



HAL
open science

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

François-Xavier Guillon

► **To cite this version:**

François-Xavier Guillon. Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical. Chimie thérapeutique. Université Paris sciences et lettres, 2017. Français. NNT : 2017PSLECO02 . tel-01941402

HAL Id: tel-01941402

<https://pastel.hal.science/tel-01941402>

Submitted on 1 Dec 2018

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

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

THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université de recherche Paris Sciences et Lettres
PSL Research University

Préparée à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic
Médical

Ecole doctorale n°406

CHIMIE MOLECULAIRE DE PARIS CENTRE

Chimie Moléculaire

Soutenue par
François-Xavier **GUILLON**
le 27 septembre 2017

Dirigée par **Dr. Fethi BEDIQUI**

COMPOSITION DU JURY :

Mme. FERRIGNO Rosaria
Université Claude Bernard Lyon 1, Rapporteur

M. PIRO Benoît
Université Paris Diderot Paris 7, Rapporteur

Mme. LOJOU Elisabeth
Université d'Aix-Marseille, Membre du jury

Mme. BONNEFONT-ROUSSELOT Dominique
Université Paris Descartes Paris 5, Membre du jury

M. THOUIN Laurent
Ecole Normale Supérieure Paris, Membre du jury

M. BEDIQUI Fethi
ENSCP Chimie Paristech, Membre du jury

M. LAZERGES Mathieu
Université Paris Descartes Paris 5, Membre du jury



Je dédie ce travail à mes grands-parents adorés qui auraient aimé voir le fruit de ces années de travail.

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr Fethi Bedioui et le Dr Mathieu Lazerges pour leur implication et leur encadrement pendant ces trois années. Leur expérience et leurs conseils m'ont permis de mener ce projet jusqu'à son terme et d'acquérir de l'expérience et une maturité en tant que chercheur. Je les remercie sincèrement pour leur constante disponibilité et le temps qu'ils ont pu me consacrer durant ces trois années de thèse. Je tiens également à remercier le Dr Daniel Scherman pour m'avoir accueilli au sein de l'UTCBS qu'il dirige et où j'ai pu mener mon projet et l>IDEX PSL pour le financement de ce projet. Je tiens également à remercier l'ensemble de l'équipe SEISAD au sein de laquelle j'ai pu m'épanouir tant personnellement que professionnellement et l'ensemble des membres qui se sont toujours rendus disponibles pour m'apporter de l'aide ou répondre à mes questions. Enfin, je remercie particulièrement Huong avec qui j'ai collaboré sur ce projet pendant deux années et qui m'a été d'une grande aide. Partager la paillasse avec toi et ton sourire constant a été un véritable plaisir.

Je tiens également à remercier l'équipe pédagogique de l'ENSCP et particulièrement celle des TP de Chimie-Physique Analytique au sein de laquelle j'ai enseigné pendant trois années. Cela m'a permis de sortir du laboratoire, de rencontrer d'autres doctorants et personnels et d'acquérir une expérience d'enseignement au contact des étudiants-ingénieurs qui fût très intéressante. Je remercie particulièrement Peggy et Sébastiana pour leur bonne humeur permanente au sein du service et qui sont d'une aide précieuse en toute circonstance.

Je tiens à remercier particulièrement les autres doctorants, post-doctorants et stagiaires que j'ai pu côtoyer au sein du laboratoire pour leur soutien, leur aide scientifique et technique et pour tous les bons moments passés au labo (pauses cafés, repas) et aussi en dehors. Caroline (Cacaro), Ludovic (Lulu la petite patate), Huong, Raquel, Camille P. (Cacabis), Laura G. (Lala), Camille L. (Cacater), Laura T. (Lolo), Menel, Amandine, Gonzalo, Damaris, Abed, Julien, Jérémie, Samantha, Sophie, William, Gerson, et ceux que j'oublie sûrement en écrivant ces lignes ; vous m'avez permis de faire du laboratoire, outre un lieu de travail, un lieu de rencontres, de bonne humeur et de bons souvenirs au cours de ces trois années. Je suis ravi d'avoir fait votre connaissance et je n'oublierai jamais ces années grâce à vous.

Je remercie tout spécialement Raquel et Huong qui, en plus de leur amitié et de leurs conseils de sages, ont facilité ma rédaction et m'ont permis de sauver mon manuscrit à plusieurs reprises grâce à leur grande expérience de docteur !!

Je remercie aussi plus spécialement Cacaro et Ludo, mes compagnons de thèse, pour tous ces moments de discussions, de décompression, et de soutiens sans qui ces trois années auraient été certainement beaucoup, beaucoup plus tristes. Votre présence et votre amitié ont rendu ces trois ans beaucoup plus courts qu'attendus. Nous sommes à jamais liés par cette épreuve qu'est la thèse. ;-P

Je tiens également à remercier mes amis de toujours, mes amis Martellois, qui m'ont permis de décompresser, de me changer les idées durant les weekends et de traverser plus facilement les périodes de stress !

Je remercie profondément mon oncle Jacques et ma tante Madeleine pour m'avoir gentiment hébergé à proximité du laboratoire pendant trois années. Vous m'avez considérablement facilité la vie et maintenant je vous laisse enfin tranquilles ! Merci mille fois !

Enfin, je remercie ma famille, ma tante Lydie et surtout mes parents pour tout ce que vous m'avez donné et appris. Merci pour votre soutien, votre aide pendant ces années. C'est grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui et je vous en serai éternellement reconnaissant.

Pour terminer, je remercie de tout cœur Charlène qui a toujours été à mes côtés durant ces années, qui m'a supporté dans les bons comme dans les moins bons moments, qui a supporté notre éloignement géographique et qui m'a soutenu corps et âme quoi qu'il arrive. Je n'aurais sans doute pas réussi tout cela sans toi. Avec ce manuscrit, une page se tourne et une nouvelle s'ouvre avec toi.

La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi !

—Albert Einstein

Table des matières

Introduction générale.....	1
I. Généralités.....	4
A. Les acides nucléiques	5
1) L'acide désoxyribonucléique (ADN).....	5
2) L'acide ribonucléique (ARN) et plus précisément les micro-ARNs (miRNAs)	6
B. Les différents types de capteurs.....	9
1) Les capteurs optiques	9
a) Transduction basée sur la fluorescence	9
b) Transduction basée sur la chimiluminescence ou l'électroluminescence	11
c) Transduction basée sur la colorimétrie.....	13
2) Les capteurs basés sur la mesure de masse	14
3) Les capteurs électrochimiques	15
C. Les différentes méthodes d'immobilisation des sondes sur l'électrode	16
1) Immobilisation par adsorption physique.....	16
2) Immobilisation par voie chimique	17
D. Les méthodes de mesure électrochimiques	21
1) Cas des systèmes rédox en solution	24
Cas des électrodes de géométrie disque.....	24
Cas des électrodes de géométrie bande	26
2) Cas des systèmes rédox adsorbés à la surface de l'électrode.....	28
3) Courant capacitif avec un composé adsorbé non-électroactif.....	29
E. Les différents types de transduction	31
1) Transduction non-faradique	31
2) Transduction basée sur l'oxydation de la guanine	33
3) Transduction basée sur des sondes marquées par une molécule rédox.....	36
4) Transduction basée sur la réponse électrochimique des polymères conducteurs ..	39
5) Transduction basée sur la résistance faradique	42
6) Transduction basée sur le transfert d'électrons longue distance non catalysé.....	43

7)	Transduction basée sur le transfert d'électrons longue distance catalysé.....	46
8)	Le choix de la transduction	48
F.	Le montage à deux électrodes	50
	Matériels et méthodes.....	55
II.	Matériels et méthodes.....	56
A.	Les électrodes utilisées	56
1)	Electrodes disque unitaires en carbone graphite.....	56
2)	Electrodes disque unitaires en or	58
3)	Réseau d'électrodes bandes interdigitées.....	59
4)	Les contre-électrodes	63
B.	Les mesures électrochimiques	63
1)	Les dispositifs expérimentaux.....	64
a)	Le picostat	64
b)	Le potentiostat PAR 263A.....	64
c)	Le potentiostat PG 580R.....	64
2)	Les méthodes de mesures électrochimiques	64
a)	La voltampérométrie cyclique.....	64
b)	La chronoampérométrie.....	65
C.	L'électrolyte de mesure	66
1)	Le sel de fond.....	66
2)	La sonde rédox	66
3)	L'intercalant rédox	68
D.	Les sondes et cibles ADN et ARN	69
1)	Les cibles ADN et ARN	70
2)	Les cibles non-complémentaires.....	71
3)	Les sondes ADN et ARN.....	72
a)	Sonde modifiée par une amine	72
b)	Sondes modifiées par un thiol.....	73
c)	Sonde modifiée par l'acide thioctique	74

d)	Sondes marquées par un ou plusieurs dithiol phosphoramidite (DTAP)	75
E.	L'immobilisation	77
1)	L'immobilisation sur carbone	77
a)	Les réactifs.....	77
b)	Réduction du diazonium.....	78
c)	Couplage peptidique de la sonde et du ferrocenylméthylamine.....	79
d)	Caractérisation de la couche de diazonium	79
2)	L'immobilisation sur or	80
a)	Les réactifs.....	80
b)	Le protocole d'immobilisation des sondes modifiées par un thiol ou par l'acide thioctique 81	
c)	Le protocole d'immobilisation des sondes modifiées par le DTAP	81
3)	Le protocole d'hybridation	81
4)	Le protocole de régénération (dénaturation).....	82
F.	Evaluation de la performance des capteurs	82
1)	Détection de l'hybridation	82
2)	Mesure de la robustesse du capteur.....	83
3)	Mesure de la spécificité du capteur.....	83
4)	Mesure de la sensibilité du capteur	83
	Biocapteurs sur UMEs unitaires.....	85
III.	Biocapteurs sur UMEs unitaires.....	86
A.	Configuration UME de carbone graphite	86
1)	La caractérisation des électrodes.....	87
2)	Le greffage du diazonium	88
a)	Greffage par chronoampérométrie.....	88
b)	Greffage par voltampérométrie cyclique	92
c)	Greffage par adsorption puis voltampérométrie cyclique.....	94
3)	Le couplage peptidique de la sonde ADN sur l'électrode greffée	98
a)	Le couplage avec le ferrocène amine	98
b)	Le couplage avec la sonde ADN modèle.....	102

4)	La détection de miRNAs avec des biocapteurs réalisés sur UMEs en fibre de carbone	103
B.	Configuration UME d'or	108
1)	Monocouches auto-assemblées à partir des sondes ADN marquées par un thiol (conditions classiques)	108
a)	Caractérisation des électrodes.....	109
b)	Formation de la monocouche auto-assemblée sur l'électrode	109
c)	Courbe de calibration	113
2)	Optimisation de la composition de l'électrolyte	117
3)	Détection d'un unique mismatch	121
4)	Vieillessement des électrodes	125
5)	Changement de sel support dans l'électrolyte	129
6)	Changement d'ancrage des sondes ADN.....	134
	Optimisation du greffage de l'acide thioctique seul	134
	Biocapteurs avec sondes ADN marquées par l'acide thioctique.....	140
	Biocapteurs avec ancrage acide thioctique et couplage peptidique de la sonde ADN.....	146
	Biocapteurs utilisant une sonde ADN marquée par une unité DTAP.....	147
	Etude par microbalance à quartz (QCM) de l'hybridation des cibles.....	151
	Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or.....	157
IV.	Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or.....	158
A.	Considérations préliminaires sur l'hybridation et sa cinétique	158
B.	Caractérisation des réseaux d'électrodes	164
C.	Formation des SAMs sur les réseaux d'électrodes d'or	167
1)	Monocouches d'acide thioctique	167
2)	Monocouches de sondes ADN marquées par le 1-DTAP.....	169
3)	Monocouches de sondes ADN marquées par le 3-DTAP.....	171
D.	Biocapteurs élaborés à partir des sondes marquées par les unités DTAP	173
1)	Biocapteurs réalisés à partir de sondes ADN marquées par le 1-DTAP.....	173
a)	Optimisation de la concentration en bleu de méthylène dans l'électrolyte.....	174

b) Evaluation des performances des biocapteurs réalisés avec la sonde 1-DTAP.....	177
2) Biocapteurs réalisés à partir de sondes ADN marquées par le 3-DTAP.....	179
Conclusion et Perspectives.....	182
Annexes.....	185
Références	194

Liste des abréviations

1-DTAP : marquage des sondes ADN par une unité DiThiol PhosphorAmidite

3-DTAP : marquage des sondes ADN par trois unités DiThiol PhosphorAmidite

A : Adénine

Å : Angström

AcTh : marquage commercial des sondes ADN par l'acide thioctique

ADN : Acide DésoxyriboNucléique = DNA

ARN : Acide RiboNucléique = RNA

AT : Acide Thioctique

BSA : Bovine Serum Albumine = Albumine de Sérum Bovin

C : Cytosine

CD⁻ : ligand Céfadroxil forme basique

CDH : Céfadroxil forme acide

CN⁻ : ligand cyanure

DTAP : DiThiol PhosphorAmidite

ECS : Electrode au Calomel Saturée

EDC : hydrochlorure de 1-(3-Diméthylaminopropyl)-3-EthylCarbodiimide

ET : Electrode de Travail

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer = transfert d'énergie de fluorescence par résonance

G : Guanine

HOPG : Highly Oriented Pyrolytic Graphite = Graphite Pyrolytique Hautement Orienté

HRP : HorseRadish Peroxydase = peroxydase issu du radis noir

I : Inosine

IAM : Infarctus Aigu du Myocarde

INSERM : Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

LB : Leucomethylene Blue = Bleu de Leucométhylène

LOD : Limit Of Detection = limite de détection

LOQ : Limit Of Quantification = Limite de Quantification

M : Molaire = mol/L

MB : Methylene Blue = bleu de méthylène

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

miRNA : micro-ARN : micro-Acide RiboNucléique

mRNA : Acide RiboNucléique messenger

NHS : N-HydroSuccinimide

NO : Nitric Oxyde = Oxyde nitrique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerisation Chain Reaction = réaction de polymérisation en chaîne

PDMS : PolyDiMéthylSiloxane

QCM : Quartz Crystal Microbalance = microbalance à cristal de quartz

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire = NMR

SAM : Self-Assembled Monolayer = monocouche auto-assemblée

T : Thymine

Taq polymérase: *Thermus Aquaticus* polymérase

TCEP HCl : Hydrochlorure de Tris(2-CarboxyEthyl)Phosphine

THF : Tétrahydrofurane

U : Uracile

UME : UltraMicro-Electrode

UV : Ultra-Violet

Introduction générale

Introduction générale

Dans le domaine de la santé, trois champs d'études permettent de réaliser des progrès concernant la guérison des patients : l'amélioration du diagnostic d'une part, la mise au point de nouveaux traitements d'autre part et enfin le perfectionnement du suivi post-traitement. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), avec un diagnostic précoce et un traitement adapté, les chances de guérison sont grandes pour de nombreux cancers[1]. L'amélioration du diagnostic et du traitement du cancer est une priorité puisqu'il représente la première cause de mortalité chez l'homme et la deuxième chez la femme avec environ 380000 nouveaux cas par an pour environ 150000 décès annuels en France[2]. De plus, l'incidence des cancers normalisée par la population est en hausse globale sur les quatre dernières décennies autant pour les hommes que pour les femmes (Figure 1)[3]. Ces chiffres montrent donc le besoin évident d'un dispositif de diagnostic fiable, sensible et précoce des cancers. La plupart des outils utilisés à l'heure actuelle par les cliniciens permettent rarement un diagnostic précoce et sont soit invasifs, comme les prélèvements sanguins et les biopsies, soit très coûteux, comme les IRMs et les scanners. Il est donc important de développer des outils économiques et simples à utiliser pour améliorer la précocité du diagnostic.

Aussi, certaines pathologies nécessitent un diagnostic ou une confirmation rapide. C'est le cas, par exemple, de l'infarctus du myocarde qui doit être confirmé par un électrocardiogramme et le dosage de la troponine dans le sang le plus rapidement possible pour permettre un traitement efficace. En effet, sur 120000 cas recensés annuellement, la mortalité dans l'heure suivant le début de la crise est estimée à 10 %[4]. Cela indique le besoin de rapidité pour le dépistage de cette pathologie, d'autant que d'après l'INSERM, 25 % des cas ne présentent pas de symptômes physiques[4]. Aussi, un dispositif de diagnostic rapide pourrait être utile en complément de l'électrocardiogramme.

C'est pour ces différentes raisons que les (bio)capteurs sont aujourd'hui devenus un sujet de recherche majeur dans le domaine de la santé autant pour le diagnostic de pathologies diverses (cancers, maladies infectieuses, respiratoires, auto-immunes) que pour le suivi de traitements (diabète ou oxygénation du sang par exemple). Cet intérêt grandissant pour les (bio)capteurs ces vingt dernières années, qu'il s'agisse du développement de nouvelles

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

technologies ou de l'amélioration de celles existantes (performances accrues, miniaturisation, rapidité, coûts), est facilement visible dans la littérature au vu du nombre grandissant de citations et publications concernant le domaine chaque année (105 publications en 1996, 396 en 2006 et 1661 en 2016 sur Web of Science). Ce travail aborde l'aspect diagnostique des biocapteurs. L'Unité des Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS) détient une expertise importante dans le domaine des capteurs, notamment ceux du monoxyde d'azote (NO) et également depuis quelques années ceux des micro-ARNs. C'est dans ce dernier champ d'application que s'inscrit le projet de thèse.

Les ADNs et ARNs sont des biomolécules essentielles associées à de nombreux processus de l'organisme humain et par conséquent très souvent impliquées dans les dérèglements pathologiques de ces mécanismes (proliférations cellulaires incontrôlées, maladies auto-immunes, neurodégénératives). La quantification de ces biomolécules est aujourd'hui réalisée par une technique complexe mettant en jeu une réaction de polymérisation en chaîne (PCR), et il serait intéressant de développer un dispositif permettant une quantification fiable, rapide, sans amplification et facile à mettre en place au niveau clinique. Le but de cette thèse est de mettre au point et d'optimiser un biocapteur électrochimique de micro-ARNs destiné à une utilisation clinique. Ce manuscrit s'attache donc dans un premier temps à exposer la cible de ce biocapteur, les acides nucléiques et plus précisément les micro-ARNs, leur rôle biologique et la raison de ce choix, ainsi qu'un tour d'horizon des différents biocapteurs d'acides nucléiques existants pour arriver au choix de la technologie pour la conception du biocapteur électrochimique et sa mise en œuvre. La seconde partie de cet écrit s'attache à exposer les différents matériels, méthodes et réactifs chimiques et biologiques utilisés. La troisième partie est consacrée à l'exposé des résultats obtenus sur les ultramicro-électrodes pour évaluer et comparer les performances des différents biocapteurs réalisés sur divers matériaux, géométries d'électrodes ou avec diverses méthodes chimiques et électrochimiques. Enfin, la dernière partie expose les résultats des expériences réalisées sur les réseaux d'électrodes en bandes interdigitées de leur caractérisation jusqu'à l'évaluation de leurs performances en passant par l'optimisation.

Chapitre I :

Généralités

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

I. Généralités

L'*IUPAC* définit le terme biocapteur comme un dispositif indépendant permettant de fournir des informations analytiques spécifiques quantitatives ou semi-quantitatives et constitué d'un élément de reconnaissance biologique au contact direct avec le capteur, appelé récepteur biochimique, et d'un transducteur électrique, optique, thermique ou gravimétrique[5] (Figure I-1). D'un point de vue plus technique, les biocapteurs peuvent être, comme le décrit la littérature, de conception plus ou moins complexe. Pour compléter la définition globale de l'*IUPAC*, leur architecture dépend de quatre grands paramètres qui sont : (i) le type de capteurs et la méthode de transduction associée, (ii) le type d'immobilisation de la sonde biologique, (iii) la méthode de mesure et enfin (iv) la cible choisie.

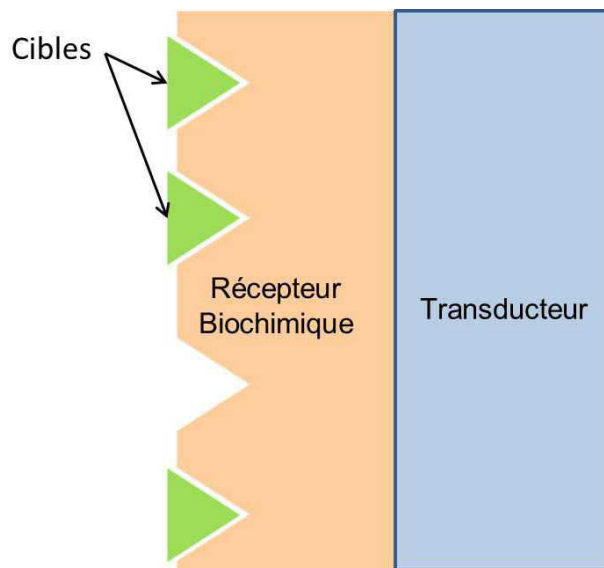


Figure I-1 : Schéma général d'un biocapteur selon la définition de l'IUPAC

Dans le cas où un capteur n'est pas assez sensible, une étape préalable de concentration est nécessaire. Cependant, cette étape est loin d'être intégrée à la majorité des dispositifs du fait de sa complexité. Ce chapitre s'attachera à détailler les grands types de biocapteurs existants dans le but d'expliquer le choix de l'électrochimie et à expliciter les aspects théoriques des mesures électrochimiques. Il y sera également détaillé les grands principes d'immobilisation des sondes biologiques et les différents modes de transduction de l'hybridation de l'ADN développés dans la littérature. Cependant, il est nécessaire de s'intéresser en premier lieu à la cible du biocapteur afin de développer une architecture adaptée à la détection de cette dernière. En effet, les cibles et architectures de biocapteurs sont variées. Les cibles les plus communes des biocapteurs sont les protéines, les enzymes, les anticorps et les acides nucléiques. La diversité des biocapteurs découle de l'abondance des

Généralités

molécules impliquées dans les processus biologiques de l'organisme. Il est évident que la compréhension des mécanismes biologiques et les progrès des biologistes engendrent de nouvelles voies à explorer pour les biocapteurs et réciproquement les biocapteurs jouent un rôle majeur dans la réalisation de progrès en biologie. Le choix de la cible est primordial pour l'élaboration du capteur puisqu'il va conditionner l'intérêt du développement d'un tel capteur ainsi que les difficultés technologiques ou techniques à surmonter. Ce choix doit donc être un compromis entre l'ambition d'élaborer un capteur innovant pour un diagnostic précoce et les contraintes induites par la cible qui ne pourront être surmontées.

A. Les acides nucléiques

Les biocapteurs d'acides nucléiques peuvent cibler deux types d'espèces biologiques qui sont d'une part les acides désoxyribonucléiques (ADN) et d'autre part les acides ribonucléiques (ARN).

1) L'acide désoxyribonucléique (ADN)

L'ADN génomique, porteur de l'information génétique chez les êtres vivants, a été découvert au XIX^{ème} siècle par le suisse *Friedrich Miescher*[6], [7]. C'est un copolymère stable constitué de quatre nucléotides chacun composé d'un groupement phosphate, d'un groupement désoxyribose (sucre), et d'une base aromatique purine ou pyrimidine qui peut être l'adénine (A), la thymine (T), la cytosine (C) ou la guanine (G). Ces bases aromatiques peuvent former des complexes A-T associés par deux liaisons hydrogènes et C-G associés par trois liaisons hydrogènes en milieu aqueux (Figure I-2). La formation spécifique de ces complexes constitue une reconnaissance supramoléculaire et ces nucléotides appariés sont appelés nucléotides complémentaires. De plus, il est possible de distinguer les deux extrémités d'une séquence d'ADN par les groupements chimiques les constituant. A la première extrémité, on trouve une fonction OH terminant le groupement sucre du dernier nucléotide ; c'est l'extrémité 3'. A la seconde extrémité, on trouve le groupement phosphate du dernier nucléotide ; c'est l'extrémité 5'.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

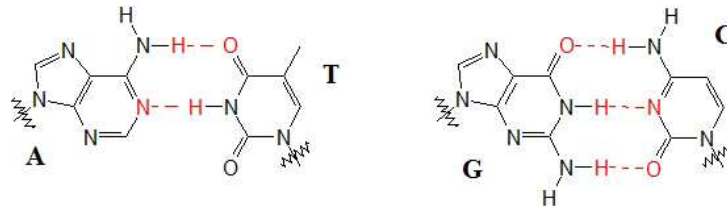


Figure I-2 : Structure des complexes Adénine-Thymine (A-T) et Cytosine-Guanine (C-G)

En 1953, *Watson* et *Crick* suggèrent que les copolymères d'ADN (ADN simple brin) forment avec une séquence de nucléotides complémentaires, par liaisons hydrogènes, un complexe appelé ADN double brin ou duplex d'ADN dont la géométrie est une double hélice chirale[8]. L'appariement des deux brins complémentaires doit s'effectuer en assemblant une extrémité 3' et une extrémité 5'. Pour l'ADN humain génomique, chaque duplex est composé d'environ 3,2 milliards de paires de bases. L'ADN a pour rôle de coder toutes les informations requises pour le développement, la croissance et le fonctionnement du corps en permettant la synthèse de toutes les protéines de l'organisme. C'est pour ces raisons que l'ADN est un biomarqueur privilégié des biocapteurs permettant la détection de maladies génétiques. Sa concentration dans le sang humain est de l'ordre de 4 ng.L^{-1} soit environ 10^{-18} M [9].

