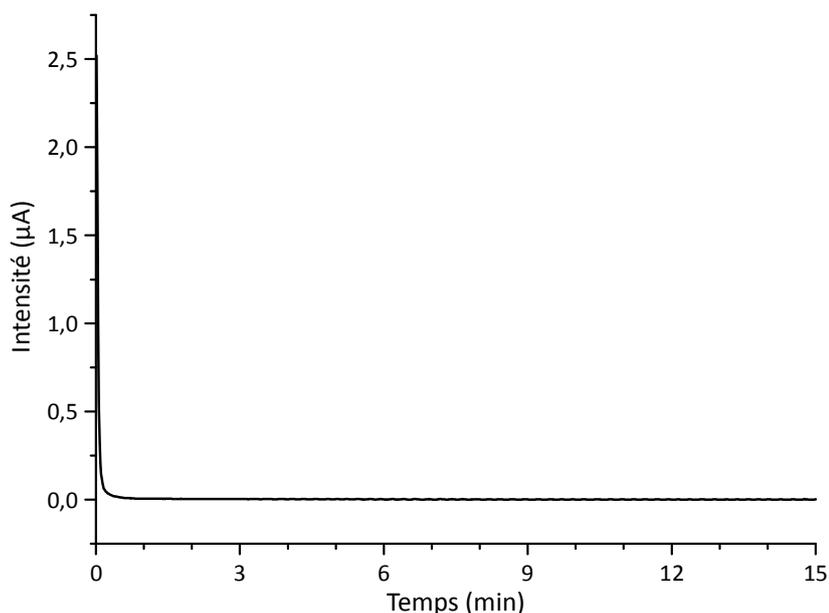


Figure 3.19 Chronoampérométrie obtenue lors de l'électropolymérisation d'eugénol à la surface d'un réseau de 110 UMEs d'or de 50 µm de diamètre. Potentiel appliqué = 0,15 V vs Ag/AgCl, pendant 15 min. Solution d'eugénol 10 mM dans NaOH 0,1 M.

La Figure 3.20 montre le voltampérométrie obtenue lors du dépôt de polyphénol à la surface d'un réseau d'UMEs déjà modifiées par du polyeugénol. Comme lors des expériences avec les UMEs de platine, un pic d'oxydation apparaît lors du premier cycle, pic qui n'est pas présent lors des cycles suivants. Malgré la présence d'une couche de polyeugénol isolante, le phénol parvient à diffuser jusqu'à la surface de l'électrode pour être oxydé et polymériser. Ceci est probablement lié à la plus petite taille de la molécule de phénol en comparaison avec l'eugénol, et permet d'obtenir un dépôt plus dense et plus sélectif. De telles couches bloquent l'oxydation électrochimique du ferrocyanure, comme cela a été observé avec les UMEs de platine (cf. paragraphe 3.1.c).

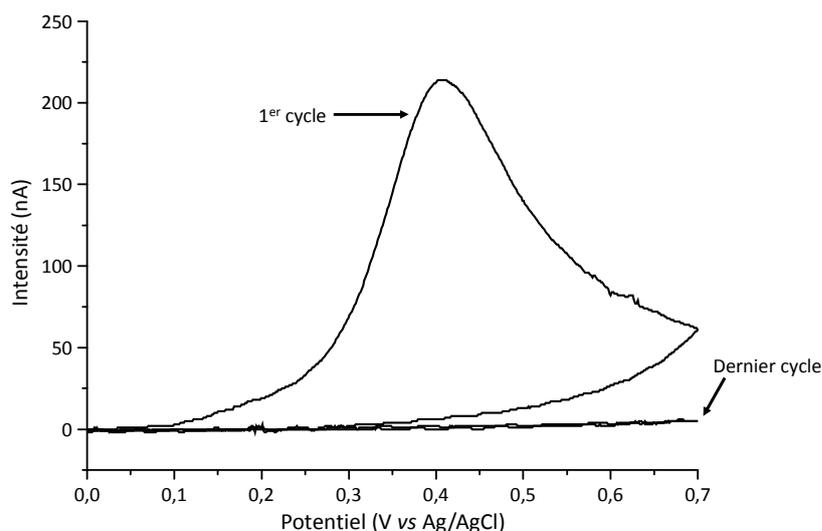


Figure 3.20 Voltampérométrie obtenue lors de l'électropolymérisation de phénol à la surface d'un réseau de 110 UMEs de 50 μm de diamètre, déjà recouvertes de polyéugénol. Potentiel balayé de 0 à 0,7 V vs Ag/AgCl pendant 10 cycles, à 10 mV/s, dans une solution de phénol 0,5 M dans PBS 0,1 M ($\text{pH} = 7,4$).

ii) Sélectivité des dépôts

Nous avons ensuite vérifié que les dépôts permettent la détection de NO^\bullet de manière sélective, comme dans le cas des UMEs de platine. La Figure 3.21 montre les chronoampérométries obtenues à 0,8 V sur les réseaux modifiés, lors de l'ajout d'un donneur de NO^\bullet en solution neutre. La pseudo-électrode de référence utilisée lors de ces expériences était soit un fil d'Ag recouvert d'AgCl, soit la référence interne en forme de bande ; les deux configurations ont donné des résultats similaires. L'ajout de l'aliquote de solution alcaline de DEA-NONOate a lieu après environ 15 min, pour permettre la stabilisation de la ligne de base. Cet ajout est suivi d'une agitation rapide afin d'homogénéiser la solution. Un courant d'oxydation apparaît, son évolution est similaire à ce qui a été observé sur les UMEs de platine. Les chronoampérométries reflètent ainsi l'évolution de la concentration de NO^\bullet en solution. Les variations de la concentration de NO^\bullet peuvent donc être détectées grâce à ces réseaux d'UMEs d'or modifiés. La présence de la bicouche polyéugénol/polyphénol à la surface des électrodes n'entrave pas la détection de NO^\bullet . Enfin, l'intensité du courant varie de manière linéaire avec le nombre d'UMEs connectées, confirmant l'amplification du signal par les réseaux d'UMEs.

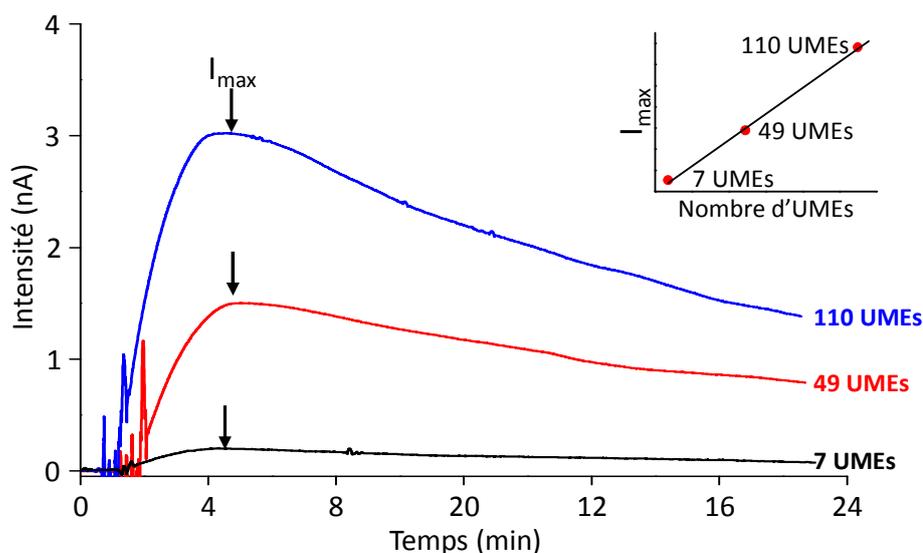


Figure 3.21 Suivi chronoampérométrique de la libération de NO^\bullet par du DEA-NONOate dans du PBS (pH = 7,4), à 25 °C. Chronoampérogrammes enregistrés à 0,8 V vs Ag/AgCl, avec 7, 49 et 110 UMEs modifiées par une bicouche polyéugénol/polyphénol. L'ajout de DEA-NONOate de 10 μM correspond à une concentration maximale en NO^\bullet de 3,5 μM . L'encart illustre la relation linéaire entre l'intensité maximale enregistrée et le nombre d'UMEs connectés.

La Figure 3.22 permet de comparer la sensibilité des réseaux d'électrodes modifiées vis-à-vis de NO^\bullet et des analytes interférents. À 0,8 V, ces électrodes sont beaucoup plus sensibles à NO^\bullet qu'aux molécules interférentes testées. Aux concentrations utilisées, les réseaux sont insensibles à NO_2^- et à l'acide ascorbique. Le capteur détecte tout de même H_2O_2 et la dopamine, même si la sensibilité est plus de 20 fois plus faible que celle vis-à-vis de NO^\bullet . En conséquence, la mesure de NO^\bullet ne sera pas perturbée par ces analytes, sauf si les variations de la concentration en H_2O_2 et en dopamine sont très importantes, en comparaison avec les variations de la concentration de NO^\bullet . Par exemple, une augmentation de la concentration en H_2O_2 de 25 μM produirait un signal de la même intensité qu'une augmentation de la concentration en NO^\bullet de 1 μM . Ces résultats sont encourageants car la sélectivité de ce capteur est similaire à celle observée sur des capteurs modifiés par du Nafion® [122], qui sont largement répandus dans la littérature pour les mesures *in vivo*.

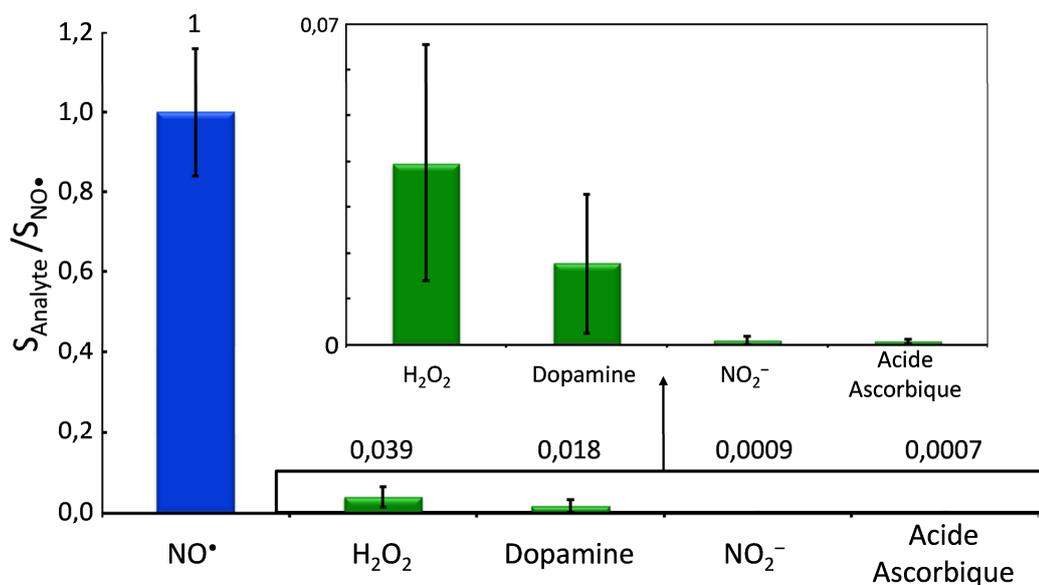


Figure 3.22 Comparaison de la sensibilité à différents analytes interférents (S_{analyte}), par rapport à la sensibilité à $\text{NO}\cdot$ ($S_{\text{NO}\cdot}$), de réseaux d'UMEs en or recouvertes d'une bicouche de polyeugénol/polyphénol. Données obtenues à partir d'expériences de chronoampérométrie, dans le PBS (pH = 7,4) à 0,8 V vs Ag/AgCl.

iii) *Étalonnage du capteur à $\text{NO}\cdot$*

La Figure 3.23 montre la courbe d'étalonnage du capteur, pour des concentrations de $\text{NO}\cdot$ variant de 0,1 à 7 μM . Cette courbe a été réalisée en mesurant l'intensité enregistrée lorsque la concentration en $\text{NO}\cdot$ est maximale, suite à l'ajout du DEA-NONOate en solution neutre. La sensibilité d'un réseau de 110 UMEs est de $0,56 \text{ nA}\cdot\mu\text{M}^{-1}$, elle est constante dans l'intervalle de concentrations testées. La limite de détection théorique de ce capteur, calculée pour un rapport signal/bruit de 3, est 27 nM. Ces caractéristiques analytiques sont comparables à celles reportées dans la littérature [67], malgré les différences dans la forme et les dimensions des capteurs.

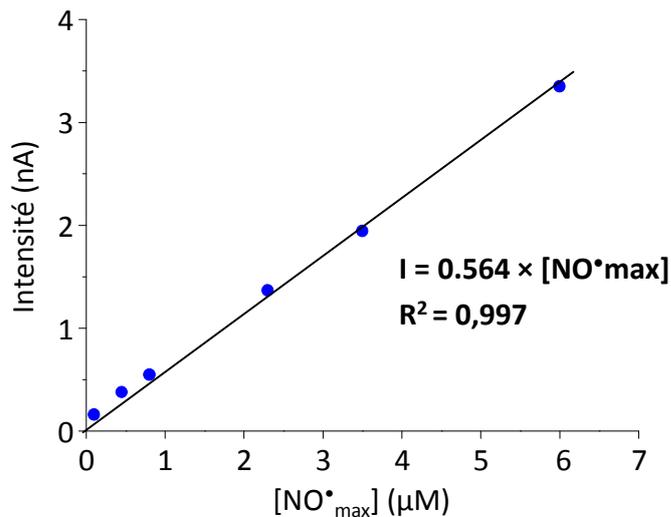


Figure 3.23 Courbe d'étalonnage d'un réseau de 110 UMEs recouvertes d'une bicouche polyeugénol/polyphénol. Données obtenues à 25 °C dans le PBS (pH = 7,4), à 0,8 V vs Ag/AgCl.

Les expériences précédentes ont été réalisées dans un milieu tamponné à pH 7,4. Les solutions tampon phosphate PBS ne fournissent pas les conditions optimales pour le maintien de cultures cellulaires ou tissulaires, pour lesquelles des milieux spécifiques sont utilisés. Ces milieux contiennent, en plus des ions permettant de tamponner la solution, des acides aminés, des vitamines et des sucres. Il est donc primordial de vérifier la sensibilité de nos capteurs dans les milieux de culture. La Figure 3.24 compare la sensibilité des réseaux d'électrode, lorsque les ajouts de donneur de NO[•] sont effectués dans des milieux couramment utilisés en culture cellulaire (tous ont un pH de 7,4 lors des expériences réalisées). Ces milieux sont le *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), le *minimum essential eagle medium* (MEM) et le *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI), avec ou sans rouge de phénol. Le rouge de phénol est un indicateur coloré utilisé en culture cellulaire pour surveiller l'évolution du pH au cours de la culture. La Figure 3.24 indique que pour tous les milieux de culture testés la sensibilité vis-à-vis de NO[•] est plus faible que dans le PBS, et la diminution est plus prononcée quand l'indicateur de pH est présent. Ceci est probablement dû à la réactivité de NO[•] vis-à-vis des composants des milieux de culture, ayant pour effet de diminuer sa concentration en solution. La diminution est de moins d'un ordre de grandeur, ce qui permet tout de même d'envisager la détection de NO[•] dans ces milieux avec une sensibilité acceptable. Cependant, lorsque cela est possible, il est préférable d'éviter la présence de rouge de phénol lors d'expériences visant à détecter NO[•].

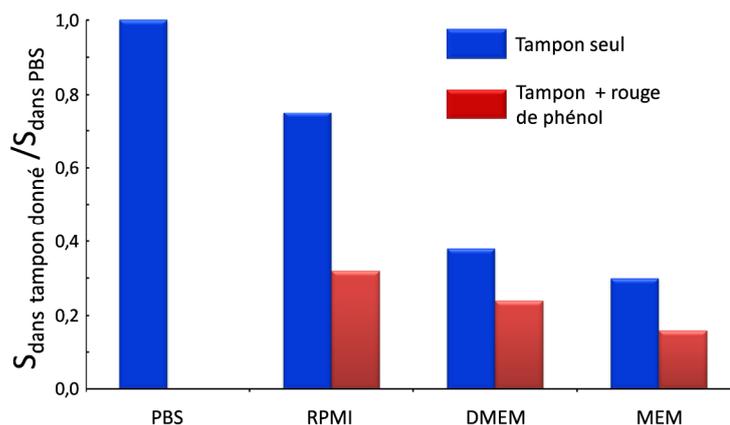


Figure 3.24 Comparaison de la sensibilité à NO^\bullet (S) de réseaux d'UMEs dans le PBS et différents tampons. NO^\bullet obtenu grâce à la décomposition de DEA-NONOate 10 mM. Sensibilité déterminée grâce à des mesures ampérométriques à 0,8 V vs Ag/AgCl.

