

Titre: Développement d'une méthode de fonctionnalisation de polymère conducteur (PEDOT:PSS) pour le greffage de protéines
Title:

Auteur: Olga Berezhetska
Author:

Date: 2015

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Berezhetska, O. (2015). Développement d'une méthode de fonctionnalisation de polymère conducteur (PEDOT:PSS) pour le greffage de protéines [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/1706/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/1706/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Fabio Cicoira, & Gregory De Crescenzo
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE FONCTIONNALISATION DE POLYMÈRE
CONDUCTEUR (PEDOT:PSS) POUR LE GREFFAGE DE PROTÉINES

OLGA BEREZHETSKA
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

AVRIL 2015

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE FONCTIONNALISATION DE POLYMÈRE
CONDUCTEUR (PEDOT:PSS) POUR LE GREFFAGE DE PROTÉINES

présenté par : BEREZHETSKA Olga

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. HENRY Olivier, Ph. D., président

M. CICOIRA Fabio, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. VETRONE Fiorenzo, Ph. D., membre

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Prof. Fabio Cicoira du département de génie chimique, de m'avoir accueilli dans son groupe de recherche, pour l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer.

Je remercie mon co-directeur Prof. Grégory De Crescenzo pour tous les efforts fournis à mon égard tout au long de ce projet, les nombreux conseils et pour sa disponibilité exceptionnelle. Je tiens également à le remercier pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet motivant au sein de son laboratoire dynamique.

Je désire exprimer mes remerciements et ma reconnaissance à un membre du groupe de recherche de mon co-directeur, l'associé de recherche du département de génie chimique, Benoît Liberelle, pour sa patience, le support quotidien et son aide énorme pendant toute la période de réalisation de mon projet. Merci de m'avoir enseigné les méthodes de recherche et de m'avoir offert la possibilité d'avancer plus rapidement dans la partie expérimentale de mon projet. Sans ta participation je ne serai pas arrivée jusque là.

Je souhaite remercier tous les amis que j'ai rencontrés à Polytechnique. Merci à Samantha Noël, Charles Fortier, Frédéric Murschel, Massinissa Si Mehand et Benoît Liberelle. Merci de m'avoir encouragée et motivée pendant toutes les situations difficiles de ma vie et pour m'avoir permise d'améliorer mon français au quotidien. Merci pour tous les bons moments que j'ai passés avec vous et votre enthousiasme à toujours m'aider. Je vous aime beaucoup, vous êtes les meilleurs amis au monde.

Mes forts remerciements à ma compatriote Irina Valitova de mon groupe de recherche et à sa famille. Merci pour votre amitié, soutien inconditionnel et l'aide apporté durant mon projet.

Merci pour la collaboration efficace de tous les étudiants et les stagiaires du groupe de mon directeur de recherche: Prajwal Kumar, Zhihui Yi, Shiming Zhang, Gabriel Trevisan, Sampath Satti, Ariane Bérard, Amel Sarah Nouas, Laurie Fontaine, Arvindh Sekar. Merci au chercheur invité Hao Tang.

Je tiens également à exprimer mes remerciements à la professeure du département génie physique

Clara Santato et son groupe de recherche: Dilek, Julia, Jonathan, Sareh, Xiang, Francis, Frédéric et Eduardo. Merci pour le partage actif des connaissances et d'expérience scientifique.

Je remercie le GRSTB et la Fondation Universitaire Pierre Arbour pour leur soutien financier durant mes deux années de maîtrise.

Merci aux professeurs Olivier Henry et Fiorenzo Vetrone d'avoir accepté de juger mon travail.

Merci à mon mari Andrii et à ma petite fille Anna qui donnent une raison à ma vie et pour m'avoir soutenu dans mon choix de poursuite d'étude en maîtrise. Merci à ma mère et mes grands-parents pour tout ce qu'ils ont apportés à ma vie.

RÉSUMÉ

Les polymères conducteurs sont très utilisés dans le domaine de la bioélectronique. Il existe donc un besoin de développer de nouvelles méthodes pour intégrer la composante biologique à ces dispositifs électroniques. Plusieurs méthodes de modification de polymères conducteurs basées sur le greffage covalent de molécules biologiques induisent une diminution problématique de la conductivité. Notre objectif est de développer une méthode de greffage covalent de protéines sans influencer la conductivité et la stabilité du polymère conducteur commercial le plus utilisé, à savoir, le PEDOT:PSS. Pour atteindre cet objectif, nous avons employé la stratégie suivante: les couches minces de PEDOT:PSS ont été fabriquées par l'enduction centrifuge; la conductivité a été évaluée en utilisant la méthode des quatre pointes et la profilométrie; la caractérisation du greffage d'une protéine modèle (anticorps) a été réalisée par ELISA. Le greffage des anticorps a été effectué via les groupements carboxyles du dextrane carboxyméthylé 500 kDa (CMD), préalablement incorporé au film du PEDOT:PSS en concentration 0,1 % (w/v). L'agent que nous avons employé pour augmenter la conductivité du film (glycérol) a eu une influence négative sur l'efficacité de ce greffage. Un pontage covalent (*cross-linking*) avec du glycidoxypropyltriméthoxysilane (GOPS) a été proposé pour augmenter la stabilité du film et limiter l'effet négatif du glycérol. Le GOPS a permis d'améliorer drastiquement la stabilité du film de PEDOT:PSS/DCM sans pertes importantes en conductivité. L'épaisseur des couches minces (150 ± 10 nm) était stable lorsque plongées dans diverses solutions aqueuses (pH 5-7). Après la stabilisation des films, une concentration de 2% v/v du glycérol, notre condition optimale, a permis d'assurer un greffage efficace avec un bon niveau de conductivité (environ 200 S cm^{-1}). Finalement, le greffage covalent de molécules biologiques à la surface d'un film de polymère conducteur sans diminution importante en conductivité a été rendu possible par l'ajout de petites concentrations de DCM dans le film de PEDOT:PSS stabilisé par le GOPS (1% v/v).

Les résultats obtenus ont le potentiel d'être utilisés pour développer un substrat d'immobilisation d'une composante biologique de biocapteur, ainsi que de créer un substrat fonctionnalisé avec des molécules bioactives pour y cultiver des cellules avec une possible stimulation électrique.

ABSTRACT

The fact that conducting polymers have better biocompatibility than traditional conducting materials made them very popular in bioelectronics. That's why integration of biological compound in the structure of devices based on conducting polymer is important. Various methods of conducting polymer functionalisation were developed. Some of them can provoke conductivity decrease. Our objective was a creation of simple approach for protein covalent grafting on conducting polymer films (PEDOT:PSS) without influence on the stability and conductivity of the functionalised material. By mixing a commercial PEDOT:PSS suspension with the modified biopolymer carboxymethylated dextran (CMD), we obtained films displaying carboxyl ($-\text{COOH}$) groups allowing for covalent grafting of proteins via amide bonds. By fine-tuning the concentration of CMD (500 kDa) as well as those of a conductivity enhancer (glycerol) and a crosslinking agent (glycidoxypropyltrimethoxysilane, GOPS) in the film processing mixture, we were able to produce COOH -functionalized PEDOT:PSS films displaying excellent electrical conductivity and high stability in aqueous environment. The thickness of the GOPS-stabilised PEDOT:PSS/DCM films (150 ± 10 nm) was stable after a long-term immersion in aqueous buffered media (pH 5-7). Also we state that conductivity enhancer had some negative impact on the protein grafting efficiency. Finally, the glycerol in the concentration of 2% v/v was accepted as optimum condition which can provide high antibody grafting efficiency in combination with a film conductivity of about 200 S cm^{-1} . In the future our biofunctionalized PEDOT:PSS films can be incorporated into bioelectronic devices such as biosensors based on organic electrochemical transistors, implantable electrodes for *in vivo* stimulation and recording, and smart devices for cell culture and stimulation.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	iii
RÉSUMÉ	v
ABSTRACT.....	vi
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xiii
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Problématique	1
1.2 Objectifs.....	1
1.2.1 Objectif général	2
1.2.2 Objectifs spécifiques	2
1.3 Question de recherche.....	2
1.4 Hypothèse scientifique.....	2
CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE	4
2.1 La bioélectronique	4
2.1.1 Principe de base d'un dispositif bioélectronique.....	4
2.1.2 Limitations de la bioélectronique	6
2.2 Les semi-conducteurs organiques.....	6
2.2.1 Propriétés semi-conductrices.....	7
2.2.2. Dopage.....	8
2.2.3 Fabrication	9
2.3 Utilisation des polymères conducteurs pour la bioelectronique	9
2.3.1 Poly(pyrrole).....	10
2.3.2 Le poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT).....	11
2.4 Formation de films conducteurs de PEDOT:PSS.....	13
2.4.1 Traitement thermique	13

2.4.2 « Dopage secondaire ».....	14
2.4.3 Stabilisation des films du PEDOT par pontage covalent en utilisant du 3-glycidoxypropyltriméthoxysilane (GOPS).....	15
2.5 Biofonctionnalisation des polymères conducteurs	16
2.5.1 Modification chimique du monomère	17
2.5.2 Encapsulation	18
2.6 Le dextrane carboxyméthylé.....	20
2.7 Les techniques d'immobilisation des anticorps.....	21
2.8 La méthode immuno-enzymatique ou Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)	23
2.9 Résumé	25
 CHAPITRE 3 UNE TECHNIQUE SIMPLE POUR LE GREFFAGE COVALENT DES PROTÉINES SUR LA SURFACE DES FILMS DE POLYMÈRE CONDUCTEUR	27
3.1 Présentation de l'article	27
3.2 Article 1: A Simple Approach for Protein Covalent Grafting on Conducting Polymer Films	28
3.2.1 Authors	28
3.2.2. Abstract.....	28
3.2.3 Keywords.....	28
3.2.4 Introduction	29
3.2.5 Materials and Methods	30
3.2.6 Results and Discussion	33
3.2.7 Conclusion.....	43
3.2.8 Acknowledgments	43
3.2.9 References	44
 CHAPITRE 4 MÉTHODOLOGIE	47
4.1 Fabrication et caractérisation des films de PEDOT:PSS.....	47
4.2 Greffage des anticorps et caractérisation.....	47
 CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE.....	49
 CHAPITRE 6 RECOMMANDATIONS ET CONCLUSION.....	51

6.1 Recommandations.....	51
6.2 Conclusion	52
RÉFÉRENCES	54

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1 : La conductivité des polymères conducteurs modifiés chimiquement	18
---	----

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1 : Le schéma du transistor électrochimique organique [16]	5
Figure 2-2 : La structure chimique du polyacétylène.....	7
Figure 2-3 : La formation de bandes dans les molécules conjuguées	8
Figure 2-4 : La structure chimique des polymères conducteurs [3].....	10
Figure 2-5 : La structure chimique du sel macromoléculaire – PEDOT:PSS [1]	12
Figure 2-6 : La structure chimique du GOPS.....	16
Figure 2-7 : Carboxyméthylation du dextrane	20
Figure 2-8 : Schéma général de la structure d'un anticorps de type IgG. Fab – le fragment, qui est capable de lier l'antigène; Fc – le fragment cristallisable; CHO – les résidus glucidiques; VL – le domaine variable de la chaîne légère; VH – le domaine variable de la chaîne lourde; CL – le domaine constant de la chaîne légère; CH1, CH2, CH3 – trois domaines constants de la chaîne lourde [87].....	22
Figure 2-9 : Le schéma de la méthode immuno-enzymatique ELISA-sandwich	24
Figure 3-1: (A) Electrical conductivity of PEDOT:PSS films deposited by spin coating from a mixture containing all or part of the following components (the + signs indicate the presence of the component): Clevios™ PH1000, 0.1% w/v of unmodified 500-kDa dextran, 0.1% w/v of 500-kDa carboxymethylated dextran (CMD, degree of carboxymethylation = 55%) and 5% v/v of glycerol. (B) Impact of dextran and carboxymethylated dextran (CMD) on the conductivity of PEDOT:PSS films. Dextran (10 kDa, 70 kDa, 500 kDa) and CMD 500 kDa was added to the PEDOT:PSS suspensions (Clevios™ PH1000) prior to spin coating.....	34
Figure 3-2: Schematic illustration of (A) the capture anti-human EGF antibody covalent grafting and (B) the ELISA procedure that was used to evaluate the amount of –COOH groups that are available to graft covalently anti-human EGF antibody on PEDOT:PSS/CMD films. Capture antibody (Ab) was covalently grafted onto the COOH-functionalized surface of the PEDOT:PSS film via NHS/EDC chemistry. Following the successive incubation of human EGF (hEGF), biotinylated detection Ab and streptavidin-horseradish peroxidase (streptavidin-HRP), a substrate	

solution was added. The uncolored substrate solution turns to colored after being oxidized by the HRP enzyme.....36

Figure 3-3: Reactivity of the carboxyl groups of PEDOT:PSS/CMD films: specificity of ELISA reagents. The tests were performed on PEDOT:PSS films containing 0.1% w/v CMD. Capture antibodies were grafted in 100 mM MES buffer (pH 5.5). The star (*) denotes that 0.2% w/v of unmodified dextran was added to the buffer. ELISA steps related to detection antibody (Ab), HRP and substrate were identical for all conditions37

Figure 3-4: Influence of glycerol on the reactivity of the carboxyl of PEDOT:PSS/CMD films. PEDOT:PSS suspensions containing 0.1% w/v unmodified dextran or CMD were mixed with glycerol (concentration ranging from 0 to 5% v/v).....38

Figure 3-5: Stability of PEDOT:PSS films in PBS. PEDOT:PSS suspensions containing CMD (0.1% w/v), glycerol (1% v/v), with or without glycidoxypropyltrimethoxysilane (GOPS, 1% v/v) were spin-coated on pristine (conditions A and C) or GOPS-treated (condition B) glass surfaces. A profilometer was used to measure the thickness before and after immersion in phosphate buffered saline (PBS, 10 mM, pH 7.4).....40

Figure 3-6: Impact of glycerol on the conductivity of GOPS-containing PEDOT:PSS films. Prior to the spin coating and the drying processes, PEDOT:PSS suspensions containing 0.1% w/v CMD and 1% v/v GOPS were mixed with glycerol (concentration ranging from 0% v/v to 5% v/v)41

Figure 3-7: Impact of glycerol on the –COOH groups reactivity in GOPS-containing PEDOT:PSS films. Prior to the spin coating and the drying processes, PEDOT:PSS suspensions containing 0.1% w/v CMD and 1% v/v GOPS were mixed with glycerol (concentration ranging from 0 to 5% v/v)42

Figure 4-1 : Le schéma d'immobilisation de la molécule qui porte un groupement aminé sur les groupements –COOH de polymère intercalé dans le film48

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

BSA	–	Albumine de sérum bovin (<i>Bovin serum albumin</i>)
CMD	–	Dextrane carboxyméthylé (<i>Carboxymethylated dextran</i>)
DBSA	–	Acide sulfonique de benzène dodécylique (<i>Dodecylbenzenesulphonic acid</i>)
DCM	–	Dextrane carboxyméthylé (<i>Carboxymethylated dextran</i>)
DMSO	–	Diméthylsulfoxyde (<i>Dimethyl sulfoxide</i>)
EDC	–	<i>Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride</i>
ELISA	–	Méthode immuno-enzymatique (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
GOPS	–	Glycidoxypropyltriméthoxysilane
hEGF	–	Facteur de croissance épidermique humain (<i>Human epidermal growth factor</i>)
HPLC	–	Chromatographie en phase liquide à haute performance (<i>High performance liquid chromatography</i>)
HRP	–	Peroxydase de raifort (<i>Horseradish peroxidase</i>)
IgG	–	Immunoglobulines G
MES	–	<i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i>
NHS	–	N-hydroxysuccinimide
PANI	–	Poly(aniline)
PBS	–	Tampon phosphate salin (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PDMS	–	Poly(méthylsiloxane)
PEDOT	–	Poly(3,4-Ethylene DiOxyThiophene)
PEG	–	Polyéthylène glycol
PSS	–	Acide poly-(styrenesulfonique) (<i>Poly(styrenesulfonic acid)</i>)
pTS	–	Paratoluènesulfonate
RT	–	Température ambiante (<i>Room temperature</i>)
OECT	–	Transistor électrochimique organique (<i>Organic ElectroChemical Transistor</i>)
TOS	–	Tosylate
XPS	–	Spectrométrie photoélectronique X (<i>X-Ray photoelectron spectrometry</i>)

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Problématique

La bioélectronique correspond au domaine développant des dispositifs électroniques conjugués à une composante biologique. Les matériaux utilisés dans les dispositifs bioélectroniques doivent posséder des propriétés conductrices, pour permettre le transfert du signal, tout en étant suffisamment biocompatibles. Certains types de matériaux organiques comme les polymères conducteurs possèdent ces qualités [1].

Depuis quelques dizaines d'années, les polymères organiques sont utilisés en tant que semi-conducteurs, comme alternative au silicium dans les dispositifs électroniques [2]. Parmi ces semi-conducteurs organiques, le Poly(3,4-Ethylene DiOxyThiophene) dopé avec le Poly(StyreneSulfonate) (PEDOT:PSS) est reconnu comme biocompatible et plusieurs groupes étudient l'adhésion et la prolifération cellulaire sur des films de PEDOT:PSS. La structure de ce polymère conducteur (PEDOT) peut être modifiée chimiquement pour amener des groupements permettant le greffage de molécules biologiques. Cependant, plusieurs méthodes de modification de polymères conducteurs permettant le greffage covalent de molécules biologiques induisent une diminution problématique de la conductivité [3]. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies afin de greffer chimiquement des composantes biologiques à ces dispositifs électroniques. L'incorporation des molécules fonctionnalisées dans le film est une des voies possibles [4].

Dans la littérature, plusieurs polymères biologiques chargés négativement tels que le sulfate de dextrane [5,6], la chondroïtine sulfate [7], des peptides dérivés de la laminine [8] et l'acide hyaluronique [9] ont été utilisés comme alternative au polyanion organique PSS. Dans ce cas, le matériau biologique peut améliorer la biocompatibilité, mais en même temps diminue la stabilité du film de polymère conducteur [7].

1.2 Objectifs

Ce projet propose d'incorporer un biopolymère semi-synthétique, à savoir le dextrane carboxyméthylé (DCM), pour développer et optimiser une méthode de greffage covalent de protéines à la surface d'un film de PEDOT:PSS, et ce, sans diminution de conductivité. Les chaînes de PEDOT sont chargées positivement, donc elles sont capables de créer un complexe

avec les groupements qui portent une charge négative (comme les groupements carboxyles du DCM), ce qui devrait faciliter son incorporation. L'immobilisation des protéines modèles (anticorps) va être réalisée via les groupements carboxyles du dextrane si ils sont disponibles en surface du film. L'intercalation de petites concentrations de DCM devrait offrir une fonctionnalisation du film sans influencer de manière négative sa conductivité et sa stabilité.

1.2.1 Objectif général

Développer une méthode de greffage covalent de protéines sans influencer la conductivité et la stabilité du polymère conducteur commercial le plus utilisé (PEDOT:PSS).

1.2.2 Objectifs spécifiques

- 1- Fabriquer des couches minces et stables de PEDOT:PSS par enduction centrifuge avec des concentrations variables de DCM.
- 2- Mesurer la résistance et l'épaisseur du film créé (permettant l'évaluation de la conductivité) en utilisant la méthode des quatre pointes et la profilométrie, respectivement.
- 3- Réaliser le greffage de protéines modèles (anticorps) et évaluer l'efficacité du greffage par un test ELISA.
- 4- Déterminer la concentration optimale de DCM permettant un greffage efficace de protéines sans influencer négativement la conductivité du film.

1.3 Question de recherche

Comment peut-on greffer des molécules biologiques à la surface d'un film de polymère conducteur sans diminution de conductivité et de stabilité ?

1.4 Hypothèse scientifique

Le greffage covalent de molécules biologiques à la surface d'un film de polymère conducteur sans diminution de conductivité est possible en intégrant de petites concentrations de DCM.

Hypothèse #1 : L'intercalation de petites concentrations de DCM dans un film de PEDOT:PSS est possible sans diminution de sa conductivité.

Justification de l'originalité : Le DCM n'a pas été utilisé dans la littérature, à notre connaissance,

comme dopant et/ou agent de fonctionnalisation du polymère conducteur (PEDOT:PSS). Par contre, cette molécule et ses dérivés sont largement utilisés pour greffage de biomolécules dans le domaine des biocapteurs, de la chromatographie d'affinité et des tests ELISA.

Réfutabilité : L'hypothèse sera réfutée si même une quantité infime de DCM intercalée est capable d'influencer les qualités conductrices du film de PEDOT:PSS. C'est possible si on arrive à un excès de polymères non-conducteurs anionique (PSS et DCM) dans le film.

Hypothèse #2 : Le film de PEDOT:PSS fonctionnalisé avec l'incorporation du DCM est stable dans les solutions aqueuses dans une gamme de pH 4,5-8,5.

Justification de l'originalité : Plusieurs composants du film (PSS et DCM) ont un caractère hydrophile nécessitant la caractérisation de la stabilité du film et l'ajout d'un agent de stabilisation au besoin.

Réfutabilité : Le film de PEDOT:PSS fonctionnalisé avec le DCM n'est pas stable dans l'eau et il est impossible de trouver le moyen pour le stabiliser sans perte importante en conductivité.

Hypothèse #3 : Les groupements carboxyles du DCM se retrouvent à la surface du film de PEDOT:PSS fonctionnalisé en densité suffisante pour permettre le greffage des protéines modèles (anticorps).

Justification de l'originalité : Jusqu'à présent, l'efficacité de la fonctionnalisation des polymères conducteurs avec l'intercalation de DCM n'a pas été démontrée et constituera une méthode originale si les hypothèses 1 à 3 sont vérifiées.

Réfutabilité : La concentration de DCM qui garde la conductivité et stabilité du film de PEDOT:PSS au même niveau n'est pas suffisante pour le greffage des protéines efficace.

CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 La bioélectronique

Les recherches dans le domaine de la bioélectronique prennent leur origine à partir des travaux de Luigi Galvani au XVIII^e siècle. Parmi ses expériences, la plus connue est l'application d'un courant aux muscles de la patte coupée d'une grenouille. C'était le premier essai étudiant l'influence des phénomènes physiques sur une composante biologique [2]. Aujourd'hui la communauté internationale des chercheurs a réussi à créer plusieurs dispositifs électroniques conjugués à une composante biologique, qui permettent d'améliorer la qualité de la vie des patients. Comme exemples des produits de la bioélectronique, on retrouve les biocapteurs (glucomètre), les stimulateurs et défibrillateurs cardiaques et les implants cochléaires [1]. Les dispositifs bioélectroniques permettent par exemple le suivi de l'état physiologique (glucomètre) et la restauration d'une fonction physiologique partiellement perdue (stimulateur cardiaque). Les recherches actuelles en bioélectronique visent entre autre au développement de méthodes de diagnostic rapide de maladies et de prothèses intelligentes [10]. En dehors du domaine biomédical, les biocapteurs trouvent aussi des applications dans le contrôle environnemental et/ou de qualité des produits alimentaires [11].

2.1.1 Principe de base d'un dispositif bioélectronique

Les dispositifs bioélectroniques doivent, dans la plupart des cas, être en contact direct avec les matériaux biologiques. Dans ce cas, l'utilisation de circuits électroniques classiques basés sur la technologie de Métal-Oxyde-Semi-conducteur complémentaire est limitée.

Un dispositif bioélectronique doit assurer la transformation du courant ionique du milieu biologique en courant électronique pour détecter certaines réactions biochimiques [1] ou encore pour la stimulation ou le décodage de l'activité neuronale [12, 13]. On a donc besoin de construire un dispositif à partir de matériaux qui vont fournir une bonne interface à la frontière biologie/électronique, c'est-à-dire à la fois biocompatibles et avec une grande sensibilité aux réactions mesurées. Dans ce but, plusieurs modèles d'électrodes [14], de pompes ioniques [15] et de transistors [16, 17] ont été développés à base de semi-conducteurs organiques (polymères conducteurs). À titre d'exemple, nous allons décrire l'architecture et le principe du

fonctionnement d'un transistor électrochimique organique (OECT, Figure 2-1) [16].

Un OECT contient trois électrodes (la source, le drain et la grille) et le canal en polymère conducteur (voir Figure 2-1). Le canal du transistor se trouve entre les électrodes de source et de drain, en contact avec l'électrolyte. Le polymère conducteur le plus utilisé pour le développement de OECT est le poly(3,4-éthylènedioxythiophène) dopé avec le poly(styrènesulfonate) (PEDOT:PSS). Les OECTs qui contiennent la grille en Pt [18], Ag/AgCl [19] et PEDOT [20] sont décrits dans la littérature. La grille est connectée (de façon ionique et non pas électronique) par l'électrolyte au canal de transistor. Une cellule dont le but est de contenir l'électrolyte, liquide au-dessus du canal du transistor est souvent fabriquée en poly(méthylsiloxane) (PDMS) [16]. Dans le cas d'un biocapteur, cette solution d'électrolyte peut être utilisée comme milieu de mesure. De plus, grâce au canal composé de polymère conducteur, qui est reconnu comme la surface biocompatible, le OECT est un dispositif applicable dans le domaine du génie tissulaire et biomédical [2, 21].

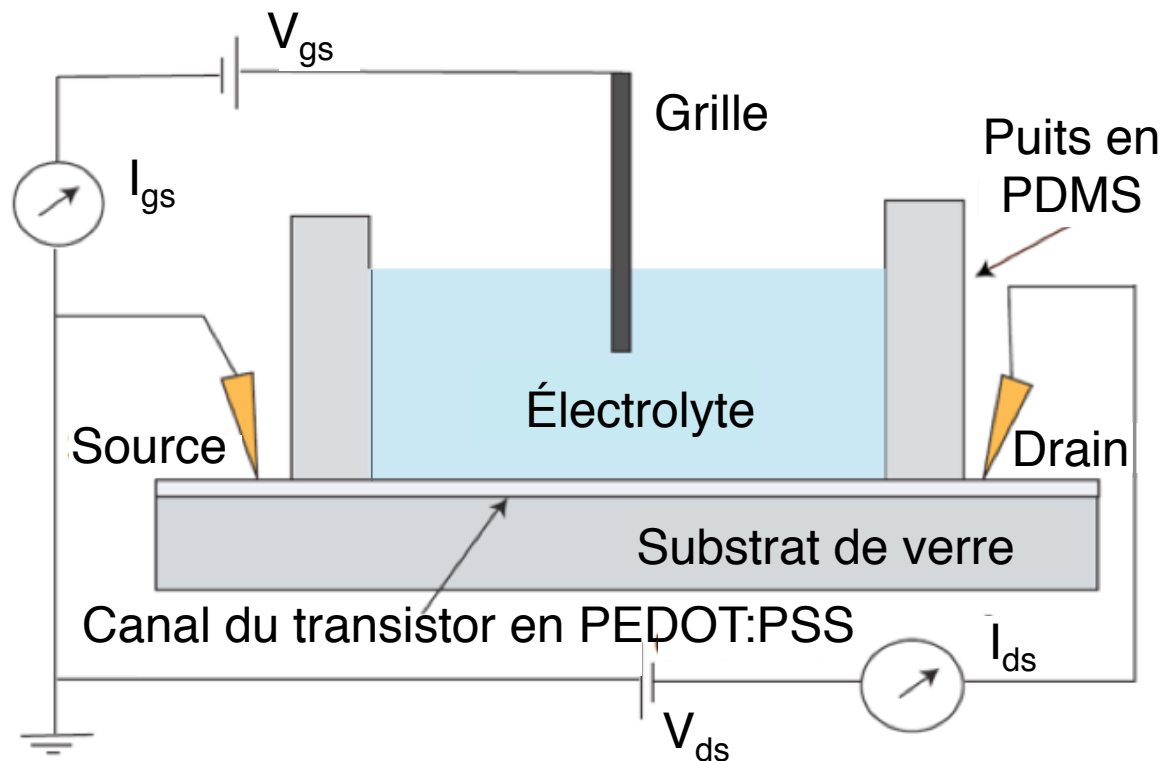


Figure 2-1 : Le schéma du transistor électrochimique organique [16]

Le OECT fonctionne selon le mécanisme suivant: après l'application du biais positif sur la grille,

les cations contenus dans l'électrolyte sont capables de pénétrer dans le film du polymère conducteur et d'en changer sa conductivité électronique. Ces cations compensent la charge négative des groupements sulfonates du PSS. Dans ce cas, on a une diminution de la densité de trous à cause du mouvement des trous vers le drain sans réinjection à partir de la source. Il en résulte une diminution du courant sur le drain (I_D). On a alors transformation du courant ionique ((bio)chimique) en signal électronique (changement de I_D) [17].

La transconductance g_m est le paramètre du transistor qui est responsable de l'amplification du signal. La transconductance est égale au changement du courant sur le drain (I_D) divisé par la différence de tension sur la grille, $g_m = \Delta I_D / \Delta V_G$. Le volume du canal est le paramètre déterminant la transconductance. Quand l'épaisseur du film de polymère conducteur est plus importante, la transconductance augmente du fait d'un ΔI_D plus élevé [17].

2.1.2 Limitations de la bioélectronique

Les recherches dans le domaine de la bioélectronique sont actuellement limitées par les propriétés de surface des matériaux utilisés, matériaux qui se trouvent à l'interface électronique/biologique [2]. Dans le cas des biocapteurs, le point critique pour la sensibilité du dispositif est le transfert du signal entre la composante biologique et l'électrode [22]. Dans le cas des implants neuronaux, le facteur limitant leur efficacité et leur durée de vie est l'augmentation de la résistance sur la surface des électrodes [12-13, 23]. De manière générale, les matériaux utilisés dans ces dispositifs bioélectroniques doivent posséder des propriétés conductrices, pour permettre le transfert du signal, tout en étant suffisamment biocompatibles et stables pour être en contact avec le milieu biologique ou servir comme substrat pour l'immobilisation de biomolécules.

2.2 Les semi-conducteurs organiques

L'investigation des polymères conducteurs est liée au développement des systèmes électroniques flexibles ainsi qu'à la nécessité de trouver des semi-conducteurs qui ont une technologie de dépôt simplifiée. La perspective d'application de ces polymères pour la construction des dispositifs portatifs, capteurs et journaux électroniques rend ce domaine de recherche très prometteur [24]. De plus, les polymères conducteurs sont des composés organiques, ce qui est favorable à la conception d'un dispositif biocompatible.

2.2.1 Propriétés semi-conductrices

Les propriétés électroniques des polymères conducteurs sont déterminées par la configuration de leurs liaisons chimiques. Les atomes de carbone jouent le rôle principal dans la formation de la chaîne de tous les polymères conducteurs. Le carbone possède quatre électrons avec la configuration $2s2p$, qui déterminent sa valence. Quand une liaison covalente entre deux atomes de carbone est formée, les électrons de valence forment des orbitales moléculaires. Dans le cas des polymères conducteurs, chaque atome de carbone a trois orbitales hybrides sp^2 , qui donnent lieu à des liaisons covalentes de type σ par recouvrement axial d'orbitales, et une orbitale p_z , qui donne lieu à une liaison covalente π perpendiculaires au plan formés par les liaisons σ [25]. Le polymère conducteur avec la structure la plus simple possible est le polyacétylène (voir la Figure 2-2).

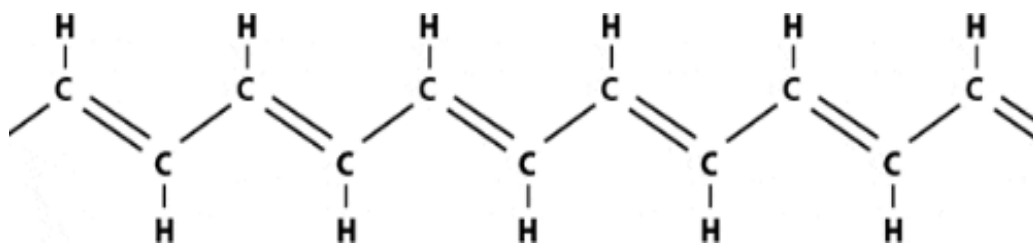


Figure 2-2 : La structure chimique du polyacétylène

Dans le polyacétylène les atomes de carbone forment trois liaisons σ avec deux autres atomes de carbone et un atome d'hydrogène. Ils forment également des liaisons π par les orbitales non-hybridées p_z . Avec l'augmentation du nombre d'atomes dans la chaîne du polymère, le chevauchement des orbitales p_z s'étend donnant lieu à une délocalisation des électrons π le long de la chaîne du polymère (voir la Figure 2-3). Le résultat est un système avec une alternance de liaisons simples (σ) et doubles (π), i.e. un système conjugué. Dans ce cas, à chaque orbitale liante σ ou π correspond une orbitale antiliante σ^* ou π^* [26]. Selon la terminologie des orbitales moléculaires, dans un polymère conducteur les bandes de valences correspondent à l'orbitale moléculaire π occupée (liante) la plus haute énergie (HOMO, highest occupied molecular orbital) et les bandes de conduction à l'orbitale moléculaire π^* non occupée (antiliante) à la plus basse énergie (LUMO, lowest unoccupied molecular orbital) (voir la Figure 2-3) [27].

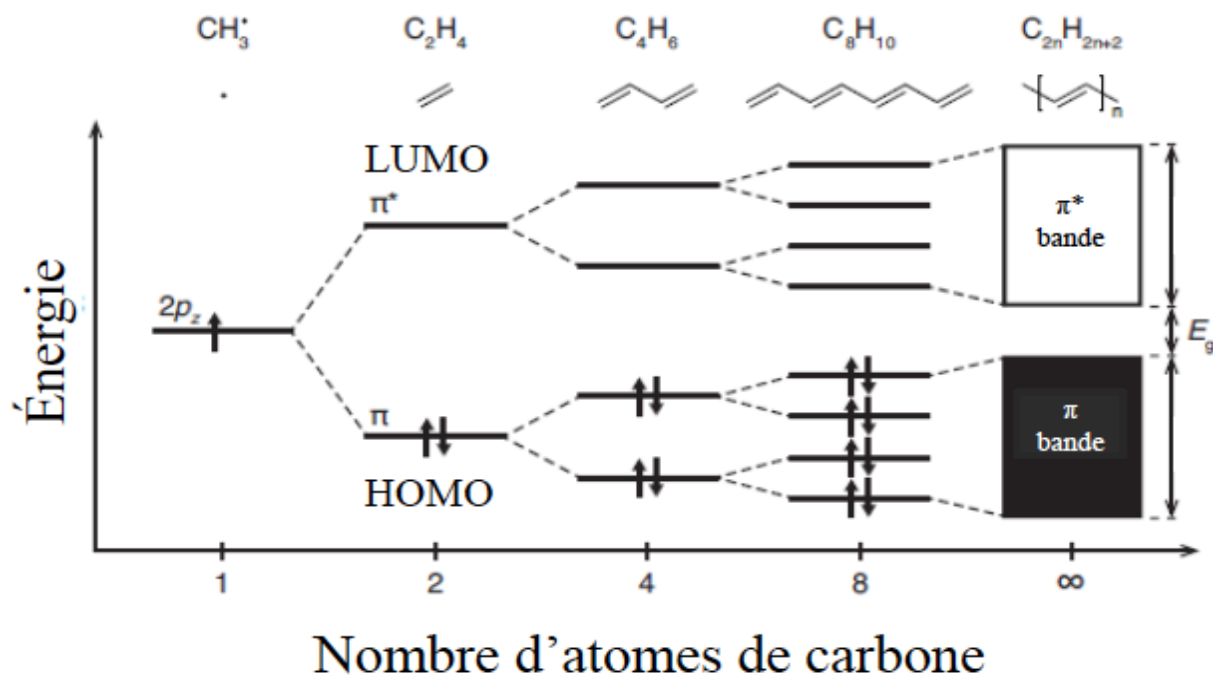


Figure 2-3 : La formation de bandes dans les molécules conjuguées

2.2.2. Dopage

L'augmentation de la conductivité des semi-conducteurs organiques est possible par la voie du dopage. Le mécanisme du dopage dans le cas des semi-conducteurs organiques est différent de celui qui est utilisé pour les semi-conducteurs inorganiques. Le dopage des semi-conducteurs inorganiques correspond à la substitution d'un atome du réseau par un atome de valence différente. Cet atome peut être un donneur (le dopage de type n) ou un accepteur (le dopage de type p) d'électrons. Dans ce cas, seulement quelques parties par million (ppm) de dopant suffisent pour améliorer largement la conductivité [28]. Dans le cas des semi-conducteurs organiques, le dopage est de type rédox (échange d'électrons entre le polymère conducteur et le dopant). On a alors apparition d'une charge positive ou négative, qui est compensée par les contre-ions du dopant [1]. Pour changer la conductivité d'un polymère conducteur on a besoin d'une quantité plus importante de dopant (plus de 10%) par rapport au dopage des semi-conducteurs inorganiques [29]. Le dopage de type p est préférable pour la plus grande partie des polymères conducteurs. Les ions, les petites molécules chargées ou les polyélectrolytes peuvent servir de dopants pour les semi-conducteurs organiques. Le dopant peut être incorporé pendant la synthèse chimique, l'électropolymérisation ou la polymérisation en phase vapeur. Par exemple,

les dopants plus utilisés du PEDOT sont le polystyrènesulfonate (PSS), le tosylate (TOS) et les petites molécules chargées négativement [30]. La charge positive du PEDOT est créée par le groupement sulfonate de la chaîne du PSS, qui prend un électron de la chaîne du PEDOT. Cette charge positive est distribuée parmi quelques monomères du PEDOT en créant le *polaron*. Pendant l'application de la tension, ce *polaron* se déplace le long de la chaîne du polymère conducteur assurant la conductivité électrique.

Dans les transistors électrochimiques la conductivité des polymères conducteurs est altérée par les ions du milieu, qui sont capables d'entrer et/ou de sortir du film de polymère. Il s'agit d'un « dopage électrochimique », qui prévoit la compensation de la charge électronique par les électrodes en métal [1, 31].

2.2.3 Fabrication

La méthode de l'induction centrifuge (*spin coating*) est la plus utilisée dans le cas de la fabrication des couches minces de polymères conducteurs sur un substrat non conducteur (verre, céramique). Elle est la technique de dépôt utilisée dans ce travail.

Pour le dépôt des polymères conjugués sur le substrat conducteur, la méthode de la polymérisation électrochimique, ou électropolymérisation, est le plus souvent utilisée. Elle consiste en la polymérisation à l'électrode d'un monomère en solution.

Les électrodes pour les dispositifs électroniques organiques sont obtenues par microfabrication. La microfabrication est un ensemble de procédés: photolithographie, dépôts de couches minces, gravure, galvanoplastie, lithographie douce, *etc.* Comme la fabrication des électrodes n'est pas le sujet de ce travail, pour avoir plus d'informations par rapport à la technique de microfabrication et les architectures des dispositifs possibles, veuillez consulter la référence [32].

2.3 Utilisation des polymères conducteurs pour la bioelectronique

Les polymères conducteurs les plus utilisés sous forme de couches minces dans le domaine biomédical sont: le poly(pyrrole), le poly(aniline) et le poly(thiophène) (voir Figure 2-4).

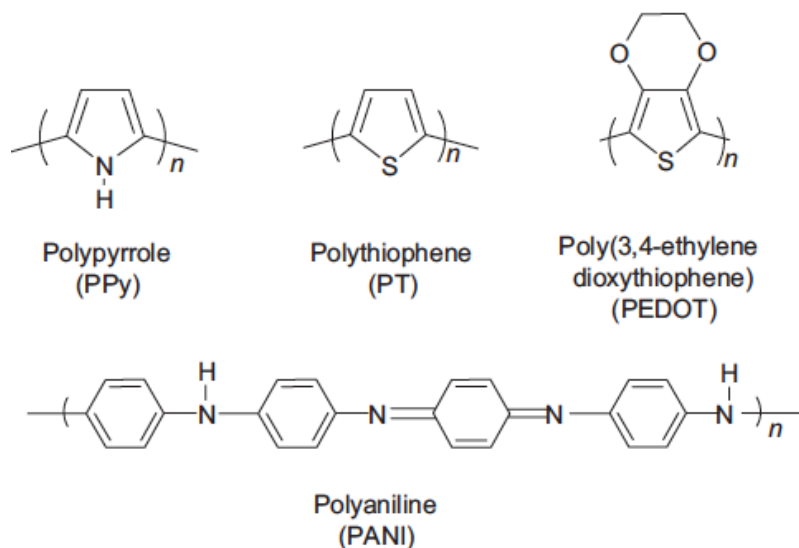


Figure 2-4 : La structure chimique des polymères conducteurs [3]

La conductivité des couches minces de polymères conducteurs peut varier dépendamment de la méthode de dépôt, du type de dopant utilisé, du pH, du potentiel appliqué, et de l'environnement des mesures. Les méthodes pour la déposition de polymères conducteurs sont simples, rapides et moins coûteuses que la procédure de microfabrication applicable aux semi-conducteurs inorganiques [1]. C'est pourquoi pendant quelques dizaines d'années ils ont été parmi les matériaux les plus intéressants dans le domaine de la fabrication des biocapteurs électrochimiques. Les capteurs à base de polymère conducteur sont sensibles et donnent les signaux de haute qualité. Ils permettent l'obtention de surfaces à impédance moins élevée et la transduction du courant ionique du milieu en un courant électronique [3, 33]. Ceci est rendu possible grâce à la conductivité électrique et au transport de charge des polymères conducteurs.

2.3.1 Poly(pyrrole)

Le poly(pyrrole) est largement utilisé pour le développement de biocapteurs, d'implants neuronaux et d'électrodes ainsi que pour augmenter la biocompatibilité des matériaux [3]. Les polymères conducteurs sont en effet compatibles avec des biomolécules dans les solutions aqueuses de pH neutre [34]. Plusieurs enzymes : la *cholesterolesterase*, les *cholesteroloxydases* et *peroxydase* ont été immobilisées sur un film PANI par réticulation au glutaraldéhyde. L'immobilisation de *glucose oxydase* et de viologène sur la couche de poly(pyrrole) en utilisant le greffage avec l'acide acrylique a été rapporté. Pour ce faire, le film de poly(pyrrole) dans la

solution d'acide acrylique a été traité à la lumière UV. Dans ces conditions, les résidus d'acide acrylique interagissent avec la surface du polymère conducteur, après quoi les groupements de carboxyle sont disponibles pour l'immobilisation d'enzyme [3].

Il existe plusieurs exemples d'utilisation du poly(pyrrole) comme substrat biomimétique. Les substrats dits 'biomimétiques' sont des films de polymère qui sont capables de réagir de manière spécifique avec certaines molécules. Par exemple, un capteur piézoélectrique à base de poly(pyrrole) a été mis au point pour la détection de caféine. La technique de l'impression moléculaire a permis de polymériser le pyrrole en présence de caféine puis de retirer ces molécules par lavage, ce qui crée des sites tridimensionnels capables de reconnaître les molécules de caféine [35].

Le poly(pyrrole) a été aussi utilisé comme additif dans la création de biomatrices pour les biocapteurs. A cet effet, l'électropolymérisation a été effectuée dans les pores d'un hydrogel avec les molécules d'enzymes immobilisées. Cet environnement possède deux avantages: il est hydrophile et il dispose de propriétés conductrices [3]. Le gel de poly(pyrrole)-alginate avec des cellules algales de *Chlorella vulgaris* immobilisées a été utilisé pour la détection de l'activité de l'enzyme *alkaline phosphatase*. Dans ce cas, la composante d'alginate a augmenté la biocompatibilité du milieu et la stabilité du biocapteur [36].

Cependant l'oxydation du poly(pyrrole) est souvent irréversible. Pour assurer la stabilité et la reproductibilité du signal du biocapteur ou encore réduire l'impédance de la surface des électrodes neuronales, il faut trouver un polymère conducteur plus stable.

2.3.2 Le poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT)

Les études récentes montrent que le PEDOT est plus stable que le poly(pyrrole) pendant les cycles d'oxydo-réduction répétitifs et peut parfois remplacer ce dernier [3]. De plus, le PEDOT est reconnu comme matériau transparent et très stable lorsque sous forme de couches minces oxydées [37, 38].