2) L'acide ribonucléique (ARN) et plus précisément les micro-ARNs (miRNAs)

L'ARN, quant à lui, est une molécule transcrite à partir de l'ADN. Sa structure, découverte en 1960 par *Jacob* et *Monod*[10], est proche de celle de l'ADN. L'ARN est constitué d'un groupement phosphate, d'un groupement ribose (sucre), et d'une base aromatique purine ou pyrimidine qui peut être l'adénine (A), l'uracile (U), la cytosine (C) ou la guanine (G). L'ARN est une molécule moins stable que l'ADN car son groupement ribose peut être hydrolysé en milieu aqueux[11]. L'hydrolyse du groupement sucre est un équilibre chimique, et l'ARN est hydrolysé lentement au cours du temps selon le mécanisme donné sur la Figure I-3

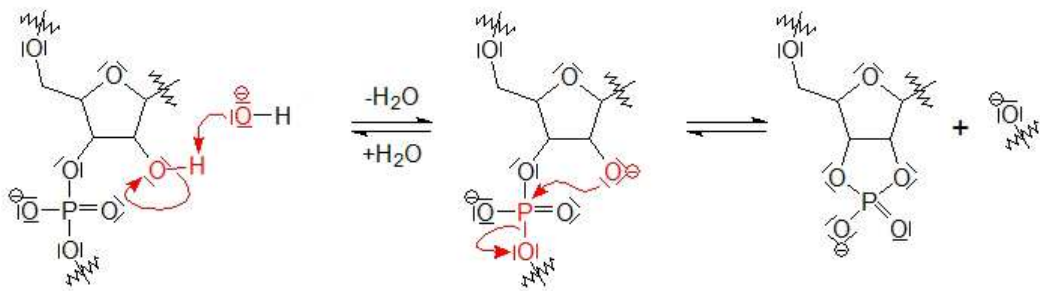


Figure I-3 : Mécanisme d'hydrolyse de l'ARN en milieu aqueux

Généralités

La thymine et l'uracile diffèrent l'un de l'autre par un groupement méthyle. Les nucléotides A et U sont complémentaires et forment un complexe par deux liaisons hydrogènes (Figure I-4).

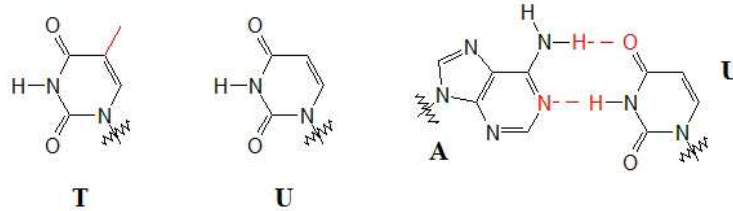


Figure I-4 : Structures de la Thymine (T), de l'Uracile (U) et du complexe Adénine-Uracile (A-U)

Il existe plusieurs types d'ARN avec des fonctions différentes. Le plus largement connu est l'ARN messager (mRNA) dont le rôle est de coder les séquences d'acides aminés formant les protéines. Les miRNAs ont été découverts il y a une trentaine d'années par l'équipe de Lee en menant des études sur un organisme modèle, *Caenorhabditis Elegans*, qui est une espèce de ver rond transparent[12]. Ce sont de petits acides ribonucléiques (environ 20 paires de bases) simples brins dont la fonction biologique est d'assurer la régulation de l'expression des gènes par appariement partiel avec des séquences d'ARNs messagers[13]. Les miRNAs constituent la dernière classe de molécules biologiques connue impliquée dans la régulation de l'expression génétique. De ce fait, leur fonction exacte n'est pas parfaitement connue. Cependant, il a été démontré que ces miRNAs sont d'excellents biomarqueurs. Par exemple, la différenciation des cellules tumorales par criblage des miRNAs permet de classer les cancers humains avec beaucoup plus de précision en comparaison avec le criblage des ARNs messagers[14]. D'autre part, des études ont récemment démontré que les miRNAs circulants pouvaient être considérés comme de nouveaux biomarqueurs fiables de l'infarctus aigu du myocarde (IAM)[15] et qu'ils étaient impliqués dans des pathologies hépatiques comme l'hépatite C, l'hépatite B, les troubles métaboliques ou la toxicomanie[16]. D'un point de vue plus général, les miRNAs semblent être des biomarqueurs de diverses maladies chroniques et de tout dérèglement cellulaire. La découverte des micro-ARNs est une avancée majeure dans le domaine du diagnostic puisque les analyses sont alors limitées à une centaine de miRNAs contre des milliers d'ARN messagers d'une part, et d'autre part puisqu'un diagnostic peut être établi précisément par la quantification d'environ 6 miRNAs montrant un schéma de concentration unique pour une pathologie[17]. De ce fait, les micro-ARNs sont les uniques cibles des biocapteurs développés dans cette thèse. La concentration des miRNAs circulant dans le sérum humain est comprise entre 10^{-12} et 10^{-17} M[18].

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

Actuellement, la méthode utilisée pour quantifier les micro-ARNs, et plus largement les acides nucléiques, est la PCR (*polymerase chain reaction*) qui consiste à amplifier *in vitro* un fragment d'ADN donné, à l'aide d'une réaction enzymatique, pour obtenir 10^6 à 10^9 copies du fragment en quelques heures. Cette technique de biologie moléculaire est combinée à une méthode de détection classique comme la fluorescence pour doser des échantillons d'acides nucléiques ne contenant que quelques copies d'une séquence connue. La PCR a été développée dans les années 1980 par Kary Mullis qui reçut le prix Nobel de chimie en 1993[19]. Il s'agit de synthétiser des copies du fragment initial à l'aide d'une enzyme, la DNA polymérase, de deux amorces (courts oligonucléotides de 20 à 25 bases) chacune complémentaire d'une extrémité d'un des deux brins (par exemple, une amorce complémentaire de l'extrémité 3' du premier brin, et l'autre amorce complémentaire de l'extrémité 3' du second brin), et des quatre nucléotides qui sont les réactifs (Figure I-5). Chaque cycle est composé de trois étapes : une étape de dénaturation pour séparer les deux brins d'ADN en chauffant, une étape d'hybridation des amorces sur les brins séparés en diminuant la température, et une étape d'élongation en augmentant de nouveau la température pour permettre l'action de l'enzyme. Il faut 30 à 40 cycles pour pouvoir quantifier les fragments d'ADN. De plus, les variations de température importantes nécessitent d'utiliser une enzyme thermo-résistante comme la polymérase issue d'une bactérie thermophile vivant dans les sources d'eau chaude, *Thermus Aquaticus*, appelée Taq polymérase et découverte en 1966 par Brock[20]. La PCR peut être intégralement automatisée mais il subsiste malgré tout des limitations à la quantification d'ADN par cette méthode. Tout d'abord, c'est une méthode onéreuse tant par l'appareillage nécessaire pour réaliser les cycles thermiques rapides que par les réactifs nécessaires (Taq polymérase, amorces spécifiques, nucléotides).

Figure I-5 : Schéma de principe de l'amplification d'acides nucléiques par Polymerase Chain Reaction (PCR) ; extrait de Brooklyn Academic Website [21]

De plus, malgré d'importants progrès sur le temps d'analyse ces dernières années, les cycles de chauffage-refroidissement nécessitent du temps. Dans le cas du diagnostic de certaines pathologies telles que l'Infarctus Aigu du Myocarde (IAM), la rapidité du diagnostic clinique et sa confirmation par l'analyse peuvent être primordiales afin d'obtenir un traitement le plus efficace possible et une guérison totale. Enfin, la limitation majeure de la technique est la précision. En effet, la quantification est réalisée en se basant sur la réplification de fragments références dont la fréquence de réplification en PCR est bien connue. Cependant,

Généralités

tous les fragments d'acides nucléiques n'ont pas nécessairement le même taux de réplication, ce qui peut conduire à des erreurs de quantification importantes puisque l'erreur est reportée sur les 30 à 40 cycles de réplication. A ceci s'ajoute l'éventualité de résultats faux positifs dans le cas où d'autres fragments que celui recherché présenteraient des extrémités similaires[22]. Ce sont ces limitations qui encouragent à mettre au point une technique de quantification qui répond aux contraintes suivantes : rapidité du dosage avec un protocole le plus rapide possible, inférieur à une heure, une méthode sans amplification du fragment d'ADN pour éviter les erreurs de quantification d'un cycle à l'autre, sans marquage de la cible pour une utilisation simplifiée en milieu médical, et le plus sélectif possible pour éviter les résultats faux positifs. Pour cela, il convient dans un premier temps de choisir le type de biocapteurs le mieux adapté pour détecter et quantifier l'hybridation d'un miRNA choisi avec sa cible complémentaire.

B. Les différents types de capteurs

De nombreux types de biocapteurs existent en fonction de la méthode de transduction et de détection choisie. Cependant, ils peuvent être classés en trois grandes catégories qui sont : (i) les capteurs optiques (fluorescence[23], luminescence[24], absorption[25]), (ii) les capteurs basés sur la différence de masse, principalement les capteurs à cristal de quartz piézo-électrique[26] et enfin (iii) les capteurs électrochimiques.

1) Les capteurs optiques

Les capteurs optiques sont certainement ceux offrant le plus large éventail de modes de transduction. Il s'agit alors de traduire un évènement biologique, dans ce cas précis l'hybridation de deux simples brins d'acides nucléiques, en un signal dans un premier temps optique. Il peut s'agir d'un changement de couleur, de l'émission ou de l'absorption d'un signal de fluorescence ou de luminescence. Ce signal optique peut ensuite être traduit et recueilli sous forme d'un signal électrique pour être traité numériquement.

a) *Transduction basée sur la fluorescence*

Ce type de transduction est très largement utilisé dans les domaines comme la biologie ou la biochimie depuis quelques décennies. Le principe repose sur l'utilisation d'une molécule pouvant être fluorescente (fluorophore) sous une excitation par un rayonnement extérieur. Il s'agit ensuite d'exciter la molécule à la bonne longueur d'onde et de mesurer la variation de fluorescence provoquée par l'évènement biologique à détecter. Plusieurs stratégies ont été

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

développées pour traduire un évènement biologique à l'aide de la fluorescence. Il est possible de travailler en marquant les sondes ou les cibles biologiques avec une molécule fluorescente[27]. C'est alors le changement de conformation de l'espèce biologique marquée dû à l'hybridation qui va entraîner une modification des propriétés de désexcitation conduisant à l'émission ou au contraire l'extinction (*quenching*) de la fluorescence. D'autre part, certaines stratégies utilisent des molécules fluorescentes qui s'intercalent dans la couche d'ADN (bromure d'éthyldium, *Oligreen*[28]) plutôt que des marquages covalents (Figure I-6). Pour le capteur de *Chen et al.*, présenté sur ce schéma, la cible du capteur est l'adénosine. Dans un premier temps, des aptamères thiolés spécifiques de l'adénosine sont donc mis au contact de l'échantillon. Puis, des nanoparticules d'or sont ajoutées, à la surface desquelles les aptamères thiolés viennent s'adsorber. Enfin, l'intercalant fluorescent *Oligreen* est mis en présence de l'échantillon. Cet intercalant ne peut se fixer que sur les aptamères dépliés. En l'absence d'adénosine (haut de la Figure I-6), tous les aptamères qui s'adsorbent sur les nanoparticules d'or sont dépliés car non liés à une molécule d'adénosine. Après l'ajout de *Oligreen*, un rayonnement à sa fréquence d'excitation est appliqué. L'adsorption des aptamères enrichis en intercalant sur les nanoparticules d'or provoque le quenching de la fluorescence de cet intercalant et aucun rayonnement n'est réémis. Au contraire, en présence d'adénosine, les nanoparticules d'or sont saturées par les aptamères liés à la cible. Les aptamères liés à l'adénosine sont plus encombrants et tous les aptamères ne peuvent être adsorbés. Les aptamères restants en solution et non liés à l'adénosine sont dopés en *Oligreen* et leur fluorescence n'est pas quenchée lors de l'application du rayonnement. Il y a donc augmentation de la fluorescence mesurée pour quantifier l'adénosine.

Figure I-6 : Schéma de principe d'une détection par fluorescence de l'adénosine utilisant des nanoparticules d'or, des aptamères et la molécule fluorescente Oligreen (extrait de enrichment and fluorescence enhancement of adenosine using aptamer-gold nanoparticles, PDGF aptamer, and Oligreen ; Chen *et al.*[28])

Des molécules secondaires fluorescentes peuvent également être utilisées pour provoquer une compétition entre ces celles-ci et la cible du capteur et par conséquent détecter indirectement un évènement biologique.

Cependant, ce type de stratégies développées il y a quelques années présente des inconvénients comme une fenêtre d'absorption réduite, une fenêtre d'émission très vaste, qui peuvent poser problème. C'est pourquoi de nouveaux matériaux ont été développés ces dernières années comme les quantum dots[29], les nanoparticules fluorescentes[30], ou

Généralités

encore les nano-agrégats[31]. D'autres stratégies plus complexes, mais beaucoup plus efficaces ont également été élaborées comme le FRET[32] (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) utilisant un couple donneur/accepteur fluorescent[33]. Dans ce cas, les deux molécules doivent se situer à une distance inférieure à 2 nm. La première molécule est excitée, transfère l'énergie à la seconde lors de sa désexcitation, qui fluoresce à une longueur d'onde supérieure (l'énergie est plus faible) et permet de détecter l'évènement biologique. Aussi, la résonance du plasmon de surface est parfois utilisée avec la fluorescence[34]. Cependant, cette technique exige des conditions bien particulières (rendements quantiques et intensités suffisants, persistance, stabilité dans le temps, non-perturbation de l'émission par l'excitation) parfois difficiles à mettre en œuvre. De plus, les sondes marquées sont le plus souvent très onéreuses.

b) Transduction basée sur la chimiluminescence ou l'électroluminescence

La méthode de la luminescence repose également sur la mesure d'émission de photons. Dans ce cas précis, l'émission de photons est provoquée soit par une réaction chimique (chimiluminescence) soit par une réaction électrochimique (électroluminescence). Il n'y a en aucun cas besoin d'utiliser un rayonnement pour exciter les molécules et provoquer l'émission de photons. C'est un avantage puisque cela évite les perturbations du signal mesuré par le rayonnement d'excitation. Comme pour la fluorescence, l'évènement biologique peut être observé par une augmentation (ou apparition) ou par une diminution (ou disparition) de la luminescence. Pour l'électroluminescence, l'une des stratégies possibles est d'utiliser, comme Chen *et al.*[35], une molécule électroluminescente présentant une forte affinité pour la sonde ADN immobilisée sur l'électrode. Dans ce cas, la molécule réactive s'accumule près de l'électrode et il devient facile d'obtenir la luminescence par oxydation de cette molécule. Cependant, en présence de la séquence complémentaire de la sonde ADN, l'encombrement stérique provoqué par l'hybridation empêche l'accumulation de la molécule luminescente et une diminution de luminescence à l'électrode est alors mesurée. Une stratégie de détection indirecte peut également être employée, comme Li *et al.*[36], en utilisant trois sondes ADN (Figure I-7). La première sonde est complémentaire de la thrombine qui est la cible à détecter, la seconde est partiellement complémentaire de la première et est marquée par la molécule luminescente, ici un complexe de ruthénium, et la troisième est complémentaire de l'extrémité marquée de la seconde. Dans un premier temps, la séquence 1 est adsorbée sur l'électrode et la séquence 2 s'hybride avec la séquence 1. La séquence 3 est ensuite adsorbée sur l'électrode. En appliquant un potentiel suffisant pour oxyder le complexe de ruthénium,

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

aucune luminescence n'est observée. Lorsque le dispositif est mis en présence de la thrombine, sa capture par la séquence 1 provoque un changement de conformation des sondes. L'extrémité déshybridée et marquée de la séquence ADN 2 s'hybride alors à la séquence 3 et le complexe de ruthénium se retrouve à proximité de l'électrode. Le même potentiel que précédemment est appliqué pour oxyder le ruthénium proche de l'électrode et il est alors possible de mesurer une électroluminescence et par conséquent de doser indirectement la thrombine avec une limite de détection de $2,0 \times 10^{-15} M$.

Figure I-7 : Schéma de la détection indirecte de la thrombine par électroluminescence utilisant des aptamères et un complexe de ruthénium électro-luminescent (extrait de [electrogenerated chemiluminescence aptasensor for ultrasensitive detection of thrombin incorporating an auxiliary probe](#) ; Li *et al.*[36])

Pour la chimiluminescence, il s'agit d'utiliser une sonde marquée par une molécule spécifique pouvant créer une réaction de chimiluminescence. Une fois que la sonde a capturé sa cible, elle est mise en présence de réactifs chimiques permettant la réaction et l'émission de photons est alors mesurée. L'hybridation peut alors être traduite par une apparition ou une extinction de la luminescence. L'une des réactions de chimiluminescence majoritairement utilisée est la réaction entre l'eau oxygénée et le luminol catalysée par la horseradish peroxydase (HRP). Il est alors envisageable, comme l'avaient fait Cai *et al.*[37], de marquer une sonde ADN par la HRP, de capturer les objets biologiques, d'isoler les sondes hybridées, de réaliser la réaction luminescente et de la quantifier. D'autres stratégies existent, comme celle de Huang *et al.*[38], qui utilise une sonde ADN biotinylée, la HRP marquée par la streptavidine, l'eau oxygénée et le luminol pour détecter la capsase 3 qui rompt la liaison ADN/biotine, inhibant ainsi le transfert d'énergie par résonance (Figure I-8). Dans un premier temps, les sondes ADN biotinylées sont adsorbées sur des nanoparticules d'or. Les sondes ADN sont mises en présence de HRP marquée par la streptavidine et l'interaction forte biotine/streptavidine permet de fixer la HRP aux nanoparticules. L'ensemble est ensuite mis en présence d'eau oxygénée et de luminol. En l'absence de capsase 3, la réaction de fluorescence entre la HRP, l'eau oxygénée et le luminol est quenchée par transfert d'énergie par résonance du fait de la proximité des nanoparticules d'or. Mais en présence de capsase 3, la liaison chimique biotine/ADN est rompue et l'ensemble HRP-streptavidine-biotine est relargué en solution. Dans ce cas la réaction de chimiluminescence attendue n'est plus

Généralités

quenchée et la mesure du rayonnement émis permet de quantifier la capsase 3 avec une limite de détection de l'ordre de 20 pM.

Figure I-8 : Schéma du principe d'une détection de la capsase 3 par chimiluminescence utilisant des nanoparticules d'or (extrait de [chemiluminescent detection of cell apoptosis enzyme by gold nanoparticle-based resonance energy transfer assay](#) ; Huang *et al.*[38])

c) Transduction basée sur la colorimétrie

La transduction basée sur la colorimétrie s'appuie sur un changement de couleur direct détectable à l'œil nu lorsque la cible est présente et capturée[39]. Le principal avantage de cette méthode de transduction est sa simplicité de mise en œuvre. En effet, la technique dépend très peu, voire pas du tout de l'instrumentation analytique traditionnelle. De ce fait cette méthode rend les analyses possibles sur le terrain et en temps réel comme pour les éthylotests utilisés par les autorités en contrôle routier. Cependant, la quantification devient difficile voire impossible. La plupart des techniques colorimétriques employées aujourd'hui utilisent les nanoparticules d'or en solution qui présentent une couleur rouge. C'est donc un colorant très visible pour les tests et permettant de nombreuses fonctionnalisations. Une des solutions est d'utiliser, comme Song *et al.*[40], des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des anticorps spécifiques d'une cible et de fixer ces mêmes anticorps dans une zone de confinement d'un système microfluidique (Figure I-9). Le système est constitué d'une membrane en nitrocellulose permettant la migration de l'échantillon par capillarité. L'immobilisation d'anticorps spécifiques des cibles à détecter est réalisée sur 4 lignes différentes. Des nanoparticules d'or sont fonctionnalisées par des anticorps spécifiques de la Bovine Serum Albumine (BSA) et les cibles à détecter sont marquées par la BSA. En l'absence d'analyte dans l'échantillon, les nanoparticules ne se lient à aucune molécule et ne sont pas retenues par les anticorps immobilisés. Aucune coloration n'est alors observée. Cependant, en présence de l'analyte, celui-ci est d'abord fixé aux nanoparticules par le marquage BSA. Dans un deuxième temps, lorsque l'échantillon migre par capillarité, les analytes sont spécifiquement retenus par les anticorps correspondants sur chaque ligne. Les nanoparticules en solution donnent une coloration rouge à chaque ligne et l'analyte peut alors être quantifié par mesure de l'absorbance avec une sensibilité faible.

Figure I-9 : Schéma de principe d'une détection colorimétrique basée sur nanoparticules d'or (extrait de [multiplex lateral flow immunoassay for mycotoxin determination](#) ; Song *et al.*[40])

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

Cependant, ces dernières années, des méthodes utilisant des sondes ADN ont permis de mettre au point des tests colorimétriques ADN[41]. Dans la stratégie de Jeong *et al.* présentée sur la Figure I-10, la présence commune d'un ADN modèle, de la cible recherchée et d'une amorce ADN thiolée permet leur assemblage et la polymérisation en présence d'une enzyme polymérase qui permet l'apparition d'une couleur mauve. En effet, dans un premier temps, une amorce ADN thiolée est immobilisée sur une électrode d'or. Parallèlement, l'échantillon est mis en présence d'un ADN modèle ayant la particularité de devenir circulaire en présence de la séquence ADN recherchée et d'une enzyme ligase. L'ensemble est alors mis en présence de l'amorce ADN thiolée complémentaire de l'ADN modèle à la surface de l'or et permettant de l'immobiliser. L'ajout de réactifs permettant la polymérisation de l'ADN modèle sous forme circulaire est réalisé puis un potentiel adéquat est appliqué sur les électrodes d'or. En l'absence de la séquence ADN recherchée, l'ADN modèle n'a pas adopté sa conformation circulaire et la polymérisation ne peut avoir lieu. Après l'application du potentiel, il n'y a donc aucun changement de l'aspect du système. En revanche, en présence de l'analyte dans l'échantillon, l'ADN modèle est sous forme circulaire la polymérisation peut avoir lieu. Après l'application du potentiel sur les électrodes présentant l'ADN polymérisé, l'apparition d'une couleur rose intense est observée et permet de quantifier l'ADN cible avec une LOD faible.

Figure I-10 : Schéma de principe d'un capteur ADN colorimétrique (extrait de [RCA-based biosensor for electrical and colorimetric detection of pathogen DNA ; Jeong *et al.*\[41\]](#))

Cette technique est donc surtout qualitative et nécessite le plus souvent des réactifs ou des sondes très chères et parfois fragiles, donnant lieu à des capteurs pas toujours robustes.

2) Les capteurs basés sur la mesure de masse

Ces capteurs sont basés sur la mesure d'une différence de signal proportionnelle à la variation de masse[42]. En effet, les liaisons entre protéines, cellules ou brins d'ADN greffés sur un substrat solide génèrent des variations de masse. Les techniques les plus courantes emploient principalement des cristaux de quartz. La méthode la plus répandue est la microbalance à quartz (QCM) utilisant la fréquence de résonance des cristaux de quartz pour évaluer la variation de masse avant et après reconnaissance de la cible[43]. L'augmentation de la masse à la surface du cristal entraîne une diminution de la fréquence de résonance qui permet de détecter l'hybridation. Cependant, d'autres types de capteurs, utilisant des

Généralités

microcantilever comme support de fixation de sondes ADN, sont recensés dans la littérature. C'est ensuite la mesure de la déviation de ces supports qui permet de détecter la variation de masse due à l'hybridation[44]. Ce sont des capteurs très efficaces puisqu'ils permettent de détecter et mesurer des différences de masse extrêmement faibles même si leur limite de détection correspondante reste assez élevée. Cependant, ces techniques nécessitent un appareillage important et plus onéreux que d'autres techniques comme l'électrochimie. Elles ne sont donc pas vraiment adaptées à une application de diagnostic clinique.