En fonction de l'application désirée, il peut être nécessaire d'ajouter une couche supplémentaire à la surface des électrodes, afin de minimiser la perturbation de l'échantillon biologique étudié (les rendre « biocompatibles »). À titre d'exemple, nous avons étudié l'impact de l'ajout d'une couche de fibronectine, sur la sensibilité des électrodes modifiées vis-à-vis de NO^\bullet . La fibronectine est une protéine de la matrice extracellulaire, jouant un rôle clé dans l'adhésion cellulaire [123]. Après adsorption de cette protéine à la surface des réseaux d'UMEs modifiés, la sensibilité vis-à-vis de NO^\bullet est diminuée de 20 %. Il est donc possible d'effectuer des traitements aux réseaux d'UMEs, dans le but d'améliorer leur biocompatibilité, tout en conservant une sensibilité acceptable pour des mesures de NO^\bullet dans des systèmes biologiques.

iv) Stabilité des couches électrodéposées

Le comportement électrochimique des électrodes modifiées ne varie pas de manière significative, lorsqu'elles sont stockées dans le PBS ou à l'air pendant une semaine. Cependant il a été observé que la sensibilité des électrodes est affectée par les expériences impliquant de fortes concentrations en NO^\bullet . La Figure 3.25 montre l'évolution de la sensibilité vis-à-vis de NO^\bullet d'un réseau d'UMEs modifiées, en fonction du nombre d'ajouts de NO^\bullet (concentration maximale 31 μM) déjà effectués sur les électrodes pour évaluer leurs performances. Au fil des expériences, la sensibilité des électrodes vis-à-vis de NO^\bullet augmente. La sensibilité vis-à-vis des analytes interférents augmente aussi, dans les mêmes proportions. La sélectivité reste donc inchangée. Ceci laisse à penser que les couches deviennent plus perméables à tous les analytes lorsqu'elles sont exposées à de fortes concentrations en NO^\bullet . Une explication possible de ce phénomène viendrait de la réaction de NO^\bullet avec les couches

électrodéposées, qui engendrerait la transformation partielle de ces dernières. En effet, NO^\bullet peut réagir avec différents composés dérivés du phénol et le phénol lui-même [124]. Bien que la sélectivité des électrodes ne soit pas modifiée par ce phénomène, il devient nécessaire d'étalonner le capteur avant et après chaque expérience pour vérifier que la sensibilité n'a pas évolué.

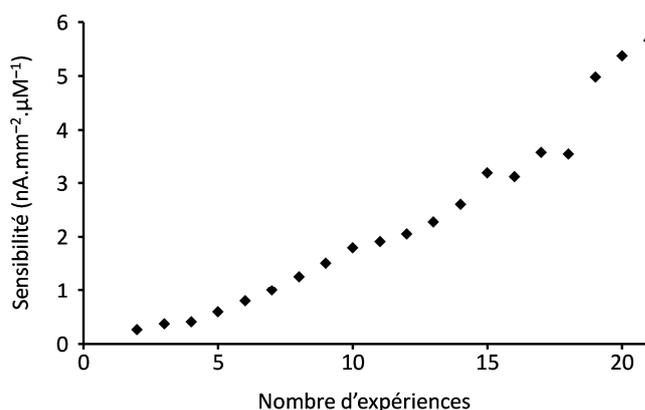


Figure 3.25 Évolution de la sensibilité à NO^\bullet d'un réseau d'UMEs d'or de $20\ \mu\text{m}$ de diamètre, en fonction du nombre d'expériences. Dans chaque expérience un ajout de NONOate $500\ \mu\text{M}$ est effectué, correspondant à une concentration maximale en NO^\bullet de $31\ \mu\text{M}$. L'électrode est rincée à l'eau entre chaque expérience. Sensibilité mesurée à $0,8\ \text{V}$ vs ECS, dans le PBS ($\text{pH} = 7,4$).

3.3.c. Détection sélective de ONOO^- à un réseau d'UMEs

Nous avons montré que ONOO^- peut être détecté en solution neutre grâce à l'électroréduction de son acide conjugué ONOOH , à des électrodes d'or tournantes. En utilisant un potentiel de $-0,1\ \text{V}$ vs ECS, la détection est sélective vis-à-vis de H_2O_2 , la dopamine, NO_2^- , l'acide ascorbique et le glutamate. La Figure 3.26 montre un chronoampérogramme typiquement obtenu à un réseau de 7 UMEs d'or, lors d'ajouts dans du PBS ($\text{pH} = 7,4$) de ONOO^- , NaOH , NO_2^- et H_2O_2 . Les injections ont été réalisées près de la surface des électrodes avec une micropipette. La solution n'est pas mélangée pour ne pas perturber le signal électrochimique. De plus, comme ONOO^- n'est pas stable en milieu neutre, si la solution était mélangée, cette molécule serait presque entièrement décomposée à la fin de l'homogénéisation de la solution.

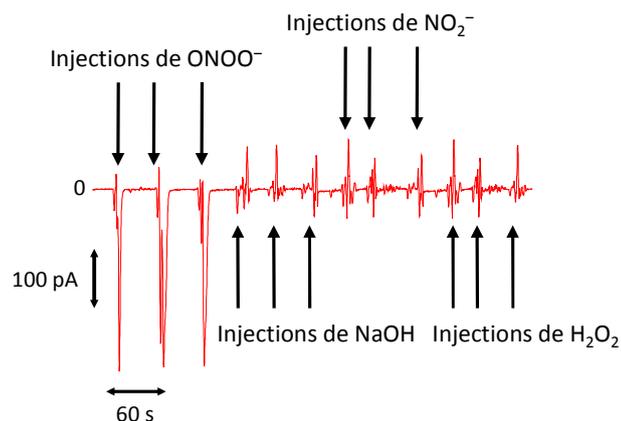


Figure 3.26 Chronoampérogramme d'un réseau de 7 UMEs d'or non modifiées, d'un diamètre de 50 μm , à $-0,1\text{ V vs Ag/AgCl}$ dans le PBS (1 M, $\text{pH} = 7,4$). Les flèches indiquent des injections de ONOO^- (50 μM + NaOH 1700 μM), NaOH (1700 μM), NO_2^- (200 μM) et H_2O_2 (500 μM).

À $-0,1\text{ V vs Ag/AgCl}$, les ajouts de la solution alcaline de ONOO^- entraînent l'apparition d'un courant de réduction transitoire, associé à la réduction de sa forme protonée ONOOH . Le signal disparaît en environ 15 s, à la suite de la décomposition de l'analyte. Cette durée est beaucoup plus importante que les 3 s environ nécessaires à la disparition du signal à des électrodes tournantes. Comme la solution n'est pas mélangée, il est possible que le pH soit localement plus élevé à l'endroit de l'injection avant que la solution alcaline injectée ne soit entièrement tamponnée par le PBS. Cette augmentation locale du pH entraînerait la stabilisation de ONOO^- , et pourrait expliquer la durée de vie plus importante de l'analyte au cours de ces expériences. Les injections de la solution de NaOH ne contenant pas de ONOO^- n'engendrent pas de signal, le courant observé est donc dû à la présence de ONOO^- . Les injections de H_2O_2 et NO_2^- ne produisent pas de signal non plus, confirmant la sélectivité du capteur envers ces analytes.

Comme ONOO^- a été injecté manuellement, la distance exacte entre les électrodes de travail (le réseau d'UMEs) et le point d'injection peut varier, modifiant alors l'intensité du courant enregistré. De plus, à cause de la très faible durée de vie de ONOO^- , ce capteur permet d'obtenir des informations seulement sur des changements dans les flux de production de l'analyte. L'analyse quantitative de ces signaux analytiques n'est pas possible tant que la cinétique de décomposition de ONOO^- n'est pas entièrement comprise.

3.3.d. Détection simultanée de NO^\bullet et ONOO^- à un réseau d'UMEs

La dernière étape de développement du dispositif capteur consiste à vérifier la possibilité de détecter simultanément NO^\bullet et ONOO^- . Afin de valider cette double détection,

deux mesures chronoampérométriques ont été réalisées simultanément sur deux sets d'UMEs d'un dispositif capteur (Design 2). Pour ceci, un groupe de 7 UMEs a été modifié électrochimiquement par des films de polyeugénol et polyphénol, et dédié à l'oxydation de NO^{\bullet} à 0,8 V. Un autre groupe de 7 UMEs d'or a été utilisé sans modification et dédié à la réduction de ONOO^- à $-0,1$ V. Après la stabilisation de la ligne de base pendant environ 15 min, une aliquote de solution alcaline contenant à la fois du DEA-NONOate ($10 \mu\text{M}$) et ONOO^- ($50 \mu\text{M}$) a été rapidement injectée. À cause de la faible durée de vie de ONOO^- dans le PBS, l'injection de la solution a été réalisée à proximité des UMEs d'or nues, sans agiter immédiatement. Trente secondes plus tard, la solution électrolytique a été rapidement mélangée pour homogénéiser la concentration en donneur de NO^{\bullet} . Ceci permet la libération de NO^{\bullet} à proximité des UMEs dédiées à sa détection. La Figure 3.27 montre les chronoampérogrammes obtenus en suivant ce protocole.

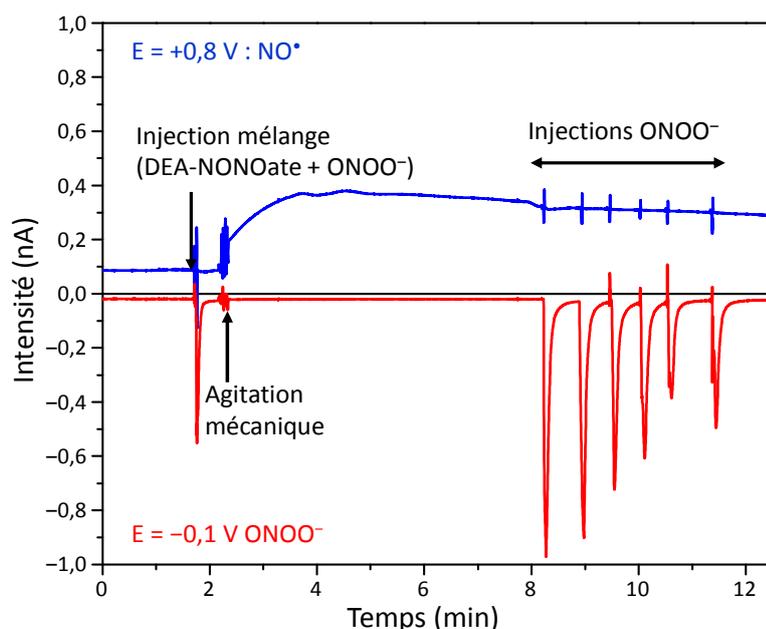


Figure 3.27 Détection simultanée de NO^{\bullet} et ONOO^- par deux mesures chronoampérométriques simultanées. La première injection contient une solution alcaline de DEA-NONOate ($10 \mu\text{M}$) + ONOO^- ($50 \mu\text{M}$), les autres injections effectuées 5 min plus tard contiennent une solution alcaline de ONOO^- ($50 \mu\text{M}$). Détection de NO^{\bullet} : à $+0,8$ V vs Ag/AgCl, à un réseau de 7 UMEs recouvertes de polyeugénol/polyphénol. Détection de ONOO^- : à $-0,1$ V vs Ag/AgCl à un réseau de 7 UMEs nues.

La présence de ONOO^- est immédiatement détectée lors de l'injection de la solution, sur le réseau d'UMEs d'or non modifiées opérant à $-0,1$ V. Trente secondes plus tard, et après avoir mélangé la solution électrolytique, la production de NO^{\bullet} est détectée au niveau des électrodes modifiées, auxquelles un potentiel de 0,8 V est appliqué. Des injections supplémentaires de solution alcaline de ONOO^- , à proximité des électrodes non modifiées,

permettent d'observer de nouveau les signaux cathodiques liés à la réduction de ONOOH. Ceci ne perturbe pas la détection de NO[•]. Ces résultats suggèrent que les deux réseaux de 7 UMEs peuvent être employés simultanément pour la détection de NO[•] et ONOO⁻, sans que ces deux mesures n'interfèrent entre elles.

3.4. Conclusion

Un dispositif capteur permettant la détection sélective et simultanée de NO[•] et ONOO⁻ a été développé. Ce dispositif tire avantage des réseaux d'UMEs pour augmenter sa sensibilité. La mise au point de méthodes de détection sélectives pour NO[•] a été effectuée à l'aide d'UMEs de platine modifiées et la détection de NO[•] est réalisée à 0,8 V vs Ag/AgCl. Afin de rendre cette détection de NO[•] sélective vis-à-vis de H₂O₂, la dopamine, NO₂⁻ et l'acide ascorbique, les électrodes sont recouvertes d'une couche mixte polyeugénol/polyphénol. Une étude réalisée avec des électrodes tournantes en or a permis d'étudier le comportement électrochimique de ONOO⁻ à pH neutre en solution aqueuse. Cette étude a montré qu'il est possible de détecter ONOO⁻ à travers la réduction de son acide conjugué ONOOH. Lorsque cette réduction est effectuée à -0,1 V vs Ag/AgCl, il n'y a pas d'interférences de la part des analytes précédemment cités. Le dispositif capteur mis au point devrait *a priori* être capable de détecter ONOO⁻ et NO[•] produits par des cultures cellulaires ou des tranches de tissus biologiques.

Chapitre 4. Application des dispositifs capteurs à l'étude de macrophages

4.1. Introduction

Au cours des chapitres précédents, nous avons décrit la mise au point d'un capteur électrochimique permettant la détection de deux analytes d'intérêt biologique, NO^\bullet et ONOO^- . Ces premières étapes de développement se sont déroulées dans des conditions expérimentales reproductibles. Par exemple, la composition initiale de chaque solution pour les étalonnages et les tests de faisabilité était maîtrisée et connue. Or, le capteur est destiné à détecter des analytes produits par des cellules vivantes, qui représentent des systèmes beaucoup plus complexes et sont, par essence, sujettes à une plus grande variabilité expérimentale. Il est donc nécessaire de vérifier que l'outil développé fonctionne bien en milieu biologique. Ceci représente la dernière étape de validation du dispositif capteur, avant son application à l'étude de mécanismes biologiques impliquant les espèces réactives de l'azote.

Afin d'étudier le comportement du capteur électrochimique dans ces milieux, il est nécessaire d'utiliser un modèle biologique dont la capacité à produire le ou les analytes cibles est connue. Ainsi, dans l'hypothèse où le signal électrochimique attendu ne serait pas observé dans le milieu de l'étude, l'absence d'analyte ne pouvant être en cause, ceci signifierait que le capteur n'est pas assez sensible ou souffre d'interférences. Nous avons d'abord appliqué cette méthodologie pour tester la capacité des réseaux d'UMEs modifiés à détecter NO^\bullet . Dans une première étape, une lignée cellulaire produisant cet analyte a été identifiée, grâce à une méthode d'analyse spectrophotométrique utilisée classiquement en biologie : le test de Griess. Ensuite, ces cellules ont été utilisées pour étudier le fonctionnement des réseaux d'UMEs dans cet environnement biologique, et leur capacité à détecter NO^\bullet biosynthétisé.