Une solution d'acide poly-(styrenesulfonique) (PSS) dans l'eau est souvent utilisée comme milieu pour la synthèse du PEDOT à partir de son monomère [39]. Le PEDOT initialement insoluble dans l'eau forme avec le PSS une suspension assez stable en milieu aqueux [40]. Le PEDOT:PSS (Figure 2-5) est un conducteur de type p, qui est biocompatible et perméable aux ions [1]. Les

composants du film de PEDOT:PSS sont liés par des interactions de van der Waals, qui sont beaucoup plus faibles que la structure cristalline du silicium. Donc en comparaison avec le silicium, le PEDOT:PSS est un matériau qui peut être facilement fonctionnalisé. Ainsi, il est possible de moduler facilement ses propriétés de surface telles que la conductivité, la biocompatibilité et les propriétés mécaniques [3]. La surface de polymères conducteurs est chimiquement stable à l'air ou lorsqu'en contact direct avec la solution d'électrolyte ou avec le milieu biologique, ce qui est un grand avantage pour son utilisation en bioélectronique. Les semi-conducteurs organiques permettent le transport d'ions entre les composantes biologique et électronique à température ambiante. En plus, avec le temps, le film de polymère est capable d'améliorer cet échange d'ions grâce à l'adsorption d'eau [1, 2].

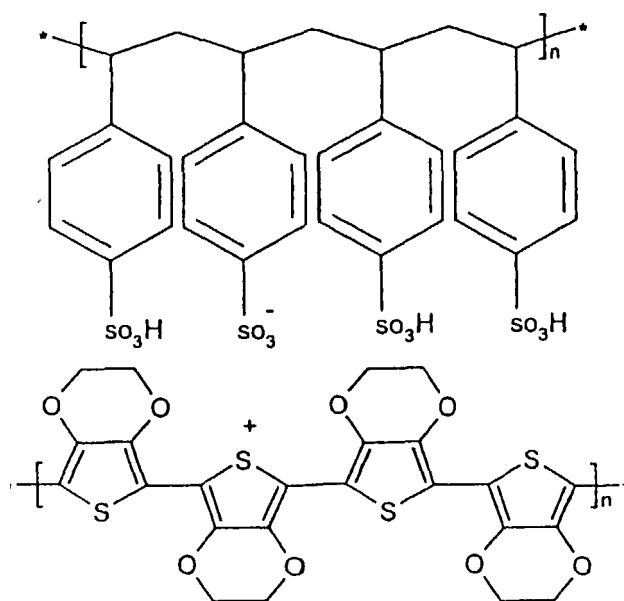


Figure 2-5 : La structure chimique du sel macromoléculaire – PEDOT:PSS [1]

Le PEDOT:PSS est déjà largement utilisé dans la fabrication des diodes lumineuses [41], des transistors électrochimiques [16, 17] ainsi que des cellules photovoltaïques [42]. Tous ces dispositifs sont économiques et reconnus pour leurs propriétés mécaniques particulières, notamment la possibilité d'utiliser un substrat flexible. Les transistors électrochimiques nécessitent un électrolyte pour connecter la grille avec le canal [43]. Les transistors électrochimiques sont décrits dans la littérature comme les transducteurs pour développement des biocapteurs [44] et le support pour la culture cellulaire [45]. Dans le cas d'exploitation des OECTs pour le développement des biocapteurs, la substance à analyser est exposée directement

avec la surface active du canal du transistor. Ensuite, la réaction chimique qui engage les molécules d'analyte, change le courant qui passe entre la source et le drain. Potentiellement, ce processus peut influencer la densité de la charge près de la surface du canal, la mobilité de la charge dans le film de polymère conducteur, la facilitée de l'injection de la charge dans le canal de OEET, le potentiel de la grille *etc* [44]. Sur ce principe, fonctionnent déjà les prototypes laboratoire des biocapteurs pour la détection du glucose [46], de l'eau oxygénée [47], d'anticorps [48] *etc*. En plus des biocapteurs basés sur les OEETs, d'autres application du PEDOT:PSS existent aujourd'hui dans le domaine biomédical. Comme exemple, les électrodes recouvertes d'un film de PEDOT:PSS ont une biocompatibilité plus élevée que les mêmes électrodes dont la surface est métallique [3]. Toutes les applications biomédicales, telles que la création d'un biocapteur ou le développement d'une surface biocompatible pour les électrodes implantables, exigent le développement de la fonctionnalisation du PEDOT:PSS sans pertes de ses qualités conductrices et de sa stabilité mécanique. Dans ces cas, le but est de capturer les molécules sélectives capables de détecter la présence d'analyte ou de greffer les groupements/molécules actives, qui peuvent favoriser la biocompatibilité [34].

2.4 Formation de films conducteurs de PEDOT:PSS

2.4.1 Traitement thermique

Selon la littérature la température utilisée pendant le séchage du film de PEDOT:PSS peut influencer la conductivité. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que pendant le procédé du chauffage la conformation des particules du PEDOT:PSS change en quelques étapes [40]. Les oligomères du PEDOT sont constitués de 5-15 monomères et sont attachés avec les interactions électrostatiques à la chaîne de polymère isolant PSS. Cet ensemble forme des particules d'environ 50 nm de diamètre dont la surface présente du PSS, qui est hydrophile. Les chaînes conductrices du PEDOT, qui sont de nature hydrophobe, sont localisées au centre de la particule. La conductivité pour cette conformation du PEDOT:PSS dépend du transport des trous dans la chaîne du PEDOT ainsi que de la possibilité qu'ont ces trous de sauter entre les particules de PEDOT:PSS [24]. Pendant la première étape du chauffage les chaînes du PSS sont emmêlées et liées aux particules du PEDOT par les interactions électrostatiques. L'étape de chauffage peut partiellement casser les liaisons ioniques entre les chaînes du PEDOT et du PSS. Comme résultat,

la charge négative du PSS reste sans compensation et peut repousser les chaînes du polymère, qui s'alignent. À partir de ce moment les molécules du PEDOT commencent à s'accumuler entre les chaînes du PSS en formant des grains conducteurs. Cette conformation des polymères est la plus conductrice tant que le transfert de la charge entre les agglomérats des molécules du PEDOT est plus facile qu'entre les molécules séparées. Par contre, sous l'influence permanente des hautes températures les grains conducteurs peuvent se dégrader; ce processus peut être considéré comme de la corrosion [40].

2.4.2 « Dopage secondaire »

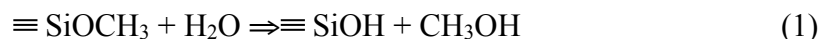
En plus d'un dopage primaire avec les polyanions, la littérature fait aussi état d'un phénomène d'augmentation de la conductivité après le « dopage secondaire » avec des substances relativement inertes comme le glycérol [49], l'éthylène glycol [50], le sorbitol [39], le (poly)-éthylène glycol [4], etc. Cette augmentation de la conductivité peut atteindre plusieurs ordres de grandeur et est très persistante même après l'évaporation complète du « dopant secondaire » [51]. Cependant la nature de ce phénomène n'est pas assez comprise. Kim et collègues ont démontré que l'addition du « dopant secondaire » n'a aucune influence sur le niveau du dopage [52]. Les auteurs expliquent l'augmentation de la conductivité à travers la réduction des interactions coulombiennes entre les chaînes du PEDOT et du PSS en présence du solvant polaire. Une autre étude a utilisé la spectroscopie Raman afin d'examiner les changements de conformation des chaînes du PEDOT en présence d'éthylène glycol, de mesoerythritol et de tetrahydroxybutane [53]. Ces changements sont déterminés par l'interaction entre les dipôles du « dopant secondaire » et les molécules du PEDOT chargées positivement. Timpanaro et collègues ont constaté que l'addition du sorbitol conduit à une augmentation de la taille apparente des particules riches en PEDOT [39]. Crispin et al. ont observé des changements de la morphologie des surfaces pour les films du PEDOT:PSS avec l'éthylène glycol et le sorbitol ajoutés, en utilisant la spectrométrie photoélectronique X. Plus tard cette équipe a développé un modèle qui implique une augmentation de la surface efficace riche en particules conductrices du PEDOT en présence de diéthylène glycol [24]. Les auteurs ont émis l'hypothèse que ce phénomène pourrait servir à améliorer l'efficacité de l'injection de la charge dans le film. Sans le « dopant secondaire » les grains de PEDOT sont couverts par une couche mince du PSS. Après l'ajout du diéthylène glycol ces grains conducteurs commencent à former un réseau tridimensionnel alors

que la séparation du PSS forme des régions isolantes. Les molécules de diéthylène glycol dans la suspension du PEDOT:PSS restent dans la phase aqueuse. Pendant le séchage du film, l'évaporation complète de l'eau s'effectue à des températures plus basses que l'évaporation du « dopant secondaire ». Dans ce cas, la concentration locale de ce dopant est donc plus élevée que dans le film mouillé. Les zones riches en « dopant secondaire » font gonfler les particules riches en PSS, il en résulte que les interactions électrostatiques entre les deux polymères dans le film sont écartées. Après le séchage du film, le PSS en excès reste collé au PEDOT:PSS [24]. De plus Kim et al. ont démontré que les films de PEDOT:PSS fabriqués en utilisant des solvants dont la constante diélectrique est élevée ont une meilleure conductivité [52]. En résumé, les propriétés importantes pour le « dopant secondaire » sont: une bonne solubilité dans l'eau, un haut point d'ébullition et une constante diélectrique élevée.

2.4.3 Stabilisation des films du PEDOT par pontage covalent en utilisant du 3-glycidoxypropyltriméthoxysilane (GOPS)

Dans la littérature, les films de PEDOT obtenus par la méthode d'électropolymérisation sont décrits comme assez stables dans les solutions aqueuses [54, 55]. Par contre l'utilisation du produit commercial - la suspension aqueuse de PEDOT:PSS - exige parfois une stabilisation additionnelle. En effet, une diminution de l'épaisseur du film a été observée dans le cas où le film de PEDOT:PSS est incubé dans l'eau [56]. Afin d'améliorer l'adhésion du film sur la surface de substrat, l'hydrophobicité de la surface de déposition est un facteur très important. En même temps, dans la littérature, le GOPS (Figure 2-6) est souvent décrit comme un agent 'cross-linker' capable de stabiliser le film en le rendant insoluble dans l'eau [57, 58]. Le mécanisme impliqué dans l'interaction entre le GOPS et les composants du film de polymère conducteur n'est pas bien expliqué. Il n'en demeure pas moins que le GOPS est utilisé comme un agent de fonctionnalisation de surface et comme 'cross-linker' pour l'immobilisation des biomolécules [59]. Dans ce cas, l'immobilisation des molécules est basée sur l'activation de la surface par le GOPS et l'introduction d'une liaison covalente entre le cycle époxy et les substances contenant certains groupements fonctionnels. Par exemple, le verre expose des groupements hydroxyles à sa surface; ces derniers sont capables de remplacer les groupements -OH du silane dans la molécule de GOPS en formant une liaison -Si-O-Si-. Le cycle époxy, qui est alors exposé à la

surface du verre peut réagir avec les groupements amines, hydroxyles, thiols et carboxyles des biomolécule en formant des amines, éthers, thioéthers et esters respectivement [60]. La polymérisation du GOPS se produit en présence d'eau et conduit à l'obtention d'un film multicouche de GOPS [61]. En présence d'eau, l'atome de silicium perd facilement le groupement méthoxy de la façon suivant:



Comme produits de la réaction (1), on obtient le silanol et méthanol. Dans ces conditions les silanols peuvent facilement réagir entre eux ou avec les groupements méthoxy en formant le siloxane ($-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$) [60-62].

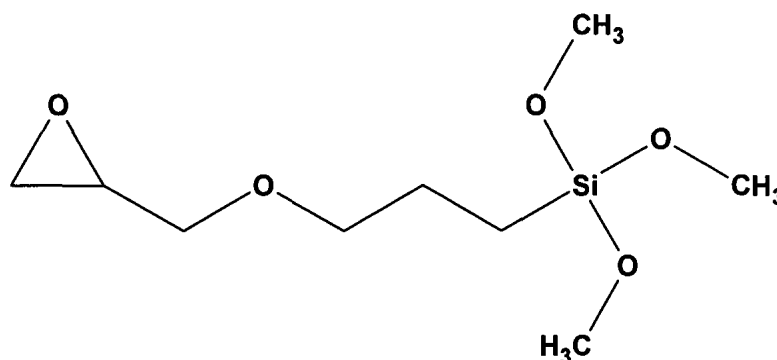


Figure 2-6 : La structure chimique du GOPS

La stabilisation des films de PEDOT par ajout de GOPS dans la composition de la solution avant l'enduction centrifuge peut avoir un avantage. Les molécules du PEDOT et PSS ne possèdent pas de sites d'interaction avec le GOPS. On suppose que l'interaction du GOPS pendant le séchage du film avec le glycérol doit limiter l'évaporation complète de ce composant. De plus, la polymérisation du GOPS peut influencer la conformation du complexe PEDOT:PSS dans le film, il n'est cependant pas envisagé que la conductivité finale du film soit grandement affectée tant que la structure chimique du PEDOT reste constante.

2.5 Biofonctionnalisation des polymères conducteurs

À ce jour beaucoup d'efforts ont été investis afin de contrôler la biocompatibilité des polymères conducteurs. Plusieurs molécules bioactives ont été incorporées dans les films des polymères conducteurs pour améliorer la prolifération cellulaire sur ces surfaces [63, 64]. Il faut cependant trouver un compromis entre les qualités électrochimiques, mécaniques, biologiques et de

biocompatibilité du film obtenu pour la création d'une surface multifonctionnelle. Les stratégies visant au recrutement de biomolécules sont nombreuses, en voici quelques exemples.

2.5.1 Modification chimique du monomère

La création d'une liaison covalente entre le film de polymère et les biomolécules est préférable afin d'obtenir un système stable et contrôlable [65]. Malheureusement les polymères conducteurs les plus utilisés pour la recherche biomédicale (polypyrrole et PEDOT) ne possèdent pas de groupements fonctionnels utilisables pour créer de telles liaisons [3]. Par contre, la synthèse des polymères conducteurs à partir de monomères fonctionnalisés est devenue possible [65-67]. Par exemple, des films de polypyrrole et de PEDOT fonctionnalisés avec des groupements COOH ont été synthétisés à partir des monomères suivants: le N-(2-carboxyethyl)pyrrole [67], l'acide pyrrole- α -carboxylique [68], et le 3,4-(1-carboxyethylenedioxy)thiophene [69]. Cosnier *et al.* ont développé plusieurs modèles d'immunocapteurs basés sur l'électropolymérisation de résidus de pyrrole biotinylé [66, 70]. Lee *et al.* ont fonctionnalisé le polypyrrole avec les groupements des carboxyles pour effectuer le greffage des peptides. Le polypyrrole fonctionnalisé par les résidus de l'acide acétique a été utilisé pour le greffage de peptides reconnus pour favoriser l'adhésion cellulaire (motif RGD). Les tests de culture cellulaire sur la surface de film modifiée ont démontré une meilleure adhésion cellulaire pour le polymère fonctionnalisé par rapport aux films de polypyrrole non-modifié. Par contre, la conductivité du film a été influencée de façon négative par l'interruption des liaisons conjuguées causée par le changement de la structure chimique. Les niveaux de conductivité rapportés par les auteurs ont été qualifiés d'acceptables pour la culture cellulaire et le génie tissulaire, mais pas assez élevés pour les recherches dans le domaine de bioélectronique [67]. C'est pourquoi les travaux subséquents de Lee *et al.* se basent sur des monomères de polypyrrole fonctionnalisé avec un groupement carboxyle dans la position α pour la co-électropolymérisation sur la couche de polypyrrole. Dans ce cas, la conductivité est assez haute et la surface du film présente des groupements réactionnels [68]. La technique de copolymérisation a été appliquée par Povlich *et al.* pour obtenir un film de PEDOT fonctionnalisé avec les groupements COOH. Le film a été obtenu par l'électropolymérisation d'un mélange de monomères fonctionnalisés et non-modifiés. La biocompatibilité du PEDOT-COOH fonctionnalisé avec des peptides a ainsi été améliorée, mais les propriétés électrochimiques du film sont tout de même moins bonnes que celles du contrôle [69]. Le polyterthiophene obtenu à

partir de monomères fonctionnalisés avec des groupements carboxyles possède une conductivité suffisante pour les applications dans le domaine du génie tissulaire [65]. Les valeurs de la conductivité pour certains polymères modifiés chimiquement sont présentées dans le tableau 2-1.

Tableau 2-1 : La conductivité des polymères conducteurs modifiés chimiquement

Polymère conducteur	Conductivité, S x cm ⁻¹
PPy-COOH [64]	4,7x10 ⁻²
PPy- α -COOH polymérisé sur le film de PPy[65]	2,8
Poly(3'-carboxyl-2,2':5',2'')-terthiophene [62]	1,2

La conductivité des polymères conducteurs modifiés chimiquement est souvent de l'ordre de quelques S cm⁻¹. En même temps, le développement du substrat pour l'application dans le domaine des biocapteurs, des électrodes bioactives et des autres secteurs de la bioélectronique exige d'avoir une meilleure conductivité. Comme approche possible, le dopage des polymères conducteurs grâce à des macromolécules contenant des groupements fonctionnels est une avenue prometteuse [4, 71].

2.5.2 Encapsulation

Une méthode courante est l'encapsulation des molécules pendant le procédé d'électropolymérisation. La biofonctionnalisation par encapsulation est très pratique pour contrôler l'épaisseur du film et la bioactivité de la matrice. De plus, la surface après le dépôt est souvent bien définie. Cette approche est cependant coûteuse car elle consomme beaucoup de matériel [3].

Par exemple, Richardson *et al.* ont décrit la fonctionnalisation de films de polypyrrole avec la neurotrophine-3 pour la culture des cellules neuronales [72]. Green *et al.* ont de leur côté examiné l'influence de la co-incorporation de deux types de peptides dérivant de la laminine et du facteur de croissance neurotrophique sur les propriétés du film de PEDOT. Le dopage du PEDOT par le paratoluènesulfonate (pTS) servait de contrôle positif. L'incorporation des biomolécules a été effectuée pendant le dépôt du polymère conducteur par le procédé de l'électropolymérisation. Les résultats obtenus ont démontré que l'utilisation des peptides pour le dopage primaire avait une influence négative sur les propriétés électrochimiques. Par contre, le film de PEDOT:pTS avec le

facteur de croissance incorporé a démontré les propriétés électrochimiques similaires au PEDOT:pTS original. La comparaison de la qualité d'adhésion des films de PEDOT avec le dopant organique (pTS) et biologique (les peptides dérivant de la laminine) a permis de conclure que le film ayant la composante biologique est plus fragile et moins adhérent. Les essais de culture cellulaire sur la surface des films fonctionnalisés avec les peptides issus de la laminine et du facteur de croissance ont démontré une amélioration de l'adhésion cellulaire, cependant aucune amélioration de la prolifération n'a pas été observée [8]. A partir des résultats décrits dans la littérature, il est possible de conclure que les biomolécules sont stables dans le film [7, 8]. Les protéines incorporées pendant l'électropolymérisation restent bioactives [8, 3].

Une autre stratégie est d'utiliser des polyanions biologiques tels que des polysaccharides et des peptides comme dopants primaires du PEDOT et du polypyrrole [7, 8]. L'utilisation du dextrane sulfate comme dopant pour les polymères conducteurs a été rapportée pour les dérivés de la polyaniline et du polypyrrole [5, 6]. Aussi, deux études décrivent l'utilisation de la chondroïtine sulfate et de l'acide polyglutamique comme dopants du polypyrrole. De plus, les groupements carboxyles de ces molécules ont pu être utilisés pour le greffage de collagène et de laminine, respectivement [7, 71]. L'étude des propriétés électrochimiques du film de polypyrrole dopé avec la chondroïtine sulfate a démontré, qu'une minorité des carboxyles de la chondroïtine sulfate intercalée était impliquée dans le greffage de collagène [71]. Le polypyrrole fonctionnalisé avec le collagène et la laminine ont favorisé l'adhésion et la prolifération des cellules en culture [71, 73]. Mais les films qui contiennent un dopant organique sont caractérisés comme plus stables et résistants à l'influence mécanique.

C'est pourquoi l'idée de créer un film dopé par une substance organique et fonctionnalisé avec une biomolécule devient intéressante. Dans ce type de stratégies, la structure du polymère conducteur reste constante, la conductivité n'est pas influencée et en plus on est capable d'améliorer la biocompatibilité de la surface et d'immobiliser des biomolécules. Dans ce travail, nous allons présenter la possibilité de fonctionnaliser un film de PEDOT:PSS avec des groupements carboxyles, par l'intercalation du dextrane carboxyméthylé. La réactivité des groupements fonctionnels exposés sur la surface de film sera évaluée par l'efficacité du greffage d'une protéine-modèle – un anticorps.

2.6 Le dextrane carboxyméthylé

Le dextrane est un polysaccharide très utilisé dans les domaines pharmaceutique et médical entre autre à cause de sa biocompatibilité, de sa bonne solubilité dans l'eau et de son caractère biodégradable. Il existe une grande variété de produits commerciaux dérivés du dextrane [74]. Ce polysaccharide est naturellement produit par certaines espèces de bactéries. La chaîne du dextrane est composée de résidus de D-glucose sous forme pyranose connectés entre eux par des liaisons α -(1 \Rightarrow 6). Dépendamment de son l'origine, la chaîne de dextrane peut avoir différents degrés de ramification. Dans le cas des ramifications, les résidus peuvent être liés par liaison α -(1 \Rightarrow 2), α -(1 \Rightarrow 3) et α -(1 \Rightarrow 4).

Le dextrane est un homopolymère de D-glucose sans aucune l'intercalation d'autres types de résidus dans la chaîne. Cette homogénéité au sein de la structure du dextrane, la disponibilité de chaînes ayant une masse moléculaire variée et les différents types de ramification rendent ce polymère très intéressant pour la fonctionnalisation chimique. Le dextrane carboxyméthylé quant à lui est un produit de la réaction du dextrane avec l'acide monochloroacétique dans des conditions extrêmement basiques (voir Figure 2-7). Dépendamment des conditions de carboxyméthylation (concentration de NaOH, température, temps de réaction) il est possible de varier le degré de carboxyméthylation [75]. Pendant la carboxyméthylation la dégradation des chaînes du dextrane n'a pas été observée: la masse moléculaire de produit est toujours un peu plus élevée que le substrat [76, 77]. L'investigation de la structure du dextrane modifié ou non est possible par la voie de dégradation enzymatique suivie d'une analyse par chromatographie sur couche mince, par chromatographie en phase liquide à haute performance et par spectroscopie RMN ^{13}C et ^1H [78, 79].