3) Les capteurs électrochimiques

Ces capteurs s'appuient sur des méthodes de mesures électrochimiques et donc sur les propriétés électriques (*i.e.* charge ou conduction électronique) des acides nucléiques. En effet, il va être possible dans ce cas de détecter et quantifier l'hybridation d'ADN en évaluant le transfert électronique à la surface de l'électrode où sont immobilisées les sondes avant et après hybridation. De nombreux types de transductions existent d'ores et déjà dans la littérature et seront détaillés dans la suite de ce manuscrit. Ces différentes stratégies varient par la méthode de mesure électrochimique, l'immobilisation des sondes, la sonde rédox utilisées.

C'est la transduction électrochimique qui a été retenue pour concevoir les biocapteurs qui sont l'objet de ce travail. En effet, l'électrochimie est le seul mode de transduction qui permet de convertir un évènement biologique directement en un signal électrique sans conversion intermédiaire qui nécessiterait des composants supplémentaires et entraînerait une modification du signal au cours de la transduction. Ce point clé fait de l'électrochimie une méthode de transduction appréciée des chercheurs. C'est pourquoi les biocapteurs électrochimiques font l'objet de nombreuses recherches dans la communauté scientifique ces deux dernières décennies (Figure I-11) représentant environ 40 % des publications sur les biocapteurs ADN pour atteindre 50 % sur l'année 2015.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

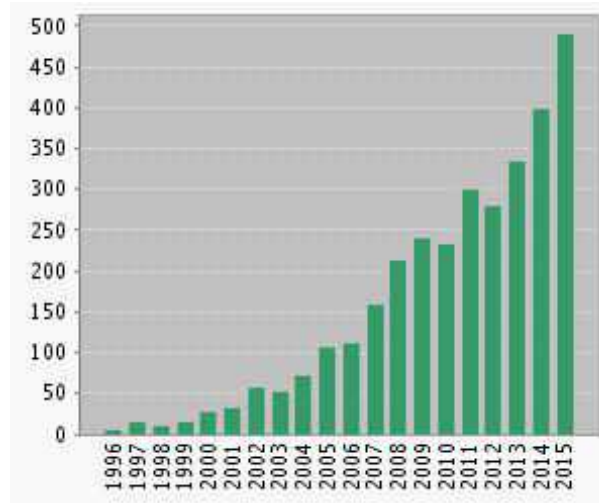


Figure I-11 : Nombre de publications portant sur les biocapteurs ADN électrochimiques ces 20 dernières années

Néanmoins, aucun biocapteur électrochimique n'a réussi à supplanter la PCR jusqu'à présent. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire de poursuivre les recherches dans ce domaine au vu des résultats apportés par les différents groupes développant cette thématique.

C. Les différentes méthodes d'immobilisation des sondes sur l'électrode

Afin de construire un biocapteur électrochimique d'acides nucléiques, il convient d'immobiliser une sonde complémentaire du fragment à détecter à la surface d'une électrode par des interactions physiques ou chimiques. L'immobilisation peut alors reposer sur des interactions faibles, de types électrostatiques ou *Van der Waals*, ou des interactions fortes comme des liaisons covalentes ou semi-covalentes.

1) Immobilisation par adsorption physique

Le moyen le plus simple d'immobiliser des acides nucléiques à la surface d'une électrode est l'adsorption physique[45] ; en effet, cette méthode permet l'immobilisation de sondes ADN sans aucune modification chimique de leur structure. On peut cependant distinguer deux types d'adsorption physique : l'adsorption physique directe et l'adsorption physique électro-assistée. L'adsorption directe est réalisée en plongeant l'électrode dans une solution aqueuse contenant la sonde ADN. L'adsorption peut être due à des interactions électrostatiques entre les sondes ADN et la surface. Il est possible d'améliorer l'efficacité de l'adsorption physique avec la complémentarité de charge sonde-substrat, par exemple avec une électrode de carbone modifiée par un film de polypyrrole chargé positivement et créant une force électrostatique conduisant à l'adsorption des ADNs sondes chargés négativement à

Généralités

la surface du film[46]. Aussi, il est envisageable d'immobiliser les sondes ADN par adsorption physique électro-assistée. Cette approche consiste à appliquer un potentiel positif à l'électrode de travail, qui conduit à la formation d'une charge de surface positive dans l'électrode, pour immobiliser les brins d'ADN chargés négativement[47]. Il est important de préciser que le potentiel imposé doit être de sorte qu'il permette l'accumulation des ADNs à la surface de l'électrode sans toutefois entraîner l'oxydation des bases de l'ADN telles que la guanine[48]. Les potentiels utilisés pour l'adsorption se situent classiquement entre +0,4 et +0,5 V par rapport à l'électrode de référence Ag/AgCl (3 M KCl)[49]. L'adsorption de brins d'ADN assistée par électrochimie offre également la possibilité de favoriser la cinétique de leur adsorption. L'adsorption physique des sondes sur l'électrode présente pour avantages une simplicité d'utilisation ; les sondes ne subissent pas de marquage chimique et l'adsorption se réalise en une seule étape ; et un coût d'utilisation très bas. Cependant, l'immobilisation est réversible sous l'effet de la température ou encore de la compétition avec d'autres espèces qui peuvent s'adsorber sur le substrat, ce qui confère à la couche de sondes une stabilité chimique assez faible. De plus, le taux d'hybridation observé avec cette méthode est relativement faible du fait de l'enchevêtrement des sondes accumulées à l'électrode et elle n'est donc pas la plus adaptée à une application de diagnostic médical avec une limite de détection observée de 0,25 μM [49].

2) Immobilisation par voie chimique

L'immobilisation par voie chimique, basée sur la formation de liaisons fortes, comme des liaisons covalentes, améliore la stabilité du biocapteur. Il s'agit dans ce cas de greffer à une extrémité du simple brin de la sonde ADN un groupement chimique qui va pouvoir réagir spécifiquement avec la surface de l'électrode pour immobiliser les sondes de manière durable[48]. Par exemple, une des voies couramment utilisée pour ce type d'immobilisation est la réaction de couplage peptidique en utilisant l'éthylcarbodiimide (EDC) et le N-hydroxysuccinimide (NHS) pour activer les groupements acides carboxyliques et greffer des sondes marquées amine (ou acide carboxylique) sur la surface de l'électrode modifiée par des groupements acides carboxyliques (ou amines)[50]. D'autres travaux décrits dans la littérature s'appuient sur des interactions biologiques fortes entre protéines comme le couple avidine-biotine[51]. Les interactions entre ces deux espèces ne sont pas covalentes mais sont très fortes. En effet, elles comptent parmi les plus fortes interactions non covalentes connues à ce jour, avec une constante d'association 100 fois plus forte que les valeurs de constantes d'association protéine-ligand habituelles[52]. Outre la plus grande stabilité du capteur

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

conférée par ce type d'immobilisation, cette voie permet également un recouvrement de la surface de l'électrode plus homogène et régulier qu'avec l'adsorption physique. Cependant la procédure d'immobilisation est plus complexe, longue et comporte plus d'étapes.

Une méthode particulière d'immobilisation sur carbone basée sur l'exemple du couplage peptidique utilise un sel de diazonium réduit à la surface d'une électrode de carbone graphite pour conduire à son électro-greffage[53]. Le mécanisme de greffage covalent du diazonium (Figure I-12) élucidé par Savéant, Pinson *et al.*[54], tous deux à l'origine de la méthode, est bien connu et confère une grande robustesse à la couche ainsi formée[55].

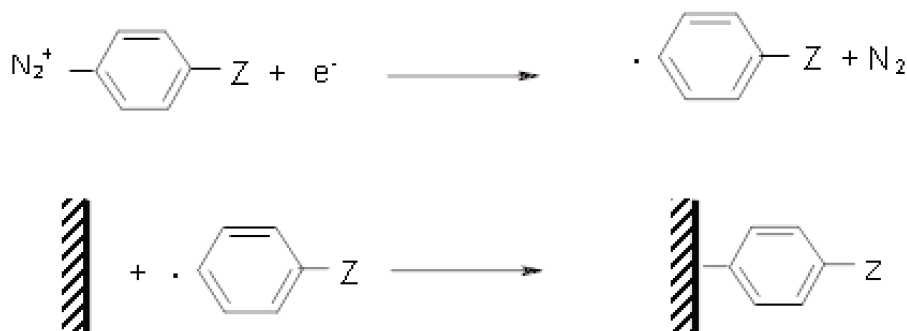


Figure I-12 : Mécanisme de greffage à partir d'un sel de diazonium

Le sel de diazonium possède un groupement acide carboxylique comme substituant (Z = COOH) et permet alors d'utiliser la technique de couplage peptidique pour greffer une sonde ADN marquée par une amine sur la couche d'accroche composée du diazonium réduit. On peut alors résumer la procédure d'immobilisation de la sonde avec la Figure I-13.

Généralités

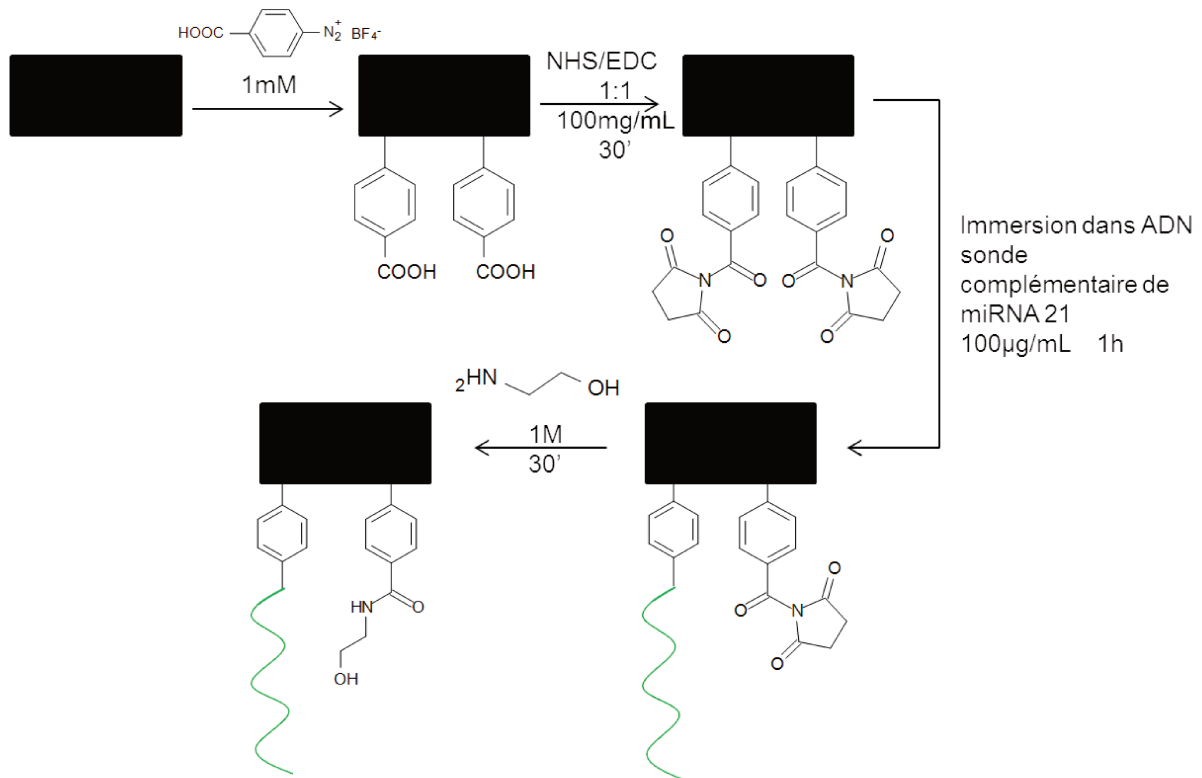


Figure I-13 : Schéma récapitulatif de la méthode d'immobilisation des sondes utilisées sur électrodes de carbone

Une autre méthode d'immobilisation chimique des sondes ADN s'appuie sur les interactions entre les atomes de soufre et d'or permettant de former des liaisons semi-covalentes (environ $200\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)[56]–[58] relativement robustes. Pour cela, des sondes ADN marquées par des groupements contenant un ou plusieurs atomes de soufre (le plus souvent des thiols ou des disulfures) sont utilisées. Cette technique permet alors la formation de monocouches auto-assemblées (SAMs) (Figure I-14) de sondes marquées à la surface d'électrodes en or. Cette méthode permet également d'obtenir des couches compactes et très homogènes à la surface de l'électrode. La densité des monocouches de molécules thiolées sur surface d'or varie selon le ligand, la rugosité de l'or et la préparation de l'électrode entre 3×10^{-10} et $8 \times 10^{-10}\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ [59].

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

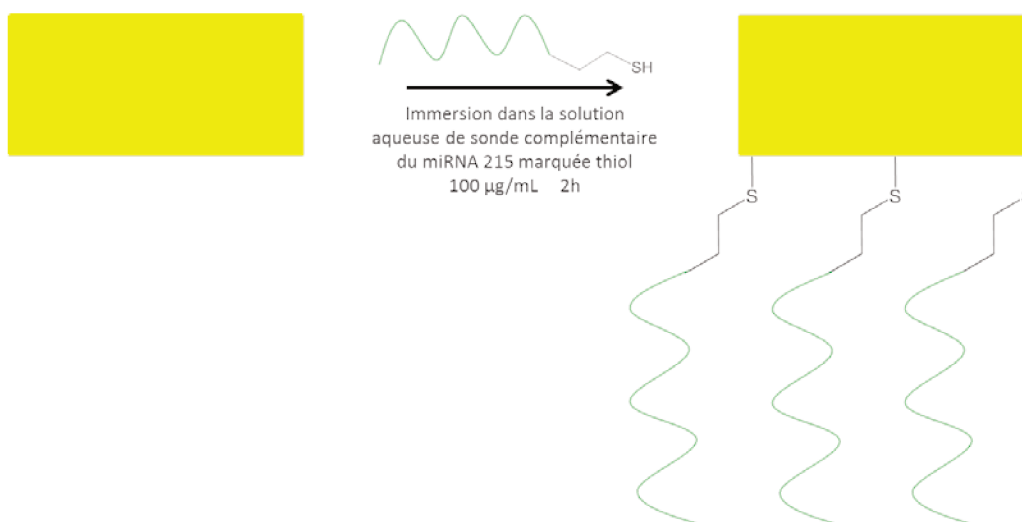


Figure I-14 : Schéma récapitulatif de la méthode d'immobilisation des sondes utilisée sur les électrodes d'or

La réduction de sel de diazonium suivie du couplage peptidique repose sur des interactions covalentes robustes et permet d'obtenir des monocouches plus stables en comparaison aux SAMs sur or pour lesquelles une désorption des sondes peut survenir. La désorption des sondes peut être due à l'augmentation de la température ou à des réactions de compétition avec d'autres molécules soufrées dans les milieux biologiques comme des cystéines ou des protéines contenant des cystéines. Cependant, pour limiter l'effet de la désorption des sondes présentant un groupement d'ancrage avec plusieurs soufres, comme l'acide thioctique[60], [61] (Figure I-15), peuvent être employées. Par ailleurs, l'auto-assemblage des molécules thiolées à la surface de l'or permet d'éviter la formation de multicouches, plus difficile à contrôler dans le cas de la réduction du sel de diazonium.

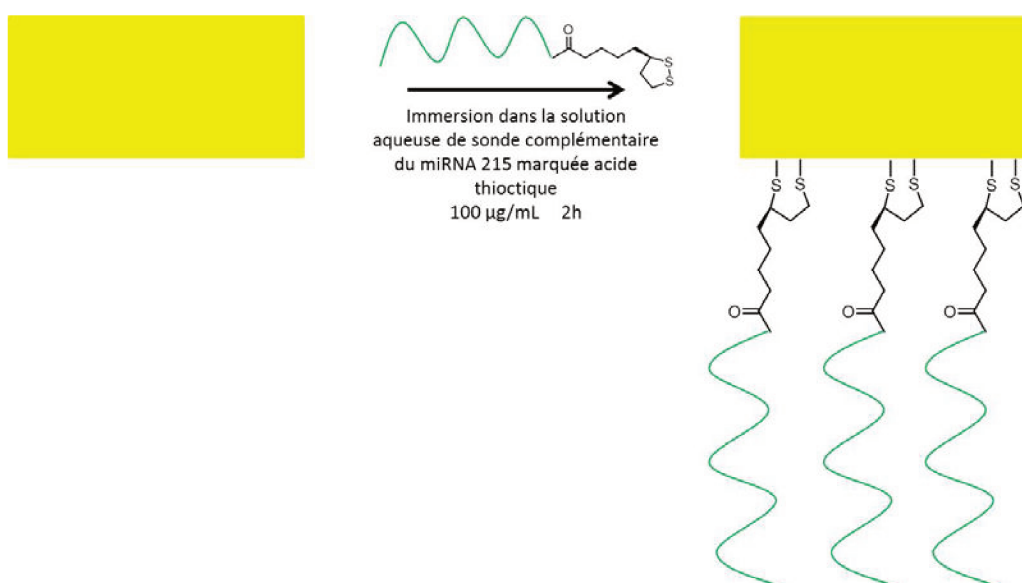


Figure I-15 : Schéma récapitulatif de la méthode d'immobilisation des sondes marquées par l'acide thioctique utilisée sur les électrodes d'or

Généralités

D. Les méthodes de mesure électrochimiques

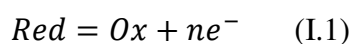
La méthode utilisée pour les mesures électrochimiques sur le biocapteur peut jouer un rôle important dans les performances de celui-ci. Il existe de nombreuses méthodes de mesures électrochimiques. Chacune permet d'obtenir des informations différentes sur le système étudié. La méthode de mesure est alors choisie en fonction de l'architecture du biocapteur choisi. Selon les cas, un potentiel (respectivement un courant) est appliqué, et le courant (respectivement le potentiel) correspondant est mesuré. Les différentes méthodes sont listées dans le Tableau I-1.

Tableau I-1 : Tableau récapitulatif des méthodes de mesures électrochimiques disponibles

Technique	Entrée	Sortie / lecture
Ampérométrie	ΔU°	<u>$I(t)$</u>
Potentiométrie	ΔI°	<u>$\Delta U(t)$</u>
Voltampérométrie cyclique/linéaire	$\Delta U^\circ \pm r \times t$	<u>$I(t)$</u>
Conductimétrie	$ \Delta U^\circ \times \sin(\omega \times \Delta t) $	$ \Delta I^\circ \times \sin(\omega \times \Delta t + \phi) $ $\underline{K \times \Delta U^\circ / \Delta I^\circ}$
Spectroscopie d'impédance électrochimique	$\Delta U_1^\circ \pm r \times t + \Delta U_2^\circ \times \sin(\omega \times \Delta t)$ $\Delta U_2^\circ \ll \Delta(\Delta U_1^\circ \pm r \times t)$	$I^\circ + \Delta I^\circ \times \sin(\omega \times \Delta t + \phi)$ $\underline{I_0}; Z = \Delta U^\circ / \Delta I^\circ; \phi$
Voltampérométrie différentielle pulsée	$\Delta U_1^\circ \pm r \times t + \Delta U_2^\circ \times \text{Sgn}(\sin(\omega \times \Delta t))$ $\Delta U_2^\circ \ll \Delta(\Delta U_1^\circ \pm r \times t)$	$I(t)$ $\underline{(I(t+\pi/\omega) + I(t))/2}$
Potentiel de circuit ouvert	$\Delta I^\circ = \varepsilon$	<u>$\Delta U(t)$</u>

U : Potentiel (V) ; I : Intensité du courant (A) ; r : Vitesse de balayage ($V.s^{-1}$) ;
t : Temps (s) ; ω : Pulsation de l'onde électrique (Hz) ; Φ : Déphasage

La plupart des biocapteurs électrochimiques d'acides nucléiques utilise l'ampérométrie comme méthode de mesure électrochimique. L'ampérométrie est une technique classique de mesure électrochimique qui permet de mesurer le courant faradique pour une réaction rédox telle que :



Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

A un potentiel appliqué $E_{app} \gg E_{(Ox/Red)}^0$ (potentiel standard de l'espèce redox utilisée), le processus électrochimique est la conséquence (Figure I-16) :

- du transport d'espèces électroactives en solution à la surface de l'électrode par diffusion, convection ou migration.
- du transfert de charges à l'interface électrode/solution

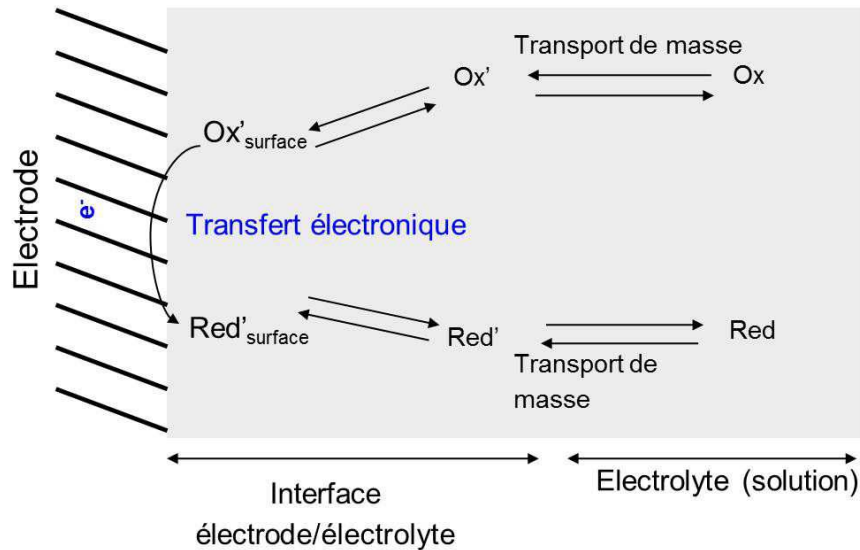


Figure I-16 : Schéma général du processus électrochimique à l'interface électrode/solution

Ce courant faradique peut être séparé en deux composantes qui sont le courant faradique non-stationnaire d'une part, aussi appelé courant de *Cottrell* (i_{fc}), qui s'établit immédiatement après l'application du potentiel et décroît très vite et en un temps assez court, et d'autre part, le courant faradique stationnaire (i_{fs}) qui s'établit après un temps plus long. Ces caractéristiques sont la conséquence directe de la géométrie de l'électrode.

Le signal ampérométrique possède également une autre composante qui est appelée courant capacitif (i_c). Ce courant est dû à la résistance de l'électrolyte au voisinage de la surface de l'électrode. L'électrolyte forme, très près de l'électrode, une double couche électrochimique d'épaisseur nanométrique comme décrit dans le modèle de *Stern*[62]. Cette double couche, composée d'espèces chargées, peut être considérée comme une capacité électrique dont la charge crée un courant capacitif transitoire. Ce courant disparaît après quelques instants mais peut apparaître de nouveau après une perturbation du système. Les expressions analytiques de ces trois composantes du courant faradique sont détaillées ci-après dans le cas des ultramicro-électrodes (UMEs) ainsi que des électrodes millimétriques. Ces

Généralités

expressions sont aussi détaillées dans le cas d'espèces rédox en solution et adsorbées à la surface de l'électrode.

Pour commencer, il est nécessaire de rappeler quelques hypothèses de base nécessaires pour la suite du développement théorique de la mesure électrochimique : le phénomène de migration est négligeable du fait de l'utilisation d'un électrolyte support et le phénomène de convection est négligeable au voisinage de l'électrode. Par conséquent, un régime de diffusion pure est adopté pour exprimer le processus électrochimique. Aussi, deux équations simples doivent être connues pour comprendre la résolution analytique des expressions des différentes composantes du courant. Ce sont les lois de *Fick* :

$$\vec{J}_R = -D_R \overrightarrow{\text{grad}} C_R \quad (\text{I.2})$$

J_R : flux de matière de l'espèce Réductrice (R) à l'électrode ($\text{mol.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$)

$$\frac{\partial C_R}{\partial t} = D_R \Delta C_R \quad (\text{I.3})$$

D_R : coefficient de diffusion de l'espèce R ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)

C_R : concentration de l'espèce R (mol.m^{-3})

Habituellement, les électrodes disques sont utilisées pour fabriquer des biocapteurs électrochimiques. C'est pourquoi les résolutions analytiques sont exprimées pour cette géométrie d'électrodes avec r_0 (en m) le rayon de l'électrode. L'équation (I.3) doit donc être écrite en coordonnées cylindriques (Figure I-17).