4.2. Production de NO^\bullet par les macrophages RAW 264.7

Parmi les outils disponibles en biologie cellulaire, les lignées de macrophages de souris paraissent adaptées aux expériences de détection électrochimique de NO^\bullet . En effet, lorsqu'elles sont activées, ces cellules du système immunitaire murin produisent

d'importantes quantités de cette molécule [22]. Les macrophages sont des cellules dont le rôle principal dans l'organisme est la phagocytose, qui consiste à attacher puis ingérer des particules micrométriques, pour pouvoir ensuite les digérer. Les macrophages sont ainsi chargés d'éliminer des débris cellulaires ainsi que différents pathogènes, notamment les bactéries. Lorsqu'ils se trouvent en présence de bactéries, les macrophages sont activés et synthétisent l'enzyme NOS inducible. Cette enzyme conduit à la production de grandes quantités de NO^\bullet , destinées à aider le processus de digestion des corps étrangers, notamment *via* la formation de ONOO^- [26].

Les cellules utilisées lors de ce travail proviennent d'une lignée cellulaire de macrophages de souris appelée RAW 264.7. Elles ont été cultivées par des collaborateurs au sein de l'équipe « Thérapies innovantes pour le cancer et les maladies rares » du laboratoire. La production de NO^\bullet a été évaluée en mesurant la quantité de NO_2^- présent dans les surnageants des cultures cellulaires par le test de Griess modifié. En effet, NO^\bullet une fois produit par les cellules est oxydé en NO_2^- en solution aqueuse, à la suite de sa réaction avec l'oxygène dissous. Ainsi, une lignée cellulaire produisant NO^\bullet conduira à une accumulation de NO_2^- dans la solution, à condition que d'autres voies de décomposition/métabolisme ne deviennent pas prépondérantes. Si NO^\bullet réagit avec des cibles biologiques autres que O_2 , il est possible que le produit final soit tout de même NO_2^- . C'est le cas lors de la formation de ONOO^- , dont la décomposition engendre de nombreuses molécules instables qui seront au final transformées en NO_2^- ou NO_3^- [40].

Le test de Griess modifié (voir paragraphe 1.3.c) a été employé pour mesurer la concentration de NO_2^- dans le milieu de culture cellulaire. Il permet d'estimer le moment à partir duquel les cellules produisent NO^\bullet en quantité notable. En effet, il est important d'évaluer la période à partir de laquelle les cellules sont capables de commencer la production de NO^\bullet , ainsi que la période durant laquelle cette production est significative. Ceci permet d'établir le protocole adéquat pour la mesure électrochimique proprement dite.

Comme indiqué dans le paragraphe 1.3.c, le principe de ce test est basé sur la réactivité de NO_2^- : NO_2^- réagit dans un premier temps avec une amine aromatique, conduisant à la formation d'un diazonium qui est engagé dans une substitution aromatique électrophile pour produire une molécule colorée, absorbant fortement la lumière à 540 nm. Ainsi, la concentration en NO_2^- d'une solution peut être déterminée à partir d'une mesure de l'absorbance à cette longueur d'onde. La relation entre l'absorbance et la concentration en

NO_2^- est déterminée grâce à une droite d'étalonnage réalisée à partir de solutions de concentration connue en NaNO_2 .

La Figure 4.1 montre les courbes d'étalonnage du test de Griess modifié, dans le PBS et dans le milieu DMEM (avec indicateur coloré) utilisé pour la culture des cellules RAW 264.7. Dans les deux cas, une relation linéaire peut être observée entre la concentration en NO_2^- de l'échantillon et la densité optique mesurée, dans la gamme de concentration étudiée (1 à 50 μM). L'indicateur coloré utilisé pour la culture cellulaire (de couleur rouge) affecte peu la mesure d'absorbance à 540 nm (longueur d'onde qui correspond à une couleur rose/violette) ; la sensibilité est légèrement diminuée par rapport au même test effectué dans un milieu transparent, le PBS.

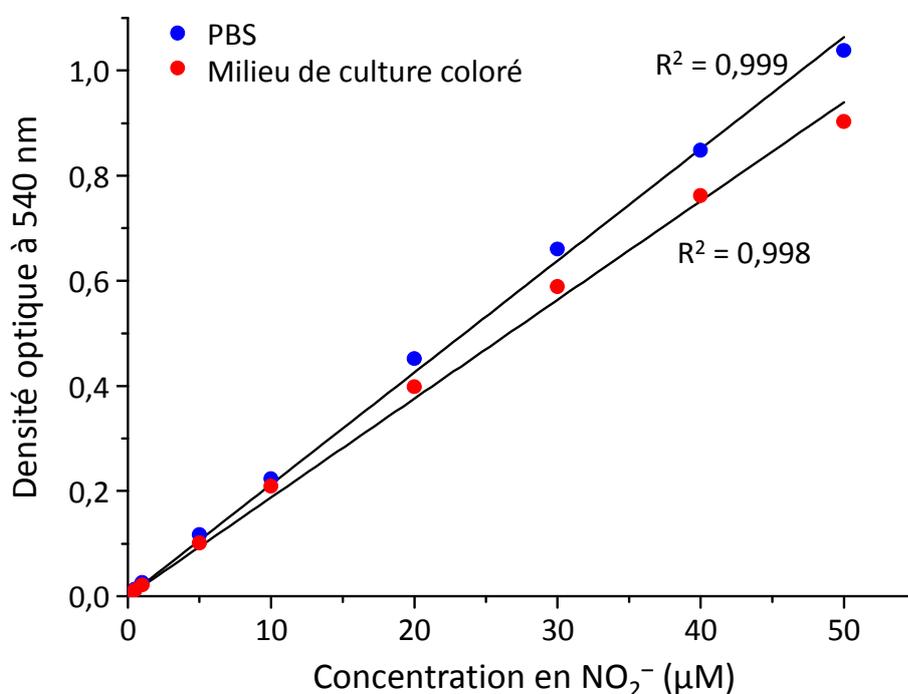


Figure 4.1 Courbes d'étalonnage du test de Griess modifié reliant la densité optique à 540 nm à la concentration en NO_2^- , dans le PBS (pH = 7,4) et le milieu de culture coloré (pH = 7,4). Les mesures d'absorbance sont effectuées 15 min après le mélange de l'échantillon avec le réactif de Griess du kit commercial.

La production de NO^* par les macrophages RAW 264.7 utilisés au cours de ce travail n'est pas continue : la biosynthèse de cette molécule est déclenchée par l'expression de l'enzyme NOS inductible, suite à la présence de pathogènes. L'activation des cellules RAW 264.7 qui conduit à l'expression de la NOS inductible peut être induite par un composant de la membrane externe de toutes les bactéries à Gram négatif, le lipopolysaccharide (LPS) [125].

La présence de ce composé entraîne la transcription du gène codant pour la NOS inductible, ce qui permet la production de NO^* par les cellules RAW 264.7.

La Figure 4.2 montre l'évolution de la concentration en NO_2^- dans le milieu de culture des cellules RAW 264.7 en fonction du temps de traitement avec le LPS (ou sans aucun traitement). La mesure de la concentration de NO_2^- permet d'observer de manière indirecte la production de NO^* , à la suite de l'activation des cellules par le LPS. La concentration basale en NO_2^- est estimée grâce aux mesures effectuées sur les milieux contenant des cellules non activées. Ceci permet de vérifier que les éventuels changements de concentration de NO_2^- sont bien liés à l'activation biochimique des cellules.

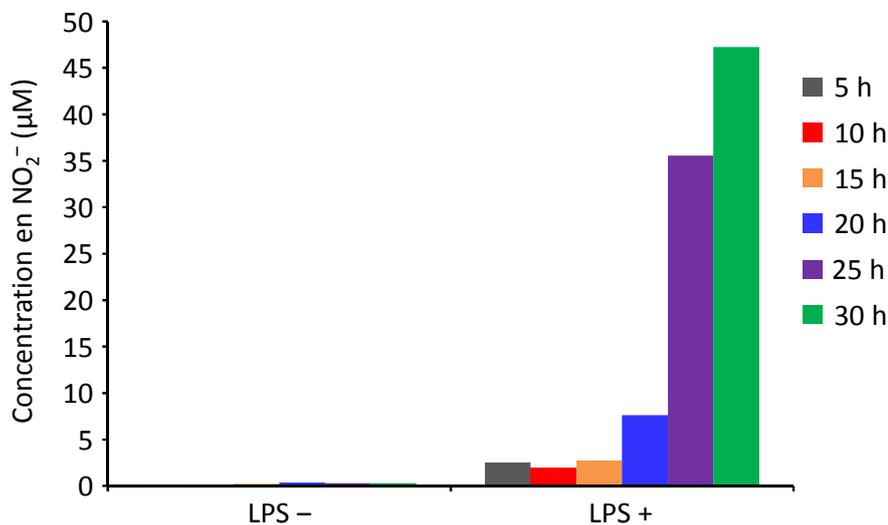


Figure 4.2 Évolution de la concentration en NO_2^- dans le milieu de culture des cellules RAW 264.7, mesurée grâce au test de Griess modifié. LPS + : ajout de LPS à $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ à $t = 0$. LPS - : aucun ajout de LPS. Nombre initial de cellules : environ un million dans un volume de surnageant de 2 mL.

La Figure 4.2 montre que le traitement des cellules avec le LPS engendre l'accumulation de NO_2^- dans le milieu de culture. Pendant les 15 premières heures après le traitement, la quantité de NO_2^- reste constante et peu élevée. Entre 15 h et 30 h après traitement, la quantité de NO_2^- dans le milieu augmente, indiquant une production soutenue de NO^* . La conversion de NO^* en NO_2^- est rapide en comparaison avec l'échelle de temps de cette expérience ; le délai entre l'ajout de LPS et l'augmentation continue de la concentration en NO_2^- est donc représentatif du temps nécessaire à l'activation des cellules. Dans les conditions expérimentales de cette expérience, il s'écoule au minimum 15 h entre le contact avec le LPS et l'apparition de NOS inductible produisant NO^* dans les macrophages RAW

264.7. Ensuite, entre 15 h et 30 h après le début de l'incubation avec le LPS, la production de NO^\bullet peut être estimée à environ 90 fmol par cellule.

L'activité de la NOS inductible peut être inhibée par l'ajout de L-N^G-nitroarginine méthyl ester (L-NAME) dans le milieu. Ce composé est hydrolysé par les estérases cellulaires pour devenir l'inhibiteur pleinement fonctionnel L-N^G-nitroarginine (L-NNA), qui se fixe dans le site actif des NOS sans être converti en NO^\bullet [7]. Le caractère inhibiteur du L-NNA est expliqué par la forte similarité structurelle avec le substrat naturel des NOS, la L-arginine (Figure 4.3). Le L-NNA a une constante d'inhibition (K_i) de 4,4 μM pour la NOS inductible chez la souris (concentration pour laquelle la moitié des sites enzymatiques sont occupés) [126].

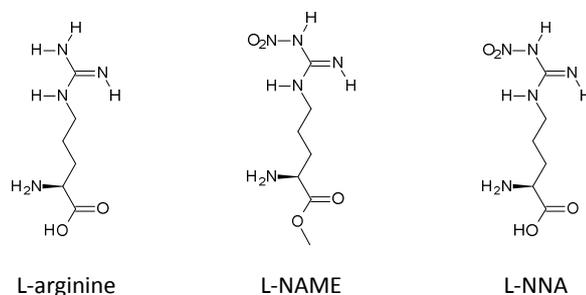


Figure 4.3 Structures chimiques de la L-arginine, le L-NAME et le L-NNA.

La Figure 4.4 montre les effets d'ajouts de L-NAME sur la quantité de NO_2^- produit par les macrophages RAW 264.7. Comme auparavant, il est nécessaire de stimuler les macrophages par le LPS au début de l'expérience pour observer la présence de NO_2^- . L'ajout de L-NAME est effectué 15 h après la stimulation des cellules, c'est-à-dire au moment où les cellules ont exprimé la NOS inductible et où la production de NO^\bullet est soutenue. Dans les cultures cellulaires traitées avec l'inhibiteur, la quantité de NO_2^- mesurée à 20 h et 25 h est la même que celle mesurée au moment de l'ajout du L-NAME, à 15 h. Ceci confirme la capacité de cette molécule à empêcher la biosynthèse de NO^\bullet par les cellules RAW 264.7 à partir du moment où l'injection de L-NAME a été réalisée. Ces résultats confirment bien la spécificité de la production de NO^\bullet par ces cellules.

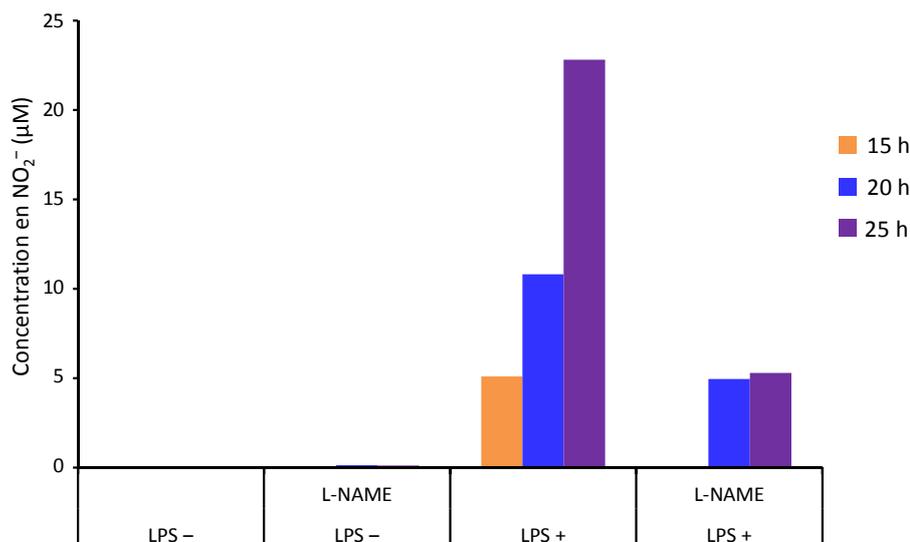


Figure 4.4 Influence de l'ajout de L-NAME (20 mM) sur la concentration en NO_2^- dans le milieu de culture des cellules RAW 264.7, dans différentes conditions. LPS + : ajout de LPS à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $t = 0$. LPS - : Aucun ajout de LPS. L-NAME : ajout de L-NAME 20 mM à $t = 15$ h. Nombre initial de cellules : environ un million. Volume de surnageant : 2 mL.

Grâce à ces expériences préliminaires, les conditions nécessaires à la production de NO^\bullet par les cellules RAW 264.7 ont été identifiées. Ces cultures cellulaires deviennent alors un outil pour tester les capteurs électrochimiques développés au cours des chapitres précédents.

4.3. Détection électrochimique de NO^\bullet produit par des cultures cellulaires

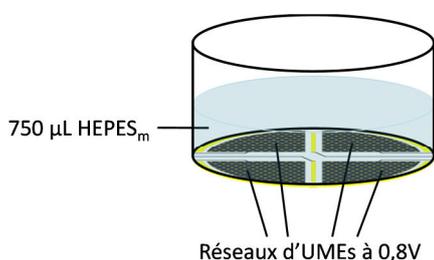
4.3.a. Description des conditions expérimentales

Les cellules de cette étude sont cultivées à 37°C , sous une atmosphère contenant 5 % de CO_2 , dans le milieu DMEM supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal, 1 % d'antibiotique (pénicilline-streptomycine) et 1 % de glutamine. Or, l'indicateur de pH coloré utilisé dans ce milieu de culture a une influence sur la détection électrochimique de NO^\bullet (voir paragraphe 3.3.b). Les mesures électrochimiques ont été réalisées dans un milieu différent, ne contenant pas d'indicateur coloré, mais dont la composition est favorable à la survie des cellules. Ce milieu est composé de NaCl 108 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 1,5 mM, MgCl_2 0,5 mM, KH_2PO_4 0,5 mM, NaH_2PO_4 0,5 mM, HEPES 25 mM et glucose 10 mM. Il sera appelé HEPES_m dans la suite de ce manuscrit (le « m » en indice signifiant modifié). Lors des mesures avec les électrodes, la quantité de CO_2 dans l'atmosphère n'a pas été contrôlée. Afin de minimiser l'impact de ces changements sur le comportement des cellules, elles ont été

cultivées dans leur milieu habituel puis transférées dans le nouveau milieu quelques minutes avant la mesure. Pendant les expériences, le dispositif électrochimique a été plongé dans un bain de sable thermostaté permettant de maintenir la température de la solution entre 35 °C et 37 °C. Contrairement aux bains d'eau thermostatés, le bain de sable n'est pas agité et produit moins de perturbations électriques et mécaniques pouvant augmenter le bruit expérimental.