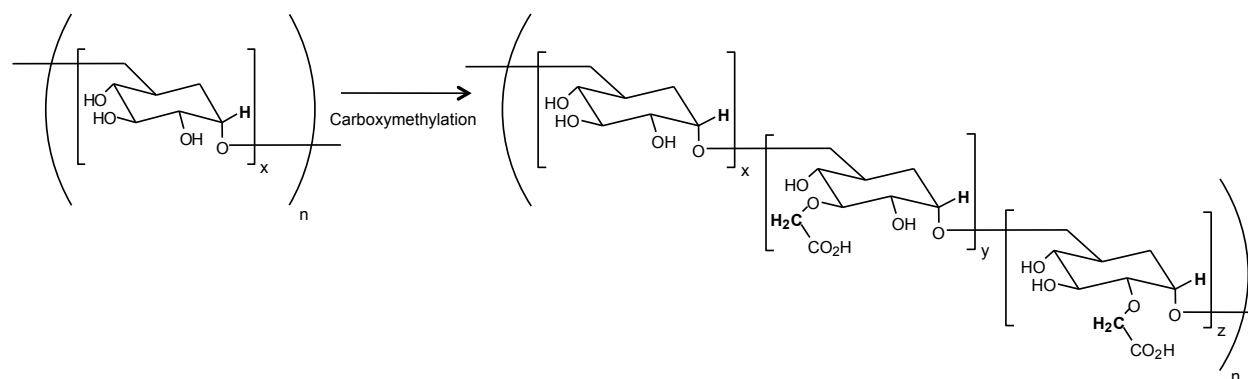


Figure 2-7 : Carboxyméthylation du dextrane

Le dextrane carboxyméthylé est très utilisé dans le domaine de la recherche biomédicale. Les conjugués DCM-protéines sont utilisés pour la création de molécules chimères, qui sont des allergènes plus faibles que les protéines pures correspondantes. Les chaînes du polysaccharide dans ce cas sont capables de cacher les épitopes de la protéine responsables du développement de la réaction allergique [80, 81]. La formation des liaisons covalentes entre les molécules de DCM et les protéines est favorisée par la capacité réduite d'interactions non-spécifiques. Cet avantage justifie aussi l'utilisation du dextrane pour d'autres applications: comme substrat d'immobilisation des biomolécules (surtout les protéines) dans les biocapteurs [82, 83]. Ainsi, les plusieurs puces commercialisées pour le système Biacore ont une surface couverte d'une monocouche de DCM. La disponibilité des molécules de dextrane ayant une taille et un degré de carboxyméthylation différent a permis de développer plusieurs types des puces pour des applications variées [84].

Dans le domaine du génie tissulaire le DCM est une bonne alternative au polyéthylène glycol (PEG) – le polymère le plus utilisé pour prévenir l'adhésion des protéines et cellules [85]. Monchaux et Vermette ont démontré qu'en optimisant la procédure de greffage du DCM sur la surface, aussi que le poids moléculaire et le degré de carboxyméthylation du polymère, il est possible créer un revêtement qui élimine la majorité des interactions non-spécifiques, et ce, d'une manière aussi efficace que le PEG. L'adhésion des protéines sur la surface recouverte de DCM a été minimisée par la diminution de la densité de charge, l'augmentation de la densité et la flexibilité de la couche et grâce à haut niveau d'hydratation. L'intérêt de remplacer l'utilisation du PEG par le DCM est lié à son prix moins élevé et à son origine naturelle. En plus le DCM contient les groupements carboxyles, qui donnent la possibilité de greffer de manière covalente des molécules, à leur tour capables de promouvoir une interaction particulière avec des cellules. Cette surface biofonctionnalisée peut servir au développement de substrats intelligents, qui vont stimuler la prolifération locale de certains types cellulaires dépendamment de la distribution sur la surface de la composante bioactive greffée [85, 86].

2.7 Les techniques d'immobilisation des anticorps

Un anticorps est une protéine du système immunitaire dont le rôle est de détecter et de neutraliser les agents pathogènes de manière spécifique. La structure des anticorps – et particulièrement ceux appartenant à la classe des immunoglobulines G (IgG) – est très bien étudiée, et le schéma de la structure moléculaire d'une IgG est présenté sur la Figure 2-8 [87]. Les IgG sont des

glycoprotéines formées de quatre chaînes polypeptidiques: deux chaînes lourdes et deux chaînes légères. Ces chaînes forment une structure en Y. Chaque chaîne légère est constituée d'un domaine constant et d'un domaine variable; les chaînes lourdes sont composées d'un fragment variable et de 3 ou 4 fragments constants [88].

L'immobilisation des molécules biologiques peut influencer leur spécificité et leur stabilité. Plusieurs méthodes d'immobilisation des anticorps sont basées sur les connaissances de la biologie moléculaire et de la biochimie. Aujourd'hui, les techniques d'immobilisation des biomolécules sont divisées en deux grands groupes: 1) avec orientation aléatoire ou 2) avec orientation déterminée.

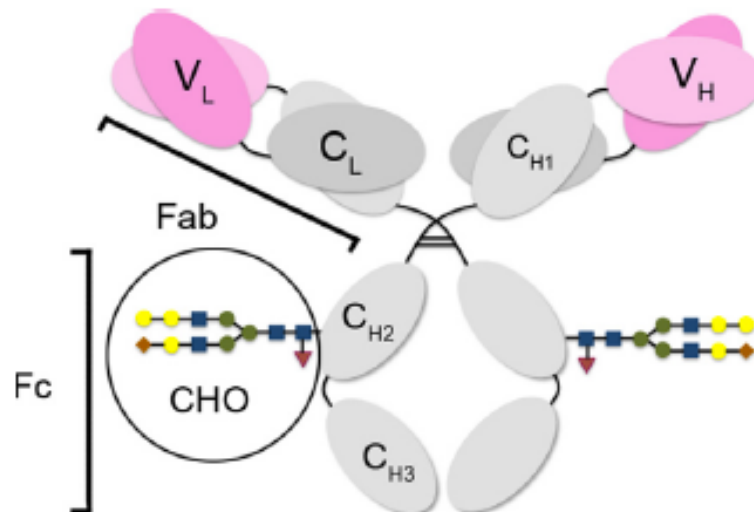


Figure 2-8 : Schéma général de la structure d'un anticorps de type IgG. Fab – le fragment, qui est capable de lier l'antigène; Fc – le fragment cristallisable; CHO – les résidus glucidiques; VL – le domaine variable de la chaîne légère; VH – le domaine variable de la chaîne lourde; CL – le domaine constant de la chaîne légère; CH1, CH2, CH3 – trois domaines constants de la chaîne lourde [87]

Chaque type d'immobilisation a ses avantages et ses défauts. Par exemple, toutes les techniques d'immobilisation aléatoire sont simples, moins coûteuses et rapides [89]. Par contre, une partie des molécules est immobilisée avec une orientation sous-optimale par rapport à la surface. A cause de cela, certains anticorps ne sont plus capables de réagir avec l'antigène. L'immobilisation orientée des anticorps permet de limiter les pertes de l'activité biologique des molécules, mais le

coût de fabrication est plus élevé, la procédure de greffage complexe est parfois longue [90]. De plus, pour donner une bonne orientation aux molécules, on utilise souvent l'interaction avec d'autres protéines immobilisées (par exemple, les protéines bactériennes A et G). Dans ce cas, nous avons une même nature d'interaction (affinité biologique) entre l'anticorps et l'antigène et entre l'anticorps et l'agent d'immobilisation. Cette situation pose le problème de la régénération de la surface active après l'interaction avec l'antigène, notamment dans le cas des surfaces de biocapteur sur lesquelles des anticorps sont immobilisés. D'habitude, pour la régénération, il est possible d'utiliser des solutions de DMSO, de tampon HCl-glycine, pH-2.5 [91], de carbamide [89], *etc.* Toutes ces substances abaissent l'affinité entre protéines; cependant les anticorps peuvent être décrochés pendant la procédure de régénération [92].

L'immobilisation des anticorps est exploitée pour le développement des biocapteurs. Dans ce cas, le DCM est souvent utilisé comme substrat d'immobilisation. Une approche par la chimie carbodiimide est la plus souvent utilisée pour le greffage des molécules *via* les groupements carboxyles. Cette voie chimique permet la formation de la liaison amide entre le groupement aminé d'un anticorps et le carboxyle du DCM, après activation des groupements carboxyles par le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide. Cette technique d'immobilisation aléatoire covalente est souvent appliquée pour l'immobilisation des anticorps sur les puces des biocapteurs [93].

2.8 La méthode immuno-enzymatique ou Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

La méthode immuno-enzymatique ELISA est basée sur la spécificité d'anticorps et l'amplification du signal grâce à une enzyme, ce qui rend l'anticorps ou l'antigène conjugué avec l'enzyme la composante la plus importante du test [94]. Les enzymes les plus utilisés pour les ELISA sont la peroxydase de raifort (HRP), la phosphatase alcaline et parfois la glucose oxydase. Le type d'ELISA le plus utilisé est "l'ELISA-sandwich" qui est illustré à la Figure 2-9. Ce test est normalement conçu pour quantifier les molécules d'antigène (molécule verte dans la Figure 2-9). Cependant si la concentration de ces dernières est constante et connue, l'ELISA peut servir pour l'analyse de la concentration d'anticorps couplé à la surface (molécule bleue).

Les étapes d'analyse de la méthode immuno-enzymatique ELISA-sandwich:

- 1) l'adsorption des anticorps de capture sur la surface des puits de la plaque ELISA;
- 2) le rinçage avec du tampon phosphate salin, qui contient du détergent;

- 3) le blocage de la surface en utilisant une solution de 1% d'albumine sérique bovine dans le tampon phosphate salin;
- 4) après un rinçage identique à l'étape 2, l'incubation pendant 1 heure avec les solutions d'antigène standards et une série des dilutions des échantillons;
- 5) après un rinçage supplémentaire, l'incubation pendant 1h avec la solution diluée des anticorps de détection conjugués avec l'enzyme (par exemple HRP);
- 6) le rinçage, l'incubation avec le substrat de l'enzyme et la lecture spectrophotométrique de la plaque [95].

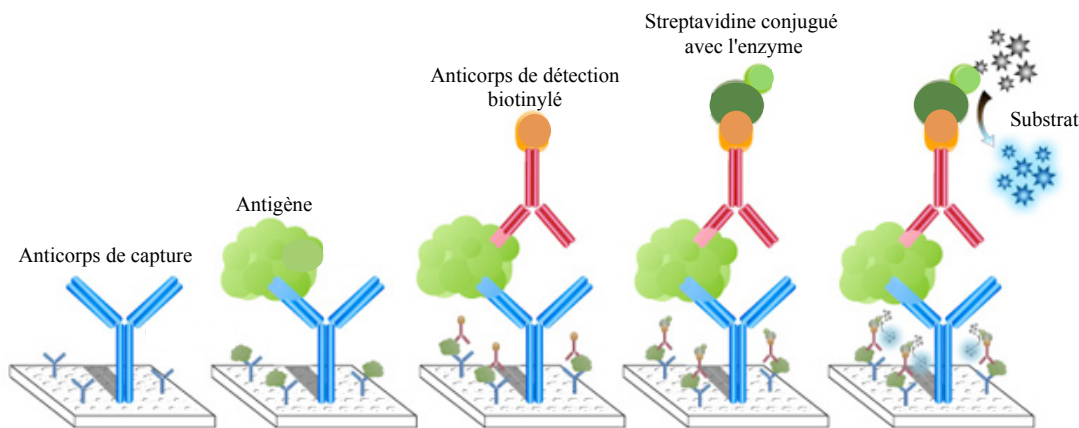


Figure 2-9 : Le schéma de la méthode immuno-enzymatique ELISA-sandwich

En plus de l'ELISA de type "sandwich", il existe d'autres variations comme l'ELISA direct, indirect et compétitif. Aujourd'hui l'ELISA est une méthode d'analyse commune, par contre les recherches sont dirigés vers le développement d'ELISA rapides à réaliser et plus sensibles. Parmi les perfectionnements apportés aux tests ELISA, l'immobilisation covalente des anticorps de capture (ou de l'antigène) sur l'une couche mince de DCM préalablement greffée sur les surfaces des plaques utilisées a été proposée par notre groupe de recherche [96]. Cette approche est une alternative novatrice du procédé d'adsorption des biomolécules sur la surface des plaques. L'utilisation du DCM comme support pour l'ELISA comporte trois avantages: 1) l'attachement des biomolécules est stable à cause des liaisons covalentes créées entre trois couches: support aminé, DCM, molécules greffées; 2) la surface du dextrane résiste à l'adhésion des protéines non-spécifiques, donc on il est possible de réduire l'utilisation d'agents bloquants; 3) la mise en œuvre de l'ELISA est moins longue [96,97]. La fonctionnalisation du support avec du DCM a été aussi appliquée pour étudier la sensibilité d'ELISA basés sur la fluorescence. Dans ce cas l'utilisation

de DCM de poids moléculaire 500 kDa a été mentionnée comme la condition optimale, c'est-à-dire qui a démontré la sensibilité d'analyse maximale [98].

L'application standard des tests ELISA est le dosage précis d'une molécule dans un échantillon. En plus de cela, le principe de l'ELISA est souvent utilisé pour le développement des immunocapteurs (une variation des biocapteurs) [99]. Un immunocapteur est un dispositif miniaturisé, qui est capable transformer le signal biochimique de l'interaction entre un anticorps et un antigène en signal électrique. Un immunocapteur comporte trois composantes principales: le matériel biologique immobilisé sur la surface sensible du transducteur; le transducteur, la partie qui est responsable de la transformation d'un type de signal (biologique) en un autre (physique); et l'appareillage de traitement, d'enregistrement et de visualisation des données [100].

Dans mon travail la construction d'ELISA a été choisie pour caractériser la disponibilité des groupements de carboxyles sur la surface du film de PEDOT. Sur ces groupements, nous avons prévu de greffer une protéine-modèle (anticorps) puis d'évaluer l'efficacité de ce greffage en appliquant la méthode "ELISA-sandwich". Si les concentrations d'antigène et d'anticorps de détection sont gardées constantes, l'intensité de la coloration après l'ajout du substrat de l'enzyme (HRP) est directement corrélée à la quantité de molécules du complexe HRP-streptavidine et donc, indirectement à la quantité d'anticorps de capture greffés aux sites carboxyles incorporés dans le film de PEDOT.

2.9 Résumé

Les polymères conducteurs sont largement utilisés dans le domaine de la bioélectronique à cause de leurs propriétés particulières comme la stabilité à l'air, la facilité de fonctionnalisation, la transparence, la biocompatibilité et les propriétés conductrices. Dans le but d'améliorer la biocompatibilité et d'ajouter une composante bioactive pour l'intégration des polymères conducteurs dans les dispositifs bioélectroniques, les chercheurs ont exploré plusieurs voies de fonctionnalisation des polymères conducteurs: la synthèse de polymère à partir de monomères modifiés chimiquement, l'incorporation de molécules qui portent des groupements fonctionnels, l'incorporation et la co-incorporation de molécules biologiques lors de la création du film polymérique. Par contre, l'amélioration de la biocompatibilité et de la bioactivité des films de polymère conducteur tout en conservant une conductivité acceptable reste un problème.

Parmi les polymères conducteurs les plus étudiés pour l'application dans ce domaine on retrouve le polypyrrole et le PEDOT. Le PEDOT est reconnu comme plus stable dans le temps par rapport polypyrrole, mais la stabilité du film de PEDOT dans un environnement aqueux reste à améliorer, car plusieurs études font mention d'une certaine fragilité des films dans les liquides biologiques. Dans ce travail de maîtrise, nous allons explorer une méthode d'enrichissement du film de PEDOT:PSS avec des groupements carboxyles ayant une influence minimale sur la conductivité du film. Si nécessaire, la stabilisation du film fonctionnalisé va être effectuée par un pontage covalent avec le GOPS. Toutes les composés que nous nous proposons d'utiliser pour la création d'un film de PEDOT fonctionnalisé ont été précédemment décrites dans la littérature comme matériaux applicables au développement de dispositifs bioélectroniques (biocapteurs, transistors organiques, surfaces intelligentes pour la culture cellulaire). Pour l'évaluation de la réactivité des groupements intégrés dans le film, nous nous proposons de développer une méthode basée sur l'ELISA de type « sandwich ».

CHAPITRE 3 UNE TECHNIQUE SIMPLE POUR LE GREFFAGE COVALENT DES PROTÉINES SUR LA SURFACE DES FILMS DE POLYMÈRE CONDUCTEUR

3.1 Présentation de l'article

L'immobilisation covalente de biomolécules sur la surface de polymères conducteurs est cruciale pour augmenter l'efficacité d'intégration des dispositifs bioélectroniques dans le milieu biologique. Dans cet article, nous avons développé une technique simple pour le greffage covalent de protéines à la surface de PEDOT:PSS (Poly(3,4-éthylènedioxythiophène) dopé avec poly(styrènesulfonate)). Le PEDOT:PSS est un polymère biocompatible très utilisé dans le domaine de la bioélectronique et dont le procédé de déposition est assez simple. Cependant, ni le PEDOT, ni le PSS ne possèdent de groupements chimiquement actifs pour le greffage de protéines. La stratégie proposée consiste à mélanger le PEDOT:PSS commercial avec un biopolymère modifié, le dextrane carboxyméthylé (DCM), pour obtenir des films fonctionnalisés qui exposent des groupements carboxyles. Cette fonctionnalisation a permis le greffage covalent d'anticorps via des liaisons amides. En optimisant le mélange à base de DCM, de glycérol (pour augmenter la conductivité) et de GOPS (glycidoxypropyltriméthoxysilane, agent de *cross-linking*), il a été possible d'obtenir des films de PEDOT:PSS stables dans les solutions aqueuses, possédant un haut niveau de conductivité et des groupements carboxyles actifs en surface.

3.2 Article 1: A Simple Approach for Protein Covalent Grafting on Conducting Polymer Films

3.2.1 Authors

Olga Berezhestka, Benoît Liberelle*, Gregory De Crescenzo*and Fabio Cicoira*

Department of Chemical Engineering, Polytechnique Montreal. P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montréal (QC), Canada H3C 3A7.

3.2.2. Abstract

Covalent immobilization of biomolecules, such as proteins, on conducting polymer films is critical to organic bioelectronics to create tailored interfaces with biological systems. In this study, we propose a simple approach to graft proteins on films of the conducting polymer Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) doped with poly(styrenesulfonate) (PEDOT:PSS). PEDOT:PSS is a biocompatible and easy to process conducting polymer, widely used in bioelectronics. However, it does not possess any chemical reactive groups available for protein grafting. By mixing a commercial PEDOT:PSS suspension with the modified biopolymer carboxymethylated dextran (CMD), we obtained films displaying carboxyl (–COOH) groups allowing for covalent grafting of proteins via amide bonds. By fine-tuning the concentration of CMD as well as those of a conductivity enhancer (glycerol) and a crosslinking agent (glycidoxypropyltrimethoxysilane, GOPS) in the film processing mixture, we were able to produce COOH-functionalized PEDOT:PSS films displaying excellent electrical conductivity and high stability in aqueous environment.

3.2.3 Keywords

Organic Bioelectronics; Thin Films; Conducting Polymers; PEDOT:PSS; Carboxymethylated Dextran; Protein grafting; Biofunctionalization.

3.2.4 Introduction

Bioelectronics deals with the translation of electronic signals into biological signals and vice versa. Pacemakers, defibrillators and neural electrodes are a few examples of bioelectronic devices that have brought enormous benefits to our society.¹⁻³ Organic electronic materials, in particular conducting polymers, are emerging as the ideal candidates for bioelectronics, as they are able to sustain mixed ionic-electronic conduction, are easy to process on various substrates and can be used for controlled incorporation/release of biological species.¹⁻⁷ Conducting polymers are widely studied for several biomedical applications, such as biosensing, tissue engineering, drug delivery as well as neural electrodes for recording and stimulation.⁸⁻¹¹ Immobilization of biomolecules at the surface of conducting polymers is highly desirable for biosensors and bioelectronics implants, to create a specific interface with biological systems and to favor the integration with surrounding tissues.

The most common strategies to introduce biomolecules on the surface of conducting polymers are doping/entrapment and covalent attachment. Doping and entrapment are typically achieved carrying out electrochemical polymerization in a solution containing the monomer and the biomolecule of choice. While doping is limited to charged species (typically anionic), entrapment is applicable to a wide range of neutral biological species. Peptides and proteins have already been entrapped in poly 3,4-ethylenedioxythiophene, (PEDOT) or polypyrrole films.^{8, 12} However, doping and or entrapment are typically pursued when the conducting polymers are prepared by electrochemical polymerization, which is limited to conducting substrates. Moreover, entrapped biomolecules may display a weakened bioactivity, as most of them are likely to be located in the bulk rather than at the surface of the polymer films, and may undergo uncontrolled release due to their weak physical interactions with the conducting polymer.