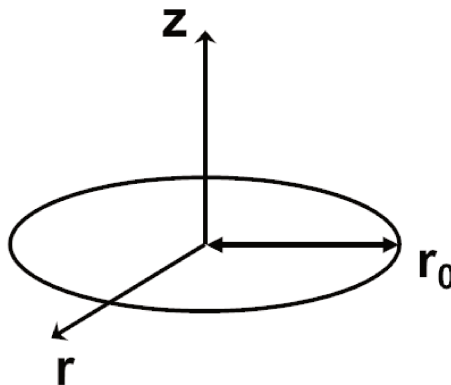


Figure I-17 : Schéma explicatif des coordonnées cylindriques

Pour les électrodes de géométrie bande, il est nécessaire d'utiliser les coordonnées polaires avec la longueur des bandes L (en m) très supérieure à leur largeur w (en m). L'angle φ définit alors l'angle entre le vecteur de longueur r (en m) et le plan de l'électrode (Figure I-18).

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

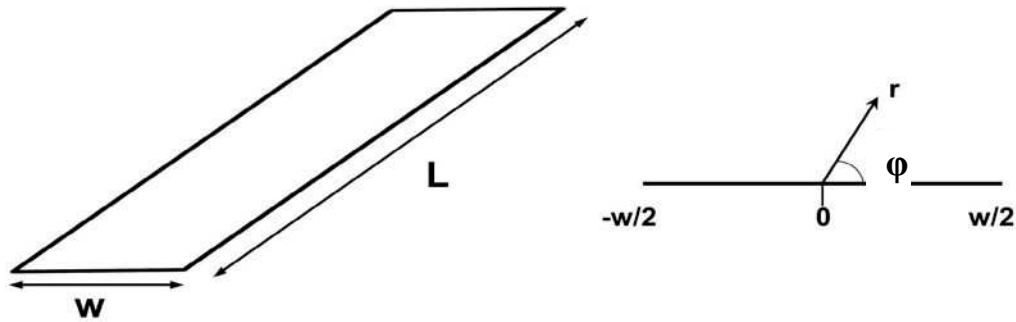


Figure I-18 : Schéma explicatif des coordonnées polaires pour une électrode de géométrie bande

1) Cas des systèmes rédox en solution

Le cas le plus général est celui d'un système rédox en solution à la concentration C_R^* . Dans ces systèmes électrochimiques, la diffusion gouverne le transport de matière dans les premiers instants jusqu'à ce que la taille de la couche de diffusion atteigne des dimensions de l'ordre de 300 à 400 μm . Ensuite, le transport de matière est également assuré par la convection naturelle existant au sein de l'électrolyte[63]. Pour comparer les électrodes millimétriques et les Ultra-MicroElectrodes (UME) plus simplement, l'hypothèse réalisée consiste à négliger la convection naturelle et à ne considérer que le transport de matière par diffusion.

Cas des électrodes de géométrie disque

Tout d'abord, il faut relier l'intensité du courant à la première loi de *Fick*. Pour cela, le flux de matière à l'électrode est considéré égal à la vitesse de consommation du réducteur à la surface de cette même électrode :

$$\frac{i}{nFA} = -J_R(r, z, t) \quad (\text{I.4})$$

$$i = -nFAJ_R(r, z, t) \quad (\text{I.5})$$

i : intensité du courant à l'électrode (A)

n : nombre d'électrons échangés au cours de la réaction rédox

F : constante de Faraday ($\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$)

A : surface de l'électrode (m^2)

Généralités

Ensuite, la seconde loi de *Fick* doit être convertie en coordonnées cylindriques :

$$\frac{\partial C_R(r,z,t)}{\partial t} = D_R \left(\frac{\partial^2 C_R(r,z,t)}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial C_R(r,z,t)}{\partial r} + \frac{\partial^2 C_R(r,z,t)}{\partial z^2} \right) \quad (\text{I.6})$$

La résolution de cette équation est complexe et a été réalisée par *Aoki* et *Osteryoung*, puis *Schoup* et *Szabo* en utilisant des développements en séries et les conditions aux limites suivantes[64]–[66] :

$$\left. \begin{array}{l} \lim_{r \rightarrow \infty} C_R(r, z, t) = C_R^* \\ C_R(r, z, t = 0) = C_R^* \\ \lim_{z \rightarrow \infty} C_R(r, z, t) = C_R^* \\ C_R(r, z = 0, t) = 0 \end{array} \right\} 0 < r < r_0 \text{ et } \left(\frac{\partial C_R(r, z, t)}{\partial z} \right)_{z=0} = 0 \text{ pour } r > r_0$$

L'expression de l'intensité du courant dépendante du temps est alors obtenue :

$$i(t) = \frac{4nFAD_R C_R^*}{\pi r_0} \times \Psi(\tau) \text{ avec } \tau = \frac{D_R t}{(r_0)^2} \quad (\text{I.7})$$

Il est alors possible d'obtenir les expressions du courant de *Cottrell* et du courant faradique stationnaire. Le courant de *Cottrell* est obtenu pour les temps courts ($\tau \ll 1$) tel que

$$\lim_{\tau \rightarrow 0} \Psi(\tau) = \frac{1}{4} \sqrt{\frac{\pi}{\tau}} :$$

$$i_{fc}(t) = nFA\sqrt{D_R}C_R^* \times \frac{1}{\sqrt{\pi t}} \quad (\text{I.8})$$

Le courant faradique stationnaire est obtenu aux temps longs ($\tau \gg 1$) tel que $\lim_{\tau \rightarrow \infty} \Psi(\tau) = 1$:

$$i_{fs}(t) = 4nFD_R C_R^* r_0 \quad (\text{I.9})$$

Ces deux expressions analytiques sont adaptées aussi bien pour décrire le comportement des UMEs que celui des électrodes millimétriques. Les comportements de ces deux types d'électrodes dans les conditions d'une expérimentation de biocapteur ADN peuvent maintenant être facilement comparés. Le courant stationnaire sera évidemment différent du fait de la différence de rayons entre les électrodes mais le plus intéressant est

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

d'estimer l'intensité et surtout la durée du courant de *Cottrell* qui n'est pas une donnée intéressante dans ce cas. Etant donné que i_{fc} est directement proportionnel à la surface de l'électrode, en considérant une électrode de 2 mm de diamètre et une autre de 25 μm de diamètre, l'intensité du courant de *Cottrell* sera donc environ 6400 fois plus élevée pour l'électrode millimétrique que pour l'UME. Deuxièmement, le temps de transition (t_s) entre le courant non-stationnaire et le courant faradique stationnaire peut être évalué aisément. Pour cela, une valeur classique du coefficient de diffusion pour une espèce rédox est utilisée $D_R = 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [54].

$$\tau_s = \frac{D_R t_s}{(r_0)^2} = 1 \quad (\text{I.10})$$

$$t_s = \frac{(r_0)^2}{D_R} \quad (\text{I.11})$$

Pour l'électrode millimétrique, t_s est de l'ordre de 1000 secondes. En considérant que l'état stationnaire est totalement prédominant après un temps égal à $10 t_s$, le courant stationnaire pourra donc être mesuré par ampérométrie après 10000 secondes soit environ trois heures. Ce temps d'attente est complètement incompatible avec l'utilisation d'un biocapteur en diagnostic médical.

Pour l'UME, t_s vaut 0,16 seconde. L'état stationnaire est donc prédominant après 1,6 seconde, ce qui est un temps d'attente acceptable pour mesurer i_{fs} en ampérométrie. Il est donc préférable d'utiliser des UMEs pour fabriquer des biocapteurs utilisables en ampérométrie.

Cas des électrodes de géométrie bande

Pour ce type d'électrodes, il faut reprendre les équations (I.4) et (I.5) pour les transformer en coordonnées polaires (cf. Figure I-18). L'équation suivante est alors obtenue permettant de relier l'intensité du courant à la première loi de *Fick* :

$$i = -nFAJ_R(r, \varphi, t) \quad (\text{I.12})$$

En considérant $L \gg w$, les effets de bord peuvent être négligés et la diffusion considérée comme planaire (la diffusion selon la direction de L est négligée). Ensuite, la seconde loi de *Fick* doit être convertie en coordonnées polaires :

Généralités

$$\frac{\partial C_R(r, \varphi, t)}{\partial t} = D_R \left(\frac{\partial^2 C_R(r, \varphi, t)}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial C_R(r, \varphi, t)}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 C_R(r, \varphi, t)}{\partial \varphi^2} \right) \quad (\text{I.13})$$

Comme dans le cas des électrodes de type disque, la résolution analytique de cette équation est complexe et peut être résolue en utilisant des développements en séries et les conditions aux limites suivantes :

$$\left. \begin{array}{l} \lim_{r \rightarrow \infty} C_R(r, \varphi, t) = C_R^* \\ C_R\left(-\frac{w}{2} \leq r \leq \frac{w}{2}, \varphi = 0, t\right) = 0 \\ C_R(r, \varphi, t = 0) = C_R^* \end{array} \right\} \text{et} \left(\frac{\partial C_R(r > \frac{w}{2}, \varphi, t)}{\partial \varphi} \right)_{\varphi=0} = 0$$

L'expression de l'intensité du courant en fonction du temps est alors obtenue :

$$i(t) = \frac{nFAD_R C_R^*}{w} \times \Psi(\tau) \text{ avec } \tau = \frac{D_R t}{w^2} \quad (\text{I.14})$$

Il est alors possible d'obtenir l'expression du courant de *Cottrell* aux temps courts et l'expression du courant faradique quasi stationnaire puisque dans le cas des bandes, il reste toujours dépendant du temps, même faiblement.

Le courant de *Cottrell* est obtenu pour les temps courts ($\tau \ll 0,4$) tel que $\lim_{\tau \rightarrow 0} \Psi(\tau) = \frac{1}{\sqrt{\pi\tau}}$:

$$i_{fc}(t) = nFA\sqrt{D_R} C_R^* \times \frac{1}{\sqrt{\pi t}} \quad (\text{I.15})$$

Le courant faradique stationnaire est obtenu aux temps longs ($\tau \gg 0,4$) tel que $\lim_{\tau \rightarrow \infty} \Psi(\tau) = \frac{2\pi}{\ln 64\tau}$:

$$i_{fs}(t) = nF\pi D_R C_R^* L \times \frac{2}{\ln\left(64\frac{D_R t}{w^2}\right)} \quad (\text{I.16})$$

Ces expressions permettent de décrire le comportement des électrodes de type bande. Comme précédemment pour les électrodes de type disque, le courant de *Cottrell* est directement proportionnel à la surface de l'électrode. En considérant une bande de largeur proche des dimensions d'une UME, soit $w = 25 \mu m$, et une bande de largeur 2 mm, l'intensité du courant de *Cottrell* sera 80 fois plus élevée pour l'électrode millimétrique que

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

pour l'UME à longueur égale. D'autre part, le temps de balance (t_s) entre le courant non-stationnaire et le courant faradique stationnaire peut être évalué en utilisant la même valeur du coefficient de diffusion que précédemment $D_R = 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [54].

$$\tau_s = \frac{D_R t_s}{w^2} = 0,4 \quad (\text{I.17})$$

$$t_s = 0,4 \frac{w^2}{D_R} \quad (\text{I.18})$$

Pour l'électrode millimétrique, t_s est égal à 1600 secondes. En considérant que l'état quasi-stationnaire est totalement prédominant après un temps égal à $10 t_s$, le courant quasi-stationnaire pourra donc être mesuré par ampérométrie après 16000 secondes soit environ 4h30. Ce temps d'attente est, comme précédemment, complètement incompatible avec l'utilisation d'un biocapteur en diagnostic médical.

En revanche, pour l'UME, t_s vaut 0,25 seconde. L'état stationnaire est donc prédominant après 2,5 secondes, ce qui est un temps d'attente acceptable pour mesurer i_{f_s} en ampérométrie. Encore une fois, il est donc préférable d'utiliser des UMEs pour fabriquer des biocapteurs utilisables en ampérométrie.

2) Cas des systèmes rédox adsorbés à la surface de l'électrode

Dans le cas des biocapteurs d'acides nucléiques, des espèces rédox adsorbées ou fixées à la surface de l'électrode sont aussi utilisées. Le principe est alors assez différent puisque toutes les espèces électroactives sont présentes à la surface de l'électrode à chaque instant et dans une quantité connue. Il n'y a donc pas de transport de masse et pas de phénomène de diffusion mis en jeu. L'électrode est donc recouverte dès le début par une espèce Réd à une concentration surfacique Γ_R^* (en $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2}$).

Pendant la variation de potentiel $E = E_i \pm vt$, l'ampérométrie permet de quantifier à chaque instant la fraction de réducteur qui a été oxydé. La quantité maximale de Réd oxydée en Ox est atteinte au pic d'intensité anodique (i_{pa}) à un potentiel $E(t) = E^0$ correspondant au potentiel standard du couple rédox, en considérant qu'il s'agit d'un couple rapide et réversible. Une fois ce pic atteint, il est possible de quantifier de la même manière la quantité d'espèce Ox réduite en Réd à chaque instant. On peut donc écrire :

$$\Gamma_{Red}(t) + \Gamma_{Ox}(t) = \Gamma_R^* \quad (\text{I.19}) \quad \Gamma_{Red} : \text{Concentration de Réd à l'électrode (mol.cm}^{-2}\text{)}$$

$$\Gamma_{Ox} : \text{Concentration de Ox à l'électrode (mol.cm}^{-2}\text{)}$$

Généralités

Par conséquent, la seule donnée d'intérêt mesurable par cette technique est l'intensité du pic anodique i_{pa} qui peut ensuite être reliée à la vitesse de balayage et aux caractéristiques de l'électrode comme le rayon r_0 ou la largeur de bande w . Pour obtenir cette formule, il est possible d'utiliser le modèle donné par *A. J. Bard*[67] :

$$i = \frac{n^2 F^2 v A \Gamma_R^* (b_R/b_O) \exp[(nF/RT)(E-E^0)]}{RT \{1+(b_R/b_O) \exp[(nF/RT)(E-E^0)]\}^2} \quad (I.20)$$

et de l'adapter à $E(t) = E^0$ pour obtenir :

$$i_{pa} = \frac{n^2 F^2}{4RT} v A \Gamma_R^* \quad (I.21)$$

Cette équation est adaptée pour décrire le comportement des UMEs type disque ou bande mais aussi des électrodes millimétriques. Comme i_{pa} est directement proportionnel à la surface active de l'électrode, le courant de pic anodique pour une électrode type disque de 2 mm de diamètre est 6400 fois supérieur à celui mesuré pour une UME de 25 μm de diamètre. D'autre part le courant de pic anodique pour une électrode type bande de 2 mm de largeur est 80 fois supérieur à celui mesuré pour une UME de 25 μm de largeur à longueur L égale. En conclusion, en travaillant avec des espèces rédox adsorbées, il est préférable de travailler avec des électrodes millimétriques plutôt qu'avec des UMEs car le signal obtenu avec un courant plus intense permet une mesure et une quantification plus facile.

3) Courant capacitif avec un composé adsorbé non-électroactif

La dernière composante de la mesure électrochimique est le courant capacitif (i_c) dû à la présence d'espèces chargées non-électroactives dans la solution au voisinage de l'électrode. Ces espèces forment alors une double couche à la surface de l'électrode.

Cette double couche est composée d'une couche compacte (couche de *Helmoltz*) et d'une couche diffuse (couche de *Gouy-Chapman*) (Figure I-19) et crée une capacité interfaciale C_0 à l'interface électrode/solution. Cette composante électrochimique ne traduit pas une réaction électrochimique et c'est pour cette raison qu'elle est considérée comme du bruit électrochimique dans les techniques non-stationnaires. Son expression est :

$$i_c = \frac{\Delta E}{R_e} \times \exp\left(\frac{-t}{t_0}\right) \quad (I.22)$$

Avec ΔE : différence de potentiel (V)

R_e : résistance de l'électrolyte (Ω)

t_0 : constante de temps (s)

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

Avec la constante de temps $t_0 = \frac{\rho \times C_0 \times \pi \times r_0}{4}$ (I.23)

Avec ρ : résistivité de l'électrolyte ($\Omega.m$)

C_0 : capacité interfaciale ($F.m^{-2}$)

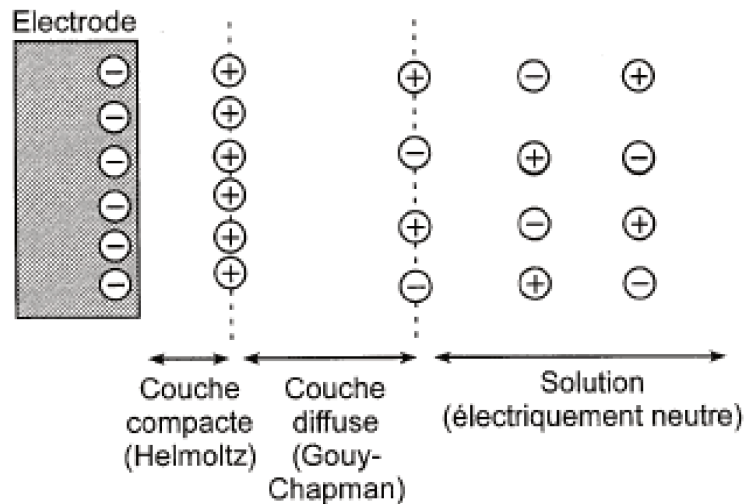


Figure I-19 : Schéma de la composition de la double couche électrochimique à l'interface électrode/solution

En considérant les mêmes géométries d'électrodes que précédemment, une résistance d'électrolyte classique $\rho = 0.17 \Omega.m$ [68], une capacité interfaciale $C_0 = 0.24 F.m^{-2}$ [69], les différentes constantes de temps peuvent être comparées. Pour une électrode type disque millimétrique, $t_0 = 3.2 \times 10^{-5} s$ alors que, dans le cas d'une UME, $t_0 = 4.0 \times 10^{-7} s$. La constante de temps t_0 est donc 100 fois plus petite pour une UME que pour une électrode millimétrique, ce qui signifie que le courant capacitif est complètement négligeable pour l'UME alors qu'il demeure significativement élevé à des vitesses de balayage élevées dans le cas de l'électrode millimétrique pouvant conduire à une erreur lors de la mesure du courant faradique. La même remarque peut être faite concernant les électrodes de type bande puisque la constante de temps est directement proportionnelle à la dimension caractéristique de l'électrode, ici la largeur. C'est pour cette raison qu'il est important d'utiliser des UMEs pour fabriquer des biocapteurs dans la mesure où elles permettent de mesurer de petites différences de courant faradique et ainsi d'améliorer la limite de détection (LOD).

Généralités

E. Les différents types de transduction

L'hybridation de la cible sur la sonde immobilisée à la surface de l'électrode est suivie en réalisant des mesures électriques avant et après l'hybridation permettant à la fois la détection et la quantification du fragment d'ADN. La méthode choisie pour construire le biocapteur va également jouer un rôle primordial dans les performances de robustesse et de sélectivité du capteur. De plus, pour des raisons de coût et d'applicabilité du capteur au diagnostic médical, la transduction doit être réalisée sans marquage de la cible. Dans un premier temps, il est intéressant d'exposer les différentes techniques de transduction électrochimiques sans marquage de la cible afin d'en étudier les caractéristiques et de choisir celle qui semble correspondre le mieux aux contraintes imposées par ce projet. Les capteurs peuvent être classés dans 7 grandes familles selon la méthode de transduction adoptée.

1) Transduction non-faradique

La première famille de capteurs est celle des capteurs non faradiques. Dans ce cas, la transduction se fait en mesurant la variation de la charge dans la couche dense de *Helmoltz* due à l'hybridation (Figure I-20). En effet, lorsqu'une électrode solide est immergée dans une solution, il se produit une diffusion d'espèces chargées au voisinage de l'interface électrode/électrolyte dans la couche de *Helmoltz* entraînant la formation d'une capacité interfaciale. Par la suite, toute variation au niveau de cette couche, comme l'hybridation d'une cible ADN sur la sonde, entraîne une variation de la capacité interfaciale. Cette variation de charge durant l'hybridation est due à l'augmentation de la densité de charges négatives, portées par les groupements phosphates des bases nucléotidiques, et de contre-ions (sodium par exemple) à la surface de l'électrode. Il se produit alors un effet de charge miroir menant à la variation de la densité de porteurs de charge dans le métal ainsi qu'à la variation de la capacité de la double couche électrochimique. Il a été montré que dans le cas d'une électrode métallique, la variation de potentiel se produit majoritairement dans la double couche électrochimique (Figure I-21 A) alors que dans le cas d'une électrode semi-conductrice, la variation de potentiel se produit majoritairement dans l'électrode (Figure I-21 B)[70].

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

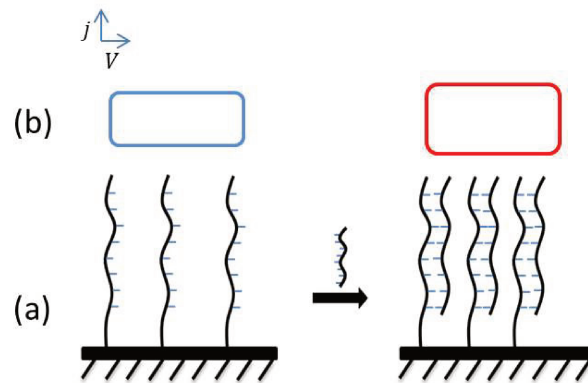


Figure I-20 : (a) Schéma de la détection d'ADN par mesure non faradique et (b) réponse voltampérométrique d'une capacité pure avant (gauche) et après (droite) hybridation

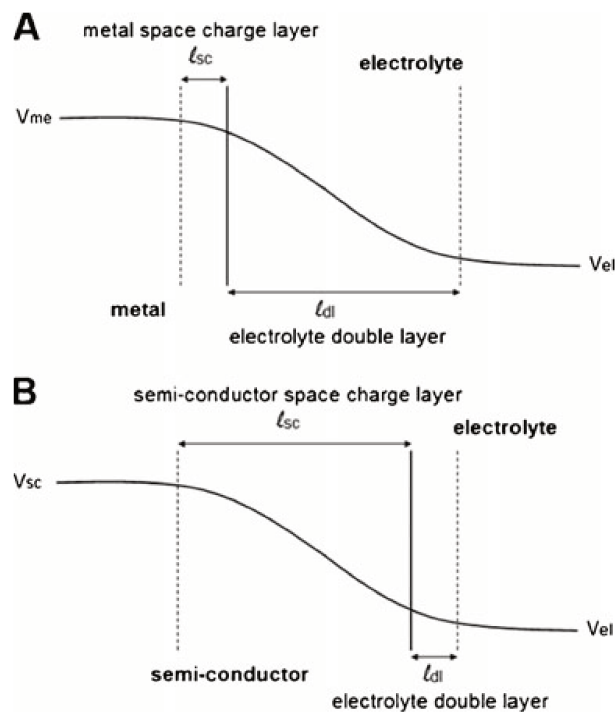


Figure I-21 : Schéma des couches de charges d'espace à l'interface électrode-électrolyte pour un métal (A) et pour un semi-conducteur (B) (V_{me} = potentiel du métal ; V_{el} = potentiel de l'électrolyte ; V_{sc} = Potentiel du semi-conducteur ; ℓ_{dl} = épaisseur de la double couche électrochimique ; ℓ_{sc} = épaisseur de la couche de charge d'espace)

C'est pour cette raison que, pour détecter l'hybridation, la spectroscopie d'impédance est utilisée dans le cas d'une électrode métallique pour mesurer la variation de capacité interfaciale, qui peut être une augmentation ou une diminution, et que la variation de résistance est utilisée dans le cas d'un semi-conducteur pour mesurer la variation de densité de porteurs de charge.

Généralités

Cette méthode permet la détection de concentration beaucoup plus faible que l'oxydation de la guanine jusqu'à une LOD de $1 \times 10^{-20} M$ [71] (Tableau I-2). Cette technique permet également de différencier une cible parfaitement complémentaire d'un fragment avec une unique non-complémentarité (*mismatch*). Cette méthode est donc très performante mais les mesures prennent jusqu'à plusieurs heures et elle n'est pas parfaitement adaptée au diagnostic puisque l'adsorption non spécifique d'espèces à la surface du capteur génère un bruit électrochimique important. De plus, les matériaux d'électrodes coûtent cher et il semble difficile de concevoir un capteur économique par cette méthode.