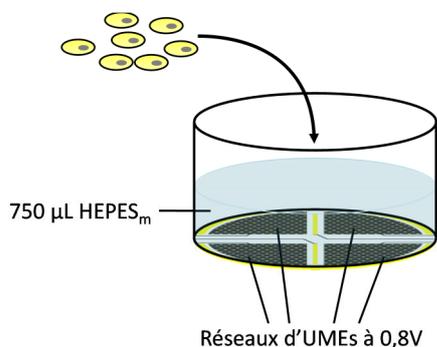
NO^{\bullet} est détecté par chronoampérométrie à 0,8 V vs Ag/AgCl, à l'aide de réseaux d'UMEs d'un diamètre de 20 μm modifiées par des couches de polyeugénol et polyphénol. Le protocole expérimental peut être détaillé de la manière suivante :

Étape 1



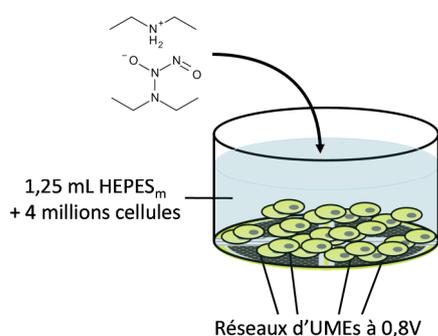
Application d'un potentiel de 0,8 V vs Ag/AgCl à des réseaux de 617 UMEs d'or de 20 μM de diamètre, modifiées par des couches de polyeugénol et polyphénol. Stabilisation de la ligne de base pendant environ 15 min.

Étape 2



Ajout de 500 μL HEPES_m contenant 4 millions de cellules RAW 264.7 et mesure de l'évolution du courant.

Étape 3



Ajout de DEA-NONOate (donneur de NO^{\bullet}) pour étalonner le dispositif capteur.

4.3.b. Mesures électrochimiques

i) Modification de la ligne de base en absence de cellules

La Figure 4.5 montre un chronoampérogramme enregistré à un réseau d'UMEs modifiées, lors d'ajouts de HEPES_m ne contenant pas de macrophages.

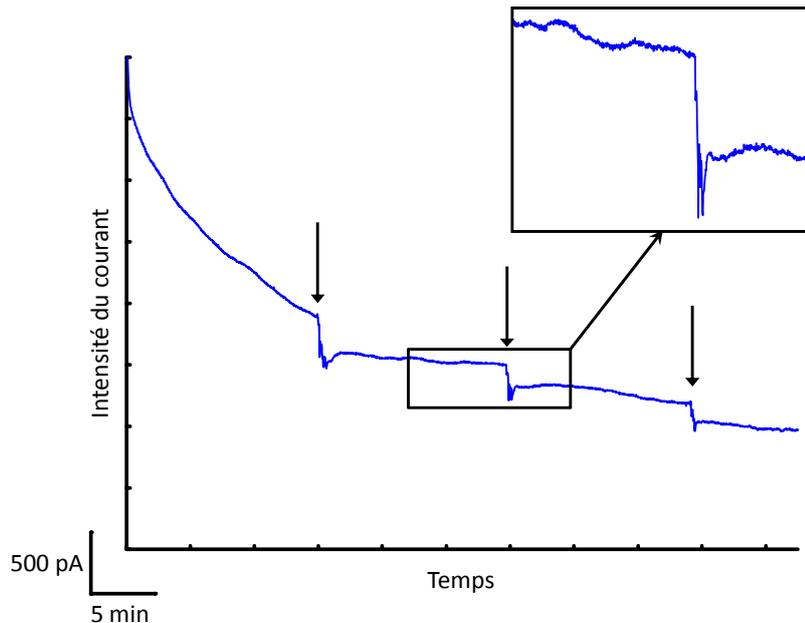


Figure 4.5 Chronoampérogramme dans HEPES_m d'un réseau de 617 UMEs d'or (diamètre 20 µm) recouvertes de couches de polyéugénol et polyphénol, à 0,8 V vs Ag/AgCl. Volume initial de HEPES_m 750 µL. Les flèches indiquent des ajouts de 500 µL de HEPES_m. L'encart représente un zoom sur un ajout particulier.

Les ajouts entraînent une diminution immédiate du courant enregistré (ligne de base). Cette diminution ne peut être imputée à un effet de dilution, car la solution ajoutée est la même que la solution initialement présente dans la cellule électrochimique. De plus, cette solution est stockée dans une étuve à 37 °C ; il y a peu de différence de température entre la solution ajoutée et la solution déjà présente dans la cellule électrochimique (maintenue entre 35 °C et 37 °C). L'origine de la diminution de la ligne de base demeure pour l'instant sans interprétation et des expériences supplémentaires sont nécessaires à la compréhension de ce phénomène. Il est important de noter que cette diminution est reproduite à chaque ajout de solution dans le puits de mesure, et que la ligne de base reste par la suite constante.

ii) Détection de NO[•] libéré par des cellules

La Figure 4.6 montre le chronoampérogramme enregistré lors d'ajouts de cellules RAW 264.7, préalablement traitées ou non avec le LPS (le traitement des cellules a été

effectué entre 20 h et 25 h avant les expériences électrochimiques, temps nécessaire à leur activation). L'injection des cellules dans la solution électrolytique provoque une variation du courant d'oxydation mesuré, différente selon la nature de l'ajout. En effet, lorsque les cellules traitées avec le LPS sont ajoutées, le courant mesuré au cours du temps augmente immédiatement après la décroissance de la ligne de base précédemment décrite. L'ajout de cellules non traitées avec le LPS n'induit aucune augmentation de la ligne de base (après la diminution de celle-ci suite à l'ajout du tampon).

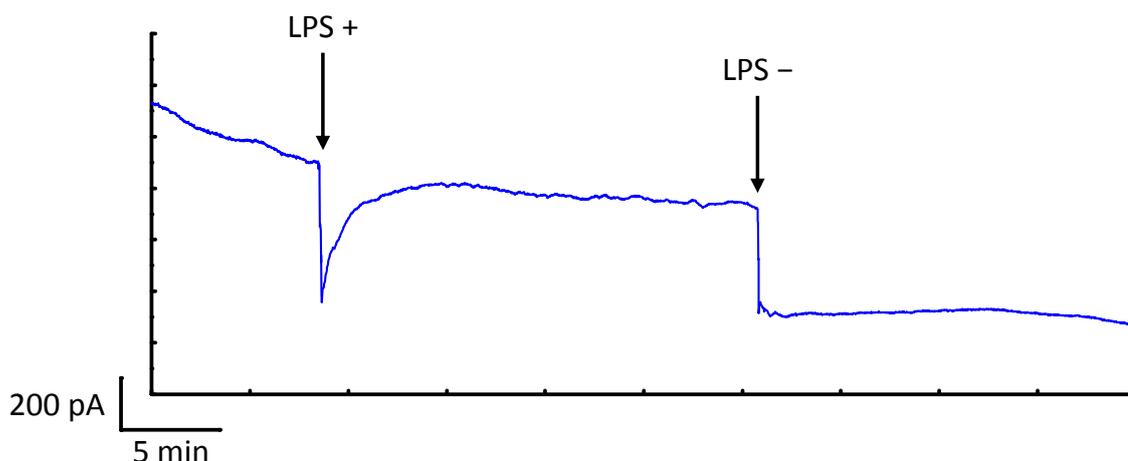


Figure 4.6 Chronoampérogramme enregistré à un réseau de 617 UMEs (diamètre 20 μm), modifiées par des couches de polyéugénol et polyphénol, à 0,8 V vs Ag/AgCl. Volume de HEPES_m initial = 750 μL . LPS + indique un ajout de 500 μL de HEPES_m contenant environ 4 millions de cellules RAW 264.7 traitées avec du LPS à 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ entre 20 et 25 h auparavant. LPS - indique un ajout de 500 μL de HEPES_m contenant environ 4 millions de cellules RAW 264.7 non activées.

Ce résultat est confirmé par la mesure du courant avec le dispositif capteur, après ajout de cellules traitées avec le LPS et incubées avec le L-NAME (Figure 4.7). Dans ce cas, les cellules expriment l'enzyme NOS inductible mais son activité est bloquée par l'inhibiteur L-NAME. L'ajout de ces cellules n'induit pas d'augmentation de la ligne de base, confirmant que la production de NO^{\bullet} par les enzymes NOS est à l'origine du signal électrochimique observé.

La différence d'évolution du courant observé après ajout de cellules, traitées et non traitées avec le LPS et/ou le L-NAME, traduit donc la capacité du dispositif capteur à suivre en temps réel la production de NO^{\bullet} par des macrophages RAW 264.7.

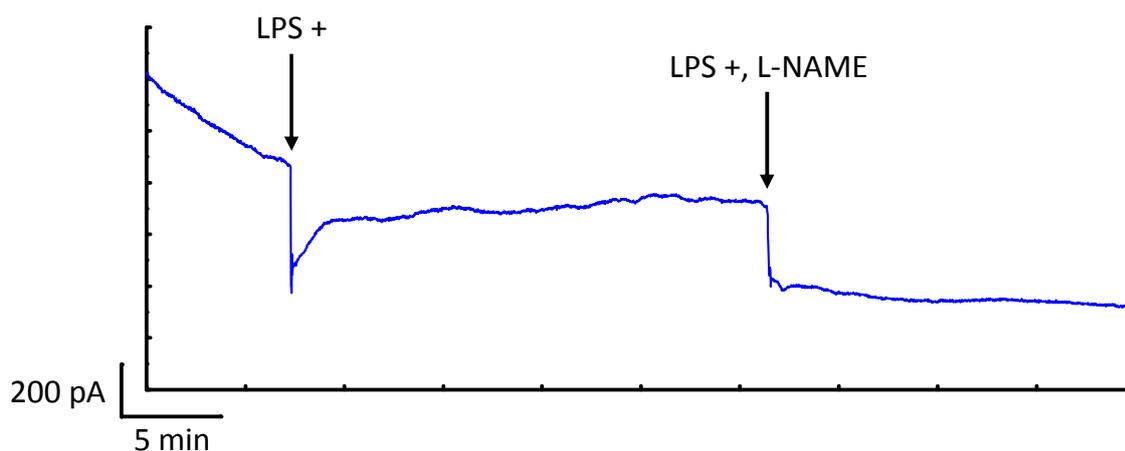


Figure 4.7 Chronoampéromètre enregistré à un réseau de 617 UMEs (diamètre 20 μm), modifiées par des couches de polyeugénol et polyphénol, à 0,8 V vs Ag/AgCl. Volume de HEPES_m initial = 750 μL . LPS + indique un ajout de 500 μL de HEPES_m contenant environ 4 millions de cellules RAW 264.7 traitées avec du LPS à 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ entre 20 et 25 h auparavant. L-NAME indique que les cellules ont été incubées avec du L-NAME 20 mM en même temps que le LPS.

La Figure 4.8 montre les chronoampéromètres corrigés par soustraction de la décroissance de la ligne de base, induite par l'ajout du tampon HEPES_m. Elle indique clairement que le courant augmente seulement lorsque les cellules sont capables de produire NO \cdot . L'intensité de la variation du courant d'oxydation, engendré par les cellules stimulées, dépend de l'ordre des ajouts. En effet, lors du premier ajout, les macrophages sédimentent et se déposent directement sur la surface des électrodes. En conséquence, lors du troisième ajout de macrophages, NO \cdot produit par ces nouvelles cellules doit diffuser à travers plusieurs couches cellulaires déjà présentes au-dessus des électrodes, afin d'atteindre la surface de celles-ci ; l'augmentation d'intensité est alors plus faible.

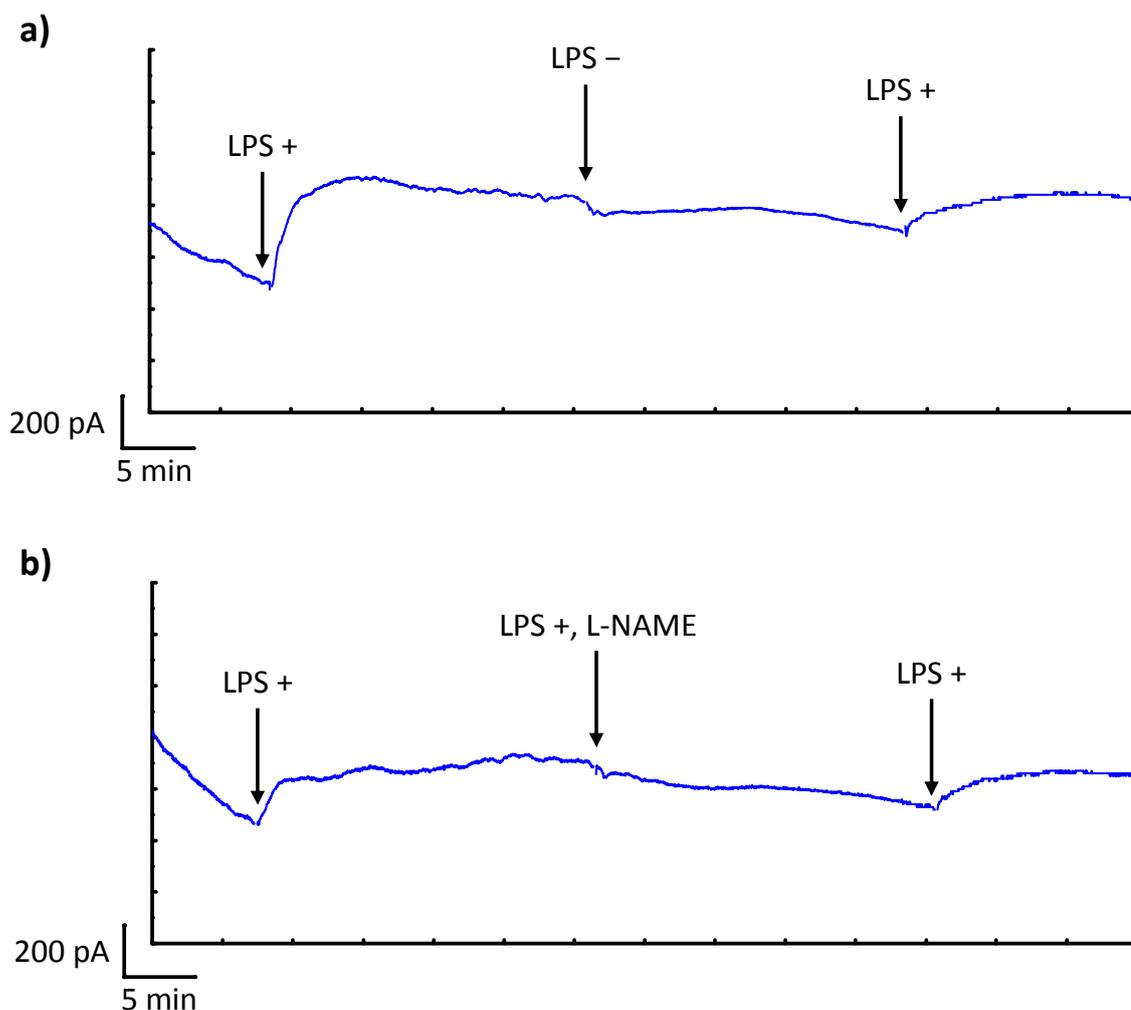


Figure 4.8 Chronoampérogrammes après correction de la ligne de base (en appliquant un décalage de l'intensité mesurée pour qu'elle ait la même valeur avant et 10 s après un ajout), enregistré à un réseau de 617 UMEs (diamètre 20 μm), modifiées par des couches de polyéugénol et polyphénol, à 0,8 V vs Ag/AgCl. Volume de HEPES_m initial = 750 μL . LPS + indique un ajout de 500 μL de HEPES_m contenant environ 4 millions de cellules RAW 264.7 traitées avec du LPS à 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ entre 20 et 25 h auparavant. LPS - indique un ajout de 500 μL de HEPES_m contenant environ 4 millions de cellules RAW 264.7 non activées. L-NAME indique que les cellules ont été incubées avec du L-NAME 20 mM en même temps que le LPS.