A more versatile strategy to immobilize biomolecules at the surface of conducting polymer films is chemical functionalization followed by the covalent attachment of biomolecules (*e.g.* proteins). Chemical functionalization can be achieved by electropolymerization in presence of monomers or dopants holding a reactive functional group.¹³⁻¹⁷ However, the chemical modification of monomers to introduce functional groups yields films with low electrical conductivity.^{18, 19} The insertion, into conducting polymers films, of species bearing functional groups (*e.g.* chondroitin sulphate, heparin sulfate, COOH-terminated PEG) for subsequent attachment of biomolecules has

also been achieved with electropolymerization and vapor phase polymerization.^{18, 20, 21} More recently, covalent attachment of biomolecules at surface of solution-processable conducting polymer films has been achieved by adding polyvinyl alcohol to a commercially available dispersion of PEDOT:PSS prior to spin coating, followed by silanization and condensation reaction with a biomolecule.²²

In this work, we propose a novel *single-step* approach to immobilize proteins on PEDOT:PSS via amide bonds, based on the mixing of the functional biopolymer carboxymethylated dextran (CMD) with a PEDOT:PSS suspension prior to film spin coating. Dextran is a well-defined polysaccharide in terms of molecular weight and polydispersity and it is widely used for its low-fouling properties, providing a barrier against non-specific adsorption of biological molecules.²³ Carboxymethylation of dextran allows the introduction of a controlled number of reactive –COOH groups, homogeneously distributed along the polymer chain. When films are deposited from mixtures containing CMD and PEDOT:PSS, the –COOH groups of CMD act as reactive sites for covalent grafting of proteins via amide bonds.²⁴ To assess the ability of the –COOH groups present at the film surface to react with proteins, we used an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which allowed establishing a direct correlation between optical density measurements and the availability of –COOH groups for subsequent protein immobilization. Film thickness and electrical conductivity measurements were used to evaluate the impact of CMD, the conductivity enhancer glycerol and the crosslinker agent glycidoxypropyltrimethoxysilane (GOPS) on film electrical conductivity and long-term stability in aqueous media.

3.2.5 Materials and Methods

3.2.5.1 Materials and Reagents. Hydrogen peroxide (30% v/v), sulfuric acid (98% purity), isopropyl alcohol (98% purity), sodium hydroxide (98.7% purity) and potassium hydroxide (85+% purity) were purchased from VWR International Inc. Milli-Q quality water (18.2 M Ω -cm; total organic compounds = 3 ppb) was generated with a Millipore Reference purification system. The aqueous suspension of PEDOT:PSS (Clevios™ PH1000) was purchased from Heraeus Electronic Materials GmbH (Leverkusen, Germany). Glycerol (99.5+ % purity) was donated by Caledon Laboratories Ltd (Georgetown, ON). Dodecylbenzenesulfonic acid (DBSA, 95+% purity), anhydrous 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GOPS, 98+% purity), Phosphate

Buffered Saline (modified PBS, without calcium chloride and magnesium chloride), Tween 20, N-hydroxysuccinimide (NHS, 98% purity), ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC, 99+% purity), 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) hydrate (99.5+% purity), MES sodium salt (99.5+% purity) and monochloroacetic acid (99+% purity) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON). Dextran ($M_w = 10, 70$ and 500 kDa) was obtained from Pharmacosmos A/S (Holbaek, Denmark). Recombinant human epidermal growth factor (hEGF, catalog #236-EG) as well as DuoSet enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit containing mouse anti-human EGF antibody (capture antibody), biotinylated goat anti-human EGF antibody (detection antibody), streptavidin-horseradish peroxidase (streptavidin-HRP), bovine serum albumin (BSA), and substrate solution (hydrogen peroxide/tetramethylbenzidine) were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN).

3.2.5.2 Surface Treatment. Prior to PEDOT:PSS film deposition, the glass slides used as substrates ($2.5 \text{ cm} \times 2.5 \text{ cm}$) were immersed in a 3:1 mixture of sulfuric acid and hydrogen peroxide (Piranha solution) for 20 min at 80°C . After intensive rinsing with Milli-Q water, the surfaces were dried using a pressured steam of nitrogen. Subsequently part of the glass were silanized with GOPS using a previously reported procedure.²⁵ Briefly, the slides were immersed in a dry Schlenk containing 1% v/v GOPS in anhydrous toluene for 30 min under anhydrous argon atmosphere, subsequently rinsed in toluene, dried under a gentle stream of nitrogen and dried in an oven at 120°C for 30 min.

3.2.5.3 Deposition and Characterization of PEDOT:PSS films. The PEDOT:PSS aqueous suspension (Clevios™ PH1000) was first sonicated for 15 min at room temperature (RT) to ensure an uniform distribution of the PEDOT:PSS particles. Spin coating was carried out from mixtures containing all or part of the following components (see Results and Discussions for details): Clevios™ PH1000, the surfactant dodecylbenzenesulfonic acid (DBSA, constant concentration of 0.25% v/v for all films), used to facilitate film processing, the conductivity enhancer glycerol (0.5% to 5% v/v) and the biopolymers dextran or CMD (0.05 to 0.5% w/v). The crosslinking agent GOPS (1% v/v) was added just prior to spin coating, after filtering the mixture through a $5\text{-}\mu\text{m}$ polyvinylidene fluoride filter. Spin coating was carried out at 500 rpm for 9 s followed by 1500 rpm for 45 s. Finally, the films were dried in an oven (120°C for 120

min). Film thickness was measured using a Stylus Profilometer (Dektak 150). Electrical conductivity measurements were performed using a four-point probe station (Jandel).

3.2.5.4 Synthesis and Characterization of Carboxymethylated Dextran (CMD). As previously reported,²⁴ 400 mg of dextran were dissolved in 10 mL of 3 M NaOH containing 1 M monochloroacetic acid. The solution was stirred for 2 h at RT. The carboxymethylation reaction was stopped by adjusting the pH to neutral with 18 M H₂SO₄. The solution was then filtered through a 0.2- μ m PTFE filter, dialyzed five times against Milli-Q water for 1 h in order to remove excess reagents and salts, and finally lyophilized. As assessed by ¹H NMR spectroscopy,²⁴ the carboxymethylation degree of our 500-kDa dextran was 55%.

3.2.5.5 Capture Antibody Grafting and Assay Procedure. Capture antibodies were covalently grafted on PEDOT:PSS films containing carboxymethylated dextran (CMD) using carbodiimide chemistry in aqueous solution.²⁶ The films were immersed into a solution containing 200 mM of EDC and 50 mM of NHS in Milli-Q water for 5 min and successively rinsed with Milli-Q water. The activated films were incubated with 4.0 μ g/mL of capture antibody in 100 mM MES (pH 5.5) containing 2 mg/mL of 500-kDa pristine dextran for 15 min (see Results and Discussions for details). The films were then washed with a buffer consisting of 10 mM PBS and 0.05 % v/v Tween 20 (PBS-T). Remaining reactive groups were deactivated by immersion in ethanolamine (1 M, pH 8.5) for 20 min, followed by rinsing with PBS-T. The films on which antibodies had been grafted were incubated with 34 nM hEGF in 10 mM PBS (pH 7.4) containing 1% bovine serum albumin (PBS-BSA) for 30 min. After rinsing with PBS-T, the surface was incubated with 50 ng/mL of biotinylated detection antibody in PBS-BSA for 30 min. After a PBS-T wash, the surface was exposed to streptavidin-HRP (diluted 200 times with PBS-BSA) for 20 min. Following a final PBS-T wash, the HRP-catalyzed reaction was revealed with a substrate solution (1:1 mixture of hydrogen peroxide/tetramethylbenzidine). After a 15-min incubation in the dark, the colorimetric reaction was stopped by adding 1 M H₂SO₄ (one third the volume of substrate solution). 100 μ L of the colored solution was then transferred into a 96-well polystyrene plate. The optical density (O.D.) at 450 nm and 540 nm (for correction) was measured using an ELISA plate reader (Victor ³V Multilabel Counter, Perkin Elmer).

3.2.5.6 Statistical Analysis. The results are expressed as mean \pm standard deviation (*n*, number of independent results, *n* \geq 3). The mean values were obtained on at least three independent tests on at least three different samples. Statistical analysis was carried out using independent two-

sample *t*-test with equal variances. A *p*-value lower than 0.05 was considered significant for all tests.

3.2.6 Results and Discussion

PEDOT:PSS films containing reactive –COOH groups were generated by mixing CMD with Clevios™ PH1000. To achieve a good balance between chemical reactivity (*i.e.* availability of –COOH groups), film electrical conductivity, and long term stability in aqueous environment, the conductivity enhancer glycerol and the crosslinking agent GOPS were added to the film processing mixture. In what follows, we discuss the effect of the various components present in the film processing mixture on film conductivity, availability of surface-exposed –COOH groups, and stability in aqueous environment.

3.2.6.1 Influence of Dextran and CMD on PEDOT:PSS Film Conductivity. The addition of CMD to PEDOT:PSS may have an impact on film conductivity, due to the presence of long polymeric chains and of –COOH groups. To disentangle and, thus, better understand the effects of the addition of dextran chains and –COOH groups, we first performed experiments with pristine dextran and successively with CMD.

Dextran chains of different molecular weights ($M_w = 10, 70$ and 500 kDa) were dissolved in Clevios™ PH1000 at concentrations ranging from 0.05 to 0.5% w/v. A slight increase in film conductivity (about two orders of magnitude, Figure 3-1A condition B) was observed for dextran concentrations ranging between 0.05 and 0.1% w/v, with respect to pristine PEDOT:PSS films (*ca.* 0.05 S/cm, Figure 3-1A condition A). The beneficial effect of dextran on conductivity started to decrease for concentrations above 0.2% w/v and totally vanished at 0.5% w/v. We found a similar trend for all the investigated dextran M_w , *i.e.* 10, 70 and 500 kDa (Figure 3-1B). Interestingly, when CMD was used instead of pristine dextran, we did not observe significant changes in film conductivity (Figure 3-1A, conditions B and C, $p > 0.05$). This means that the carboxymethylation does not impact the film electrical properties. Based on the above results, for subsequent experiments requiring the presence of –COOH groups, we fixed the CMD concentration at 0.1% w/v and used the highest M_w (500 kDa).

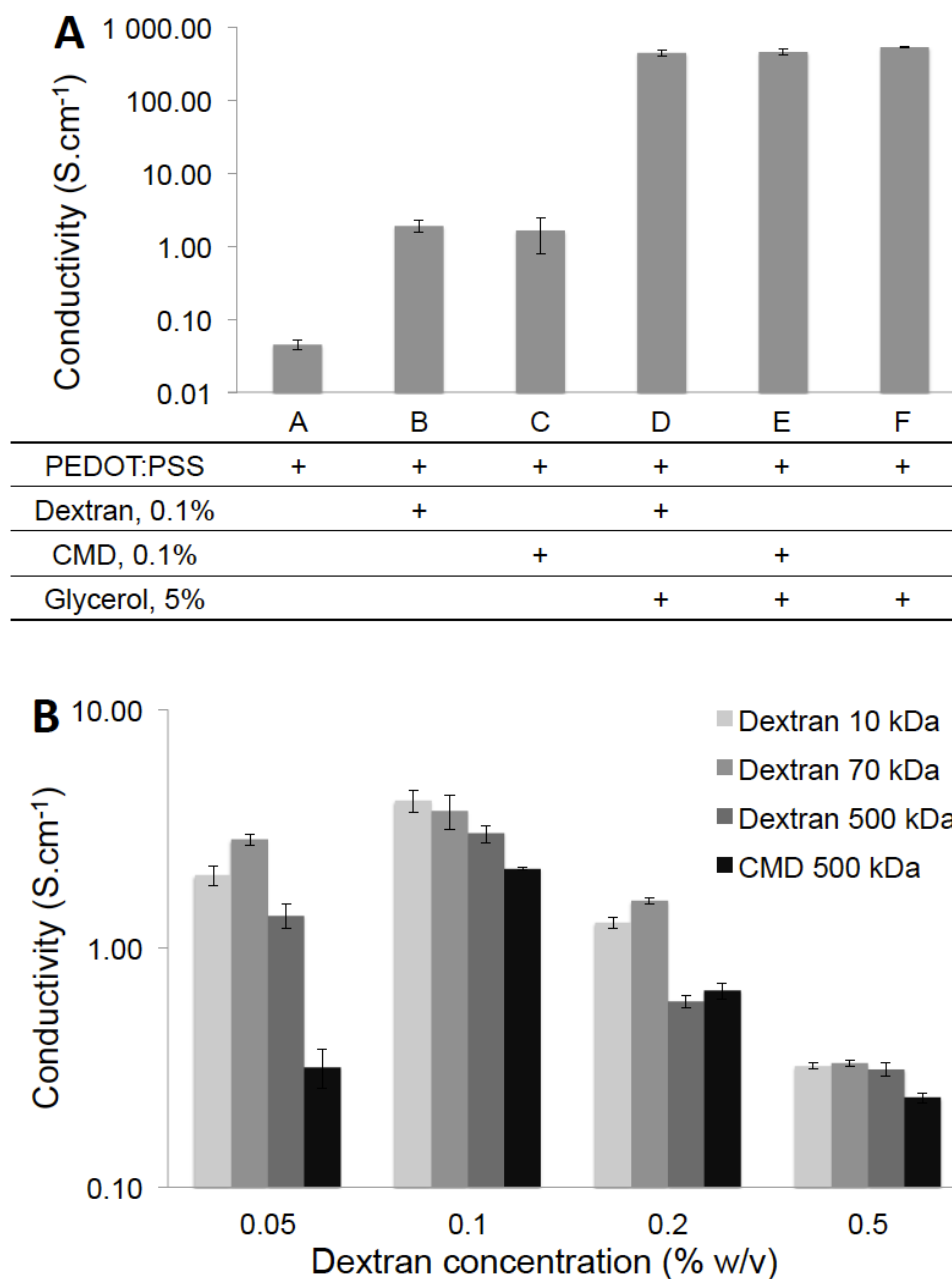


Figure 3-1: (A) Electrical conductivity of PEDOT:PSS films deposited by spin coating from a mixture containing all or part of the following components (the + signs indicate the presence of the component): Clevios™ PH1000, 0.1% w/v of unmodified 500-kDa dextran, 0.1% w/v of 500-kDa carboxymethylated dextran (CMD, degree of carboxymethylation = 55%) and 5% v/v of glycerol. (B) Impact of dextran and carboxymethylated dextran (CMD) on the conductivity of PEDOT:PSS films. Dextran (10 kDa, 70 kDa, 500 kDa) and CMD 500 kDa was added to the PEDOT:PSS suspensions (Clevios™ PH1000) prior to spin coating.

Despite the moderate increase in conductivity resulting by mixing Clevios™ with CMD, the addition of a conductivity enhancer to the processing mixture is still required to reach values of the order of a few hundreds S/cm. As reported elsewhere, the conductivity increase upon addition of conductivity enhancer is likely due to the fact that they alter the film morphology during drying, leading to lower energy barrier for charge carrier transport between individual PEDOT:PSS clusters.²⁷⁻²⁹ Among the several available conductivity enhancers, we believe glycerol to be the most suitable for biological applications because of its low toxicity, ready availability at low cost and ease of process. When 5% v/v of glycerol was added to a film processing mixture containing 0.1% w/v CMD or dextran, the films showed conductivities as high as *ca.* 500 S/cm (Figure 3-1A, conditions E and D, $p > 0.05$), i.e. similar to those of PEDOT:PSS film processed in absence of CMD (Figure 3-1A, conditions F, $p > 0.05$). These results indicate that low amounts of CMD (or dextran) in a film processing mixture containing a conductivity enhancer still yield PEDOT:PSS films with excellent electrical conductivity.

3.2.6.2 Availability of –COOH groups for covalent coupling of biomolecules on PEDOT:PSS/CMD films. The density of carboxyl group at a surface can be determined by several methods, mostly based on colorimetry and spectroscopy (*e.g.* infrared, X-ray photoelectron, fluorescence, time-of-flight secondary ion mass spectroscopy).³⁰ On the one hand, some colorimetric assays have been shown to be quite specific to surface-exposed functional groups, although they are generally more sensitive to charge.³¹ On the other hand, most spectroscopic methods provide a bulk rather than a top surface characterization.³⁰⁻³² As our goal is to evaluate the presence of surface-exposed –COOH groups available for covalent coupling with biomolecules (we will here after designate them as 'reactive groups' for simplicity sake), we developed a method adapted from an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). More specifically, the –COOH groups made available by the presence of CMD chains in PEDOT:PSS films were reacted with the free amino groups of a capture antibody, to create a covalent amide bond (Figure 3-2A).²⁶ A standard 'sandwich' ELISA (Figure 3-2B) was then used to evaluate the surface density of capture antibody. As a result, a direct relationship between the availability of the –COOH groups at the surface and the optical density (O.D.) value extracted from the ELISA could be established.

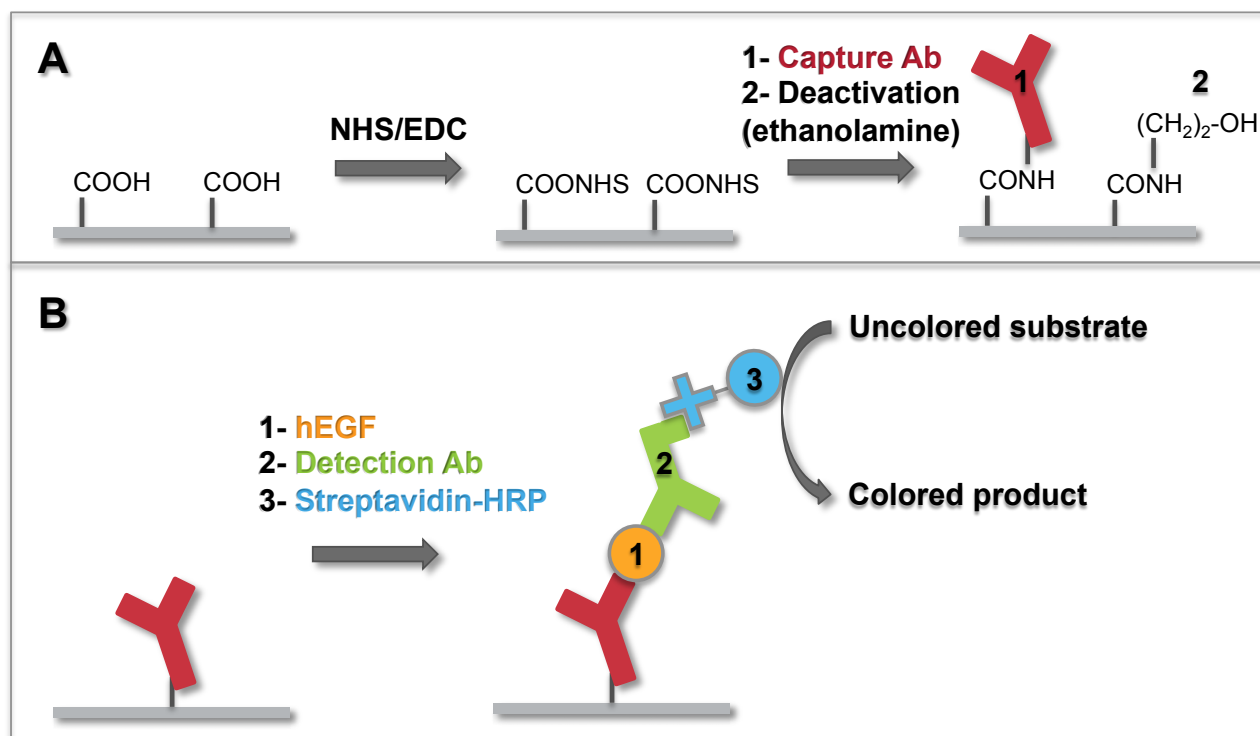


Figure 3-2: Schematic illustration of (A) the capture anti-human EGF antibody covalent grafting and (B) the ELISA procedure that was used to evaluate the amount of $-\text{COOH}$ groups that are available to graft covalently anti-human EGF antibody on PEDOT:PSS/CMD films.