Tableau I-2 : Evolution de la limite de détection des biocapteurs ADN non faradiques (A = surface)

Technique	Electrode	Immobilisation	Sonde/Cible	LOD / M (mismatch)	Année [réf.]
Impédance	Si ₃ N ₄ A = 0.05 cm ²	Covalente	30 b polyC <u>30 b polyG</u>	10⁻¹⁰	2000 [72]
Impédance	Carbone sérigraphié modifié A = 3 mm ²	Electrostatique	ADN issu de PCR <u>ADN issu de PCR</u> <u>complémentaire</u>	5.10⁻¹⁷	2007 [73]
Mesure de résistance	Nanofils de silicium	Covalente	22 b DNA <u>22 b DNA</u>	1.10⁻¹⁴ (single mismatch)	2007 [74]
Impédance	Or	Interactions biotine- streptavidine	19/22 b DNA <u>72 b DNA</u>	3.10⁻⁶	2008 [75]
Impédance	Diamant dopé bore	Electrostatique	30 b DNA <u>30 b DNA</u>	10⁻²⁰ (single mismatch)	2009 [71]
Impédance	Fil nanométrique de GaN	Covalente	15 b DNA <u>15 b DNA</u>	10⁻¹⁹ (single mismatch)	2011 [76]

2) Transduction basée sur l'oxydation de la guanine

La première famille est celle des capteurs basés sur l'oxydation directe de l'ADN et plus précisément de la guanine contenue dans l'ADN. Les bases aromatiques des nucléotides sont assez sensibles à l'oxydation. La guanine est celle qui possède le potentiel d'oxydation le plus bas parmi les 4 bases. La réaction d'oxydation de la guanine a été étudiée en détail pour parvenir à proposer un mécanisme (Figure I-22)[77], [78]. Son potentiel est donné à 0,94 V

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

sur une électrode à pâte de carbone par rapport à l'électrode de référence Ag/AgCl (3 M KCl)[79].

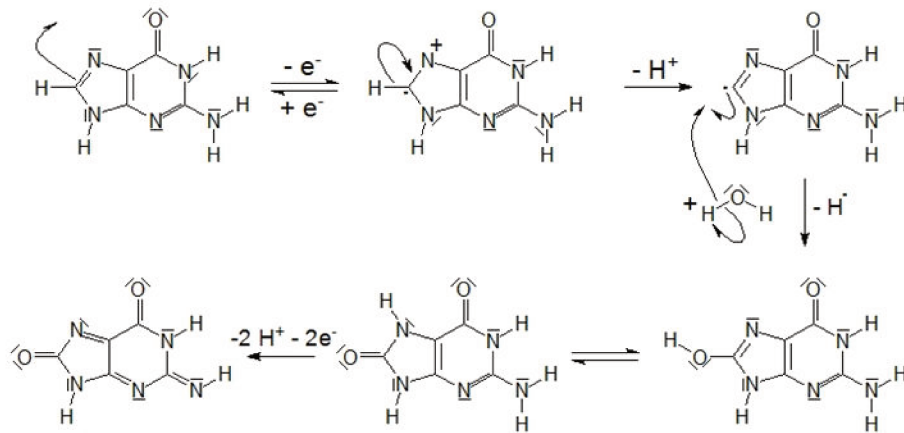


Figure I-22 : Mécanisme d'oxydation de la guanine

Le principe de cette détection est très simple et consiste à mesurer le pic anodique correspondant à l'oxydation de la guanine sur le capteur avant et après hybridation. Le nombre de bases G après hybridation étant plus grand qu'avant l'hybridation, l'intensité du pic d'oxydation mesurée est plus grande et permet de quantifier la cible dans l'échantillon (Figure I-23).

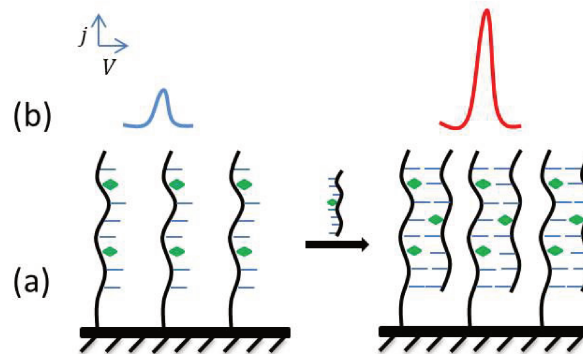


Figure I-23 : (a) Schéma de la transduction basée sur l'oxydation électrochimique de la guanine (losanges verts) et (b) réponse voltampérométrique avant (gauche) et après (droite) hybridation

Ce capteur présente l'avantage d'avoir une architecture simple et donc d'être facile à mettre en œuvre. Cependant, l'oxydation de la guanine est un processus irréversible et le capteur ne peut être utilisé qu'une seule fois avec la même couche de sondes greffées à la surface de l'électrode. Ceci est problématique pour le développement et l'optimisation du capteur. D'autre part, le rapport signal/bruit de cette technique peut être très faible dans le cas où la sonde est formée de nombreuses bases G alors que la cible en contient peu la plupart du

Généralités

temps. Ces obstacles ont été surmontés en adoptant une stratégie intéressante mais plus coûteuse qui consiste à remplacer toutes les guanines de la sonde par des bases inosines (I)[80] (Figure I-24). L'inosine s'oxyde à un potentiel plus élevé que la guanine et n'est donc pas détectée lors de la mesure. Cela contribue à améliorer le ratio signal/bruit tout en rendant le capteur réutilisable. Cependant, l'inosine n'est pas complémentaire de la cytosine comme la guanine mais elle forme des complexes avec les trois autres bases par liaisons hydrogènes (Figure I-24).

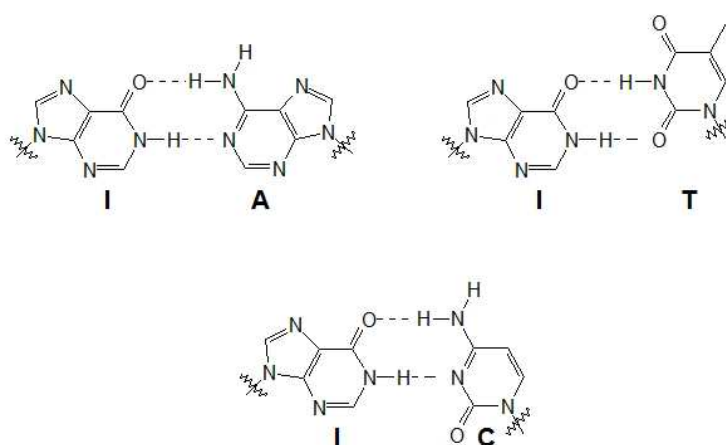


Figure I-24 : Structures des complexes I-A, I-T et I-C

Cette modification permet donc une quantification plus précise, mais une sélectivité plus faible qui ne conduit pas à la détection d'un fragment à un seul mismatch si celui-ci est situé en regard d'une inosine. Il est possible de trouver dans la littérature des capteurs avec une limite de détection femtomolaire ($10^{-15} M$) mais les cibles sont alors des ADN génomiques fragmentés[81]. Dans ce cas, c'est le grand nombre de guanines présentes et oxydées qui permet d'atteindre cette limite. Cette méthode n'est donc pas applicable aux miRNAs. D'autre part, la meilleure limite de détection (LOD) obtenue pour des petits acides nucléiques par cette méthode est de $5 \times 10^{-10} M$ [82] (Tableau I-3). Cette LOD est bien en dessous de la gamme de concentration des miRNAs ($10^{-12} - 10^{-18} M$). Enfin, ce type de capteurs ne peut pas être régénéré.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

Tableau I-3 : Evolution de la limite de détection des biocapteurs ADN basés sur l'oxydation directe de la guanine (ϕ = diamètre)

Technique	Electrode	Immobilisation	Sonde/Cible	LOD / M (mismatch)	Année [réf.]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Pâte de carbone ($\phi = 3.5$ mm)	Adsorption électro-assistée	20 b polyG <u>20 b polyC</u>	10^{-6}	1997 [83]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Pâte de carbone ($\phi = 3.5$ mm)	Adsorption électro-assistée	29 b DNA modifiée par inosine <u>29 b DNA</u>	10^{-8}	1998 [80]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Pâte de carbone ($\phi = 3$ mm)	Adsorption électro-assistée	23 b DNA <u>23 b DNA</u>	$3 \cdot 10^{-9}$ (single mismatch)	2002 [84]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Pâte de carbone ($\phi = 5$ mm)	Adsorption électro-assistée	20 b DNA <u>20 b DNA</u>	$5 \cdot 10^{-10}$ (single mismatch)	2005 [82]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Nanotubes de carbone sur carbone vitreux	Covalente	20 b DNA <u>20 b DNA</u>	$2 \cdot 10^{-8}$	2006 [85]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Pointe de graphite ($\phi = 2$ mm)	Adsorption électro-assistée	20 b DNA <u>ADN génomique</u>	10^{-15}	2011 [81]

3) Transduction basée sur des sondes marquées par une molécule rédox

Des capteurs dont la transduction est assurée par la réponse rédox d'une molécule électro-active greffée sur la sonde peuvent également être fabriqués. En effet, une molécule ayant une activité rédox peut être greffée à l'extrémité de la sonde ADN comme le bleu de méthylène (MB) par exemple[86]. Il suffit ensuite de mesurer l'activité de cette molécule par électrochimie. Dans ce cas, deux configurations sont envisageables. Pour la première, la sonde est greffée en monocouche, mais repliée dans une configuration d'épingle à cheveux où la molécule électro-active est très proche de la surface de l'électrode. Pour la seconde, la configuration est plus classique puisque la sonde est greffée en monocouche, déployée à la verticale de l'électrode (Figure I-25).

Généralités

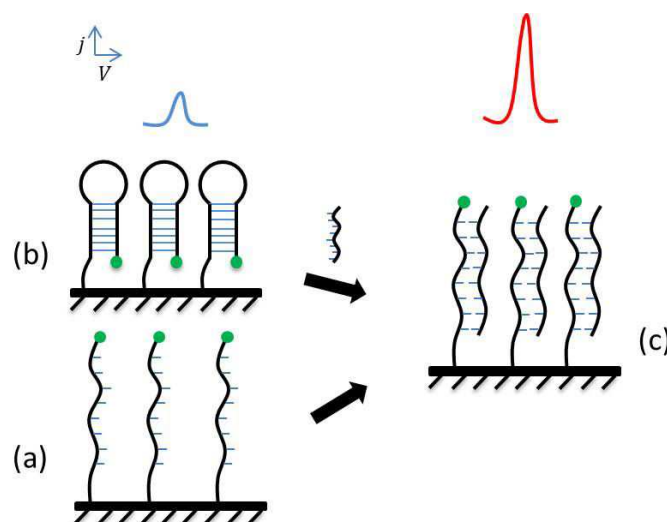


Figure I-25 : Schéma de la transduction basée sur des sondes marquées par des groupements rédox (cercles verts) en configuration classique (a) ou épingle à cheveux (b) avant et après hybridation (c)

Dans cette méthode de transduction, après l'hybridation, le transfert d'électrons se fait à travers le double brin d'ADN qui est conducteur grâce à l'empilement π des bases nucléotidiques. L'hybridation peut être traduite par voltampérométrie cyclique par une augmentation de l'intensité du courant[87] ; dans ce cas, c'est la configuration classique qui est utilisée par *Xu et al.*. La distance entre la sonde rédox et l'électrode ne varie pas et l'hybridation permet alors de favoriser le transfert d'électrons par l'empilement des bases π des séquences ADN. Dans le cas classique, c'est l'augmentation qui est attendue, la formation du double brin conducteur favorisant le transfert électronique. Mais l'hybridation peut aussi se traduire par une diminution du courant. En effet, plusieurs paramètres peuvent influencer sur la réponse électrochimique.

Dans le cas de la configuration en « épingle à cheveux », l'augmentation aussi bien que la réduction de l'intensité du courant faradique peuvent être observées. Les paramètres influant sur cette réponse électrochimique sont la taille de la sonde et l'agencement de la couche de sondes. Il a été observé qu'avec une sonde ayant pour longueur une trentaine de paires de bases, la tendance observée est une diminution du courant ; alors qu'avec la même séquence tronquée à vingt paires de bases, la tendance est une augmentation du courant[88]. Pour étudier l'influence de la longueur de la sonde ADN, *Farjami et al.* ont réalisé un capteur en configuration « épingle à cheveux » avec deux sondes ADN de longueur différentes[88] ; l'une de 33 bases et la seconde de 20 bases. Pour le capteur réalisé avec la sonde de 20 bases, quelle que soit la vitesse de balayage (entre 20 et 800 mV/s), l'intensité du courant faradique

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

augmente après l'hybridation de la sonde. En revanche, pour le capteur réalisé avec la sonde de 33 bases, le courant faradique augmente après l'hybridation aux basses vitesses de balayage (entre 20 et 100 mV/s) mais diminue après l'hybridation aux fortes vitesses de balayage (entre 200 et 800 mV/s). Deux explications sont alors avancées pour élucider cette différence de comportement qui provient du mécanisme de transfert d'électrons mis en jeu. Aux vitesses de balayage élevées, le transfert d'électrons peut avoir lieu par effet tunnel directement de la sonde rédox à l'électrode et non par l'intermédiaire du duplex ADN. La longueur plus importante de la sonde à 33 bases éloigne la molécule rédox et défavorise le transfert d'électrons par ce mécanisme par rapport à une sonde ADN à 20 bases. L'autre explication avancée par les auteurs est qu'aux vitesses de balayage élevées, dans le cas de la sonde à 33 bases, les mouvements des hélices double brins autour du thiol qui les lie à l'électrode n'ont plus lieu, empêchant ainsi un rapprochement de la sonde rédox et défavorisant le transfert d'électrons.

La compacité et l'organisation de la couche vont également jouer un rôle dans le type de réponse obtenu. En effet, lorsque la séquence ADN est trop longue pour assurer le transfert d'électron jusqu'à l'électrode, celui-ci peut avoir lieu directement si la distance séparant la molécule rédox et la surface de l'électrode le permet. Il a été montré par *Anne et al.*[89], [90] que suivant l'organisation de la couche de sondes et l'angle adopté par le duplex ADN, la réponse observée peut être une augmentation ou une diminution du courant. En effet, l'angle adopté par les duplex ADN par rapport à l'horizontale influence la distance entre la sonde rédox et l'électrode. Aussi, il existe un angle à partir duquel le transfert d'électrons est favorisé par effet tunnel et l'augmentation du courant faradique est observée. En deçà de cet angle, le transfert d'électrons est défavorisé et c'est une diminution du courant faradique après hybridation qui est observée.

Cette technique permet de détecter un unique *mismatch* puisque le transfert d'électrons n'a plus lieu sitôt que l'empilement π des bases est rompu. Néanmoins, les LOD atteintes grâce à cette méthode sont de l'ordre de 10^{-15} M[91] (Tableau I-4), un peu faible pour quantifier des miRNAs mais constituant une bonne base de développement. Enfin, les sondes ADN, qui plus est marquées par une molécule rédox sont plus chères.

Généralités

Tableau I-4 : Evolution de la limite de détection des biocapteurs ADN utilisant une sonde marquée par une molécule rédox (ϕ = diamètre ; A = surface)

Technique	Electrode	Immobilisation	Sonde/Cible	LOD / M (mismatch)	Année [réf.]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Chitosan sur carbone vitreux $\phi = 3 \text{ mm}$	Covalente	256 b DNA	2.10^{-9}	2001 [87]
Voltampérométrie cyclique	Or $\phi = 1,6 \text{ mm}$	Chimisorption	28 b hairpin DNA <u>27 b DNA</u>	10^{-8} (single mismatch)	2003 [92]
Voltampérométrie cyclique	Or $\phi = 1 \text{ mm}$	Chimisorption	44 b hairpin DNA <u>20 b DNA</u>	10^{-13}	2006 [93]
Impédance	Or sérigraphié A = 0,88 mm ²	Chimisorption	27 b hairpin DNA <u>17 b DNA</u>	2.10^{-7}	2006 [86]
Voltampérométrie cyclique	Or A = 0,02 cm ²	Chimisorption	25 b hairpin DNA <u>15 b DNA</u>	2.10^{-10} (single mismatch)	2007 [94]
Square wave voltammetry	Or $\phi = 2 \text{ mm}$	Chimisorption	32 b DNA <u>32 b DNA</u>	3.10^{-8}	2009 [95]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Or $\phi = 2 \text{ mm}$	Chimisorption	27 b hairpin DNA <u>27 b DNA</u>	10^{-9} (single mismatch)	2011 [88]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Or $\phi = 3 \text{ mm}$	Chimisorption	59 b hairpin DNA <u>27 b DNA</u>	8.10^{-16} (single mismatch)	2015 [91]

4) Transduction basée sur la réponse électrochimique des polymères conducteurs

Il est également envisageable de modifier des électrodes par des polymères conducteurs pour obtenir des capteurs d'ADN. Dans ce cas, la charge d'oxydation réversible de polymères organiques comme le polypyrrole sert de grandeur pour détecter l'hybridation de la cible ADN. Ce sont l'excellente conductivité électrique de ces polymères additionnée à leurs propriétés de transport de charges qui ont conduit à développer cette transduction au cours des dernières années[96]. Dans ce cas, une couche de polymère conducteur d'épaisseur variable est formée à la surface de l'électrode. La sonde ADN est ensuite greffée à la surface de cette couche de polymère conducteur. Les polymères utilisés ont un potentiel d'oxydation assez bas pour ne pas oxyder la guanine de l'ADN. La détection de l'hybridation est réalisée

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

en observant la différence d'intensité du courant mesuré entre l'oxydation du polymère sur lequel la sonde est greffée et l'oxydation du polymère sur lequel est présent le duplex d'ADN (Figure I-26). En effet, la charge nécessaire pour oxyder le polymère avant et après hybridation est différente. En effet, l'oxydation du polypyrrole le fait passer d'un état où les monomères sont libres à un état beaucoup plus contraint appelé structure quinoïde. Après hybridation de la sonde greffée sur le polymère à la cible complémentaire, les duplex ADN sont plus encombrants et plus raides que les sondes seules. Aussi, le passage à la structure quinoïde plus contraintes demande plus d'énergie, d'où une charge électrique plus importante pour oxyder le polypyrrole[97].

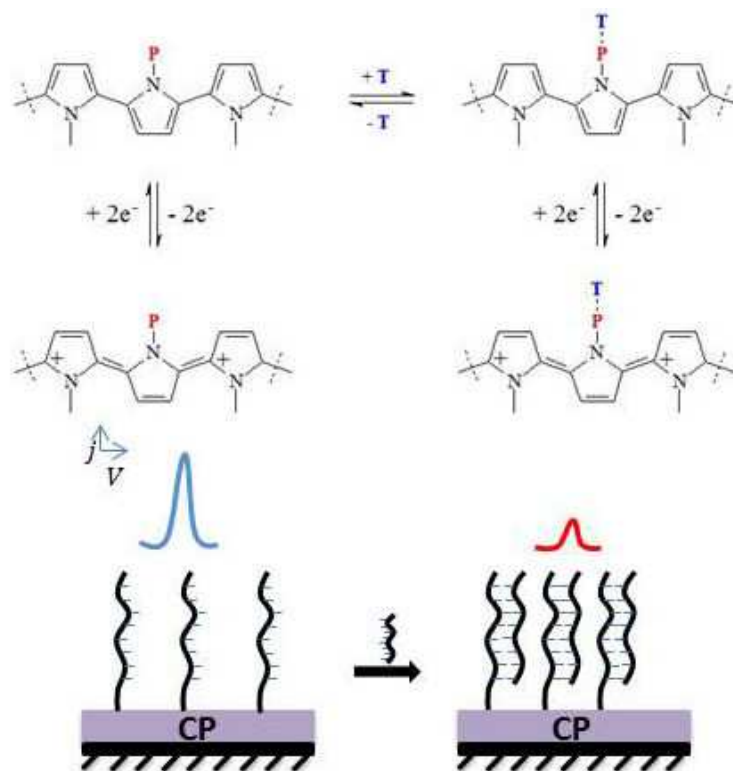


Figure I-26 : Réponse électrochimique correspondant à l'oxydation réversible du polypyrrole pour la sonde ADN (gauche) et pour le duplex sonde-cible (droite) (P = sonde ; T = cible)

Cette méthode a permis d'atteindre une LOD assez basse, convenant à la gamme recherchée pour la quantification d'ADN, de 2×10^{-21} M [98] (Tableau I-5). Cependant, cette technique présente plusieurs limites. D'abord, la différence de charge avant et après hybridation peut être assez faible et difficile à détecter. La couche de polymère va également se détériorer par oxydation à l'air et l'utilisation répétée du dispositif nécessitera une calibration à chaque fois. Enfin, il est plus difficile de détecter une cible avec *mismatch* par

Généralités

cette méthode puisque d'une part la différence de charge mesurée avant et après hybridation est faible et d'autre part, une unique non-complémentarité ne change que très peu la rigidité du duplex formé. De ce fait, la charge nécessaire pour oxyder le polymère modifié par le duplex complémentaire ou avec un seul *mismatch* est similaire. Il n'est pas possible de voir la différence et donc de détecter un unique *mismatch*.

Tableau I-5 : Evolution de la limite de détection des biocapteurs ADN basés sur l'utilisation de polymères conducteurs (A = surface ; ϕ = diamètre)

Technique	Electrode <u>Polymère utilisé</u>	Immobilisation	Sonde/Cible	LOD / M (mismatch)	Année [ref.]
Voltampérométrie cyclique	Platine A = 0.7 cm ² <u>polypyrrole</u>	Covalente	25 b DNA <u>25 b DNA</u>	2.10⁻⁹	1997 [97]
Voltampérométrie cyclique	Platine A = 0.7 cm ² <u>polypyrrole</u>	Covalente	25 b DNA <u>25 b DNA</u>	2.10⁻¹²	2002 [99]
Voltampérométrie cyclique	Or ϕ = 25 μ m <u>polypyrrole</u>	Electrostatique	27 b DNA <u>27 b DNA</u>	2.10⁻¹⁶ (single mismatch)	2006 [100]
Voltampérométrie cyclique	Platine ϕ = 10 μ m <u>polypyrrole</u>	Electrostatique	18 b DNA <u>244 b DNA issu de PCR</u>	2.10⁻²¹ (single mismatch)	2008 [98]
Voltampérométrie cyclique	Or ϕ = 200 μ m <u>polypyrrole</u>	Covalente	25 b DNA <u>25 b DNA</u>	5.10⁻¹⁷	2010 [101]
Voltampérométrie cyclique Impédance	Nanoparticules d'or <u>nanotubes de polypyrrole/polyaniline</u>	Chimisorption	15 b DNA <u>15 b DNA</u>	10⁻¹³ (single mismatch)	2012 [102]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Platine ϕ = 5 mm Or ϕ = 150 μ m <u>polypyrrole</u>	Covalente	40 b DNA <u>40 b DNA</u>	10⁻⁸	2013 [103]
Voltampérométrie cyclique Square wave voltammetry	Nanotubes de carbone <u>polypyrrole/PAMAM</u>	Covalente	15 b DNA <u>15/75 b DNA</u>	3.10⁻¹⁶	2015 [104]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Carbone vitreux et or <u>polythionine</u>	Covalente	40 b DNA <u>40 b DNA</u>	2.10⁻¹² (single mismatch)	2017 [105]

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

5) Transduction basée sur la résistance faradique

Des capteurs basés sur l'augmentation de la résistance faradique peuvent également être envisagés pour la détection d'acides nucléiques. Cette méthode de transduction utilise des sondes ADN greffées à la surface de l'électrode et un médiateur rédox en solution. Lors de l'hybridation, l'encombrement stérique de la couche d'ADN augmente empêchant d'autant plus la diffusion du médiateur rédox en solution vers l'électrode (Figure I-27). L'hybridation entraîne donc une diminution de l'intensité du signal du médiateur rédox mesurée.