L'ajout de donneur de NO[•] (NONOate) dans le milieu de la mesure électrochimique, à la fin de chaque expérience, permet l'étalonnage du capteur et l'estimation de la quantité de NO[•] produite par les macrophages RAW 264.7. La Figure 4.9 montre un tel ajout à la fin d'une expérience de chronoampérométrie. Lors d'un premier ajout de cellules stimulées par le LPS, l'intensité mesurée correspond à une augmentation de la concentration locale en NO[•] de (110 ± 30) nM (moyenne effectuée sur 4 mesures), pour un ajout de 4 millions de cellules. Lors d'un troisième ajout de cellules stimulées, l'augmentation de la concentration en NO[•] mesurée par les électrodes est de (40 ± 10) nM. Cette valeur est plus faible que lors du premier ajout, car 8 millions de cellules sont déjà présentes dans la cellule électrochimique.

NO[•] doit alors diffuser à travers plusieurs couches cellulaires, pour atteindre la surface des électrodes.

Ainsi, l'électrochimie fournit des informations sur la concentration locale de l'analyte, en temps réel. Ces informations sont précieuses pour l'étude de systèmes biologiques, et sont complémentaires des informations obtenues avec le test de Griess qui indique la quantité globale de NO[•] produit par un système, pendant une période donnée.

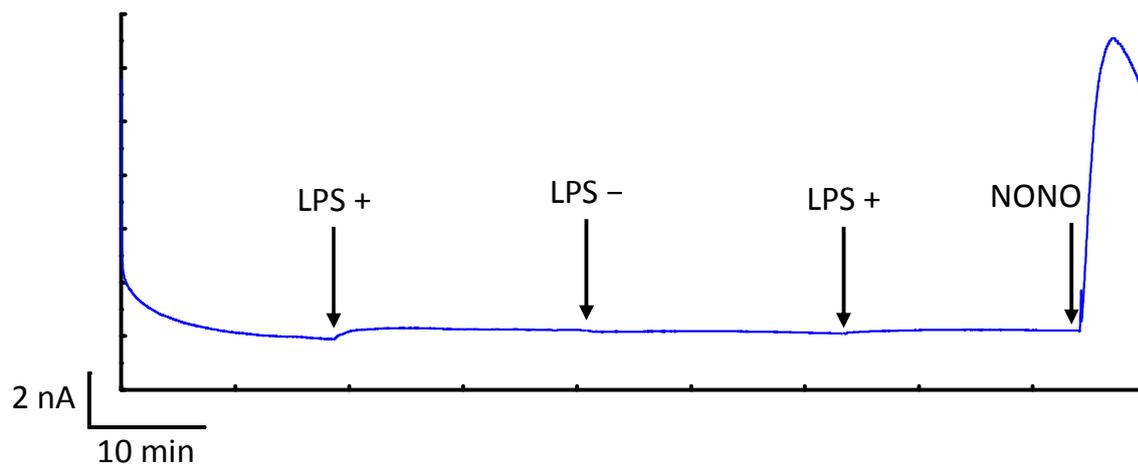


Figure 4.9 Chronoampérogramme après correction de la ligne de base, enregistré à un réseau de 617 UMEs (diamètre 20 μm), modifiées par des couches de polyéugénol et polyphénol, à 0,8 V vs Ag/AgCl. Volume de HEPES_m initial = 750 μL . LPS + indique un ajout de 500 μL de HEPES_m contenant environ 4 millions de cellules RAW 264.7 traitées avec du LPS à 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ entre 20 et 25 h auparavant. LPS - indique un ajout de 500 μL de HEPES_m contenant environ 4 millions de cellules RAW 264.7 non activées. NONO indique un ajout de DEA-NONOate 10 μM suivi d'une agitation mécanique.

La limite de détection théorique de ce capteur, calculée pour un rapport signal/bruit de 3, est de (5 ± 2) nM, en présence de macrophages. Elle est meilleure que celle calculée au cours du chapitre 3 (27 nM), reflétant les différences de conditions expérimentales, dont l'utilisation d'un réseau avec un nombre d'UMEs plus important. Ainsi, la sensibilité de cet outil peut être améliorée grâce à l'augmentation du nombre d'UMEs, ce qui peut être utile pour des applications à des systèmes produisant de faibles quantités de NO[•].

La Figure 4.10 montre la sélectivité des électrodes vis-à-vis de NO[•], mesurée dans le PBS à température ambiante avant et après les mesures sur les macrophages. Cette sélectivité reste inchangée, indiquant que les couches de polyéugénol et polyphénol remplissent toujours leur rôle après les expériences avec les cellules.

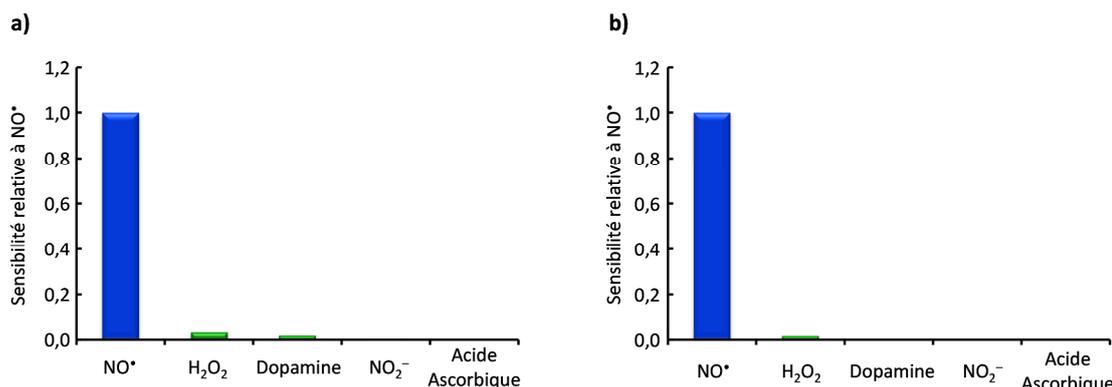


Figure 4.10 Sensibilité des électrodes modifiées ayant servi lors des expériences avec les macrophages, vis-à-vis de NO•, H₂O₂, la dopamine, NO₂⁻ et l'acide ascorbique. La sensibilité est mesurée à température ambiante dans le PBS et normalisée par rapport à la sensibilité à NO•. a) Sensibilité avant les expériences avec les cellules. b) Sensibilité après les expériences avec les cellules. Les électrodes sont rincées entre chaque expérience.

4.4. Détection électrochimique de ONOO⁻ produit par des cultures cellulaires

Des expériences préliminaires ont été menées pour tenter de détecter la production de ONOO⁻ par des cellules RAW 264.7. Ces expériences ont été réalisées avec des réseaux d'UMEs non modifiées, polarisées à 0 V vs Ag/AgCl. Ce potentiel a été utilisé, plutôt que -0,1 V vs Ag/AgCl, car il permettait de réduire considérablement les perturbations de la ligne de base. À 0 V vs Ag/AgCl, il est toujours possible de détecter la présence de ONOO⁻ de manière sélective, bien que la sensibilité de l'électrode soit légèrement diminuée (cf. section 3.2).

Les macrophages doivent produire simultanément NO• et O₂⁻ pour permettre la formation de ONOO⁻. Afin de stimuler la production de NO•, les cellules RAW 264.7 ont été traitées avec le LPS pendant 20 à 25 h avant les expériences de détection électrochimique. Le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) a été employé pour activer l'enzyme NADPH oxydase [89], qui génère O₂⁻. Ainsi, des cellules traitées avec le LPS et le PMA devraient produire simultanément NO• et O₂⁻, et donc ONOO⁻.

La Figure 4.11 montre un chronoampérogramme enregistré à un réseau de 617 UMEs d'or non modifiées, dans une solution de HEPES_m à 37 °C contenant environ 2 millions de macrophages RAW 264.7, préalablement stimulés avec le LPS. Dans ces conditions, les expériences du paragraphe 4.3.b ont montré que les macrophages produisent NO•. L'addition

de PMA n'engendre pas de modification notable de la ligne de base, pendant les 20 min suivant l'ajout. Le dispositif capteur ne détecte donc pas la présence de ONOO^- .

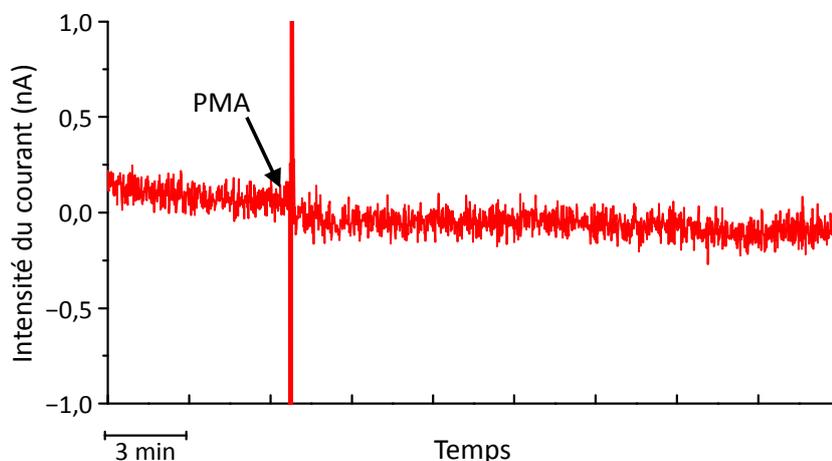


Figure 4.11 Chronoampérogramme enregistré à 0 V vs Ag/AgCl à un réseau d'UMEs d'or de 20 μm de diamètre. La solution de HEPESm à 37 °C contient 2 millions de macrophages RAW 264.7 traités avec du LPS à 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ entre 20 et 25 h auparavant. La flèche indique un ajout de PMA 5 μM .

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'absence de signal de réduction électrochimique, lors de l'ajout de PMA. D'une part, il est possible que le réseau d'UMEs polarisé à 0 V vs Ag/AgCl ne soit pas assez sensible pour détecter ONOO^- produit par les cellules. D'autre part, l'ajout de PMA ne permet peut-être pas de provoquer la production de ONOO^- dans les conditions expérimentales testées. Il paraît alors nécessaire d'évaluer dans quelles conditions les cellules RAW 264.7 peuvent produire ONOO^- , avant de pouvoir réaliser sa détection avec les dispositifs capteurs.

4.5. Conclusion

Les expériences effectuées avec les macrophages RAW 264.7 apportent la preuve de concept de la détection de NO^\bullet dans des cultures cellulaires, avec des réseaux d'UMEs modifiés. À 0,8 V vs Ag/AgCl, NO^\bullet est détecté de manière sélective vis-à-vis de H_2O_2 , la dopamine, NO_2^- et l'acide ascorbique. La présence de cellules n'affecte pas les caractéristiques analytiques de ce capteur, qui peut potentiellement être appliqué à de nombreux modèles. Afin d'apporter la même preuve de concept pour la détection de ONOO^- , des expériences supplémentaires sont nécessaires pour déterminer dans quelles conditions les macrophages RAW 264.7 produisent cet analyte.

Conclusion Générale

Les travaux effectués au cours de cette thèse s'intègrent à un projet ANR dédié à la fabrication de dispositifs capteurs électrochimiques pour la détection de NO^\bullet et ONOO^- , dans le but d'étudier leur implication dans divers modèles de pathologies. Dans ce cadre, l'objectif fixé pour cette thèse était de développer des réseaux d'UMEs permettant la détection sélective, sensible, simultanée et en temps réel de NO^\bullet et ONOO^- , dans des cultures cellulaires ou des coupes de tissus biologiques.

Pour atteindre cet objectif, des dispositifs capteurs intégrant plusieurs réseaux d'UMEs d'or ont été conçus en partenariat avec l'équipe SATIE-BIOMIS (UMR 8029, L. Griscom, F.Razan) de l'ENS Cachan-Bretagne. Ces dispositifs ont été fabriqués en salle blanche, à l'aide de techniques photolithographiques. La géométrie et le comportement électrochimique des réseaux d'UMEs ont été caractérisés par profilométrie, AFM, SECM et voltampérométrie cyclique. À l'aide de cette dernière technique, nous avons montré que chaque UME d'un réseau se comporte électrochimiquement de manière « indépendante » de ses voisines. Ainsi, les réseaux d'UMEs permettent d'améliorer la sensibilité d'une mesure voltampérométrique tout en conservant les caractéristiques électrochimiques d'une UME individuelle. Les dispositifs capteurs intègrent, en plus des réseaux d'UMEs de travail, deux électrodes de référence et deux contre-électrodes, ce qui permet de les utiliser de manière autonome. De plus, la taille de ces dispositifs est adaptée à un puits de culture cellulaire, en vue d'un transfert de la technologie à des plaques de culture cellulaire 24 puits.

La seconde partie du travail a porté sur la mise au point des conditions de la détection ampérométrique de NO^\bullet . Celle-ci a été réalisée à 0,8 V vs Ag/AgCl, à l'aide de réseaux d'UMEs dont la surface est modifiée par électropolymérisation d'une bicouche de polyéugénol/polyphénol. Ces couches confèrent la sélectivité souhaitée au capteur, en agissant comme barrière pour repousser les analytes interférents de taille et de charge variés, comme l'acide ascorbique, la dopamine, H_2O_2 et NO_2^- . La stratégie employée est théoriquement adaptable à de nombreux types d'électrodes, de tailles et de géométries diverses, car elle basée sur des modifications de surface induites électrochimiquement. L'utilisation des couches de polyéugénol et polyphénol présente cependant un inconvénient : la sensibilité des électrodes modifiées évolue en présence de fortes quantités de NO^\bullet . Le capteur reste alors sélectif, mais doit être étalonné régulièrement.

Afin de pouvoir réaliser la détection électrochimique de ONOO^- en milieu neutre, nous avons développé une méthode basée sur la réduction de son acide conjugué, ONOOH . Cette réduction est réalisée en polarisant des électrodes d'or non modifiées à $-0,1 \text{ V vs Ag/AgCl}$. À ce potentiel, la détection est sélective vis-à-vis de l'acide ascorbique, la dopamine, H_2O_2 et NO_2^- . Les réseaux d'UMEs d'or ont alors été utilisés pour détecter ONOO^- en milieu neutre, à partir d'une solution synthétique.

Par la suite, nous avons mis en évidence la possibilité de détecter simultanément NO^\bullet et ONOO^- avec les dispositifs capteurs, à l'aide d'un donneur de NO^\bullet et d'une solution synthétique de ONOO^- . L'objectif de la détection simultanée, sélective et en temps réel de NO^\bullet et ONOO^- a donc été atteint. Les dispositifs capteurs ont ainsi été évalués positivement pour être employés, par la suite, lors de l'étude de pathologies à l'aide de lignées cellulaires modèles.

Dans un dernier temps, ces dispositifs capteurs ont permis de mesurer la production de NO^\bullet par des macrophages RAW 264.7, confirmant que les réseaux d'UMEs peuvent être utilisés pour des mesures biologiques. Des travaux visant à valider la détection de ONOO^- produit par des cellules vivantes sont en cours, ils nécessitent de s'assurer des conditions dans lesquelles les cellules produisent ONOO^- .

Les perspectives immédiates de ce travail doivent ainsi porter sur la mise au point de la détection de ONOO^- par des cellules modèles. Ces mesures seront par la suite étendues, afin de réaliser un couplage avec la détection optique par fluorescence, ce qui permettra de bénéficier des informations fournies par les deux techniques. Des dispositifs ont été fabriqués dans ce but, dans lesquels l'or est remplacé par un matériau conducteur transparent, l'oxyde d'indium et d'étain (ITO). Enfin, les dispositifs capteurs pourraient être utilisés comme outil d'étude et/ou de diagnostic dans divers modèles de pathologies impliquant NO^\bullet et ONOO^- .