Capture antibody (Ab) was covalently grafted onto the COOH -functionalized surface of the PEDOT:PSS film *via* NHS/EDC chemistry. Following the successive incubation of human EGF (hEGF), biotinylated detection Ab and streptavidin-horseradish peroxidase (streptavidin-HRP), a substrate solution was added. The uncolored substrate solution turns to colored after being oxidized by the HRP enzyme

The appropriateness of our ELISA-based strategy is assessed in Figure 3-3. As depicted in Figure 3-2A, the activation of surface $-\text{COOH}$ groups *via* standard NHS/EDC chemistry is followed by covalent coupling of the capture antibody. The NHS-activated $-\text{COOH}$ groups remaining at the surface were deactivated by ethanolamine to prevent any further coupling of amine-containing molecules (Figure 3-2A).²⁶ Significant differences in the values of O.D. were observed when the deactivation step was performed before (mock surface) rather than after the incubation of the capture antibody, *i.e.* 0.12 and 0.28 for conditions C and A, respectively ($p < 0.05$, Figure 3-3). When either the capture antibody or the human EGF was not added in the ELISA (Figure 3-3, conditions B and D, respectively), the O.D. value remained low (ca. 0.08). Overall, these

observations indicate that i) the O.D. value is related to the surface density of available –COOH groups and ii) the non-specific adsorption of hEGF (O.D. ca. 0.08) as well as that of the capture antibody ($0.12 - 0.08 = 0.04$), on PEDOT:PSS films are low. Remarkably, the covalent grafting of the capture antibody on PEDOT:PSS films containing CMD was further increased by modifying the buffer used for grafting. When pristine dextran (0.2% w/v) was added in the reaction buffer (100 mM MES, pH 5.5), a significant increase in O.D. from 0.28 ± 0.01 to 0.44 ± 0.03 was observed (compare condition A to E in Figure 3-3). We believe that the dextran added to the buffer acted as a blocking agent towards the non-specific adsorption of the capture antibody (which likely lowers its concentration) on the labware used for ELISA.^{33, 34}

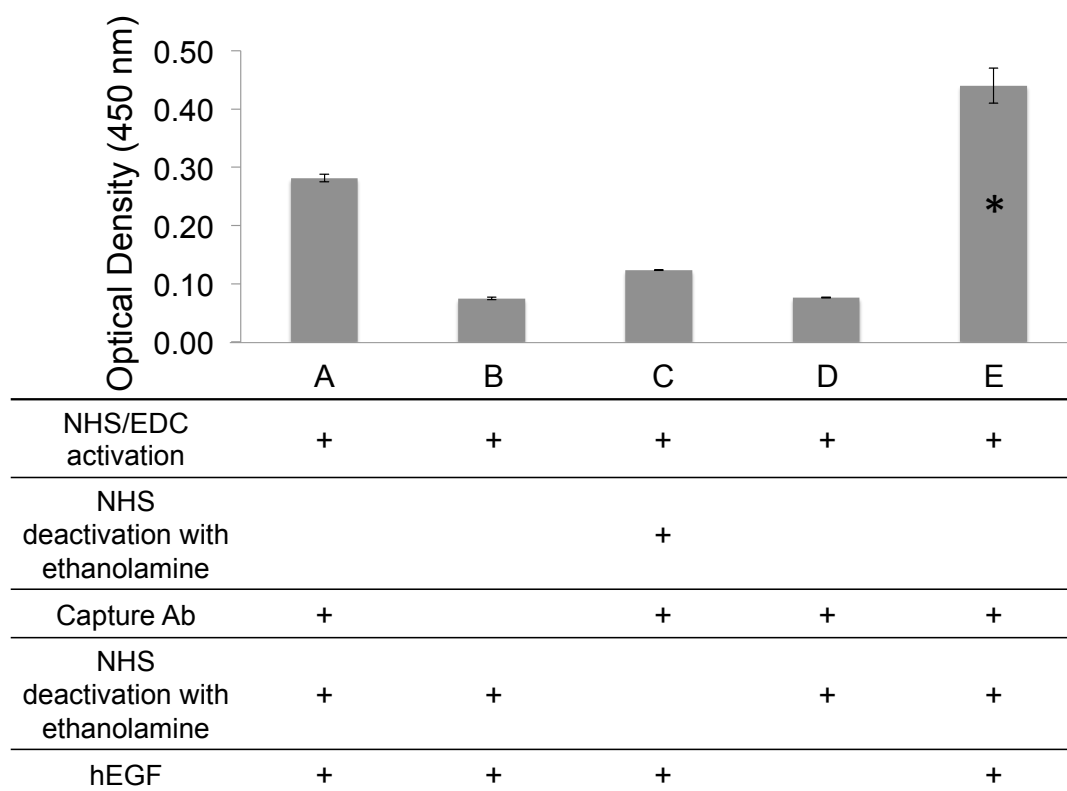


Figure 3-3: Reactivity of the carboxyl groups of PEDOT:PSS/CMD films: specificity of ELISA reagents. The tests were performed on PEDOT:PSS films containing 0.1% w/v CMD. Capture antibodies were grafted in 100 mM MES buffer (pH 5.5). The star (*) denotes that 0.2% w/v of unmodified dextran was added to the buffer. ELISA steps related to detection antibody (Ab), HRP and substrate were identical for all conditions

As mentioned above, PEDOT:PSS films require a conductivity enhancer (in our case glycerol), to achieve reasonably high electrical conductivities. As the presence of glycerol may alter the

surface composition of PEDOT:PSS films containing CMD, we evaluated its impact on the availability of $-\text{COOH}$ reactive groups at the film surface (Figure 3-4). A PEDOT:PSS film containing CMD only was used as the positive control (Figure 3-4, condition B, $\text{O.D.} = 0.41 \pm 0.05$), while a PEDOT:PSS film containing pristine dextran only was used as the negative control (no antibody grafting, Figure 3-4, condition A, $\text{O.D.} = 0.14 \pm 0.05$). No significant influence on the density of covalently grafted antibody was observed upon addition of 0.5% v/v glycerol (Figure 3-4, condition C, $\text{O.D.} = 0.38 \pm 0.02$), where as further addition of glycerol led to a significant decrease in grafted antibody ($\text{O.D.} = 0.20 \pm 0.04$, Figure 3-4, conditions D-F). This decrease may be due to an undesired interaction between glycerol and NHS-activated $-\text{COOH}$ groups preventing antibody coupling, as previously observed at high glycerol concentrations.³⁵

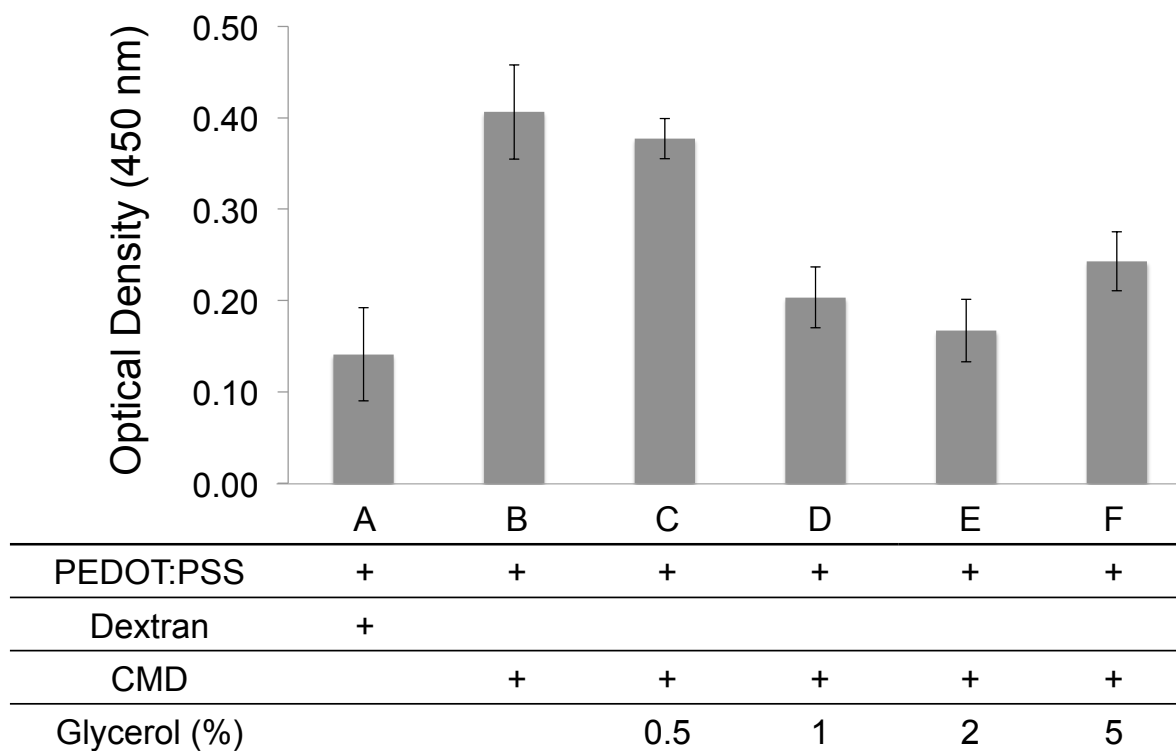


Figure 3-4: Influence of glycerol on the reactivity of the carboxyl of PEDOT:PSS/CMD films. PEDOT:PSS suspensions containing 0.1% w/v unmodified dextran or CMD were mixed with glycerol (concentration ranging from 0 to 5% v/v)

3.2.6.3 Stability of PEDOT:PSS/CMD films in a physiological buffer. As all organic bioelectronic devices work in aqueous environment (most often physiological buffers), we investigated the stability of our PEDOT:PSS films by measuring changes in thickness and electrical conductivity after immersion for 24 hours in PBS, an electrolyte widely used for

biochemical and bioelectronic applications (Figure 3-5). For films containing Clevios™ PH1000, DBSA, CMD and glycerol, immersion in PBS led to complete film removal (Figure 3-5, condition A). This observation is in agreement with recent findings, reporting that the thickness of films deposited from similar mixtures decreased of about 40% after only 10 minutes of immersion in pure water.³⁶ To improve the film stability we exploited the crosslinking properties of GOPS.³⁶⁻³⁸ GOPS possesses three methoxysilane groups, known to react with silanols present on a glass surface via a silanization reaction, and an epoxy ring, which can react with nucleophilic groups, such as the –OH groups of CMD and glycerol.^{39, 40} It has been already shown that the addition of GOPS to PEDOT:PSS film processing mixtures prevents film dissolution or delamination upon immersion into aqueous electrolytes. Here, we used two different approaches to improve films stability: GOPS was either covalently grafted via a silanization reaction on glass prior to film deposition (Figure 3-5, condition B) or added (concentration 1% v/v) to the film processing mixture (Figure 3-5, condition C). PEDOT:PSS films deposited on glass slides silanized with GOPS showed a significantly improved stability and experienced a thickness decrease of about 50% (with respect to the initial film thickness) after immersion in PBS for 24 hours (Figure 3-5, condition B). The GOPS treatment provides a high density of epoxy groups, which can form multiple covalent bonds with the –OH groups of CMD. This multiplicity of bonds may thus favor the entanglement between PEDOT and CMD chains, which may significantly contribute to enhance film stability.

PEDOT:PSS films with excellent mechanical stability, showing no thickness loss after a 24 h immersion in PBS, were obtained when GOPS (1% v/v) was added to the film processing mixture prior to spin coating on untreated glass surfaces (Figure 3-5, condition C). The addition of GOPS also led to a significant increase of film thickness (*i.e. ca.* 150 nm *vs ca.* 100 nm measured without addition of GOPS in the mixture). The enhanced stability and the higher thickness of films containing GOPS are likely related to a crosslinking between GOPS and other components of the mixture. The details of the crosslinking reaction are still unclear since several chemical reactions can take place between GOPS, the components of the mixture and the glass surface. Possible reaction paths leading to a network structure are: epoxy-hydroxy (etherification) reaction between GOPS and CMD or glycerol, condensation of the GOPS methoxysilane groups with the –OH groups of CMD, glycerol or the glass slide.³⁹⁻⁴¹ All these reactions are favored by the presence of water and by high temperatures.⁴⁰

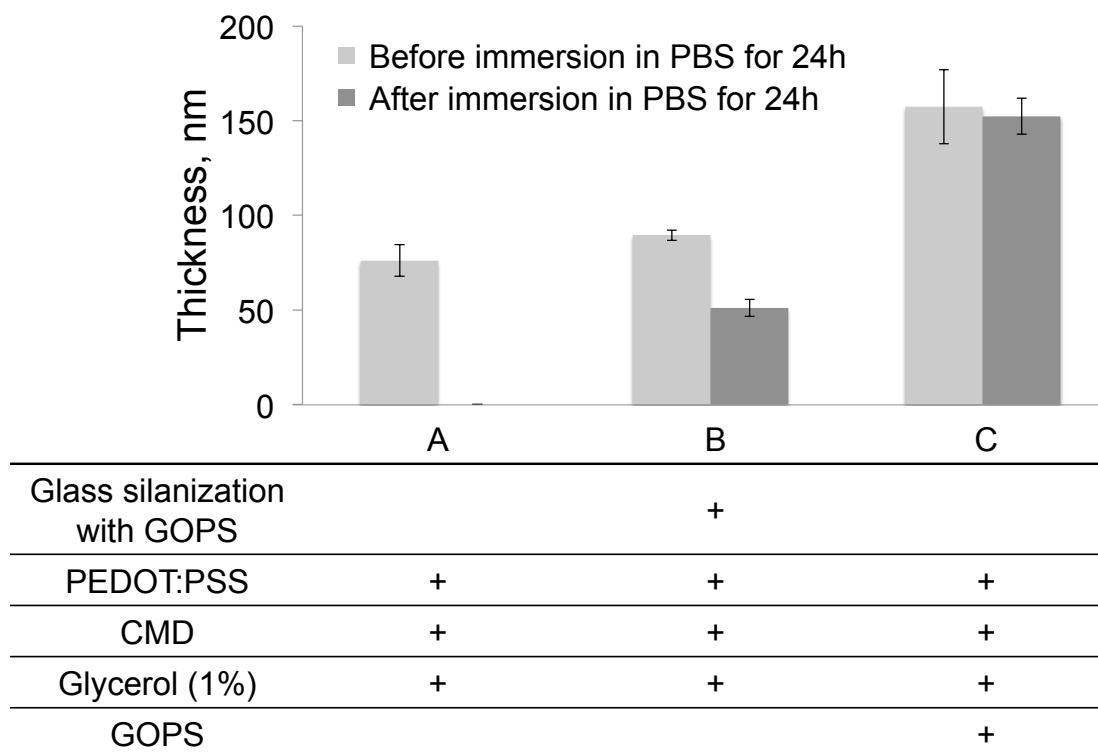


Figure 3-5: Stability of PEDOT:PSS films in PBS. PEDOT:PSS suspensions containing CMD (0.1% w/v), glycerol (1% v/v), with or without glycidoxypropyltrimethoxysilane (GOPS, 1% v/v) were spin-coated on pristine (conditions A and C) or GOPS-treated (condition B) glass surfaces. A profilometer was used to measure the thickness before and after immersion in phosphate buffered saline (PBS, 10 mM, pH 7.4)

3.2.6.4 Electrical conductivity and reactivity of GOPS-stabilized PEDOT:PSS/CMD films. The electrical conductivity of PEDOT:PSS/CMD films containing 1% v/v of GOPS increased upon increasing glycerol content, reaching about 200 S/cm for 2% v/v of glycerol (Figure 3-6, condition D). No significant changes were observed when the glycerol concentration was increased from 2% to 5% v/v (Figure 3-6, condition E). The film conductivity remained unchanged after a prolonged immersion in PBS, thus confirming the stability improvement upon GOPS addition. As an example, a film containing 2% v/v glycerol (Figure 3-6, condition D) showed the same electrical conductivity of about 200 S/cm before and after immersion in PBS for 24 h. Nevertheless, it is known that the presence of GOPS in PEDOT:PSS films, besides increasing mechanical stability, leads to a decrease of electrical conductivity.³⁶ For instance, upon

addition of 1% v/v of GOPS, the conductivity of PEDOT:PSS/CMD films containing 5% v/v of glycerol decreased from 500 S/cm (Figure 3-1A, condition E) to 200 S/cm (Figure 3-6, condition E).

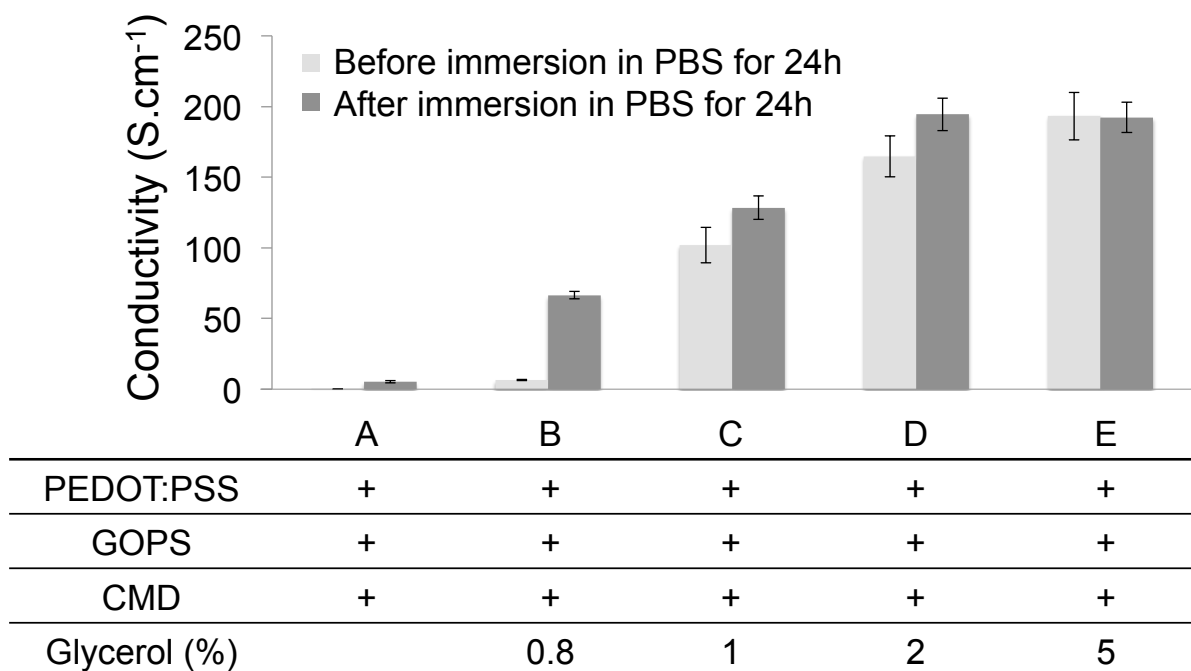


Figure 3-6: Impact of glycerol on the conductivity of GOPS-containing PEDOT:PSS films. Prior to the spin coating and the drying processes, PEDOT:PSS suspensions containing 0.1% w/v CMD and 1% v/v GOPS were mixed with glycerol (concentration ranging from 0% v/v to 5% v/v)

As recently shown by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), the addition of GOPS to the processing mixture and subsequent crosslinking leads to a large content of non-evaporating and non-conducting species in the PEDOT:PSS films, which may explain both the decrease of electrical conductivity and the increase of thickness.³⁶ However, conductivity values close to 200 S/cm appear acceptable for bioelectronic applications.

The influence of glycerol addition on the ability of GOPS-stabilized films to covalently graft antibody, was studied using our ELISA assay (Figure 3-7). In this experiment, glycerol-free films containing pristine dextran (no –COOH groups, conditions A) and CMD (high density of –COOH groups, condition B) were respectively used as the negative and positive control. As previously shown (Figure 3-4), an increasing glycerol content resulted in a decrease of availability of surface-exposed –COOH groups. However, the presence of GOPS limited the

detrimental effect of glycerol on the availability of surface-exposed $-\text{COOH}$ groups. Indeed, in the absence of GOPS, negligible antibody grafting was observed for glycerol concentrations higher than 0.5% v/v (Figure 3-4) whereas the addition of 1% v/v GOPS displaced this limit to 2% v/v (Figure 3-7). As an example, for a glycerol concentration of 2% v/v, the loss in chemical reactivity was of *ca.* 35% in the presence of GOPS (with respect to control B in Figure 3-7) and 90% in the absence of GOPS (with respect to control B in Figure 3-4).

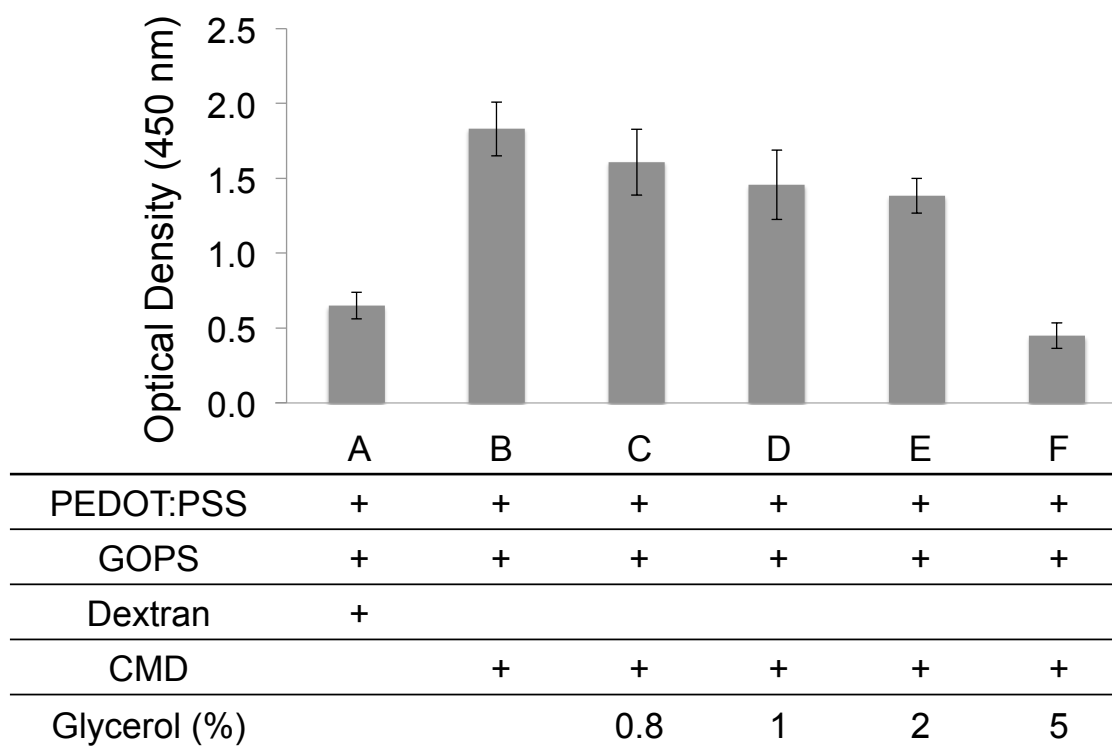


Figure 3-7: Impact of glycerol on the $-\text{COOH}$ groups reactivity in GOPS-containing PEDOT:PSS films. Prior to the spin coating and the drying processes, PEDOT:PSS suspensions containing 0.1% w/v CMD and 1% v/v GOPS were mixed with glycerol (concentration ranging from 0 to 5% v/v)

Overall, the presence of GOPS in the film processing mixture enabled to obtain PEDOT:PSS/CMD films displaying a satisfactory balance between protein grafting efficiency and electrical conductivity. In our conditions, *i.e.* 0.1% w/v of 500 kDa CMD and 1% v/v of GOPS in Clevios PH1000 suspension, these achievements were reached by adding 2% v/v of glycerol.

3.2.7 Conclusion

We demonstrated a simple and original approach for covalent protein grafting on PEDOT:PSS films. Our approach is based on the addition of the biopolymer CMD, a modified polysaccharide that *per se* reduces the non-specific adsorption of biomolecules, to the suspension used for the processing of the conducting polymer film. The addition of CMD to PEDOT:PSS films results in the presence of –COOH groups at the film surface that enable covalent grafting of proteins via amide bonds. By fine-tuning the concentration of CMD, the film crosslinking agent GOPS and the conductivity enhancer glycerol in the conducting polymer processing mixture, we were able to obtain –COOH functionalized PEDOT:PSS films with excellent electrical conductivity and long term stability in aqueous environment. We believe there are no chemical reactions between PEDOT:PSS and CMD for the reasons detailed below. The fact that we are able to graft proteins on PEDOT:PSS films via amide bonds reveals that the carboxylic groups of CMD remain available after mixing with PEDOT:PSS. Other potentially reactive groups of CMD are -OH groups, which are present on conductivity enhancers for PEDOT:PSS, such as glycerol, sorbitol and ethylene glycol. It is well established that these compounds do not change the electronic structure of PEDOT. The addition of dextran and CMD to mixtures containing PEDOT:PSS and the conductivity enhancer glycerol has no significant effects on electrical conductivity, which indicates that the presence of the carboxyl group does not impact the electronic structure of PEDOT.