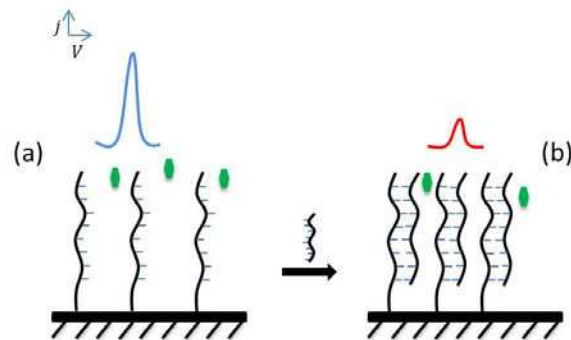


Figure I-27 : Schéma de la variation de résistance faradique d'un biocapteur ADN avant (a) et après (b) hybridation

Le développement des nanomatériaux tels que les nanoparticules ou les nanotubes de carbone au cours des dernières années a permis d'améliorer considérablement les limites de détection de ce type de capteurs. L'utilisation des nanomatériaux permet d'augmenter considérablement la surface active et par conséquent de multiplier le nombre de sondes ADN immobilisées. La sensibilité du capteur est donc améliorée. De plus, les nanomatériaux permettent d'intégrer des étapes de concentration au protocole pour améliorer encore la sensibilité de la méthode. Cette technique offre une LOD à la limite du femtomolaire de $8 \times 10^{-14} M$ [106] (Tableau I-6). Cependant quelques inconvénients accompagnent cette technique. Tout d'abord, la diminution d'intensité n'est pas adaptée à une application en sciences analytiques où il est préférable de traduire une réponse positive par une augmentation de courant. D'autre part, la technique repose entièrement sur la stabilité et la robustesse de la couche de sondes qui ne doit absolument pas varier.

Généralités

Tableau I-6 : Evolution de la limite de détection des biocapteurs ADN basés sur la variation de résistance faradique (ϕ = diamètre)

Technique	Electrode	Immobilisation	Sonde/Cible	LOD / M (mismatch)	Année [ref.]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Pâte de carbone $\phi = 3$ mm	Adsorption électro-assistée	21 b DNA <u>21 b DNA</u>	$2 \cdot 10^{-9}$ (single mismatch)	2000 [107]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Pâte de carbone $\phi = 3$ mm	Adsorption électro-assistée	24 b DNA <u>595 b DNA issu de PCR</u>	10^{-9}	2002 [108]
Voltampérométrie différentielle pulsée	ZrO ₂ $\phi = 3$ mm	Chimisorption	24 b DNA <u>24 b DNA</u>	10^{-10}	2004 [109]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Nanofil de polyaniline	Covalente	24 b DNA <u>24 b DNA</u>	10^{-12} (3 mismatches)	2006 [110]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Acide carboxylique poly-calcon $\phi = 3$ mm	Covalente	18 b DNA <u>18 b DNA</u>	$7 \cdot 10^{-13}$ (single mismatch)	2009 [111]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Poly-NET nanostructuré $\phi = 3$ mm	Chimisorption	26 b hairpin DNA <u>18 b DNA</u>	10^{-13} (single mismatch)	2010 [112]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Chitosan nanostructuré- CeO ₂ -ZrO ₂	Chimisorption	20 b DNA <u>20 b DNA</u>	10^{-13} (3 mismatches)	2012 [113]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Nanoparticules d'or sur graphène	Chimisorption	18 b DNA <u>18 b DNA</u>	10^{-13} (single mismatch)	2014 [114]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Nanotubes de carbone	Adsorption	22 b DNA <u>22 b DNA</u>	$8 \cdot 10^{-14}$ (single mismatch)	2016 [106]

6) Transduction basée sur le transfert d'électrons longue distance non catalysé

Enfin, une dernière famille de capteurs existe et peut être divisée en deux sous-familles puisque le principe de transduction est le même, à savoir le transfert d'électrons longue distance. Cette transduction utilise des sondes ADN greffées à la surface de l'électrode. Il s'agit d'utiliser une propriété fondamentale de l'ADN, c'est-à-dire

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

l'augmentation de la conductivité électronique du duplex d'ADN par rapport au simple brin du fait de l'empilement π des bases du duplex permettant le transfert des électrons à travers la couche d'ADN un peu comme le long du squelette d'une molécule aromatique. En effet, dans la configuration de l'hélice double brin, les bases aromatiques sont orientées vers l'intérieur de l'hélice, dans le plan perpendiculaire à l'axe de cette hélice. De cette manière, les bases de l'ADN se retrouvent empilées d'une façon « semblable à une pile de pièces de monnaie » avec un espace entre chaque base de l'ordre de 3 à 4 Å[115]. Cet espace interbase est alors semblable à celui mesuré entre deux plans graphène du graphite[116], ce qui permet de confirmer que le passage d'électrons d'une base à une autre est possible, tout comme il est observé entre deux plans du graphite. D'autre part, il a été montré plus récemment que les orbitales π perpendiculaires au plan des bases aromatiques de l'ADN se recouvraient les unes les autres formant ainsi un « chemin » pour le transfert des électrons parallèle à l'axe de la double hélice[117].

Dans la première génération de capteurs basés sur le transfert d'électrons longue distance, un médiateur rédox cationique en solution est utilisé. Au cours de l'hybridation, avec l'augmentation des charges négatives à la surface de l'électrode, l'attraction électrostatique du médiateur rédox dans la couche d'ADN augmente. Par conséquent, l'intensité mesurée du signal de ce médiateur augmente également, permettant la détection de l'hybridation (Figure I-28). Cependant, le rapport signal/bruit n'est pas optimal puisque l'attraction électrostatique n'est pas spécifique au duplex ADN et se produit également avec la couche de sonde simple brin.

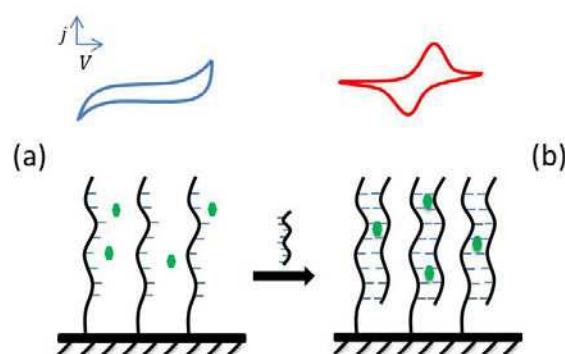


Figure I-28 : Schéma de la transduction basée sur le transfert d'électrons longue distance non catalysé d'espèces rédox cationiques (cercles verts) avant (a) et après (b) hybridation

Une LOD de $1 \times 10^{-15} M$ a été obtenue par ce type de capteurs[118] (Tableau I-7). Cette limite de détection est une base correcte mais doit être améliorée pour être utilisée en

Généralités

diagnostic. La détection d'un unique mismatch a pu être effectuée par ce type de capteurs [118], [119].

Tableau I-7 : Evolution de la limite de détection des biocapteurs ADN basés sur le transfert d'électrons longue distance non catalysé (ϕ = diamètre)

Technique	Electrode	Immobilisation	Sonde/Cible	LOD / M (mismatch)	Année [ref.]
Voltampérométrie cyclique	Carbone vitreux	Covalente	20 b polyT <u>20 b polyA</u>	2.10^{-4}	1993 [120]
Voltampérométrie cyclique	Or	Chimisorption	20 b DNA <u>20 b DNA</u>	2.10^{-13}	1994 [121]
Chronopotentiométrie	Pâte de carbone $\phi = 3,5$ mm	Adsorption électro-assistée	10/15 b DNA <u>10/15 b DNA</u>	10^{-11}	1996 [122]
Voltampérométrie cyclique	Or $\phi = 1,6$ mm	Chimisorption	20 b DNA <u>20 b DNA</u>	2.10^{-14} (single mismatch)	2002 [119]
Voltampérométrie cyclique	Or	Chimisorption	20 b DNA <u>20 b DNA</u>	1.10^{-6}	2004 [123]
Voltampérométrie cyclique	Or	Chimisorption	20 b DNA <u>20 b DNA</u>	5.10^{-7} (single mismatch)	2005 [124]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Poly-aniline nanostructurée	Covalente	21 b DNA <u>21 b DNA</u>	10^{-15} (single mismatch)	2007 [118]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Or	Chimisorption	21 b DNA <u>21 b DNA</u>	4.10^{-10} (4 mismatches)	2009 [125]
Voltampérométrie cyclique voltampérométrie différentielle pulsée	Nanosphères d'or	Chimisorption	14 b DNA <u>14 b DNA</u>	10^{-12}	2010 [126]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Nanoparticules d'or $\phi = 13$ nm	Chimisorption	21 b DNA <u>21 b DNA</u>	8.10^{-11} (4 mismatches)	2010 [127]

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

7) Transduction basée sur le transfert d'électrons longue distance catalysé

La deuxième génération de capteurs par transfert d'électrons longue distance a été développée il y a une vingtaine d'années dans le groupe de *Barton*[128]. Cette méthode utilise cette fois des sondes rédox anioniques en solution à une concentration de l'ordre du millimolaire (mM), et un intercalant rédox de l'ADN dans une quantité catalytique de l'ordre du micromolaire (μM). La transduction repose toutefois sur le même principe que précédemment, c'est-à-dire en s'appuyant sur la conductivité électronique du double brin d'ADN qui lui est conférée par l'empilement de ses bases aromatiques[129]. Dans cette méthode de transduction, la couche de sondes ADN à la surface de l'électrode, chargée négativement du fait des groupements phosphates qui la composent, empêche la diffusion des sondes rédox en solution jusqu'à l'électrode par répulsion électrostatique. Le courant mesuré à l'électrode est alors faible. En l'absence d'intercalant, après hybridation d'une cible parfaitement complémentaire, la couche d'ADN devient plus compacte et la densité de charges négatives augmente. La répulsion électrostatique est donc plus forte et empêche plus fortement la diffusion de sondes rédox à travers cette couche. En effet, il a également été montré que la catalyse du transfert d'électron par l'intercalant rédox était indispensable à la transduction[130]. Sans cette catalyse, le courant mesuré dans le cas du double brin est encore plus faible que dans le cas du simple brin (Figure I-29 A). Cependant, en présence d'intercalant rédox, après hybridation d'une cible parfaitement complémentaire, la couche d'ADN devient conductrice, et les hélices d'ADN portent des molécules d'intercalants rédox entre leurs deux brins[131]. Lors de la mesure du courant, aux potentiels d'oxydation, les sondes rédox en solution transfèrent les électrons à la molécule d'intercalant la plus proche qui va réagir puis transférer un électron à la molécule d'intercalant suivante grâce à la conductivité du brin d'ADN. Il s'agit alors d'un transfert d'électrons en cascade, depuis les sondes rédox en solution à l'extérieur de la couche de sondes ADN, jusqu'à la surface de l'électrode par le biais des molécules d'intercalant à travers la couche d'ADN. Le courant mesuré est alors beaucoup plus important qu'en configuration simple brin (Figure I-29 B). C'est la différence de courant mesurée entre ces deux situations qui permet de détecter et quantifier l'hybridation de la sonde ADN à sa cible.

Généralités

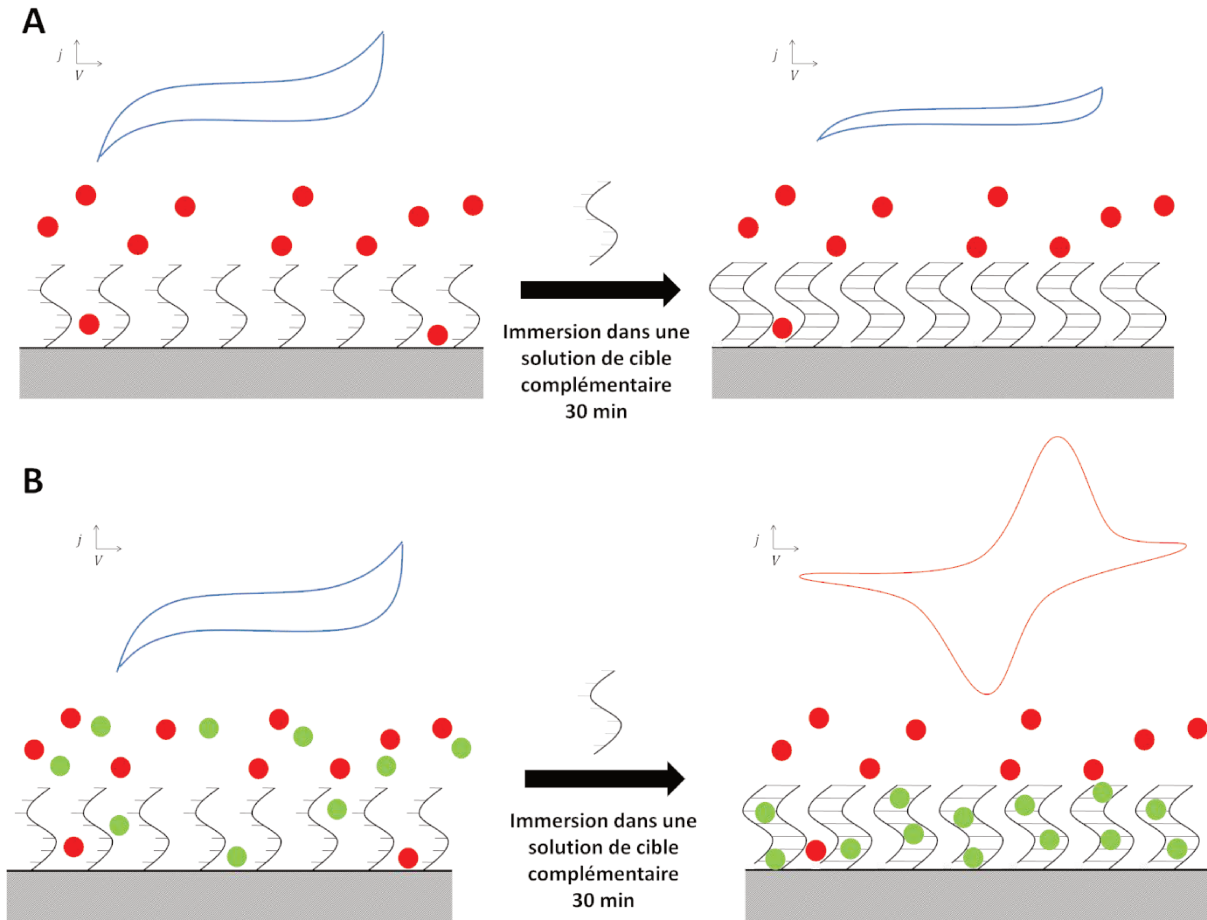


Figure I-29 : Transduction basée sur le transfert d'électrons longue distance depuis une sonde rédox anionique en solution (cercles rouges) non catalysé (cas A) ou catalysé (cas B) par un intercalant rédox (cercles verts)

Cette méthode a également bénéficié du développement des nanomatériaux pour abaisser les limites de détection permettant ainsi de détecter des concentrations aussi faibles que $4 \times 10^{-16} M$ [132] (Tableau I-8). Enfin, la sélectivité de cette technique a également été montrée puisque la présence d'une seule non-complémentarité de la cible entraîne la rupture du recouvrement des orbitales π des bases de l'ADN et ainsi la rupture de la conductivité électronique de la double hélice. Cette technique permet donc de discriminer une cible parfaitement complémentaire d'une autre contenant un seul *mismatch*[133]. Cette technique est donc parfaitement sélective et donc très adaptée à l'application souhaitée.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

Tableau I-8 : Evolution de la limite de détection des biocapteurs ADN basés sur le transfert d'électrons longue distance catalysé (ϕ = diamètre ; A = surface)

Technique	Electrode	Immobilisation	Sonde/Cible	LOD / M (mismatch)	Année [ref.]
Voltampérométrie cyclique	Fil d'or	Chimisorption	27 b DNA <u>23 b DNA</u>	10^{-11} (single mismatch)	2008 [133]
Voltampérométrie cyclique	Nanofil d'or	Chimisorption	20 b DNA <u>20 b DNA</u>	10^{-13}	2009 [134]
Voltampérométrie cyclique	Nanofibres de carbone / chitosan	Covalente	17 b DNA <u>17 b DNA</u>	9.10^{-12} (3 mismatches)	2012 [135]
Voltampérométrie différentielle pulsée					
Voltampérométrie cyclique	Or $\phi = 50 \mu\text{m}$	Chimisorption	23 b DNA <u>23 b DNA</u>	6.10^{-8} (single mismatch)	2013 [136]
Voltampérométrie différentielle pulsée	Nanocomposite graphene/acide pyrènebutyrique	Covalente	18 b DNA <u>18 b DNA</u>	4.10^{-16}	2013 [132]

8) Le choix de la transduction

Une fois les différentes méthodes de transduction exposées et détaillées à partir de la littérature, il est possible de choisir celle qui sera adoptée pour développer les dispositifs de ce travail. Pour cela, il est important de rappeler quelques contraintes imposées par l'application à laquelle sont destinés ces biocapteurs. Il est nécessaire de concevoir des capteurs robustes et stables sur plusieurs mesures, assez sélectifs pour détecter un unique *mismatch*, aussi sensibles que possible pour obtenir une limite de détection adéquate à la détection de miRNAs et régénérables. Un tableau comparatif des performances est fourni ci-après (Tableau I-9).

Généralités

Tableau I-9 : Tableau récapitulatif des meilleures performances des capteurs en fonction de leur mode de transduction

Transduction	Technique	Electrode	Immobilisation	LOD / M (mismatch)	Année [ref.]
Oxydation directe de la guanine	Voltampérométrie différentielle pulsée	Pâte de carbone ($\phi = 5 \text{ mm}$)	Adsorption électro-assistée	$5 \cdot 10^{-10}$ (single mismatch)	2005 [82]
Non faradique	Impédance	Fil nanométrique de GaN	Covalente	10^{-19} (single mismatch)	2011 [76]
Sonde marquée par une molécule rédox	Voltampérométrie différentielle pulsée	Or $\phi = 3 \text{ mm}$	Chimisorption	$8 \cdot 10^{-16}$ (single mismatch)	2015 [91]
Polymères conducteurs	Voltampérométrie cyclique	Platine $\phi = 10 \text{ }\mu\text{m}$ <u>polypyrrole</u>	Electrostatique	$2 \cdot 10^{-21}$ (single mismatch)	2008 [98]
Résistance faradique	Voltampérométrie différentielle pulsée	Nanotubes de carbone	Adsorption	$8 \cdot 10^{-14}$ (single mismatch)	2016 [106]
Transfert d'électrons longue distance non catalysé	Voltampérométrie différentielle pulsée	Poly-aniline nanostructurée	Covalente	10^{-15} (single mismatch)	2007 [118]
Transfert d'électrons longue distance catalysé	Voltampérométrie cyclique	Fil d'or	Chimisorption	$1 \cdot 10^{-11}$ (single mismatch)	2008 [133]

Les capteurs regroupés dans ce tableau répondent tous au critère de sélectivité puisqu'ils permettent tous de détecter un unique *mismatch*. Seules les méthodes présentant une LOD inférieure à $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ ont ensuite été sélectionnées pour avoir la possibilité de quantifier les miRNAs dont la concentration biologique se situe entre $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ et $1 \times 10^{-18} \text{ M}$. Il sera nécessaire d'optimiser encore la méthode pour obtenir une LOD plus basse par la suite.

L'utilisation des polymères conducteurs permet d'obtenir une LOD très basse. Cependant, la couche de polymère à la surface de l'électrode empêche une réponse spontanée du capteur. Aussi, la couche de polymère se dégrade dans le temps et le capteur n'est donc pas assez robuste. Enfin, l'immobilisation électrostatique des sondes au sein du polymère ne permet pas d'avoir une stabilité suffisante de la concentration surfacique de sondes ADN. Les biocapteurs non faradiques ne sont pas souhaitables non plus dans le cadre de cette étude. En

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

effet, les mesures d'impédance prennent beaucoup de temps (jusqu'à deux ou trois heures selon la gamme de fréquences explorée) et les électrodes en nitrure de gallium ne sont pas commerciales et donc pas adaptées à une application clinique. En ce qui concerne les sondes marquées, elles sont très chères et la réponse (augmentation ou diminution du courant) varie selon la cible à détecter. Cette technique n'est donc pas évidente à mettre en place, surtout dans le cadre d'une détection multiple. Enfin, la transduction par transfert d'électrons longue distance non catalysé et celle par mesure de la résistance faradique n'ont pas une sensibilité aussi élevée que celle par transfert d'électrons longue distance catalysé. C'est donc ce dernier mode de transduction qui sera utilisé pour mettre au point les biocapteurs de miRNAs décrits dans ce travail.

F. Le montage à deux électrodes

Pour réaliser le biocapteur électrochimique d'intérêt, un montage à deux électrodes a été choisi (Figure I-30). Le laboratoire développe depuis plusieurs années ce montage à deux électrodes destiné aux biocapteurs[136]. Il a été pensé dès sa conception pour une simplicité d'utilisation lors des manipulations et la possibilité de réaliser des analyses multiples grâce à son faible encombrement. C'est donc cette expertise détenue au laboratoire qui a orienté le choix du montage à deux électrodes pour réaliser ces biocapteurs électrochimiques de miRNAs. Celui-ci est composé de deux électrodes du même métal, ce qui permet ainsi d'éliminer une éventuelle différence de potentiel due aux matériaux d'électrodes et d'obtenir un signal centré sur 0 V comme sur la courbe rouge de la Figure I-31. L'électrolyte de mesure est composé du couple oxydant/réducteur comme pour obtenir un signal symétrique par rapport à l'origine en voltampérométrie cyclique (Figure I-31).

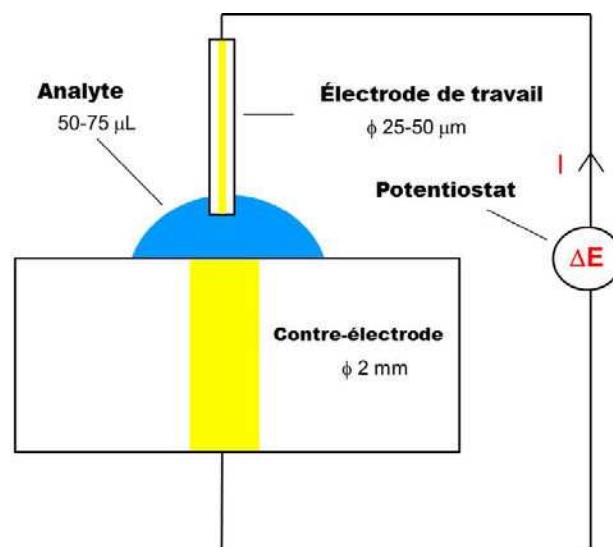


Figure I-30 : Schéma du montage à deux électrodes utilisé pour réaliser le biocapteur électrochimique de miRNAs

Généralités

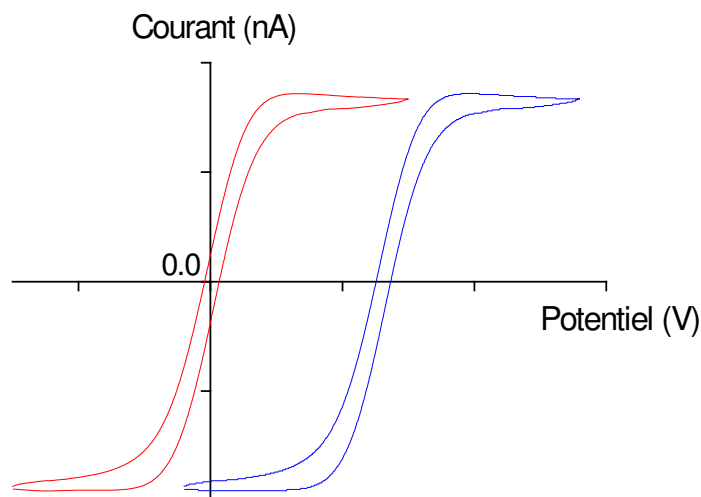


Figure I-31 : Comparaison de deux voltampérogrammes d'UMEs non greffées en montage à deux électrodes composées de différents métaux (bleu) et composées du même métal (rouge)

La première électrode est l'électrode de travail. La dimension est choisie de manière à obtenir le comportement d'une ultramicro-électrode. L'utilisation d'une UME en tant qu'électrode de travail permet l'obtention d'un régime de diffusion radial au niveau de l'électrode du fait de sa faible dimension. La couche de diffusion devient rapidement plus grande que la dimension de l'électrode. Ces électrodes permettent donc d'obtenir un régime stationnaire très rapidement et sans rotation de l'électrode, contrairement aux électrodes millimétriques[137]. D'autre part, le courant capacitif induit à la surface de ces électrodes est très faible et ne perturbe pas la mesure comme pour les électrodes millimétriques. Le rapport signal/bruit est donc fortement amélioré. De plus, la chute ohmique lorsqu'un potentiel est imposé à l'électrode est dans ce cas négligeable. Les UMEs permettent donc de travailler dans des solutions de conductivité faible. Enfin, la taille de ces électrodes permet un encombrement faible du montage. Il est donc envisageable de monter en parallèle plusieurs de ces montages pour réaliser facilement du criblage et doser plusieurs miRNAs différents. La contre-électrode est de dimension millimétrique, avec un diamètre de 2 à 3 mm, et peut également servir à déposer des gouttes d'analyte pour les mesures. Il s'agit de la contre-électrode, mais dans le cas du montage à deux électrodes, elle joue également le rôle de pseudo-référence. Cela est possible grâce à l'importante différence de taille entre les deux électrodes. En effet, la surface de la contre-électrode est environ 6400 fois plus grande que celle de l'électrode de travail. La densité de courant (j) traversant la contre-électrode pendant une expérimentation est donc

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

6400 fois inférieure à celle traversant l'UME de travail. La densité de courant au niveau de la contre-électrode est donc très faible et permet de conserver un potentiel quasi-constant au cours de l'expérience. Il est donc primordial de conserver un rapport de taille comparable entre l'UME de travail et la deuxième électrode.