Liste des publications issues de ce travail

1. F. Bedioui, S. Griveau, D. Quinton, Comment on “Electrochemical Detection of Peroxynitrite Using a Biosensor Based on a Conducting Polymer–Manganese Ion Complex”, *Anal. Chem.* 83 (2011) 5463-5464.
2. D. Quinton, A. Girard, L. T. Kim, V. Raimbault, L. Griscom, F. Razan, S. Griveau, F. Bedioui, On-chip multi-electrochemical sensor array platform for simultaneous screening of nitric oxide and peroxynitrite, *Lab Chip* 11 (2011) 1342-1350.
3. D. Quinton, E. Antunes, S. Griveau, T. Nyokong, F. Bedioui, Cyclic voltammetry and spectroelectrochemistry of a novel manganese phthalocyanine substituted with hexynyl groups, *Inorg. Chem. Comm.* 14 (2011) 330-332.
4. D. Quinton, S. Griveau, F. Bedioui, Electrochemical approach to detect the presence of peroxynitrite in aerobic neutral solution, *Electrochem. Comm.* 12 (2010) 1446-1449.
5. F. Bedioui, D. Quinton, S. Griveau, T. Nyokong, Designing molecular materials and strategies for the electrochemical detection of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite in biological systems, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2010) 9976-9988.
6. D. Quinton, A. G. Porras Granados, S. Gutierrez Granados, S. Griveau, F. Bedioui, Hybrid Materials from Electropolymerized Thin Polymer Layer-Based Electrodes for the Elaboration of a New Generation of Electrochemical Sensors of NO in Solution, *ECS Transactions* 25 (2010) 39-46.

Bibliographie

- [1] S. Katsuki, W. Arnold, C. Mittal, F. Murad, *Journal Of Cyclic Nucleotide Research* **3**, 23-35 (1977).
- [2] W. Arnold, C. Mittal, S. Katsuki, F. Murad, *Proceedings Of the National Academy Of Sciences* **74**, 3203-3207 (1977).
- [3] R. Furchgott, J. Zawadzki, *Nature* **288**, 373–376 (1980).
- [4] L. Ignarro, G. Buga, K. Wood, R. Byrns, G. Chaudhuri, *Proceedings Of the National Academy Of Sciences* **84**, 9265-9269 (1987).
- [5] R. Bruckdorfer, *Molecular aspects Of Medicine* **26**, 3-31 (2005).
- [6] H. Li, T. Poulos, *Journal Of Inorganic Biochemistry* **99**, 293-305 (2005).
- [7] W. Alderton, C. Cooper, R. Knowles, *Biochemistry Journal* **357**, 593-615 (2001).
- [8] P. Vallance, J. Leiper, *Nature Reviews. Drug Discovery* **1**, 939-950 (2002).
- [9] R. Knowles, S. Moncada, *The Biochemical Journal* **298**, 249-258 (1994).
- [10] P. Ghafourifar, E. Cadenas, *Trends In Pharmacological Sciences* **26**, 190-195 (2005).
- [11] K. Chen, R. Pittman, A. Popel, *Antioxidants & Redox Signaling* **10**, 1185-1198 (2008).
- [12] J. Lundberg, M. Gladwin, A. Ahluwalia, N. Benjamin, N. S Bryan, A. Butler, P. Cabrales, A. Fago, M. Feelisch, P. Ford, B. Freeman, M. Frenneaux, J. Friedman, M. Kelm, C. Kevil, D. Kim-Shapiro, A. Kozlov, J. Lancaster, D. Lefer, K. McColl, K. McCurry, R. Patel, J. Petersson, T. Rassaf, V. Reutov, G. Richter-Addo, A. Schechter, S. Shiva, K. Tsuchiya, E. Van Faassen, A. Webb, B. Zuckerbraun, J. Zweier, E. Weitzberg, *Nature Chemical Biology* **5**, 865-869 (2009).
- [13] Heller, *Physical Chemistry Chemical Physics* **12**, 9972-9975 (2010).
- [14] Szabó, H. Ischiropoulos, R. Radi, *Nature Reviews. Drug Discovery* **6**, 662-680 (2007).
- [15] Thomas, W. Flores-Santana, C. Switzer, D. Wink, L. Ridnour, *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*, Second Edition, (Elsevier Inc., 2009), pp. 3-25.
- [16] R. Feil, S. Lohmann, H. De Jonge, U. Walter, F. Hofmann, *Circulation Research* **93**, 907-916 (2003).

- [17] D. Thomas, L. Ridnour, J. Isenberg, W. Flores-Santana, C. Switzer, S. Donzelli, Pe. Hussain, C. Vecoli, N. Paolocci, S. Ambs, C. Colton, C. Harris, D. Roberts, D. Wink, *Free Radical Biology & Medicine* **45**, 18-31 (2008).
- [18] J. Steinert, T. Chernova, I. Forsythe, *The Neuroscientist* **16**, 435-452 (2010).
- [19] J. Garthwaite, *The European Journal Of Neuroscience* **27**, 2783-2802 (2008).
- [20] C. Hall, J. Garthwaite, *Nitric Oxide : Biology and Chemistry* **21**, 92-103 (2009).
- [21] G. Brown, *Nitric Oxide : Biology and Chemistry* **23**, 153-165 (2010).
- [22] L. Kobzik, *American Journal Of Respiratory Cell and Molecular Biology* **41**, 9-13 (2009).
- [23] J. Coleman, *International Immunopharmacology* **1**, 1397-1406 (2001).
- [24] R. Flannagan, G. Cosío, S. Grinstein, *Nature Reviews. Microbiology* **7**, 355-366 (2009).
- [25] F. Fang, *Nature Reviews. Microbiology* **2**, 820-832 (2004).
- [26] G. Ferrer-Sueta, R. Radi, *ACS Chemical Biology* **4**, 161-77 (2009).
- [27] H. Yasuda, *Nitric Oxide : Biology and Chemistry* **19**, 205-216 (2008).
- [28] M. Valko, C. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, *Chemico-biological Interactions* **160**, 1-40 (2006).
- [29] D. Wink, I. Hanbauer, M. Krishna, W. DeGraff, J. Gamson, J. Mitchell, *Proceedings Of the National Academy Of Sciences* **90**, 9813-9817 (1993).
- [30] U. Förstermann, *Pflügers Archiv : European Journal Of Physiology* **459**, 923-939 (2010).
- [31] V. Calabrese, C. Mancuso, M. Calvani, E. Rizzarelli, D. Butterfield, A. M. Giuffrida Stella, *Nature Reviews. Neuroscience* **8**, 766-775 (2007).
- [32] M. Cals-Grierson, A. Ormerod, *Nitric Oxide : Biology and Chemistry* **10**, 179-193 (2004).
- [33] B. Hill, B. Dranka, S. Bailey, J. Lancaster, V. Darley-Usmar, *The Journal Of Biological Chemistry* **285**, 19699-19704 (2010).
- [34] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. Cronin, M. Mazur, J. Telser, *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology* **39**, 44-84 (2007).
- [35] R. Hardeland, *Journal Of Experimental and Integrative Medicine* **1**, 67-81 (2010).
- [36] C. Kusano, B. Ferrari, E. França, A. Honorio-França, *Journal Of Applied Biomedicine* **7**, 163-173 (2009).

- [37] R. Kubant, C. Malinski, A. Burewicz, T. Malinski, *Electroanalysis* **18**, 410-416 (2006).
- [38] P. Pacher, J. Beckman, L. Liaudet, *Physiological Reviews* **87**, 315-424 (2007).
- [39] T. Nauser, W. Koppenol, *The Journal Of Physical Chemistry A* **106**, 4084-4086 (2002).
- [40] M., H. Korth, A. Wensing, R. Sustmann, H. de Groot, *Archives Of Biochemistry and Biophysics* **418**, 133-150 (2003).
- [41] M. Takahashi, K. Asada, *Archives Of Biochemistry and Biophysics* **226**, 558-566 (1983).
- [42] W. Koppenol, R. Kissner, *Chemical Research In Toxicology* **11**, 87-90 (1998).
- [43] S. Lyman, J. Hurst, *Journal Of the American Chemical Society* **117**, 8867-8868 (1995).
- [44] A. Denicola, B. Freeman, M. Trujillo, R. Radi, *Archives Of Biochemistry and Biophysics* **333**, 49-58 (1996).
- [45] S. Lyman, J. Hurst, *Inorganic Chemistry* **37**, 294-301 (1998).
- [46] D. Gupta, B. Harish, R. Kissner, W. Koppenol, *Dalton Transactions* 5730-5736 (2009).
- [47] S. Miyamoto, G. E Ronsein, T. Corrêa, G. Martinez, M. Medeiros, P. Di Mascio, *Dalton Transactions* 5720-5709 (2009).
- [48] G. Merényi, J. Lind, S. Goldstein, G. Czapski, *Chemical Research In Toxicology* **11**, 712-713 (1998).
- [49] X. Zhang, W. Kim, N. Hatcher, K. Potgieter, L. Moroz, R. Gillette, J. Sweedler, *The Journal Of Biological Chemistry* **277**, 48472-48478 (2002).
- [50] L. McQuade, S. Lippard, *Current Opinion In Chemical Biology* **14**, 43-49 (2010).
- [51] X. Ye, S. Rubakhin, J. Sweedler, *The Analyst* **133**, 423-433 (2008).
- [52] P. Meineke, U. Rauen, H. de Groot, H. Korth, R. Sustmann, *Chemistry - A European Journal* **5**, 1738-1747 (1999).
- [53] K. Setsukinai, Y. Urano, K. Kakinuma, H. Majima, T. Nagano, *The Journal Of Biological Chemistry* **278**, 3170-3175 (2003).
- [54] R. Radi, G. Peluffo, M. Alvarez, M. Naviliat, A. Cayota, *Free Radical Biology and Medicine* **30**, 463-488 (2001).
- [55] P. Wardman, *Free Radical Biology & Medicine* **43**, 995-1022 (2007).
- [56] J. Bates, *Neuroprotocols* **1**, 141-149 (1992).

- [57] E. Hetrick, M. Schoenfisch, *Annual Review Of analytical Chemistry* **2**, 409-433 (2009).
- [58] K. Kikuchi, T. Nagano, H. Hayakawa, Y. Hirata, M. Hirobe, *Analytical Chemistry* **65**, 1794-1799 (1993).
- [59] M. Murphy, E. Noack, *Methods In Enzymology* **233**, 240-250 (1994).
- [60] D. Tsikas, *Journal Of Chromatography. B* **851**, 51-70 (2007).
- [61] P. Griess, *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **12**, 426-428 (1879).
- [62] D. Bohle, B. Hansert, S. Paulson, B. Smith, *Journal Of The American Chemical Society* **116**, 7423-7424 (1994).
- [63] H.Hong, J. Sun, W. Cai, *Free Radical Biology & Medicine* **47**, 684-698 (2009).
- [64] N.Hogg, *Free Radical Biology & Medicine* **49**, 122-129 (2010).
- [65] A. Kleschyov, P. Wenzel, T. Munzel, *Journal Of Chromatography B* **851**, 12-20 (2007).
- [66] M. Trujillo, M. Naviliat, M. Alvarez, G. Peluffo, R. Radi, *Analisis* **28**, 518-527 (2000).
- [67] F. Bedioui, N. Villeneuve, *Electroanalysis* **15**, 5-18 (2003).
- [68] A. Ciszewski, G. Milczarek, *Talanta* **61**, 11-26 (2003).
- [69] Z. Taha, *Talanta* **61**, 3-10 (2003).
- [70] C. Amatore, C. Pebay, L. Thouin, A. Wang, J. Warkocz, *Analytical Chemistry* **82**, 6933-6939 (2010).
- [71] B. Privett, J. Shin, M. Schoenfisch, *Chemical Society Reviews* **39**, 1925-1935 (2010).
- [72] R. Grunewald, *Brain Research Reviews* **18**, 123-133 (1993).
- [73] A. Muralikrishna Rao, A. Dogan, J. Hatcher, R. Dempsey, *Brain Research* **793**, 265-270 (1998).
- [74] R. O'Neill, J.Lowry, *Behavioural Brain Research* **71**, 33-49 (1995).
- [75] B. Lei, N. Adachi, T. Arai, *Brain Research Protocols* **3**, 33-36 (1998).
- [76] P. Sood, S. Cole, D. Fraier, A. Young, *Journal Of Neuroscience Methods* **185**, 39-44 (2009).
- [77] K. Shibuki, *Neuroscience Research* **9**, 69-76 (1990).
- [78] C. Caro, J. Zagal, F.Bedioui, *Journal Of The Electrochemical Society* **150**, E95-E103 (2003).

- [79] T. Malinski, Z. Taha, *Nature* **358**, 676-678 (1992).
- [80] N. Pereira-Rodrigues, N. Zurgil, S.I Chang, J. Henderson, F. Bedioui, C. McNeil, M. Deutsch, *Analytical Chemistry* **77**, 2733-2738 (2005).
- [81] J. Xue, X. Ying, J. Chen, Y. Xian, L. Jin, J. Jin, *Analytical Chemistry* **72**, 5313-5321 (2000).
- [82] J. Sandoval Cortés, S. Gutiérrez Granados, A. Alatorre Ordaz, J. López Jiménez, S. Griveau, F. Bedioui, *Electroanalysis* **19**, 61-64 (2007).
- [83] W. Choon, A. Koh, J. Son, E. Choe, Y. Shim, *Analytical Chemistry* **82**, 10075-10082 (2010).
- [84] Y. Wang, Z. Chen, *Talanta* **82**, 534-539 (2010).
- [85] S. Peteu, P. Peiris, E. Gebremichael, M. Bayachou, *Biosensors & Bioelectronics* **25**, 1914-1921 (2010).
- [86] C. Amatore, S. Arbault, D. Bruce, P. de Oliveira, M. Erard, M. Vuillaume, *Faraday Discussions* **116**, 319-333 (2000).
- [87] C. Amatore, S. Arbault, D. Bruce, P. de Oliveira, L. Erard, M. Vuillaume, *Chemistry - A European Journal* **7**, 4171-4179 (2001).
- [88] R. Hu, M. Guille, S. Arbault, C. Lin, C. Amatore, *Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP* **12**, 10048-10054 (2010).
- [89] C. Amatore, S. Arbault, A. Koh, *Analytical Chemistry* **82**, 1411-1419 (2010).
- [90] C. Amatore, S. Arbault, M. Erard, *Analytical Chemistry* **80**, 9635-9641 (2008).
- [91] C. Amatore, S. Arbault, C. Bouton, J-C. Drapier, H. Ghandour, A. Koh, *Chembiochem : A European Journal Of Chemical Biology* **9**, 1472-1480 (2008).
- [92] C. Amatore, S. Arbault, C. Bouton, K. Coffi, J-C. Drapier, H. Ghandour, Y. Tong, *Chembiochem : A European Journal Of Chemical Biology* **7**, 653-661 (2006).
- [93] C. Amatore, S. Arbault, D. Bruce, P. de Oliveira, M. Erard, N. Sojic, M. Vuillaume, *Analisis* **28**, 506-517 (2000).
- [94] O. Ordeig, J. del Campo, F. Muñoz, C. Banks, R. Compton, *Electroanalysis* **19**, 1973-1986 (2007).
- [95] F. Bedioui, S. Griveau, *Techniques De L'ingénieur* P2129 (2009).
- [96] D. Menshykau, X. Huang, N. Rees, F. del Campo, F. Muñoz, and R. Compton, *The Analyst* **134**, 343-348 (2009).