Work is in progress to incorporate our biofunctionalized PEDOT:PSS films into bioelectronic devices such as biosensors based on organic electrochemical transistors, implantable electrodes for *in vivo* stimulation and recording, and smart devices for cell culture and stimulation.

3.2.8 Acknowledgments

The authors are grateful to Prof. Clara Santato for fruitful discussions. This work was supported by the Canada Research Chair on Protein-enhanced Biomaterials (GDC), NSERC Discovery grant (FC) and start-up funds from Polytechnique Montreal (FC). OB acknowledges the *Centre de recherche en sciences et technologies biomédicales* (GRSTB) and the *Fondation Universitaire Pierre Arbour* for partial salary support. FC acknowledges CMC Microsystems for financial support through the program MNT.

3.2.9 References

1. N. K. Guimard, N. Gomez and C. E. Schmidt, *Prog. Polym. Sci.*, 2007, **32**, 876-921.
2. G. G. Malliaras, *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subjects*, 2013, **1830**, 4286-4287.
3. J. Rivnay, R. M. Owens and G. G. Malliaras, *Chem. Mater.*, 2014, **26**, 679-685.
4. M. Berggren and A. Richter-Dahlfors, *Adv. Mater.*, 2007, **19**, 3201-3213.
5. J. Isaksson, P. Kjall, D. Nilsson, N. D. Robinson, M. Berggren and A. Richter-Dahlfors, *Nat. Mater.*, 2007, **6**, 673-679.
6. J. M. Leger, *Adv. Mater.*, 2008, **20**, 837-841.
7. G. Tarabella, F. M. Mohammadi, N. Coppede, F. Barbero, S. Iannotta, C. Santato and F. Ciccoira, *Chem. Sci.*, 2013, **4**, 1395-1409.
8. M. J. Higgins, P. J. Molino, Z. L. Yue and G. G. Wallace, *Chem. Mater.*, 2012, **24**, 828-839.
9. A. Kotwal and C. E. Schmidt, *Biomaterials*, 2001, **22**, 1055-1064.
10. N. Rozlosnik, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **395**, 637-645.
11. C. E. Schmidt, V. R. Shastri, J. P. Vacanti and R. Langer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, **94**, 8948-8953.
12. R. A. Green, N. H. Lovell and L. A. Poole-Warren, *Acta Biomater.*, 2010, **6**, 63-71.
13. H. Brisset, A. E. Navarro, C. Moustrou, I. F. Perepichka and J. Roncali, *Electrochem. Commun.*, 2004, **6**, 249-253.
14. P. Camurlu, S. Tarkuc, E. Sahmetlioglu, I. M. Akhmedov, C. Tanyeli and L. Toppare, *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, 2008, **92**, 154-159.
15. W. J. Doherty, R. J. Wysocki, N. R. Armstrong and S. S. Saavedra, *Macromolecules*, 2006, **39**, 4418-4424.
16. J. E. Collazos-Castro, G. R. Hernandez-Labrado, J. L. Polo and C. Garcia-Rama, *Biomaterials*, 2013, **34**, 3603-3617.
17. L. K. Povlich, J. C. Cho, M. K. Leach, J. M. Corey, J. Kim and D. C. Martin, *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subjects*, 2013, **1830**, 4288-4293.
18. L. H. Jimison, A. Hama, X. Strakosas, V. Armel, D. Khodagholy, E. Ismailova, G. G. Malliaras, B. Winther-Jensen and R. M. Owens, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 19498-19505.

19. X. L. Luo, C. L. Weaver, S. S. Tan and X. T. Cui, *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1**, 1340-1348.
20. A. J. Hodgson, K. Gilmore, I. Mackenzie, G. G. Wallace, N. Ogata and T. Aoki, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.*, 1994, **207**, 114-PMSE.
21. J. Serra Moreno, S. Panero, M. Artico and P. Filippini, *Bioelectrochemistry*, 2008, **72**, 3-9.
22. X. Strakosas, M. Sessolo, A. Hama, J. Rivnay, E. Stavrinidou, G. G. Malliaras and R. M. Owens, *J. Mater. Chem. B*, 2014, **2**, 2537-2545.
23. T. Heinze, T. Liebert, B. Heublein and S. Hornig, *Adv. Polym. Sci.*, 2006, **205**, 199-291.
24. B. Liberelle, C. Fortier and G. De Crescenzo, in *Cytokine Bioassays*, ed. I. Vancurova, Springer New York, 2014, vol. 1172, pp. 39-47.
25. M. Pla-Roca and D. Juncker, in *Biological Microarrays*, eds. A. Khademhosseini, K.-Y. Suh and M. Zourob, Humana Press, 2011, vol. 671, pp. 177-194.
26. B. Liberelle, A. Merzouki and G. De Crescenzo, *J. Immunol. Methods*, 2013, **389**, 38-44.
27. X. Crispin, F. L. E. Jakobsson, A. Crispin, P. C. M. Grim, P. Andersson, A. Volodin, C. van Haesendonck, M. Van der Auweraer, W. R. Salaneck and M. Berggren, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 4354-4360.
28. A. Elschner and W. Lovenich, *MRS Bull.*, 2011, **36**, 794-798.
29. A. M. Nardes, M. Kemerink, R. A. J. Janssen, J. A. M. Bastiaansen, N. M. M. Kiggen, B. M. W. Langeveld, A. J. J. M. van Breemen and M. M. de Kok, *Adv. Mater.*, 2007, **19**, 1196-+.
30. Y. J. Xing, N. Dementev and E. Borguet, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, 2007, **11**, 86-91.
31. S. Noel, B. Liberelle, L. Robitaille and G. De Crescenzo, *Bioconjugate Chem.*, 2011, **22**, 1690-1699.
32. L. Dauginet, A. S. Duwez, R. Legras and S. Demoustier-Champagne, *Langmuir*, 2001, **17**, 3952-3957.
33. J. R. Crowther, in *ELISA. Theory and Practice*, Humana Press, 1995, vol. 42, pp. 1-34.
34. L. F. Yuan, R. A. Wirtz and R. L. Beadoin, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1988, **17**, 135-142.
35. G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques, Second Edition*, Academic Press, San Diego, 2008.

36. S. Zhang, P. Kumar, A. S. Nouas, L. Fontaine, H. Tang and F. Cicoira, *APL Materials*, 2015, **3**, 014911.
37. L. Kergoat, B. Piro, D. T. Simon, M. C. Pham, V. Noel and M. Berggren, *Adv. Mater.*, 2014, **26**, 5658-+.
38. E. Stavrinidou, P. Leleux, H. Rajaona, D. Khodagholy, J. Rivnay, M. Lindau, S. Sanaur and G. G. Malliaras, *Adv. Mater.*, 2013, **25**, 4488-4493.
39. J. Piehler, A. Brecht, R. Valiokas, B. Liedberg and G. Gauglitz, *Biosens. Bioelectron.*, 2000, **15**, 473-481.
40. A. K. Y. Wong and U. J. Krull, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, **383**, 187-200.
41. M. A. Brook, Y. Chen, K. Guo, Z. Zhang and J. D. Brennan, *J. Mater. Chem.*, 2004, **14**, 1469-1479.

CHAPITRE 4 MÉTHODOLOGIE

Pour atteindre les objectifs de ce projet de maîtrise, nous avons employé la stratégie suivante:

4.1 Fabrication et caractérisation des films de PEDOT:PSS

La suspension commerciale de PEDOT:PSS (CleviosTM PH1000) doit être traitée avec un bain à ultrasons et un ajout de détergent (acide sulfonique de benzène dodécylrique) doit être effectué. Du dextrane, vierge ou carboxyméthylé, et/ou un « dopant secondaire » ont été ajoutés à des concentrations optimisées. La carboxyméthylation du dextrane a été menée suivant le protocole décrit par Liberelle *et al.* [101]. La fabrication des films a été réalisée par enduction centrifuge. Du (3-Glycidioxypropyl) triméthoxysilane (GOPS) a été utilisé pour stabiliser les films de polymère conducteur [102]. La conductivité des films a été déterminée à partir de mesures d'épaisseur et de résistance de surface, obtenues au moyen de la profilométrie et de la méthode des quatre points, respectivement.

4.2 Greffage des anticorps et caractérisation

Afin de développer une méthode de greffage de protéines basée sur l'utilisation d'un IgG comme molécule modèle sur la surface du film de PEDOT:PSS, nous avons choisi la technique d'immobilisation aléatoire covalente. En utilisant comme substrat d'immobilisation les molécules de dextrane carboxyméthylé incorporées dans le film du PEDOT:PSS, les anticorps ont été attachés aux groupes carboxyles préalablement activés par la chimie carbodiimide (NHS/EDC). La technique d'immobilisation des molécules sur les groupements –COOH via activation avec NHS/EDC (voir Figure 4-1) est simple et bien maîtrisée, donc elle est idéale pour l'étude du nouveau substrat de greffage (PEDOT:PSS/DCM).

Les groupements carboxyles des molécules DCM intercalées dans le film de PEDOT:PSS ont été activés au moyen de NHS/EDC pour permettre le greffage covalent des anticorps (anticorps de souris anti-EGF humain) via leur groupements amines. La caractérisation du greffage des anticorps sur les films a été effectuée au moyen d'un kit standard DuoSet ELISA contenant les composés utilisés dans les étapes suivantes : (1) incubation de l'antigène (EGF humain) sur les films fonctionnalisés, formant des complexes antigène-anticorps; (2) incubation d'un anticorps secondaire biotinylé (anticorps de chèvre anti EGF humain) prenant l'antigène « en sandwich » ; (3) incubation de complexe l'enzyme HRP-streptavidine se liant à l'anticorps biotinylé ; (4)

incubation du substrat (peroxyde d'hydrogène/tetraméthylbenzidine) de la HRP. À la suite de ces étapes, on a eu formation (ou non) d'une solution colorée, dont l'absorbance est en corrélation avec la quantité des anticorps greffés. Pour éviter toute adsorption non spécifique des composés de l'ELISA, plusieurs précautions ont été prises : (1) blocage des sites d'attache non spécifique avec l'albumine de sérum bovin (BSA) avant l'incubation de l'antigène ; (2) utilisation d'une solution contenant de la BSA comme diluant ; (3) rinçage des films entre chaque étape avec un détergent.

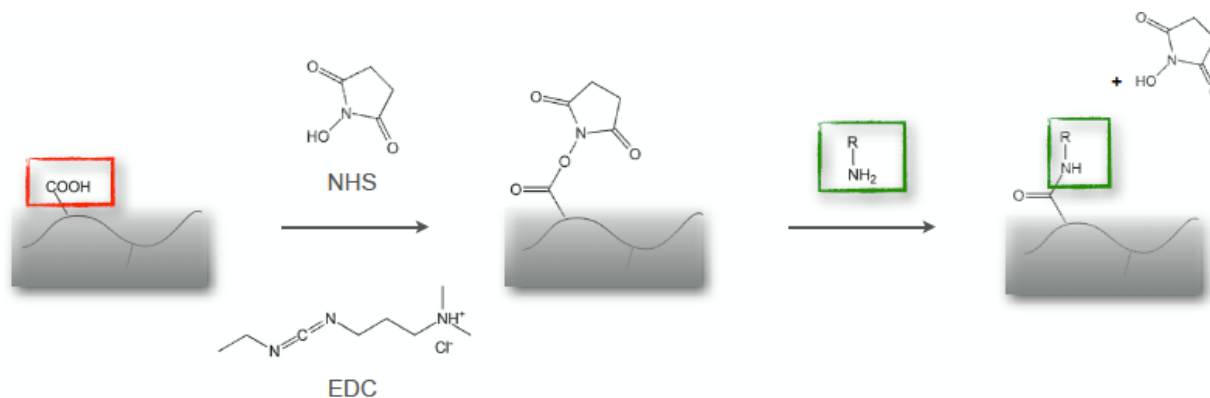


Figure 4-1 : Le schéma d'immobilisation de la molécule qui porte un groupement aminé sur les groupements -COOH de polymère intercalé dans le film

CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

Le sujet du travail présenté est le développement d'une nouvelle stratégie pour fonctionnaliser la surface de films de polymère conducteur (PEDOT:PSS). Au début du projet, une revue critique de la littérature a été effectuée pour déterminer les limitations liées à l'utilisation de polymères conducteurs pour la création de dispositifs biomédicaux. Nous avons ainsi dégagé une problématique en trois points majeurs: i) est-il possible de greffer de manière covalente des molécules sur la surface de polymère conducteur sans en diminuer la conductivité ? ii) peut-on conserver la stabilité mécanique du film modifié avec la composante biologique ? iii) est-il possible développer des technologies de détection et stimulation concurrentielles avec les techniques analogues existantes ? De plus nous avons envisagé le développement d'un test pour évaluer l'efficacité du greffage des molécules biologiques sur la surface du film fonctionnalisé.

Durant ce projet nous nous sommes attachés à partiellement résoudre les problèmes causés par l'intégration de groupements chimiquement réactifs et même d'une composante biologique dans les films de polymères conducteurs. Pour cela, nous avons choisi le DCM, un biopolymère de nature polyanionique, comme agent de fonctionnalisation. Le greffage de molécules en surface des films a été reconnu comme le plus raisonnable pour deux raisons: il a peu d'influence sur la conductivité du film et il permet de fonctionnaliser la surface avec une composante bioactive. Nous avons proposé d'utiliser un anticorps comme molécule-modèle pour l'investigation de la disponibilité des groupements carboxyles de DCM sur la surface du film de PEDOT:PSS fonctionnalisé. L'application des anticorps est raisonnable de par la possibilité de facilement tester leur présence par ELISA.

En exécutant cette stratégie, nous avons réussi à intégrer des groupements carboxyles dans les films de PEDOT:PSS. Nous avons observé que la réactivité de ces carboxyles diminue quand la concentration de l'agent ajouté pour augmenter la conductivité augmente. Par conséquent, la composition du film a été optimisée pour trouver le meilleur compromis entre une bonne efficacité de fonctionnalisation et une haute conductivité du film. La stabilité mécanique du film de PEDOT:PSS/DCM a été assurée par l'application de *cross-linking* avec le GOPS. Grâce à cette approche, nous avons obtenu la formation des liaisons covalentes entre le verre et les composantes non-conductrices du film. Ainsi, nous avons réussi à développer une méthode de fonctionnalisation et de stabilisation de film basées sur la formation de liaisons covalentes sans négativement influencer les liaisons conjuguées du PEDOT.

Toutefois, le PSS reste la seule composante des films dont la concentration n'a pas été optimisée. Potentiellement ces données peuvent être utiles pour la création de films comprenant des concentrations de DCM plus importantes. Du fait que les dérivés polyanioniques du dextrane [5, 6] ainsi que les acides faibles [103] sont décrits comme dopants des polymères conducteurs dans le cas de polymérisation électrochimique, nous supposons qu'il existe un ratio optimal entre les composantes organique (PSS) et biologique (DCM), qui permettrait d'enrichir encore plus le film en groupements carboxyles tout en gardant les propriétés de conduction au même niveau.

CHAPITRE 6 RECOMMANDATIONS ET CONCLUSION

6.1 Recommandations

À ce jour, il existe plusieurs exemples de biocapteurs, qui utilisent les OECTs comme transducteurs du signal biochimique en électrique [18-20]. Dans les premiers biocapteurs, la réaction biochimique avait lieu dans l'électrolyte [20]. Ensuite, les développeurs ont envisagé des dispositifs en plaçant une composante biologique sur un support solide de la surface du canal ou de la grille d'un transistor [104, 105]. Immobiliser la molécule qui assure l'interaction spécifique avec l'analyte rend le système plus économique. Dans ce cadre, la méthode développée dans ce projet a le potentiel d'être utilisée dans le domaine des biocapteurs. Les films PEDOT:PSS/DCM biofonctionnalisés pourraient ainsi être intégrés dans la structure de OECTs pour y jouer le rôle du canal de transistor.

Pour mettre les résultats développés dans ce projet en pratique, nous proposons une nouvelle stratégie de construction de biocapteur basé sur l'application de notre méthode de greffage de protéines sur les films de PEDOT. Cela consiste à greffer l'enzyme glucose oxydase sur la surface du canal et d'utiliser une électrode de grille en platine. Dans ce cas, la littérature indique qu'en présence de glucose (analyte), la réaction enzymatique qui se produit va entraîner la libération de molécules d'eau oxygénée, qui sont alors oxydées en dioxygène sur l'électrode en platine. De cette réaction résulte un changement du potentiel de la grille, qui va à son tour altérer le courant qui passe entre la source et le drain du transistor [20]. Ce principe est bien étudié et constitue donc un banc d'essai idéal pour l'optimisation des paramètres de OECT (distance entre la grille et le canal, taille des électrodes et distance entre les électrodes) ayant pour objectif d'assurer un niveau de sensibilité suffisant pour l'analyse. Dans le futur, la glucose oxydase pourrait être remplacée par une autre enzyme, sous réserve qu'elle produise de l'eau oxygénée. Toujours dans le cadre de ces dispositifs optimisés, nous allons être également capables de procéder au greffage d'anticorps pour développer un immunocapteur basé sur le principe d'ELISA de type « sandwich ». Dans ce cas, la détection de l'interaction entre l'antigène et l'anticorps sur la surface du canal de transistor est possible via la formation d'une liaison entre les anticorps secondaires biotinylés et le complexe streptavidine-glucose oxydase, dont nous allons être capables de détecter la réaction enzymatique.

La biocompatibilité de la surface du film de PEDOT:PSS/DCM peut être améliorée par co-

immobilisation de molécules, qui seraient capables de stimuler l'adhésion et la prolifération cellulaire. Des études avec un but similaire ont déjà été entreprises par la voie de co-incorporation de peptides dérivés de la laminine et le facteur de croissance neurotrophique dans des films de PEDOT lors de l'électropolymérisation, mais l'incorporation des molécules biologiques a diminué la stabilité mécanique du film durant les cycles d'oxydo-réduction [8]. Dans le cas de la co-immobilisation de molécules bioactives sur la surface, nous pourrions obtenir une surface intelligente applicable dans le domaine du génie tissulaire sans influence indésirable sur les propriétés conductrices et la stabilité du film de PEDOT:PSS/DCM fonctionnalisé. En intégrant ce type de film dans un OECT, il y aurait ainsi possibilité d'effectuer de la culture cellulaire sur la surface du canal de OECT et suivre la réaction des cellules suite au changement de concentration de certaine composante du milieu (électrolyte) [45]. De plus, à côté de la stimulation biochimique (par les protéines bioactives), la stimulation électrique est rendue aussi possible grâce au haut niveau de conductivité du substrat proposé.

Pour résumer, l'immobilisation covalente de protéines sur un film de PEDOT:PSS/DCM a le potentiel d'être utilisée pour développer un biocapteur, ainsi que pour créer un substrat fonctionnalisé avec des molécules bioactives pour y cultiver des cellules avec une possible stimulation électrique. Selon le matériel biologique utilisé pour la fonctionnalisation du polymère conducteur, un biocapteur basé sur le système développé peut être utilisé pour l'analyse de la concentration de certains métabolites-clés pour simplifier le diagnostic de certaines maladies ou être appliqué à la conception d'un dispositif de contrôle environnemental et/ou de qualité des produits alimentaires. Dans le cas du support pour la culture cellulaire, nous prévoyons le potentiel de générer une surface intelligente, qui donne la possibilité de combiner deux voies du contrôle de la prolifération cellulaire: régulations humorale et électrique.

Comme les biocapteurs sont des dispositifs dont le prix est moins élevé que les méthodes d'analyse standard (HPLC, spectrométrie de masse, ELISA), il est probable que l'impact économique futur de la méthode développée sera important.

6.2 Conclusion

L'immobilisation covalente d'anticorps comme protéine-modèle sur les films de PEDOT:PSS contenant du DCM a été effectuée via ses groupements carboxyles. Le glycérol (agent pour

l'augmentation de la conductivité du film) a démontré une influence négative sur l'efficacité du greffage. Une concentration de 2% v/v de glycérol a permis un bon compromis conductivité/greffage et a été reconnue comme la condition optimale. L'utilisation du *cross-linking* avec le GOPS a permis l'amélioration drastique de la stabilité du film de PEDOT:PSS/DCM sans pertes importants en conductivité.

Le greffage covalent de molécules biologiques à la surface d'un film de polymère conducteur sans diminution importante de conductivité est rendu possible par l'intercalation de petites concentrations de DCM.

Les résultats obtenus ont le potentiel d'être utilisés pour développer un substrat d'immobilisation d'une composante biologique de biocapteur, ainsi que de créer un substrat fonctionnalisé avec des molécules bioactives pour y cultiver des cellules avec une possible stimulation électrique.