Tableau I-10 : Tableau récapitulatif des caractéristiques du biocapteur et de leur intérêt pour la technologie

Caractéristique du biocapteur	Apport pour le biocapteur
Montage à deux électrodes	Expérience du laboratoire, simplicité du montage, encombrement faible, possibilité de montages en parallèles, ergonomie pour la bioanalyse
Electrodes du même métal	Prix faible par rapport aux semi-conducteurs, signal centre sur 0 V
Ultramicro-électrode comme électrode de travail	Elimination du courant capacitif et non stationnaire, sensibilité augmentée, encombrement faible
Immobilisation des sondes par chimisorption	Greffage robuste, stabilité de la monocouche de sondes
Méthode de mesure ampérométrique (voltampérométrie cyclique ou chronoampérométrie)	Simplicité et rapidité
Transduction par transfert d'électrons longue distance catalysé	Sensibilité, transduction par augmentation du courant, détection d'un unique <i>mismatch</i> sans chauffage, simplicité de mise en oeuvre
Utilisation du couple oxydant/réducteur dans l'électrolyte de mesure à la même concentration	Signal symétrique en oxydation et réduction

Au vu du cahier des charges imposé par la détection de miRNAs en diagnostic clinique et des différentes techniques exposées dans ce chapitre, les biocapteurs développés au cours de ce travail utiliseront (Tableau I-10) donc l'électrochimie avec pour mode de transduction le transfert d'électrons longue distance catalysé, une immobilisation des sondes ADN par chimisorption ; soit covalente en utilisant les sels de diazonium et le couplage peptidique sur électrodes de carbone, soit en formant des monocouches auto-assemblées s'appuyant sur la

Généralités

force des liaisons semi-covalentes Au-S sur électrodes d'or. Le montage utilisera deux électrodes ; une UME de travail et une contre-électrode millimétrique ; pour permettre la mise en parallèle de montages pour la détection multiple et le travail sur des échantillons de faibles volumes de l'ordre de 50 μL . Enfin, la détection de l'hybridation entre sonde et cible sera mesurée en ampérométrie, soit par voltampérométrie cyclique, soit par chronoampérométrie. Il est donc important maintenant d'explicitier les différentes méthodes utilisées tant au niveau du matériel utilisé que des espèces chimiques et des méthodes dans leur détail. C'est l'objet du second chapitre de ce manuscrit.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

Chapitre II :

Matériels et méthodes

II. Matériels et méthodes

Ce chapitre décrit le matériel et les méthodes mis en place pour développer les biocapteurs électrochimiques de miRNAs faisant l'objet de cette thèse. Il s'agit ici non seulement de préciser l'appareillage et les produits utilisés mais également de détailler les protocoles des mesures électrochimiques et de fabrication des électrodes lorsqu'elles ont été réalisées au laboratoire et de préciser les protocoles d'immobilisation des sondes ADN, les sondes et intercalants rédox ainsi que les raisons de leur choix. Les méthodes de calibration et de calcul de la limite de détection y sont aussi explicitées.

A. Les électrodes utilisées

Pour réaliser le développement des biocapteurs, deux matériaux d'électrodes ont été envisagés : le carbone graphite d'une part, et l'or d'autre part. Ce choix a été motivé par l'existence de méthodes d'immobilisation des sondes ADN bien connues et traitées dans la littérature, mais également pour la maîtrise de ces techniques déjà utilisées au laboratoire dans d'autres contextes. De même, deux géométries d'électrodes ont été testées : une géométrie de disque et une géométrie de bandes interdigitées.

1) Electrodes disque unitaires en carbone graphite

Pour fabriquer ces électrodes, la première opération est sans doute la plus délicate puisqu'il faut faire entrer une ou plusieurs fibres de carbone, selon le souhait, dans un capillaire en verre bouché à l'autre extrémité. La difficulté principale réside dans le fait que les fibres utilisées sont très fines et il est difficile de les manipuler. Il faut également s'assurer que la fibre soit bien insérée jusqu'au bout du capillaire pour éviter qu'elle n'en ressorte par la suite. Ce sont des fibres de carbone WPI de diamètre 7 μm (référence X1046) qui sont utilisées dans le cas présent. Une fois la fibre insérée, il faut couper la partie qui dépasse du capillaire. On peut ensuite sceller l'électrode, c'est-à-dire immobiliser la fibre de carbone dans le capillaire. Pour cela, il faut parvenir à faire fondre le verre pour emprisonner la fibre lorsque le verre refroidit. A l'aide d'une pompe à vide, on réalise le vide dans le capillaire afin que le verre fondu sertisse la fibre. Le capillaire est alors placé dans une résistance circulaire pour être chauffé (Figure II-1). Le support où est fixé le capillaire est mobile et peut être déplacé à l'aide d'une vis de réglage micrométrique. Un potentiel de 4,7 V est imposé pour chauffer la résistance au rouge. Le verre est alors localement porté à fusion. Après 7 minutes de chauffe au départ, le capillaire est descendu de 0,5 mm à l'aide de la vis de réglage micrométrique. La partie chauffée refroidit, et se solidifie autour de la fibre de carbone pour la

Matériels et méthodes

sceller dans le verre. C'est ensuite une autre partie du capillaire qui chauffe et le même cycle est réitéré. On descend ainsi le capillaire de 0,5 mm toutes les 5 minutes par la suite jusqu'à sceller l'électrode sur 5 à 6 mm. Une fois l'électrode suffisamment scellée, le chauffage est arrêté. Il suffit alors de laisser refroidir le verre, et de casser le vide.

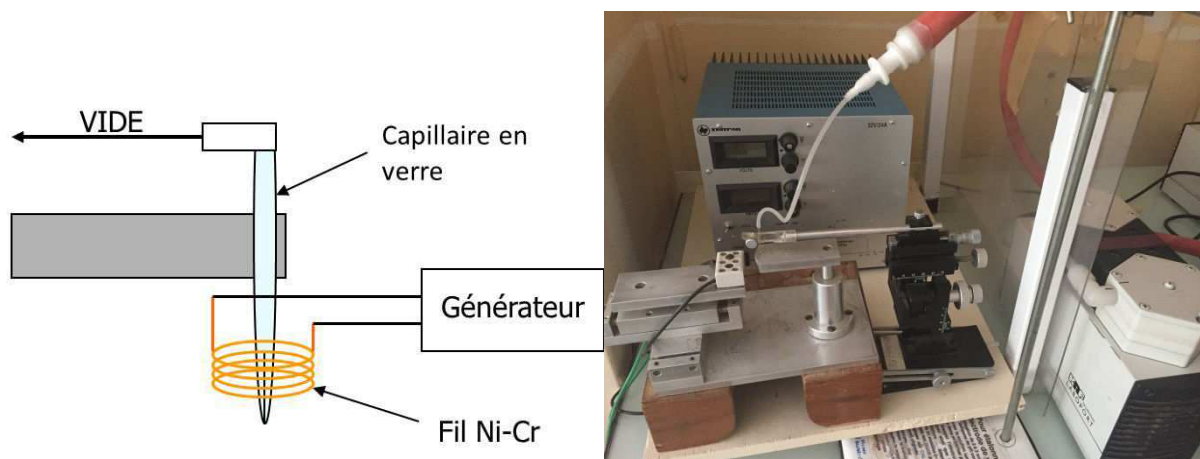


Figure II-1 : Schéma et photo du montage utilisé pour sceller les UMEs

L'électrode est ensuite polie sur un disque en carbure de silicium à gros grain ($22\ \mu\text{m}$) jusqu'à arriver à quelques dixièmes de millimètre de la fibre. Il faut ensuite créer le contact électrique. Pour cela, le capillaire est rempli de colle conductrice enrichie en argent à l'aide d'un fil de cuivre fin. Une fois le capillaire rempli de colle jusqu'au fond, deux fils de cuivre sont placés dans le capillaire. Ils constituent, par l'intermédiaire de la colle le raccordement de l'électrode au circuit électrique. Le dispositif est ensuite placé à l'étuve pendant deux heures à 150°C pour permettre un séchage complet et rapide de la colle conductrice. Une fois la colle sèche, une protection est mise en place à l'aide d'un morceau de gaine thermorétractable sur le haut du capillaire pour protéger la jonction de la colle et des fils de cuivre et éviter l'arrachement. Enfin, l'électrode est polie sur des disques au carbure de silicium à grains plus petits (15 ou $9\ \mu\text{m}$). La qualité du polissage est évaluée par une mesure voltampérométrique de l'électro-activité du couple $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}] / [\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ rapide et réversible sur l'UME. Le signal électrochimique obtenu est considéré comme satisfaisant lorsqu'il présente une faible hysteresis, que les paliers de diffusion horizontaux sont observés (Figure II-2) et que l'intensité mesurée permet de définir un rayon de l'électrode proche de celui théorique (diamètre des fibres utilisées) par l'équation (I.9). Le schéma d'une ultramicro-électrode de carbone graphite est donné ci-dessous avec la Figure II-3.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

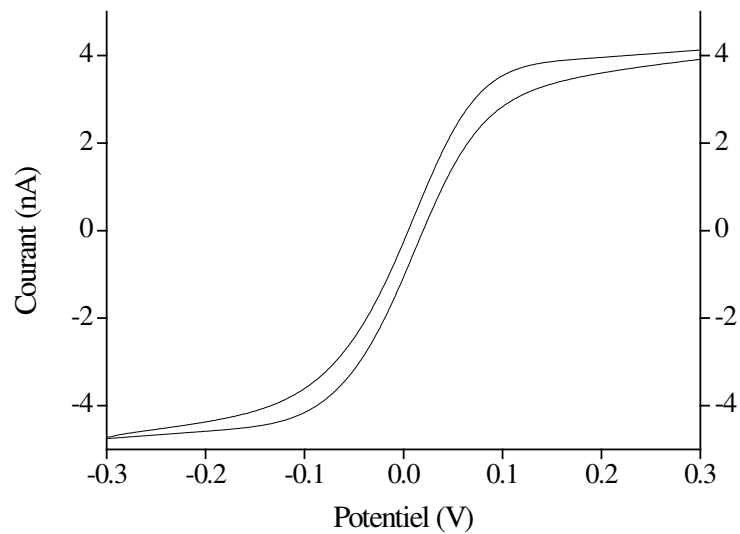


Figure II-2 : Exemple de voltampérogramme obtenu lors de la caractérisation d'une UME de carbone de 7 μm à une vitesse de balayage de 100 mV/s

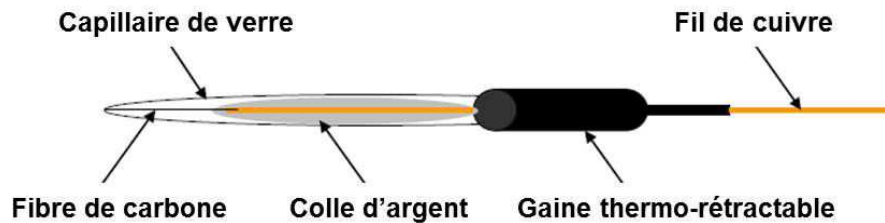


Figure II-3 : Schéma d'une UME réalisée au laboratoire avec une fibre de carbone

Le diamètre des électrodes de graphite préparées au laboratoire est 7 μm . D'autres électrodes disque unitaires ont été testées. Il s'agit d'électrodes disque de graphite commerciales Biologic de diamètre 33 μm .

2) Electrodes disque unitaires en or

Des ultramicro-électrodes en or peuvent être fabriquées de la même façon que celles en graphite. Il s'agit d'introduire un fil d'or du diamètre souhaité dans le capillaire. Dans ce cas, il s'agit de fils de 25 μm de diamètre achetés chez *Goodfellow Cambridge Limited* d'une pureté égale à 99,99 %. Par la suite, le protocole à suivre est exactement le même que pour les électrodes en graphite. Les électrodes obtenues peuvent être schématisées comme sur la Figure II-4.

Matériels et méthodes

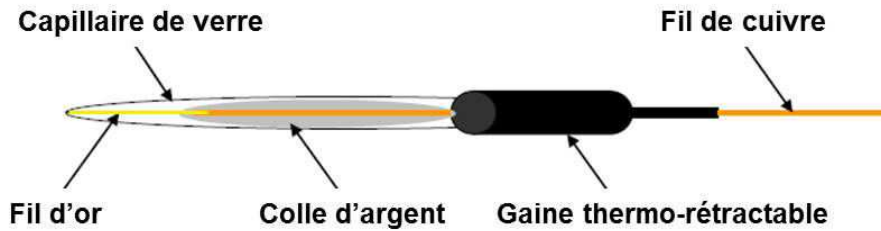


Figure II-4 : Schéma d'une UME en or fabriquée au laboratoire

La manipulation des fils d'or, plus robustes et de diamètre supérieur, est plus aisée que celle des fibres de carbone. Ces électrodes sont donc plus simples à réaliser. Des électrodes commerciales ont également été testées ; d'une part des électrodes CHInstruments de diamètre 25 μm , et d'autre part, des électrodes Biologic, également de diamètre 25 μm .

3) Réseau d'électrodes bandes interdigitées

Il s'agit ici d'un réseau d'électrodes d'or, de géométrie bandes interdigitées, lithographiées sur des supports en verre, utilisé comme électrode de travail dans le montage à deux électrodes et développé en partenariat avec l'équipe de *L. Thouin* au laboratoire PASTEUR de l'Ecole Normale Supérieure de Paris. Le but de ce design d'électrodes est de définir si le fait de travailler en réseau d'électrodes apporte un gain de fiabilité et de sensibilité au système de biocapteurs électrochimiques à ADN. Les réseaux d'électrodes envisagés présentent une surface plus grande que les UMEs disques, une dimension caractéristique (leur largeur w) proche des dimensions des UMEs pour conserver un comportement semblable à celui des UMEs disques. Ainsi, chaque bande peut être adressée indépendamment, permettant ainsi plusieurs mesures rapidement. La stratégie envisagée consiste à moyenniser les mesures réalisées sur chaque bande pour diminuer la variabilité des mesures. Enfin, les configurations de ces réseaux permettent de travailler avec des bandes indépendantes les unes des autres (pas de recouvrement des couches de diffusion) et en s'affranchissant de la convection naturelle grâce à leur design optimisé par le laboratoire PASTEUR[138].

Le schéma suivant montre l'architecture d'une électrode de travail (ET) unitaire. Les dimensions adoptées permettent la compatibilité avec une plaque 96 puits qui constitue un standard de la biologie en vue d'une application clinique future. Pour établir les dimensions

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

de l'ET, la taille de gouttes de solution aqueuse de différents volumes sur une lame de verre a également été prise en considération. En effet, la goutte doit recouvrir en totalité la largeur des bandes d'électrodes comme schématisé sur la Figure II-5.

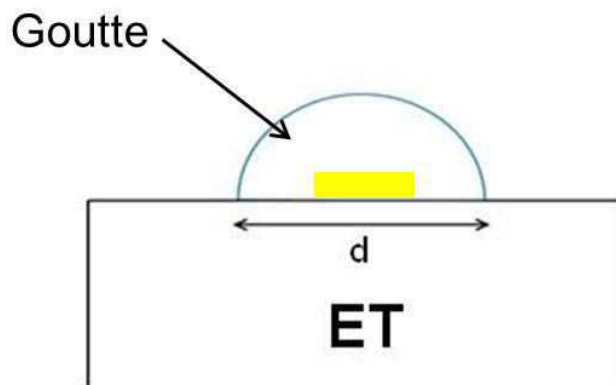


Figure II-5 : Schéma d'une électrode bande dans le cas d'une goutte déposée à sa surface

Le Tableau II-1 donne les tailles des gouttes déposées en fonction de leur volume en faisant l'hypothèse que les gouttes ne s'étalent pas sur le matériau. Le paramètre indicatif de la taille est la grandeur d . Il est estimé en mesurant la goutte à l'aide d'une règle graduée.

Tableau II-1 : Tableau de correspondance entre volume et taille d'une goutte déposée

Volume de la goutte (μL)	d (mm)
10	$3,5 \pm 0,5$
20	$4,5 \pm 0,5$
40	$6,0 \pm 0,5$

Les bandes peuvent aussi être disposées parallèlement formant ainsi un réseau comme sur la Figure II-6. Cette configuration permet de travailler en adressant indépendamment chaque électrode. La surface de travail est délimitée grâce à un bloc de PolyDiMéthylSiloxane (PDMS) collé sur le dispositif en verre et découpé à l'emporte-pièce à la dimension choisie (annexe A1).

Matériels et méthodes

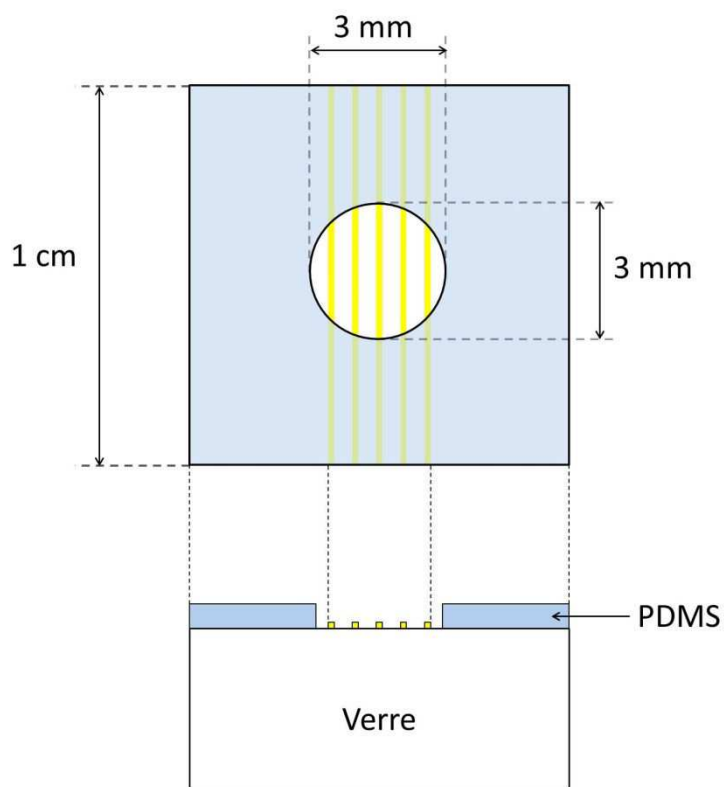


Figure II-6 : Schéma du prototype d'électrodes bandes disposées en réseau

Cette configuration permet de fabriquer des réseaux d'électrodes de travail avec des dimensions différentes ; à savoir la largeur des bandes et l'espacement entre les pistes. Ces différentes ET sont représentées sur la Figure II-7.

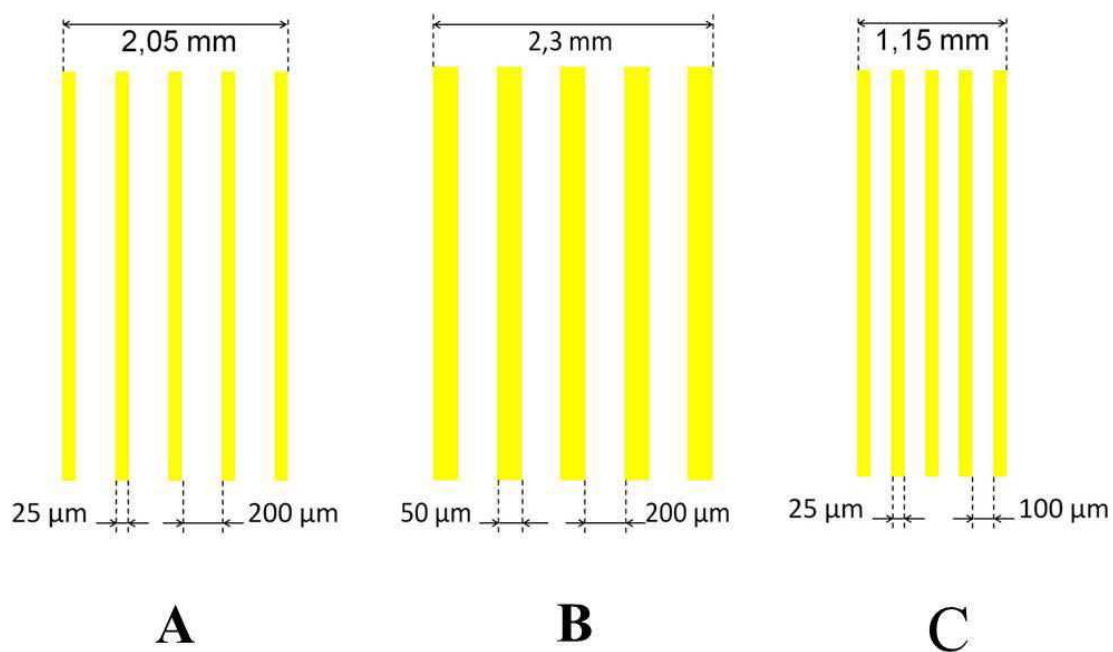


Figure II-7 : Schéma des différentes configurations de réseaux d'électrodes fabriquées

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

La configuration A permet de s'approcher de l'UME unitaire disque utilisée jusque-là de 25 μm de diamètre. La configuration B est choisie de manière à évaluer l'influence de la variation de largeur de bande sur le courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure et permet ainsi l'augmentation de la surface active d'électrodes dans un puits. Enfin, la configuration C permet d'évaluer l'influence de l'espacement entre les bandes et permet au choix d'augmenter le nombre de bandes dans un puits ou de diminuer la taille du puits en conservant une surface d'électrode constante.

Après les premières expériences de caractérisation électrochimique et la vérification de l'indépendance des bandes entre elles, un modèle de réseaux lithographiés sur des lames de verre à 10 bandes a été adopté avec les mêmes paramètres que la configuration A (Figure II-8). Cette configuration d'électrodes fonctionne pour réaliser les mesures et permet une transposition plus aisée des méthodes d'immobilisation des sondes ADN car ses caractéristiques sont celles qui se rapproche le plus de celles des UMEs disques unitaires. Ce modèle permet de réaliser 5 expériences sur le même dispositif (dans 5 puits indépendants), en réalisant 10 mesures pour chaque expérience.

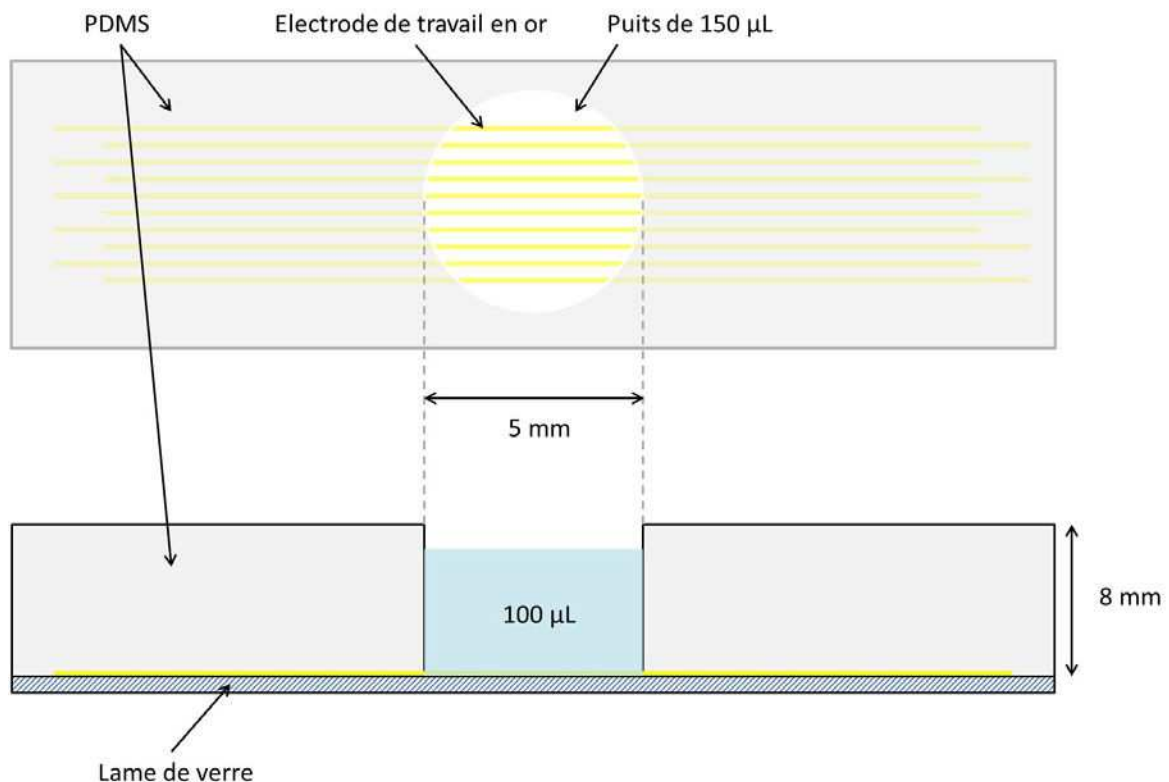


Figure II-8 : Schéma du réseau conçu vu de dessus et vu de profil en coupe

Matériels et méthodes

Ces électrodes lithographiées ont été fabriquées en partenariat avec *L. Thouin* et *E. Aït-Yahiatène* du laboratoire PASTEUR de l'Ecole Normale Supérieure de Paris disposant d'une salle blanche et du matériel adapté à la déposition de métal par pulvérisation cathodique (annexe A2).