- [97] T. Davies, R. Compton, *Journal Of Electroanalytical Chemistry* **585**, 63-82 (2005).
- [98] C. Beriet, R. Ferrigno, H. Girault, *Journal Of Electroanalytical Chemistry* **486**, 56 - 64 (2000).
- [99] J. Guo, E. Lindner, *Analytical Chemistry* **81**, 130-138 (2009).
- [100] S. Hood, D. Kampouris, R. Kadara, N. Jenkinson, F. del Campo, F. Muñoz, C. Banks, *The Analyst* **134**, 2301-2305 (2009).
- [101] D. Shoup, A. Szabo, *Journal Of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **160**, 19-26 (1984).
- [102] W. Hyk, Z. Stojek, *Analytical Chemistry* **74**, 4805-4813 (2002).
- [103] Ž. Petrović, M. Metikoš-Huković, R. Babić, J. Katić, M. Milun, *Journal Of Electroanalytical Chemistry* **629**, 43-49 (2009).
- [104] O. González-García, C. Ariño, J. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Electroanalysis* **19**, 429-435 (2007).
- [105] B. Patel, M. Arundell, R. Quek, S. Harvey, I. Ellis, M. Florence, A. Cass, A. Schor, D. O'Hare, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **390**, 1379-1387 (2008).
- [106] G. Zarkadas, A. Stergiou, G. Papanastasiou, *Electrochimica Acta* **50**, 5022-5031 (2005).
- [107] C. Maragos, D. Morley, D. Wink, T. Dunams, J. Saavedra, A. Hoffman, A. Bove, L. Isaac, J. Hrabie, L. Keefer, *Journal Of Medicinal Chemistry* **34**, 3242-3247 (1991).
- [108] J. Hrabie, J. Klose, D. Wink, L. Keefer, *The Journal Of Organic Chemistry* **58**, 1472-1476 (1993).
- [109] K. Davies, D. Wink, J. Saavedra, L. Keefer, *Journal Of the American Chemical Society* **123**, 5473-5481 (2001).
- [110] A. Ramamurthi, R. Lewis, *Chemical Research In Toxicology* **10**, 408-413 (1997).
- [111] S. Griveau, C. Dumezy, P. Goldner, F. Bedioui, *Electrochemistry Communications* **9**, 2551-2556 (2007).
- [112] www.caymanchem.com
- [113] M. Friedemann, S. Robinson, G. Gerhardt, *Analytical Chemistry* **68**, 2621-2628 (1996).
- [114] A. Ciszewski, G. Milczarek, *Electroanalysis* **10**, 791-793 (1998).
- [115] J. Craig, R. O'Neill, *The Analyst* **128**, 905-911 (2003).

- [116] J. Craig, R. O'Neill, *Analytica Chimica Acta* **495**, 33-43 (2003).
- [117] M. Ferreira, H. Varela, R. Torresi, G. Tremiliosifilho, *Electrochimica Acta* **52**, 434-442 (2006).
- [118] E. Zakharova, T. Yurmazova, B. Nazarov, G. Wildgoose, R. Compton, *New Journal Of Chemistry* **31**, 394-400 (2007).
- [119] C. Kurz, X. Zeng, S. Hannemann, R. Kissner, W. Koppenol, *The Journal Of Physical Chemistry A* **109**, 965-969 (2005).
- [120] R. Kissner, W. Koppenol, *Journal Of the American Chemical Society* **124**, 234-239 (2002).
- [121] P. Maurer, C. Thomas, R. Kissner, H. Rügger, O. Greter, U. Röthlisberger, W. Koppenol, *The Journal Of Physical Chemistry A* **107**, 1763-1769 (2003).
- [122] F. O'Brown, N. Finnerty, J. Lowry, *The Analyst* **134**, 2012-2020 (2009).
- [123] E. Ruoslahti, *Cancer and Metastasis Review* **3**, 43-51 (1984).
- [124] S. Yenes, A. Messeguer, *Tetrahedron* **55**, 14111-14122 (1999).
- [125] H. Kim, B. Cheon, Y. Kim, S. Kim, H. Kim, *Biochemical Pharmacology* **58**, 759-765 (1999).
- [126] E. Furfine, M. Harmon, J. Paith, E. Garvey, *Biochemistry* **32**, 8512-8517 (1993).
- [127] M. Hughes, H. Nicklin, *Journal Of the Chemical Society A* 450-452 (1968).
- [128] K. Robinson, J. Beckman, *Methods In Enzymology* **396**, 207-214 (2005).

Annexe 1. Matériel et méthodes

Composés chimiques

Le DEA-NONOate (diéthylammonium (Z)-1-(N,N-diéthylamino)diazen-1-ium-1,2,diolate), composé donneur de NO[•], a été fourni par Cayman Chemicals et conservé à -20 °C pendant 3 mois maximum. Tous les autres composés chimiques ont été fournis par Sigma Aldrich. Toutes les solutions ont été préparées en utilisant de l'eau ultrapure ayant une résistivité de 18,2 MΩ.cm, purifiée avec un appareil Milli-Q_{plus} de chez Millipore.

Synthèse de ONOO⁻

ONOO⁻ a été synthétisé selon une procédure reportée dans la littérature [127] : un bécher de 250 mL contenant 50 mL de peroxyde d'hydrogène (50 mM) et nitrite de sodium (50 mM) est conservé dans de la glace, sous agitation magnétique vigoureuse. 25 mL d'acide chlorhydrique (0,1 M) à température ambiante sont rapidement ajoutés, suivis 1 s plus tard par 25 mL d'hydroxide de sodium à 3 °C pour stopper la réaction. La solution est ensuite passée sur des copeaux de dioxyde de manganèse synthétisé au laboratoire pour se débarrasser du peroxyde d'hydrogène en excès [128]. Cette solution alcaline est ensuite séparée en aliquotes et conservée dans le noir à -20 °C pendant une semaine maximum. Les rendements obtenus avec cette méthode de synthèse sont compris entre 20 et 40 %. Avant chaque expérience, la concentration de cette solution mère de ONOO⁻ a été déterminée en mesurant son absorbance à 302 nm ($\epsilon = 1705 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [62]). Il est important de noter que du nitrite n'ayant pas réagi peut toujours être présent dans la solution finale, en conséquence ceci doit être pris en considération dans chaque expérience utilisant ONOO⁻ synthétisé avec cette méthode.

Préparation des solutions

Les solutions de tampon phosphate (PBS) à pH 7,4 ont été préparées en mélangeant 78,2 mL de NaOH (0,1 M) avec 100 mL de NaH₂PO₄ (0,1 M). Les solutions de PBS à pH 7,1 ont été préparées en mélangeant 78,2 mL de NaOH (1 M) avec 100 mL de NaH₂PO₄ (1 M).

Les solutions mères de donneur de NO[•] ont été préparées en dissolvant le DEA-NONOate (concentration finale 0,01 M) dans une solution de NaOH (0,01 M) et conservées

dans le noir à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 2 mois maximum. Ces solutions ont été décongelées immédiatement avant utilisation.

Les solutions mères des analytes interférents H_2O_2 , NO_2^- , dopamine, acide ascorbique et glutamate ont été préparées dans le PBS à pH 7,4. Elles n'ont pas été conservées plus de 24 h. La solution de dopamine est préparée au maximum 15 min avant son utilisation, et n'est pas conservée après.

La solution stable de $\text{O}_2^{\bullet-}$ a été préparée en ajoutant du superoxyde de potassium (KO_2) dans 5 mL de DMSO contenant une pastille de soude, jusqu'à saturation de la solution.

Électrodes

Les UMEs de type pointe en platine (diamètre 25 μm ou 50 μm) ont été fabriquées au laboratoire, en scellant un fil de platine dans un capillaire de verre. Avant chaque expérience, elles ont été polies à l'aide de papier abrasif SiC, de granulométrie P4000.

L'électrode tournante utilisée provient de Radiometer Tacussel, elle est constituée d'un disque d'or ayant une surface de $0,035\text{ cm}^2$, monté dans du Teflon. Sa rotation a été contrôlée avec un appareil Controvit de chez Radiometer Tacussel. Avant chaque expérience, l'électrode a été polie avec des pâtes de diamant de 1 et 0,25 μm .

Dans les expériences en régime hydrodynamique, un fil de platine a été utilisé comme contre électrode et une électrode au calomel saturé a été utilisée comme électrode de référence.

La procédure de fabrication des réseaux d'UMEs est décrite au paragraphe 2.2. Elle a été réalisée par l'équipe BIOMIS de l'ENS Cachan-Bretagne. Ces réseaux ont été rincés avec de l'eau ultrapure avant utilisation, ils n'ont pas été polis.

Appareils de mesure

Les expériences de voltampérométrie cyclique aux UMEs de platine ont été réalisées avec un potentiostat « picostat » de chez eDAQ, associé au logiciel EChem pour l'acquisition des données.

Un potentiostat modèle 263A de chez Princeton Applied Research, associé au logiciel Powersuite, a été utilisé pour les expériences de voltampérométrie cyclique aux réseaux

d'UMEs, pour les dépôts de polyeugénol et polyphénol, ainsi que pour les expériences en régime hydrodynamique.

Un potentiostat multicanaux « quadstat » de chez eDAQ, associé au logiciel Chart, a été utilisé pour les expériences de chronoampérométrie avec les réseaux d'UMEs. Lors des mesures simultanées de NO^\bullet et ONOO^- , des électrodes de référence et des contre électrodes communes ont été utilisées.

Les expériences de microscopie électrochimique à balayage ont été réalisées avec un équipement de Princeton Applied Research (UNISCAN Model 370) et une UME pointe de platine fabriquée au laboratoire, d'un diamètre de $25\mu\text{m}$.

Annexe 2. Synthèse d'une phthalocyanine de manganèse

Cette annexe présente une publication décrivant des travaux effectués en Afrique du Sud, dans le cadre d'un programme de mobilité appelé PROTEA. Le laboratoire d'accueil a été le département de chimie de *Rhodes University*, dans la ville de Grahamstown. L'objectif de ce projet était la synthèse d'une phthalocyanine de manganèse portant des fonctions alcynes terminales. Ces fonctions alcynes permettent d'attacher de façon covalente cette molécule à la surface d'une électrode portant des groupes azides, à travers une réaction de chimie « click ». Le but final était de tester l'activité électrocatalytique de la phthalocyanine sur la réduction de ONOO^- .

Ce projet a été abandonné en faveur de l'approche basée sur l'électroréduction de ONOOH , l'acide conjugué de ONOO^- . Cependant, la phthalocyanine de manganèse a été synthétisée et caractérisée avec succès, et la publication suivante décrit ce travail.



Cyclic voltammetry and spectroelectrochemistry of a novel manganese phthalocyanine substituted with hexynyl groups

Damien Quinton^{a,b,c}, Edith Antunes^c, Sophie Griveau^{a,b}, Tebello Nyokong^{c,*}, Fethi Bedioui^{a,b}

^a Unité Pharmacologie Chimique et Génétique et Imagerie, CNRS 8151, Université Paris Descartes, Chimie ParisTech, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris cedex 05, France

^b INSERM, Unité Pharmacologie Chimique et génétique et Imagerie n° 1022, Paris, France

^c Department of Chemistry, Rhodes University, 6140, Grahamstown, South Africa

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 August 2010

Accepted 22 November 2010

Available online 27 November 2010

Keywords:

Manganese phthalocyanine

Cyclic voltammetry

Alkyne

Spectroelectrochemistry

ABSTRACT

We report here on the synthesis of a new manganese phthalocyanine complex, namely Mn tetrakis(5-hexynoxy) phthalocyanine (**3**), specifically designed to possess an alkyne moiety for its potential use in controlled immobilization on electrodes *via* the so called “click” chemistry reaction. The electrochemical activity of complex **3** was investigated by cyclic voltammetry and the nature of the observed redox couples was elucidated by spectroelectrochemistry. This work has also shown that the reduction of Mn(III)Pc complex to Mn(II)Pc is accompanied by the formation of MnPc μ -oxo species. Further reduction results in the formation of Mn(II)Pc(–3) rather than Mn(I)Pc(–2).

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

Phthalocyanines (Pcs) have attracted a lot of interest in research because of their diverse properties which are harnessed in a variety of applications, including their use in non-linear optical devices, oncology, sensors and security printing industry [1–5]. The properties of phthalocyanines can be tuned by the introduction of substituents on the periphery of the molecule. The presence of electron donating groups results in the shift of the Q band to longer wavelengths. Alkynyl substituted MPc complexes are known [6–9]; they were found to be more soluble in common organic solvents (such as dichloromethane, chloroform and tetrahydrofuran) when compared with alkylthiophthalocyanines [7]. MPc complexes containing Mn as a central metal show a highly red-shifted Q band [10]. The alkyne substituted MPc complexes reported in the literature so far are either unmetallated or contain electrochemically inactive central metals such as Cu or Zn [6–9]. Also alkyne substituted MPc complexes containing a long alkyl chain and which terminate with a triple bond carbon are unknown. These types of complexes have the potential of being attached covalently to an electrode surface bearing azide groups by “click” chemistry. Click chemistry is an emerging attractive and efficient method of immobilization of molecular moieties on solid material. “Click” chemistry involving alkyne complexes uses the Sharpless copper(I) catalyzed azide–alkyne cycloaddition reaction to produce stable immobilized layers on electrodes [11,12]. Thus the synthesis of MPc complexes bearing terminal alkyne groups, which are also separated from the ring by long alkyl chains is of importance.

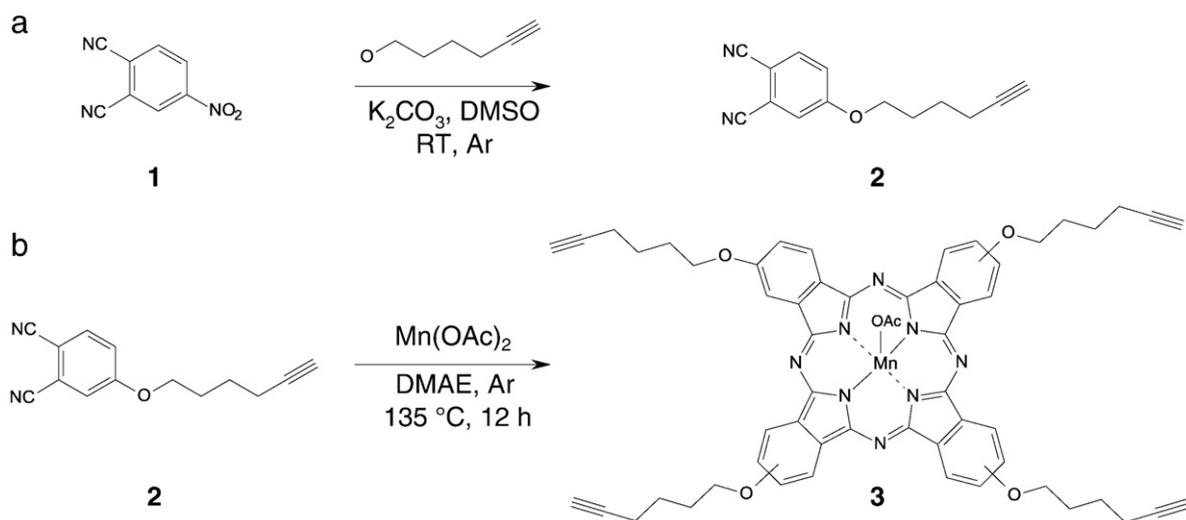
This work reports on the synthesis and electrochemistry of tetra-5-hexyn-oxysubstituted MnPc derivative (complex **3**, Scheme 1). The first reduction in Mn^{III}Pc^{–2} complexes has been a subject of some controversy, with some reports proposing ring reduction to the Mn^{II}Pc^{–3} species and others suggesting metal reduction to the Mn^IPc^{–2} species. The former species has been reported by us and other authors [13–15], and the latter has rarely been observed [16]. The formation of Mn^IPc^{–2} or Mn^{II}Pc^{–3} species is highly dependent on the ring substituents.

Complex **3** (Scheme 1) was prepared by the template reaction of 4-hex-5-ynoxyphtalonitrile (compound **2**) precursor with manganese (II) acetate in the presence dimethylaminoethanol (DMAE). The details are supplied as Supplementary data. The complex was characterized by spectroscopic methods and elemental analyses. With the aid of 2 dimensional nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy experiments such as correlation spectroscopy (COSY), heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) and heteronuclear single quantum coherence (HSQC), the structure of complex **3** was confirmed. The presence of the triple bond was confirmed by a correlation from the $\text{–C}\equiv\text{CH}$ proton to the quaternary carbon in the HMBC experiment.

A mixture of four possible structural isomers is expected for complex **3**. The four probable isomers can be designated by their molecular symmetry as C_{4h} , C_{2v} , C_s and D_{2h} , and they are known to occur in an expected statistical mixture of 12.5% C_{4h} , 25% C_{2v} , 50% C_s and 12.5% D_{2h} for peripherally substituted complexes [17]. The isomers are difficult to separate and no attempt was made to separate them in this work.

The Q band of complex **3** at 732 nm in DMF is red shifted compared to unsubstituted MnPc in DMF (at 716 nm) [18], confirming that the presence of the electron donating 5-hexyn-oxy group results in red-

* Corresponding author. Tel.: +27 46 6038260; fax: +27 46 6225109.
E-mail address: t.nyokong@ru.ac.za (T. Nyokong).