RÉFÉRENCES

1. Rivnay J., Owens R. M. and Malliaras G. G. (2014). The rise of organic bioelectronics. *Chem. Mater.*, 26, 679-685;
2. Berggren, M., & Richter-Dahlfors, A. (2007). Organic bioelectronics. *Advanced Materials*, 19(20), 3201-3213;
3. Guimard, N. K., Gomez, N., & Schmidt, C. E. (2007). Conducting polymers in biomedical engineering. *Progress in Polymer Science*, 32(8), 876-921;
4. Jimison, L. H., Hama, A., Strakosas, X., Armel, V., Khodagholy, D., Ismailova, E., ...& Owens, R. M. (2012). PEDOT:TOS with PEG: a biofunctional surface with improved electronic characteristics. *Journal of Materials Chemistry*, 22(37), 19498-19505;
5. Hodgson, A. J., Gilmore, K., Small, C., Wallace, G. G., Mackenzie, I. L., Aoki, T., & Ogata, N. (1994). Reactive supramolecular assemblies of mucopolysaccharide, polypyrrole and protein as controllable biocomposites for a new generation of 'intelligent biomaterials'. *Supramolecular Science*, 1(2), 77-83;
6. Yuan, G. L., & Kuramoto, N. (2002). Water-processable chiral polyaniline derivatives doped and intertwined with dextran sulfate: synthesis and chiroptical properties. *Macromolecules*, 35(26), 9773-9779;
7. Moreno, J. S., Panero, S., Artico, M., & Filippini, P. (2008). Synthesis and characterization of new electroactive polypyrrole–chondroitin sulphate A substrates. *Bioelectrochemistry*, 72(1), 3-9;
8. Green, R. A., Lovell, N. H., & Poole-Warren, L. A. (2010). Impact of co-incorporating laminin peptide dopants and neurotrophic growth factors on conducting polymer properties. *Acta biomaterialia*, 6(1), 63-71;
9. Panero S., Abbati G., Renier D., Crescenzi V. (2007) Electrically conductive polymeric biomaterials, the process for their preparation and the use thereof in the biomedical and healthcare field. U.S. Patent 7253152 B2;
10. Lanzani G. (2014). Organic electronics meets biology. *Nature Materials*, 13, 775-776;
11. Ahuja, T., Mir, I. A., & Kumar, D. (2007). Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. *Biomaterials*, 28(5), 791-805;

12. Abidian, M. R., & Martin, D. C. (2008). Experimental and theoretical characterization of implantable neural microelectrodes modified with conducting polymer nanotubes. *Biomaterials*, 29(9), 1273-1283;
13. Polikov, V. S., Tresco, P. A., & Reichert, W. M. (2005). Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes. *Journal of neuroscience methods*, 148(1), 1-18;
14. Green, R. A., Lovell, N. H., Wallace, G. G., & Poole-Warren, L. A. (2008). Conducting polymers for neural interfaces: challenges in developing an effective long-term implant. *Biomaterials*, 29(24), 3393-3399;
15. Isaksson, J., Kjäll, P., Nilsson, D., Robinson, N., Berggren, M., & Richter-Dahlfors, A. (2007). Electronic control of Ca^{2+} signalling in neuronal cells using an organic electronic ion pump. *Nature materials*, 6(9), 673-679;
16. Tarabella, G., Santato, C., Yang, S. Y., Iannotta, S., Malliaras, G. G., & Cicoira, F. (2010). Effect of the gate electrode on the response of organic electrochemical transistors. *Applied Physics Letters*, 97(12), 123304;
17. Kergoat, L., Piro, B., Berggren, M., Horowitz, G., & Pham, M. C. (2012). Advances in organic transistor-based biosensors: from organic electrochemical transistors to electrolyte-gated organic field-effect transistors. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 402(5), 1813-1826;
18. Bernards, D. A., Macaya, D. J., Nikolou, M., DeFranco, J. A., Takamatsu, S., & Malliaras, G. G. (2007). Enzymatic sensing with organic electrochemical transistors. *J. Mater. Chem.*, 18(1), 116-120;
19. Khodagholy, D., Rivnay, J., Sessolo, M., Gurfinkel, M., Leleux, P., Jimison, L. H., ... & Malliaras, G. G. (2013). High transconductance organic electrochemical transistors. *Nature communications*, 4;
20. Shim, N. Y., Bernards, D. A., Macaya, D. J., DeFranco, J. A., Nikolou, M., Owens, R. M., & Malliaras, G. G. (2009). All-plastic electrochemical transistor for glucose sensing using a ferrocene mediator. *Sensors*, 9(12), 9896-9902;
21. Bolin, M. H., Svennersten, K., Nilsson, D., Sawatdee, A., Jager, E. W., Richter-Dahlfors, A., & Berggren, M. (2009). Active Control of Epithelial Cell-Density Gradients Grown Along the Channel of an Organic Electrochemical Transistor. *Advanced Materials*, 21(43), 4379-4382;

22. Heller A. (1992). Electrical connection of enzyme redox centers to electrodes. *J. Phys. Chem.* 96, 3579-3587;
23. Wallace G. G., Moulton S. E., Clark G. M. (2009). Electrode-cellular interface. *Science*, 324(5924), 185-186;
24. Crispin, X., Jakobsson, F. L. E., Crispin, A., Grim, P. C. M., Andersson, P., Volodin, A., ... & Berggren, M. (2006). The origin of the high conductivity of poly (3, 4-ethylenedioxythiophene)-poly (styrenesulfonate)(PEDOT-PSS) plastic electrodes. *Chemistry of Materials*, 18(18), 4354-4360;
25. Hoffmann, R., Janiak, C. & Kollmar, C. (1991) A chemical approach to the orbitals of organic polymers. *Macromolecules* 24, 3725-3746;
26. Heeger, A. J. (2001). Semiconducting and metallic polymers: the fourth generation of polymeric materials (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 40(14), 2591-2611;
27. Bredas J.L. and Street G.B. (1985). Polarons, Bipolarons, and Solitons in Conducting Polymers. *Acc. Chem. Res.* 18, 309-315;
28. Kittel, C., McEuen, P., & McEuen, P. (1976). *Introduction to solid state physics* (Vol. 8). New York: Wiley;
29. Pfaffner, M., Fritz, T., Blochwitz, J., Nollau, A., Plönnigs, B., Beyer, A., & Leo, K. (1999). Controlled doping of molecularorganiclayers: physics and device prospects. In *Advances in Solid State Physics* 39 (pp. 77-90). Springer Berlin Heidelberg;
30. Elschner, A., Kirchmeyer, S., Lovenich, W., Merker, U., & Reuter, K. (2010). *PEDOT: principles and applications of an intrinsically conductive polymer*. CRC Press;
31. Abbati, Gianluca, et al. "Electrically conductive polymeric biomaterials, the process for their preparation and the use thereof in the biomedical and healthcare field." U.S. Patent No. 7,253,152. 7 Aug. 2007;
32. Li, M., Li, W. H., Zhang, J., Alici, G., & Wen, W. (2014). A review of microfabrication techniques and dielectrophoretic microdevices for particle manipulation and separation. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 47(6), 063001;
33. Yang, S. Y., Cicoira, F., Shim, N., & Malliaras, G. (2010). Organic electrochemical transistors for sensor applications. *Iontronics: Ionic Carriers in Organic Electronic Materials and Devices*, 163;

34. Rahman, M. A., Kumar, P., Park, D. S., & Shim, Y. B. (2008). Electrochemical sensors based on organic conjugated polymers. *Sensors*, 8(1), 118-141;
35. Ebarvia, B. S., Cabanilla, S., & Sevilla, F. (2005). Biomimetic properties and surface studies of a piezoelectric caffeine sensor based on electrosynthesized polypyrrole. *Talanta*, 66(1), 145-152;
36. Ionescu, R. E., Abu-Rabeah, K., Cosnier, S., Durrieu, C., Chovelon, J. M., & Marks, R. S. (2006). Amperometric algal *Chlorella vulgaris* cell biosensors based on alginate and polypyrrole-alginate gels. *Electroanalysis*, 18(11), 1041-1046;
37. Asplund, M., Thaning, E., Lundberg, J., Sandberg-Nordqvist, A. C., Kostyszyn, B., Inganäs, O., & von Holst, H. (2009). Toxicity evaluation of PEDOT/biomolecular composites intended for neural communication electrodes. *BiomedicalMaterials*, 4(4), 045009;
38. Greczynski, G., Kugler, T., & Salaneck, W. R. (1999). Characterization of the PEDOT-PSS system by means of X-ray and ultraviolet photoelectron spectroscopy. *Thin Solid Films*, 354(1), 129-135;
39. Timpanaro, S., Kemerink, M., Touwslager, F. J., De Kok, M. M., & Schrader, S. (2004). Morphology and conductivity of PEDOT/PSS films studied by scanning-tunneling microscopy. *ChemicalPhysicsLetters*, 394(4), 339-343;
40. Vitoratos, E., Sakkopoulos, S., Dalas, E., Paliatsas, N., Karageorgopoulos, D., Petraki, F., & Choulis, S. A. (2009). Thermal degradation mechanisms of PEDOT: PSS. *Organic Electronics*, 10(1), 61-66;
41. Abouelaoualim, D., Assouag, M., Elmansouri, A., & Elmidaoui, A. (2009). Optical and electrical characteristics of a polymer light-emitting diode. *Physical&chemical news*, (46), 26-32;
42. Hong, W., Xu, Y., Lu, G., Li, C., & Shi, G. (2008). Transparent graphene/PEDOT-PSS composite films as counter electrodes of dye-sensitized solar cells. *Electrochemistry Communications*, 10(10), 1555-1558;
43. Cicoira, F., Sessolo, M., Yaghmazadeh, O., DeFranco, J. A., Yang, S. Y., & Malliaras, G. G. (2010). Influence of device geometry on sensor characteristics of planar organic electrochemical transistors. *Advanced Materials*, 22(9), 1012-1016;

44. Mabeck, J. T., & Malliaras, G. G. (2006). Chemical and biological sensors based on organic thin-film transistors. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 384(2), 343-353;
45. Lin, P., Yan, F., Yu, J., Chan, H. L., & Yang, M. (2010). The Application of Organic Electrochemical Transistors in Cell-Based Biosensors. *Advanced Materials*, 22(33), 3655-3660;
46. Tang, H., Yan, F., Lin, P., Xu, J., & Chan, H. L. (2011). Highly sensitive glucose biosensors based on organic electrochemical transistors using platinum gate electrodes modified with enzyme and nanomaterials. *Advanced Functional Materials*, 21(12), 2264-2272;
47. Setti, L., Fraleoni-Morgera, A., Mencarelli, I., Filippini, A., Ballarin, B., & Di Biase, M. (2007). An HRP-based amperometric biosensor fabricated by thermal inkjet printing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 126(1), 252-257;
48. Kanungo, M., Srivastava, D. N., Kumar, A., & Contractor, A. Q. (2002). Conductimetric immunosensor based on poly (3, 4-ethylenedioxythiophene). *Chemical Communications*, (7), 680-681;
49. Lai, S. L., Chan, M. Y., Fung, M. K., Lee, C. S., & Lee, S. T. (2003). Concentration effect of glycerol on the conductivity of PEDOT film and the device performance. *Materials Science and Engineering: B*, 104(1), 26-30;
50. Ouyang, J., Xu, Q., Chu, C. W., Yang, Y., Li, G., & Shinar, J. (2004). On the mechanism of conductivity enhancement in poly (3, 4-ethylenedioxythiophene): poly (styrene sulfonate) film through solvent treatment. *Polymer*, 45(25), 8443-8450;
51. Nardes, A. M., Kemerink, M., De Kok, M. M., Vinken, E., Maturová, K., & Janssen, R. A. J. (2008). Conductivity, work function, and environmental stability of PEDOT: PSS thin films treated with sorbitol. *Organic Electronics*, 9(5), 727-734;
52. Kim, J. Y., Jung, J. H., Lee, D. E., & Joo, J. (2002). Enhancement of electrical conductivity of poly (3, 4-ethylenedioxythiophene)/poly (4-styrenesulfonate) by a change of solvents. *Synthetic Metals*, 126(2), 311-316;
53. Ouyang, J., Chu, C. W., Chen, F. C., Xu, Q., & Yang, Y. (2005). High-Conductivity Poly (3, 4-ethylenedioxythiophene): Poly (styrene sulfonate) Film and Its Application in Polymer Optoelectronic Devices. *Advanced Functional Materials*, 15(2), 203-208;

54. Green, R. A., Lovell, N. H., & Poole-Warren, L. A. (2009). Cell attachment functionality of bioactive conducting polymers for neural interfaces. *Biomaterials*, *30*(22), 3637-3644;
55. Kim, D. H., Richardson-Burns, S. M., Hendricks, J. L., Sequera, C., & Martin, D. C. (2007). Effect of immobilized nerve growth factor on conductive polymers: electrical properties and cellular response. *Advanced Functional Materials*, *17*(1), 79-86;
56. Zhang, S., Kumar, P., Nouas, A. S., Fontaine, L., Tang, H., & Cicoira, F. (2015). Solvent-induced changes in PEDOT:PSS films for organic electrochemical transistors. *APL Materials*, *3*(1), 014911;
57. Jimison, L. H., Tria, S. A., Khodagholy, D., Gurfinkel, M., Lanzarini, E., Hama, A., ...& Owens, R. M. (2012). Measurement of barrier tissue integrity with an organic electrochemical transistor. *Advanced Materials*, *24*(44), 5919-5923;
58. Sessolo, M., Khodagholy, D., Rivnay, J., Maddalena, F., Gleyzes, M., Steidl, E., ...& Malliaras, G. G. (2013). Easy-to-Fabricate Conducting Polymer Microelectrode Arrays. *Advanced Materials*, *25*(15), 2135-2139;
59. Tedeschi, L., Domenici, C., Ahluwalia, A., Baldini, F., & Mencaglia, A. (2003). Antibody immobilisation on fibre optic TIRF sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, *19*(2), 85-93;
60. Piehler, J., Brecht, A., Valiokas, R., Liedberg, B., & Gauglitz, G. (2000). A high-density poly (ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces. *Biosensors and Bioelectronics*, *15*(9), 473-481;
61. Maskos, U., & Southern, E. M. (1992). Oligonucleotide hybridisations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridisation properties of oligonucleotides synthesised in situ. *Nucleic Acids Research*, *20*(7), 1679-1684;
62. Wong, A. K., & Krull, U. J. (2005). Surface characterization of 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane films on silicon-based substrates. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *383*(2), 187-200;
63. Fabregat, G., Teixeira-Dias, B., del Valle, L. J., Armelin, E., Estrany, F., & Alemán, C. (2014). Incorporation of a clot-binding peptide into polythiophene: properties of composites for biomedical applications. *ACS applied materials & interfaces*, *6*(15), 11940-11954;

64. Kim, D. H., Richardson-Burns, S. M., Hendricks, J. L., Sequera, C., & Martin, D. C. (2007). Effect of immobilized nerve growth factor on conductive polymers: electrical properties and cellular response. *Advanced Functional Materials*, 17(1), 79-86;
65. Lee, J. Y., Jeong, E. D., Ahn, C. W., & Lee, J. W. (2013). Bioactive conducting scaffolds: Active ester-functionalized polyterthiophene. *Synthetic Metals*, 185, 66-70;
66. Ionescu, R. E., Gondran, C., Gheber, L. A., Cosnier, S., & Marks, R. S. (2004). Construction of amperometric immunosensors based on the electrogeneration of a permeable biotinylated polypyrrole film. *Analytical chemistry*, 76(22), 6808-6813;
67. Lee, J. W., Serna, F., Nickels, J., & Schmidt, C. E. (2006). Carboxylic acid-functionalized conductive polypyrrole as a bioactive platform for cell adhesion. *Biomacromolecules*, 7(6), 1692-1695;
68. Lee, J. W., Serna, F., & Schmidt, C. E. (2006). Carboxy-encapped conductive polypyrrole: biomimetic conducting polymer for cell scaffolds and electrodes. *Langmuir*, 22(24), 9816-9819;
69. Povlich, L. K., Cho, J. C., Leach, M. K., Corey, J. M., Kim, J., & Martin, D. C. (2013). Synthesis, copolymerization and peptide-modification of carboxylic acid-functionalized 3, 4-ethylenedioxythiophene (EDOTacid) for neural electrode interfaces. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(9), 4288-4293;
70. Cosnier, S., & Lepellec, A. (1999). Poly (pyrrole–biotin): a new polymer for biomolecule grafting on electrode surfaces. *Electrochimica Acta*, 44(11), 1833-1836;
71. Liu, X., Yue, Z., Higgins, M. J., & Wallace, G. G. (2011). Conducting polymers with immobilised fibrillar collagen for enhanced neural interfacing. *Biomaterials*, 32(30), 7309-7317;
72. Richardson, R. T., Thompson, B., Moulton, S., Newbold, C., Lum, M. G., Cameron, A., ...& O'Leary, S. (2007). The effect of polypyrrole with incorporated neurotrophin-3 on the promotion of neurite outgrowth from auditory neurons. *Biomaterials*, 28(3), 513-523;
73. Song, H. K., Toste, B., Ahmann, K., Hoffman-Kim, D., & Palmore, G. T. R. (2006). Micropatterns of positive guidance cues anchored to polypyrrole doped with polyglutamic acid: a new platform for characterizing neurite extension in complex environments. *Biomaterials*, 27(3), 473-484;

74. Heinze, T., Liebert, T., Heublein, B., & Hornig, S. (2006). Functional polymers based on dextran. In *Polysaccharides II* (pp. 199-291). Springer Berlin Heidelberg;
75. Huynh, R., Chaubet, F., & Jozefonvicz, J. (1998). Carboxymethylation of dextran in aqueous alcohol as the first step of the preparation of derivatized dextrans. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 254(1), 61-65;
76. Krentsel, L., Chaubet, F., Rebrov, A., Champion, J., Ermakov, I., Bittoun, P., ... & Jozefonvicz, J. (1997). Anticoagulant activity of functionalized dextrans. Structure analyses of carboxymethylated dextran and first Monte Carlo simulations. *Carbohydrate polymers*, 33(1), 63-71;
77. Krentsel, L. B., Ermakov, I. V., Yashin, V. V., Rebrov, A. I., Litmanovich, A. D., Plate, N. A., ... & Jozefonvicz, J. (1997). Kinetic features of the carboxymethylation of dextran and the structure of the reaction product. *Polymer science. Series A, Chemistry, physics*, 39(1), 74-80;
78. Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (2005). Leuconostoc dextranase and dextran: production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(8), 845-860;
79. Hare, M. D., Svensson, S., & Walker, G. J. (1978). Characterization of the extracellular, water-insoluble α -D-glucans of oral streptococci by methylation analysis, and by enzymic synthesis and degradation. *Carbohydrate Research*, 66(1), 245-264;
80. Hattori, M., Nagasawa, K., Ametani, A., Kaminogawa, S., & Takahashi, K. (1994). Functional changes in beta-lactoglobulin by conjugation with carboxymethyl dextran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(10), 2120-2125;
81. Kobayashi, K., Hirano, A., Ohta, A., Yoshida, T., Takahashi, K., & Hattori, M. (2001). Reduced immunogenicity of β -lactoglobulin by conjugation with carboxymethyl dextran differing in molecular weight. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(2), 823-831;
82. Cooper, M. A. (2002). Optical biosensors in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(7), 515-528;
83. Scarano, S., Mascini, M., Turner, A. P., & Minunni, M. (2010). Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors. *Biosensors and bioelectronics*, 25(5), 957-966;
84. Skottrup, P. D., Nicolaisen, M., & Justesen, A. F. (2008). Towards on-site pathogen detection using antibody-based sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(3), 339-348;

85. Monchaux, E., & Vermette, P. (2008). Cell adhesion resistance mechanisms using arrays of dextran-derivative layers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 85(4), 1052-1063;
86. Monchaux, E., & Vermette, P. (2007). Bioactive microarrays immobilized on low-fouling surfaces to study specific endothelial cell adhesion. *Biomacromolecules*, 8(11), 3668-3673;
87. Makaraviciute, A., & Ramanaviciene, A. (2013). Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 50, 460-471;
88. Narciso, J. E. T., Uy, I. D. C., Cabang, A. B., Chavez, J. F. C., Pablo, J. L. B., Padilla-Concepcion, G. P., & Padlan, E. A. (2011). Analysis of the antibody structure based on high-resolution crystallographic studies. *New biotechnology*, 28(5), 435-447;
89. Zhao, H. W., Huang, C. Z., & Li, Y. F. (2006). A novel optical immunosensing system based on measuring surface enhanced light scattering signals of solid supports. *Analytica chimica acta*, 564(2), 166-172;
90. Kausaite-Minkstimiene, A., Ramanaviciene, A., Kirlyte, J., & Ramanavicius, A. (2010). Comparative study of random and oriented antibody immobilization techniques on the binding capacity of immunosensor. *Analytical chemistry*, 82(15), 6401-6408;
91. Suzuki, M., Nakashima, Y., & Mori, Y. (1999). SPR immunosensor integrated two miniature enzyme sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 54(1), 176-181;
92. Bergström, G., & Mandenius, C. F. (2011). Orientation and capturing of antibody affinity ligands: Applications to surface plasmon resonance biochips. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 158(1), 265-270;
93. Barié, N., & Rapp, M. (2001). Covalent bound sensing layers on surface acoustic wave (SAW) biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(9), 979-987;
94. Voller, A., Bidwell, D. E., & Bartlett, A. (1979). *The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications*. Dynatech Europe, Borough House, Rue du Pre.;
95. Wisdom, G. B. (1976). Enzyme-immunoassay. *Clinical Chemistry*, 22(8), 1243-1255;
96. Liberelle, B., Merzouki, A., & De Crescenzo, G. (2013). Immobilized carboxymethylated dextran coatings for enhanced ELISA. *Journal of immunological methods*, 389(1), 38-44;

97. Liberelle, B., Fortier, C., & De Crescenzo, G. (2014). Enhanced ELISA Based on Carboxymethylated Dextran Coatings. In *Cytokine Bioassays* (pp. 39-47). Springer New York.;
98. Surugiu, I., Dey, E. S., Svitel, J., Pirvutoiu, S., & Danielsson, B. (2001). Dextran-modified surface for highly sensitive chemiluminescent ELISA. *Analyst*, 126(10), 1633-1635;
99. Tomassetti, M., Martini, E., Campanella, L., Favero, G., Carlucci, L., & Mazzei, F. (2013). Comparison of three immunosensor methods (surface plasmon resonance, screen-printed and classical amperometric immunosensors) for immunoglobulin G determination in human serum and animal or powdered milks. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 73, 90-98;
100. Moina, C., & Ybarra, G. (2012). Fundamentals and Applications of Immunosensors. *Advances in immunoassay technology*, 65. Source: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-immunoassay-technology>;
101. Liberelle, B., Boucher, C., Chen, J., Jolicoeur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2010). Impact of epidermal growth factor tethering strategy on cellular response. *Bioconjugate chemistry*, 21(12), 2257-2266;
102. Khodagholy, D., Curto, V. F., Fraser, K. J., Gurfinkel, M., Byrne, R., Diamond, D., ... & Owens, R. M. (2012). Organic electrochemical transistor incorporating an ionogel as a solid state electrolyte for lactate sensing. *J. Mater. Chem.*, 22(10), 4440-4443;
103. Kulkarni, M. V., Viswanath, A. K., Marimuthu, R., & Seth, T. (2004). Synthesis and characterization of polyaniline doped with organic acids. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42(8), 2043-2049;
104. Liu, J., Agarwal, M., & Varahramyan, K. (2008). Glucose sensor based on organic thin film transistor using glucose oxidase and conducting polymer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 135(1), 195-199;
105. White, S., Dorfman, K. D., & Frisbie, C. D. (2015). Label-Free DNA Sensing Platform with Low-Voltage Electrolyte-Gated Transistors. *Analytical chemistry*.