Scheme 1. Synthetic route for 4-hex-5-ynoxyphthalonitrile (a) and MnTHOPc (b).

shifting of the Q band and also confirming the presence of Mn(III) Pc, which results in red-shifting compared to Mn(II)Pc derivatives. The Beer–Lambert law, obeyed for complexes for concentrations less than 1×10^{-5} mol/L, confirming a lack of aggregation at these concentrations.

The cyclic voltammogram of complex **3** in deoxygenated DMF + 0.1 M TBABF₄ at GC electrode is shown in Fig. 1. Four pairs of peaks are observed at $E_{1/2} = +1.1$ V (I), +0.85 V (I'), -0.25 V (II), -1.0 V (III) (with $E_{1/2} = (E_{pa} + E_{pc})/2$). The two ill-defined voltammetric features located in the positive area (labelled I and I') might be related to the oxidation of the Pc ring. The potential for these two peaks are in the range for ring oxidation in MnPc complexes [10,19,20]. The reversible voltammetric couple located at -0.25 V can be attributed to Mn(III)Pc(-2)/Mn(II)Pc(-2) redox process and that at -1.0 V to Mn(II)Pc(-2)/Mn(II)Pc(-3) in accordance with the literature [19,20].

Spectroelectrochemistry was implemented to assess the nature of these redox processes and more particularly the involvement of the Mn center and the Pc ring. The studies were focused on the redox couples at -0.25 V and -1.0 V since the reduction processes are implicated in the catalytic activities of MnPc complex for reduction of species such as oxygen [21] and also because the nature of the second reduction process for MnPc complexes is not clearly known.

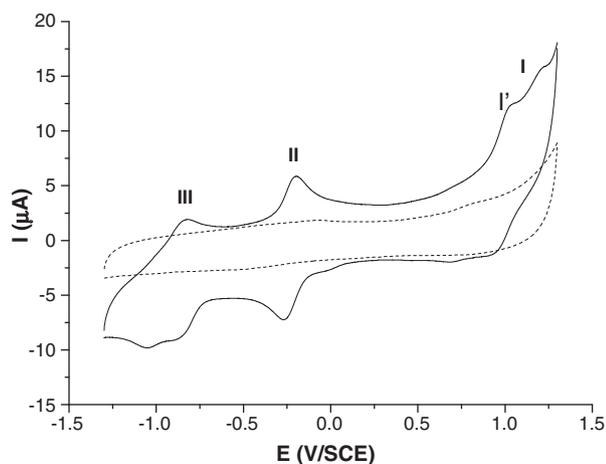


Fig. 1. Cyclic voltammogram of 1 mM complex **3** at GC electrode in deoxygenated DMF solution + 0.1 M TBABF₄. Dashed line: background. Scan rate = 50 mV s^{-1} .

The spectra of complex **3** were recorded continuously versus time while applying a constant potential of -0.45 V to induce the electrochemical process centered at -0.25 V (couple II), Fig. 2a. The

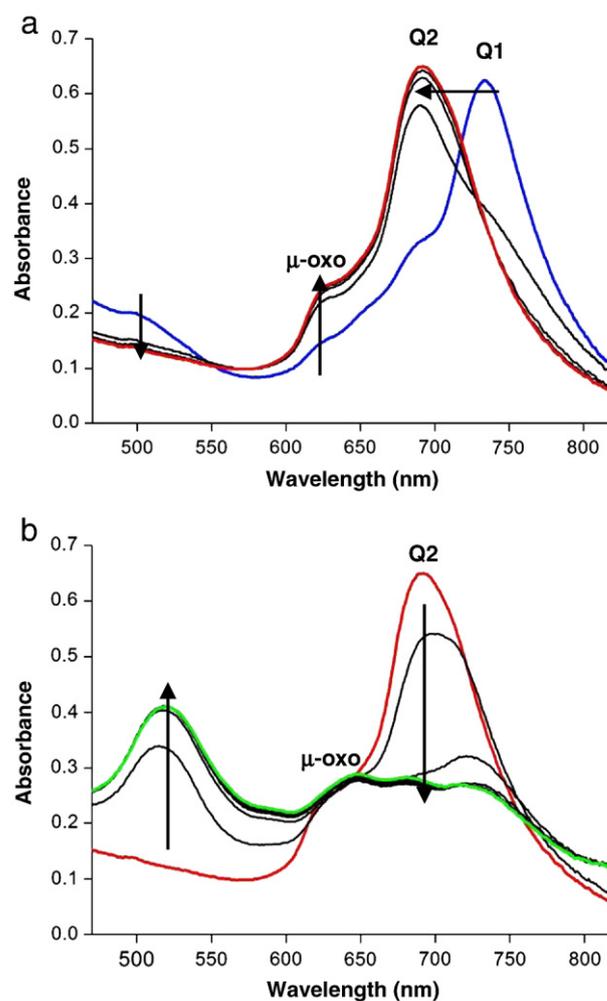


Fig. 2. UV-Vis spectral changes for **3** observed using controlled potential electrolysis at (a) -0.45 and (b) -1.24 V. First spectrum in (b) is the same as the last spectrum in (a). Electrolyte = DMF containing 0.1 M TBABF₄. Q1 = starting spectrum, Q2 = spectrum after reduction.

main modification of the initial spectrum is a hypsochromic shift of the Q band from 732 nm (labelled Q1) to 691 nm (labelled Q2), characteristic of a process occurring at the metal center [10,18], hence confirms unambiguously the assignment of process II to the one-electron reduction of Mn(III) to Mn(II) in complex 3. The lack of clear isosbestic points suggests the involvement of more than two species in solution. In MnPc complexes, the spectrum may consist of three bands corresponding to three different species in solution. The broad feature around 620 nm in Fig. 2a is typical of MnPc μ -oxo complexes [18]. It is more enhanced upon reduction suggesting that the reduction of 3 (Fig. 2a) results in the formation of both the Mn^{II}Pc and the MnPc μ -oxo complexes as reported before [22]. Aggregation of the complex, which might be at the origin of the unclear isosbestic point, has been ruled out since no characteristic spectral feature of the typical H aggregation of phthalocyanines appears on the spectrum. Also the formation of MnPc μ -oxo complexes is characterized by the decrease in absorptions in the 500 nm region and formation of bands near 620 nm [18], as observed in this work.

Further reduction of complex 3 at a constant potential of -1.25 V, Fig. 2b, to induce the electrochemical process centered at -1.0 V (couple III) resulted in a decrease in the Q band and the formation of a new band at 518 nm, this is a behavior typical [14] of ring based reduction of MnPc complexes. Thus the reduction of Mn(II)Pc(-2) to Mn(II)Pc(-3) rather than to Mn(I)Pc(-2) is confirmed in this work.

In conclusion, a manganese tetrakis(5-hexyn-oxy) phthalocyanine containing terminal alkyne groups was successfully synthesized in this work. The Q band of the new complex is red shifted compared to unsubstituted MPc complexes, which can be explained by the concomitant effect of the presence of Mn(III) and the electron donating nature of 5-hexyn-oxy substituents. This work has also shown that the reduction of Mn(III)Pc complex to Mn(II)Pc is accompanied by the formation of MnPc μ -oxo species. Further reduction results in the formation of Mn(II)Pc(-3) rather than Mn(I)Pc(-2).

Acknowledgements

This work was supported by the National Research Foundation (NRF) and the Department of Science and Technology (DST), South

Africa through DST/NRF South African Research Chairs Initiative for Professor of Medicinal Chemistry and Nanotechnology as well as Rhodes University, and by PROTEA project 07 F 10/SA (France–South Africa). DQ thanks PROTEA for offering the facilities for his stay in Grahamstown.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.inoche.2010.11.029.

References

- [1] D. Dini, M. Hanack, *J. PorphyrinsPhthalocyanines* 8 (2004) 915.
- [2] G. De la Torre, P. Vásquez, F. Agulló-López, T. Torres, *Chem. Rev.* 104 (2004) 3723.
- [3] P. Gregory, *J. PorphyrinsPhthalocyanines* 4 (2000) 432.
- [4] T. Nyokong, H. Isago, *J. PorphyrinsPhthalocyanines* 8 (2004) 1083.
- [5] J. Zagal, F. Bedioui, J.P. Dodelet (Eds.), *N4-macrocyclic Metal Complexes*, Springer, New York, 2006.
- [6] Y. Yilmaz, M.K. Şener, I. Erden, U. Avcıata, *Polyhedron* 28 (2009) 3419–3424.
- [7] A. Kalkan, A. Koca, Z.A. Bayir, *Polyhedron* 23 (2004) 3155.
- [8] D.S. Terekhov, K.J.M. Nolan, C.R. McArthur, C.C. Leznoff, *J. Org. Chem.* 61 (1996) 3034.
- [9] N. Cauchon, H. Tian, R. Langlois, C. Madeleine, S. Martin, H. Ali, D. Hunting, J.E. van Lier, *Bioconjugate Chem.* 16 (2005) 80.
- [10] T. Nyokong in: *Structure and Bonding: Functional Phthalocyanine Molecular Materials*, Vol. Ed. J. Jiang, series Ed. D.M.P. Mingos, Vol. 135, Springer (2010), pp 45–88.
- [11] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40 (2001) 2004.
- [12] J.P. Collman, N.K. Devaraj, C.E.D. Chidsey, *Langmuir* 20 (2004) 1051.
- [13] B. Agboola, K. Ozoemena, P. Westbroek, T. Nyokong, *Electrochim. Acta* 52 (2007) 2520.
- [14] C.C. Leznoff, L.S. Black, A. Heibert, P.W. Causey, D. Christendat, A.B.P. Lever, *Inorg. Chim. Acta* 359 (2006) 2690.
- [15] G. Mbambisa, P. Tau, E. Antunes, T. Nyokong, *Polyhedron* 26 (2007) 5355.
- [16] C.-L. Lin, C.-C. Lee, K.-C. Hoj, *Electroanal. Chem.* 524–525 (2002) 81.
- [17] M. Durmuş, S. Yeşilot, V. Ahsen, *New J. Chem.* 30 (2006) 675.
- [18] M.J. Stillman, T. Nyokong, in: C.C. Leznoff, A.B.P. Lever (Eds.), *Phthalocyanines: Properties and Applications*, vol. 1, VCH, New York, 1989.
- [19] C.C. Leznoff, L.S. Black, A. Heibert, P.W. Causey, D. Christendat, A.B.P. Lever, *Inorg. Chim. Acta* 359 (2006) 2690.
- [20] A.B.P. Lever, E.R. Milaeva, G. Speier, in: C.C. Leznoff, A.B.P. Lever (Eds.), *Phthalocyanines: Properties and Applications*, Vol. 3, VCH Publishers, New York, 1993, p. 1.
- [21] J.H. Zagal, M.A. Paez, J.F. Silva, in: J. Zagal, F. Bedioui, J.P. Dodelet (Eds.), *N4-macrocyclic Metal Complexes*, Springer, New York, 2006, pp. 41–76, Chpt 2.
- [22] A.B.P. Lever, J.P. Wilshire, S.K. Quan, *Inorg. Chem.* 20 (1981) 761.

Supplementary Material

1. Experimental

1.1. Materials

All chemicals were reagent grade and purchased from Aldrich except acetonitrile (ACN), dimethylformamide (DMF), tetrahydrofuran (THF), dimethylsulfoxide (DMSO), dimethylaminoethanol (DMAE) that were high performance liquid chromatography (HPLC) grade. Tetrabutylammonium tetrafluoroborate (TBABF₄) and 5-hexyn-1-ol were also from Aldrich.

1.2. Synthesis

1.2.1. 4-(Hex-5-yn-oxy)phtalonitrile (2, Scheme 1)

5-Hexyn-1-ol (6.94 mmol) and 4-nitroptalonitrile (5.78 mmol) were dissolved in dry DMSO under argon. The mixture was stirred for 15 minutes and then ground anhydrous potassium carbonate (9.83 mmol) was added. Potassium carbonate (2.89 mmol) was further added after 3 hours and again after 24 hours. After 26 hours, water was added to the reaction mixture. The brownish product was collected by centrifugation and rinsed with ethanol.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): σ ppm 7.690 (*Ar*-H, d, *J* = 8.76 Hz, 1H), 7.245 (*Ar*-H, d, *J* = 2.52 Hz, 1H), 7.167 (*Ar*-H, dd, *J* = 8.76, 2.49 Hz, 1H), 4.078 (CH₂-O-, t, *J* = 6.29, 6.29 Hz, 2H), 2.278 (CH₂, dt, *J* = 6.92, 6.92, 2.53 Hz, 2H), 1.989-1.929 (CH₂ and -C \equiv CH, m, 3H), 1.706 (CH₂, m, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): σ ppm 162.01 (*Ar*-C-O), 135.17 (*Ar*-C), 119.48 (*Ar*-C), 119.30 (*Ar*-C), 117.38 (*Ar*-C), 115.67 (C \equiv N), 115.24 (C \equiv N),

107.11 (Ar-C), 83.50 (C≡ CH), 69.04 (CH₂-O), 68.61 (C≡ CH), 27.67 (CH₂), 24.62 (CH₂), 18.00 (CH₂).

1.2.2. Manganese tetrakis(4-hex-5-ynoxy)phthalocyanine (**3**, Scheme 1)

Complex **3** was prepared by dissolving 4-hex-5-ynoxyoxy phtalonitrile (2.23 mmol) and manganese acetate (1.23 mmol) in dimethylaminoethanol and heated at reflux temperature (135 °C) under argon for 15 hours. The mixture was then allowed to cool and methanol was added to precipitate the product that was further collected by centrifugation. The complex was first purified by column chromatography over silica gel using DMF as eluent. DMF was removed with a rotary evaporator under reduced pressure at 80 °C. The resulting oil was then further purified by size exclusion column chromatography (biobeads) using THF as eluent. The product was then dried with a rotary evaporator, and finally precipitated with methanol and collected by centrifugation. ¹H NMR (DMF-*d*₇, 600 MHz): σ ppm 8.063 (*Ar*-H, m, 4H), 7.783 (*Ar*-H, m, 4H), 7.512 (*Ar*-H, m, 4H), 3.55 (CH₂-O-, m, 8H), 2.340 (-C≡ CH, m, 4H), 2.29 (CH₂, m, 8H), 1.907 (CH₂, m, 8H), 1.67 (CH₂, m, 8H). Anal. calcd. for C₅₆H₄₈MnN₈O₄ (OAc).MeOH: C 67.88, H 5.27, N 10.73%. Found C 66.37, H 4.74, N 10.02%. MS (ESI): *m/z*, found = 951.9 amu. calcd. for [PcMn - OAc]⁺ = 951.9 amu.

1.3. Equipment

IR spectra were obtained by using the Perkin-Elmer 2000 FT-IR spectrometer. Elemental analysis was done using a Vario-Elementar Microcube ELIII. UV-Vis absorption spectra were obtained using the Varian 500 UV-Vis-NIR spectrophotometer. ¹H NMR and ¹³C NMR spectra were obtained using a Bruker

Avance II+ 600MHz and a Bruker AMX 400MHz NMR spectrometer. Mass spectra was recorded with triple quadripole API 300 PE Sciex (Applied Bioystems)

1.4. Electrochemical methods

Spectroelectrochemical experiments were conducted using a home-made optically transparent thin-layer electrochemical (OTTLE) cell connected to a Bio analytical system (BAS) CV 27 voltammogram and a Varian 1E spectrophotometer. The solutions were deoxygenated with argon for 20 minutes before starting the electrolysis. The spectra were acquired every two minutes until the spectrum remains unchanged (≈ 15 min).

All other electrochemical measurements were performed with a Bas B/W 100 electrochemical workstation and a conventional three-electrode cell. The working electrode was a glassy carbon (GC) electrode (0.071 cm² geometric area), a saturated calomel electrode (SCE) was used as the reference electrode and a platinum wire served as the auxiliary electrode. GC was polished before each experiment with 2400 and then 4000 grit SiC papers followed by a final polishing using 1 μm and then $\frac{1}{4}$ μm diamond liquids (LamPlan, France) and was finally thoroughly rinsed with water.