4) Les contre-électrodes

Dans le cas des UME unitaires de type disque, les contre-électrodes utilisées sont des électrodes millimétriques Radiometer Analytical de type disque constituées du même matériau que l'électrode de travail et de diamètre 3 mm.

Dans le cas des électrodes de type bande, la contre-électrode est un fil d'or Goodfellow Cambridge Limited de pureté 99,99 % de diamètre 1 mm et de longueur 8 mm (Figure II-9).

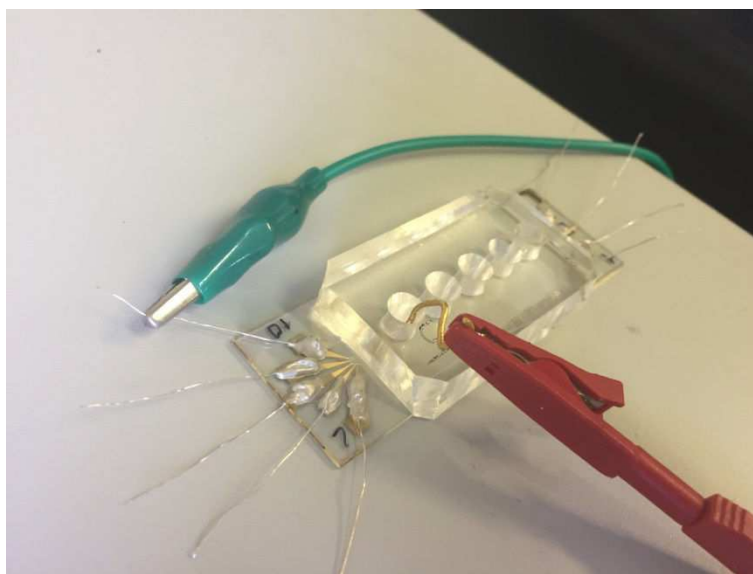


Figure II-9 : Photo du montage à deux électrodes dans le cas de l'utilisation des réseaux d'électrodes bandes comme électrode de travail

B. Les mesures électrochimiques

Il convient ici d'exposer le matériel utilisé pour réaliser les mesures électrochimiques ; c'est-à-dire les potentiostats, les interfaces et les logiciels d'acquisition. De même, les protocoles des mesures, à savoir les plages de potentiel des études, les vitesses de balayage et le nombre de cycles seront détaillés.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

1) Les dispositifs expérimentaux

Trois types de potentiostats ont été utilisés pour s'adapter aux différentes électrodes et aux différentes gammes de courants mises en jeu lors des mesures ou des procédures d'immobilisation.

a) *Le picostat*

Il s'agit d'un potentiostat de marque eDAQ modèle Picostat EA162. Il est interfacé par un boîtier eDAQ modèle e-corder ED401 ; l'ensemble est piloté par le logiciel EChem v2.1.6. Ce potentiostat est utilisé pour les mesures sur UME type disque dans des gammes de courants de 500 pA à 100 nA.

b) *Le potentiostat PAR 263A*

Il s'agit d'un potentiostat de marque EG&G Instruments (Princeton Applied Research) modèle 263 A. Il est relié directement au PC sans interface d'acquisition. Il est piloté à l'aide du logiciel PowerSuite v2.58. Ce potentiostat est utilisé pour les mesures menées sur les réseaux d'électrodes avec des gammes de courants de 100 nA à 100 mA.

c) *Le potentiostat PG 580R*

Il s'agit d'un potentiostat de marque Uniscan Instruments modèle PG 580R. Il est également relié au PC en direct et piloté par le logiciel Uniscan Instruments M370. Ce potentiostat est utilisé pour les procédures d'immobilisation à la surface des électrodes par électrochimie, en particulier la réduction du sel de diazonium sur les électrodes de graphite dans des gammes de courant de 1 nA à 10 mA.

2) Les méthodes de mesures électrochimiques

Les méthodes de mesures électrochimiques désignent les protocoles mis en place pour caractériser les électrodes, et détecter et quantifier l'hybridation d'ADN. Il s'agit donc des mesures pour caractériser l'immobilisation des sondes avant hybridation, et ensuite les mesures de différences de courant après hybridation. Ces mesures sont réalisées soit par voltampérométrie cyclique, soit par chronoampérométrie.

a) *La voltampérométrie cyclique*

La voltampérométrie cyclique a été utilisée avec les UMEs de type disque pour les caractériser d'une part, caractériser les couches de sondes ADN formées d'autre part, et enfin

Matériels et méthodes

quantifier l'hybridation. Selon l'utilisation, le protocole peut différer légèrement mais ils restent dans l'ensemble assez similaires.

Pour la caractérisation des électrodes, le potentiel appliqué varie de -0,3 V à 0,3 V. La caractérisation est toujours réalisée sur le même calibre de 50 nA en réalisant trois cycles de balayage de la plage de potentiel. Le deuxième cycle est alors conservé pour obtenir un cycle sans artefact dû à l'application du potentiel ou à l'arrêt de la mesure.

Pour caractériser la couche de sondes immobilisées à l'électrode, le protocole est le même. Cette caractérisation est toujours réalisée par trois cycles de balayage de la plage de potentiel sur le calibre 50 nA. La plage de potentiel est simplement modifiée en adoptant -0,1 V comme potentiel initial, et 0,1 V comme potentiel maximum. La plage de potentiel est moins ample pour ne pas détériorer la couche immobilisée à la surface de l'électrode. En adoptant ces limites de plage de potentiel, les réactions secondaires d'oxydation de la guanine des brins d'ADN et de réduction de la liaison thiol-or sont évitées. C'est encore une fois le deuxième cycle qui est conservé pour s'affranchir des éventuels artefacts de début et fin de mesure. Le même protocole est utilisé pour mesurer la différence de courant avant et après capture de la cible et pour quantifier l'hybridation de la cible sur la sonde.

Enfin, toutes les manipulations décrites sont réalisées en utilisant un filtre électronique passe-bas avec une fréquence de 5 Hz. Ce filtre permet d'effectuer les mesures sans cage de Faraday.

b) La chronoampérométrie

La chronoampérométrie a été employée avec les UMEs de type bande pour caractériser les couches de sondes ADN formées et pour quantifier l'hybridation sur ces sondes car elle permet d'accéder plus facilement au courant quasi-stationnaire sur les électrodes de type bande. Les électrodes bandes sont caractérisées au préalable par voltampérométrie cyclique comme décrit précédemment.

Pour la caractérisation de la couche d'ADN après immobilisation, il est possible d'observer le comportement de la sonde rédox en solution soit en oxydation, soit en réduction. Le potentiel imposé est donc égal à $\pm 0,1$ V. Le courant est alors mesuré pendant une durée de 60 secondes. Ce temps d'acquisition permet, étant donné la dimension des bandes d'or, d'obtenir une valeur fiable du courant quasi-stationnaire. La valeur du courant retenue est celle obtenue après une minute et peut donc être assimilée à une valeur de courant

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

stationnaire. Le même protocole est ensuite utilisé pour quantifier l'hybridation en soustrayant les valeurs de courant obtenues après 60 secondes avant et après l'hybridation. Les mesures sont toutes réalisées sur le même calibre de 10 μ A.

De même que pour la voltampérométrie cyclique, toutes les manipulations décrites sont réalisées en utilisant un filtre électronique passe-bas avec une fréquence de 5 Hz.

C. L'électrolyte de mesure

Comme énoncé précédemment, la méthode de transduction choisie pour le biocapteur développé dans ces travaux est celle du transfert d'électrons longue distance catalysé Figure I-28. Pour mettre en place cette méthode, les mesures électrochimiques pour caractériser la monocouche de sondes avant et après hybridation doivent être menées dans un électrolyte contenant un sel de fond, une sonde rédox chargée négativement en solution, et un intercalant rédox destiné à s'accumuler dans la monocouche pour catalyser le transfert d'électrons. Dans l'étude menée sur le développement de ce biocapteur, la composition de l'électrolyte a fait l'objet d'une attention particulière pour tenter d'améliorer la sensibilité des mesures d'une part, et pour améliorer la robustesse des capteurs d'autre part.

1) Le sel de fond

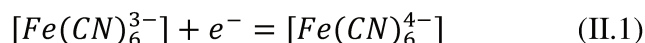
La présence du sel de fond dans l'électrolyte est indispensable pour s'affranchir du phénomène de migration des espèces. Il convient donc de maintenir la force ionique de ce sel de fond à 0,5 M pour travailler dans de telles conditions. Les différents sels de fond utilisés dans cette étude sont le chlorure de sodium (NaCl) (*Riedel-de Haën*), le nitrate de sodium (NaNO_3) (*Acros*), le tétrafluoroborate de sodium (NaBF_4) (*Acros*), et l'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3) (*Fluka*). L'utilisation de sels de fond sans chlorure pour l'étude a pour but d'éviter la corrosion des électrodes d'or et ainsi d'améliorer la durée de vie des électrodes et aussi la robustesse du capteur.

2) La sonde rédox

La sonde rédox doit impérativement être chargée négativement pour permettre la répulsion électrostatique entre cette sonde et la couche d'ADN. Les formes oxydante et réductrice de la sonde sont utilisées en quantités égales dans l'électrolyte. Le signal ainsi obtenu est symétrique en oxydation et en réduction. Deux sondes rédox ont été testées dans cette étude. La concentration en sonde rédox utilisée dans l'électrolyte est de 5 mM de chaque forme permettant ainsi d'observer un voltamogramme symétrique en oxydation et en réduction et d'identifier facilement un éventuel problème au cours de l'expérience. Le premier

Matériels et méthodes

couple de sondes rédox, très classique, est le couple ferricyanure $[Fe(CN)_6^{3-}]$ / ferrocyanure $[Fe(CN)_6^{4-}]$ dont l'équation d'oxydo-réduction est la suivante :



Le ferrocyanure et le ferricyanure ont été achetés chez Fisher Scientific.

La seconde sonde utilisée est un dérivé de la précédente. En effet, il s'agit d'un complexe mixte de fer formé par ajout de céfadroxil (CDH) (Figure II-10) à la solution de ferro/ferricyanure.

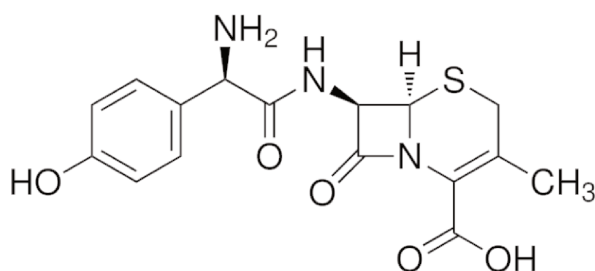
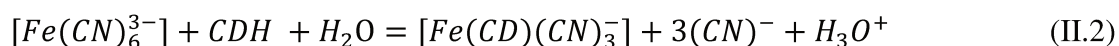
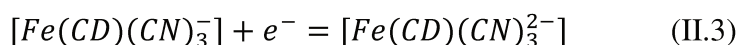


Figure II-10 : Structure du céfadroxil

En effet, cette molécule utilisée comme antibiotique[139] est un excellent complexant tridentate du fer[140]. C'est également une molécule présentant deux acidités successives[141]. La réaction supposée lors de la mise en présence de céfadroxil avec du ferricyanure est la suivante :



La réaction avec le ferrocyanure est semblable et produit la forme réduite du fer complexé. La réaction d'oxydo-réduction du couple du fer en complexe mixte est alors la suivante :



Ce couple possède un potentiel standard très proche de celui du couple ferri/ferrocyanure. Cependant, il possède l'avantage d'être plus encombrant d'un point de vue stérique. Cet encombrement stérique accru peut permettre d'empêcher un peu plus la diffusion de la sonde rédox à l'électrode et donc de diminuer le courant résiduel mesuré avant hybridation. Néanmoins, le complexe est moins chargé et la répulsion électrostatique sera moins importante. Il sera intéressant de vérifier si ce complexe peut permettre d'améliorer la sensibilité du capteur.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

Le céfadroxil utilisé dans l'étude a été acheté chez *Sigma-Aldrich*.

3) L'intercalant rédox

L'intercalant rédox est également d'une importance capitale dans l'électrolyte. Il permet de faciliter le transfert d'électrons depuis la sonde rédox en solution jusqu'à l'électrode par voie catalytique en s'intercalant dans la monocouche d'ADN. L'intercalant doit donc être une molécule présente dans l'électrolyte en quantité catalytique régénérée à la fin de la réaction de transfert d'électrons. Là aussi, deux intercalants ont été testés pour développer les biocapteurs de cette étude.

Le premier intercalant testé est le bleu de méthylène (MB) (Figure II-11). Cette molécule chargée positivement dans sa forme oxydée s'accumule dans la couche d'ADN par interactions électrostatiques.

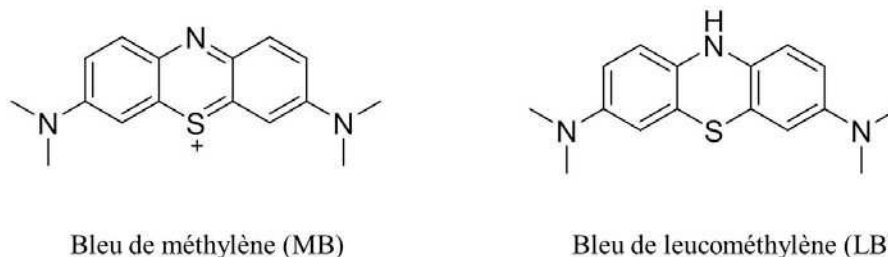
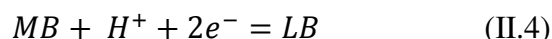


Figure II-11 : Structure du bleu de méthylène et de sa forme réduite bleu de leucométhylène

Le couple rédox MB/LB utilisé comme intercalant rédox dans une monocouche d'ADN a beaucoup été étudié par le groupe de *Barton*[142], [143]. Ainsi, le MB adsorbé dans la couche d'ADN sur électrode d'or montre un potentiel de réduction de -0,25 V par rapport à l'ECS soit 30 mV de moins qu'en solution aqueuse[142]. La réaction rédox mise en jeu peut alors être écrite comme suit :



Un mécanisme de catalyse du transfert d'électrons au sein de la monocouche d'ADN a été proposé *Gorodetsky* et *Barton* en 2008[143] (Figure II-12).

Figure II-12 : Schéma du mécanisme catalytique du MB au sein de la couche de sondes ADN. (extrait de DNA-mediated electrochemistry ; *Gorodetsky et al.*[143])

En présence du double brin d'ADN complémentaire conducteur, le bleu de méthylène est réduit grâce à l'apport de deux électrons. La forme réduite (LB) est neutre et se désorbe de

Matériels et méthodes

la couche ADN pour diffuser dans la solution. Le LB permet alors de réduire la sonde rédox en solution, et une fois réoxydé en MB est à nouveau adsorbé dans la monocouche d'ADN. Une augmentation du courant due à la catalyse du transfert d'électrons est alors observée. Le bleu de méthylène utilisé a été acheté chez *Rhône-Poulenc*.

Un deuxième intercalant rédox a été testé. Il s'agit de la proflavine (Pfl) (Figure II-13). La proflavine présente une structure proche de celle du bleu de méthylène et est connue pour ses propriétés d'intercalations dans le double brin d'ADN[144]. Elle est à ce titre utilisée comme anti-bactérien, empêchant les bactéries de proliférer en s'intercalant dans leur ADN.

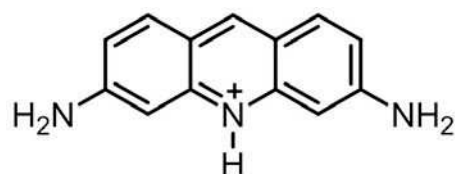


Figure II-13 : Structure de la proflavine (Pfl) à pH physiologique

Cette molécule ne possède pas de signature rédox observable directement sur électrode d'or. Cependant, son effet en tant que catalyseur du transfert d'électrons au sein d'une monocouche ADN a été montré par Dharuman en 2008[145]. La proflavine utilisée a été achetée chez *Sigma*.

Au cours des travaux, une étude des différents couples sonde/intercalant rédox a été menée en faisant varier la concentration d'intercalant dans l'électrolyte.

D. Les sondes et cibles ADN et ARN

Les séquences utilisées dans cette étude ont une grande importance. Ce sont à la fois l'objet de l'étude de la conception des biocapteurs électrochimiques et les outils utilisés pour parvenir à atteindre l'objectif. En effet, ce sont les sondes immobilisées à l'électrode qui permettent la capture et la quantification des ADNs ou ARNs cibles. Tout d'abord, il faut préciser que toutes les séquences choisies s'appuient sur les séquences de miRNAs pouvant être trouvées chez l'homme et qui sont donc potentiellement de futures cibles dans une application de diagnostic médical. Les séquences sont donc assez courtes, de l'ordre d'une vingtaine de paires de bases, ce qui rend la probabilité de trouver par hasard une séquence identique quasiment nulle. D'autre part, et pour toute la partie développement et optimisation du biocapteur, les manipulations ont été réalisées avec des séquences synthétiques d'ADN. En effet, le comportement des ADNs et des ARNs sont assez proches, cependant, la synthèse à façon de brins d'ADN est beaucoup moins chère que la synthèse d'ARN, environ 6 fois plus

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

coûteuse. C'est donc pour des raisons purement économiques que le développement est réalisé avec des ADNs.

1) Les cibles ADN et ARN

Au cours du développement et des optimisations, les études ont porté sur trois séquences différentes qui étaient disponibles au laboratoire. La première séquence a été utilisée pour l'étude sur les UME de carbone. Il s'agit de la séquence ADN correspondant au miRNA 21. Ce micro-ARN est présent chez la plupart des mammifères et comporte 22 paires de bases. C'est aussi l'un des premiers à avoir été identifié. Il est connu pour être surexprimé dans de nombreux cas de développements de tumeurs solides. Il agit en inhibant l'action de multiples suppresseurs tumoraux[146]. Ainsi, ce miRNA est associé à diverses variétés de cancers tels que le cancer du sein[147], des ovaires[148], du colon[149], du poumon[150], du foie,[151] de la prostate[150], de la thyroïde[152], de l'œsophage[153], du pancréas[150] ou du cerveau[154]. D'autre part, ce miRNA semble jouer un rôle dans des pathologies cardiaques telles que la fibrose interstitielle[155]. Cette séquence ne peut à elle seule permettre de diagnostiquer ces pathologies mais il est donc intéressant de pouvoir quantifier ce miRNA de manière précise pour pouvoir envisager de manière précoce ces pathologies et confirmer le diagnostic. La séquence ADN correspondant à ce miRNA est la suivante :

5' TAG CTT ATC AGA CTG ATG TTG A 3'

D'autre part, deux séquences ont été utilisées pour le développement des biocapteurs sur électrodes d'or. La première est celle correspondant au miRNA 215. Ce micro-ARN comporte 21 bases et est présent chez l'humain[156]. Il est très proche du miRNA 192 et de ce fait, ils ont des rôles proches. D'après la littérature, il serait un régulateur positif d'un suppresseur tumoral chez l'Homme connu sous le nom de p53[157]. Ce petit ARN est aussi un biomarqueur surexprimé dans le cas de troubles hépatiques, qu'il s'agisse d'un cancer[158], ou de lésions dues à la consommation de certains médicaments[159]. La séquence ADN correspondant à ce miRNA est la suivante :

5' ATG ACC TAT GAA TTG ACA GAC 3'

La deuxième séquence employée est celle correspondant au miRNA 122. Ce miRNA est présent chez les vertébrés et est présent en grande quantité au niveau du foie chez l'humain pour participer au métabolisme des acides gras. Il représente la plupart de l'ensemble des miRNAs présents dans le foie chez l'Homme[160]. Il a été constaté lors des

Matériels et méthodes

dernières années que ce miRNA était fortement sous-exprimé dans le cas de la présence d'un carcinome hépatocellulaire[161]. D'autre part, il a été montré récemment que le micro-ARN 122 jouait un rôle dans la réponse immunitaire innée en inhibant le développement de plusieurs virus[162]. Enfin, il a été montré que cette séquence ARN jouait un rôle de régulation de la charge virale dans le cas de l'hépatite C. En effet, ce micro-ARN pourrait dans certaines conditions faciliter la réplication de l'ARN du virus[163]. La séquence ADN correspondant à ce miRNA de 22 bases est la suivante :

5' TGG AGT GTG ACA ATG GTG TTT G 3'

Enfin, la séquence d'intérêt pour mener les tests sur échantillons biologiques est celle du miRNA 21 :

5' UAG CUU AUC AGA CUG AUG UUG A 3'

Ces trois séquences ont bien sûr été choisies pour les rôles importants qu'elles endossent dans l'organisme humain.

2) Les cibles non-complémentaires

Afin de servir de contrôle négatif, une séquence ADN définie au hasard a été utilisée. Il s'agit de montrer qu'il n'y a pas d'hybridation dans ce cas-là, et que la réponse obtenue par la mesure électrochimique montre bien cette absence d'hybridation. Pour cela, la séquence utilisée pour les trois études est la suivante :

5' ACA CAA GCA CAG TAG ATC CTG 3'

D'autre part, des séquences présentant une unique base non-complémentaire (*mismatch*) ont été utilisées pour éprouver la sélectivité des capteurs. Il s'agit de montrer que, pour un fragment cible différent d'un seul nucléotide, la réponse obtenue varie de manière à détecter cette différence. Pour cela, la séquence utilisée pour l'étude menée sur les UMEs de carbone avec le miRNA 21 est la suivante (la non-complémentarité est précisée en rouge) :

5' TAG CTT ATC A**C**A CTG ATG TTG A 3'

La séquence utilisée pour l'étude menée sur les UMEs d'or avec le miRNA 215 est la suivante :

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

5' ATG ACC TAT GTA TTG ACA GAC 3'

Enfin, la séquence utilisée pour l'étude menée avec le miRNA 122 est la suivante :

5' TGG AGT GTG AGA ATG GTG TTT G 3'

Toutes les cibles décrites dans les paragraphes précédents, complémentaires, définie au hasard ou présentant une unique non-complémentarité ont été achetées auprès de l'entreprise *Eurogentec France SASU*.

3) Les sondes ADN et ARN

Les sondes sont les objets clés du dispositif des biocapteurs. Ce sont elles qui vont permettre la capture des brins d'ADN ou d'ARN ciblés sélectivement. Ce sont aussi ces sondes qui sont immobilisées à la surface de l'électrode. Cette immobilisation confère sa robustesse au biocapteur en permettant l'obtention d'une couche de sondes stable au cours des mesures. Pour cela, selon la méthode d'immobilisation choisie, différentes modifications chimiques ont été testées sur les sondes. La modification ne peut pas toujours être effectuée directement à la suite de la séquence de nucléotides et nécessite parfois l'introduction d'un espaceur chimique ; la plupart du temps une chaîne carbonée.

a) Sonde modifiée par une amine

Pour l'étude menée sur électrodes de carbone, l'immobilisation des sondes repose sur le couplage peptidique entre la sonde et un diazonium substitué par un acide carboxylique (Figure II-14). Il est donc nécessaire que la sonde soit modifiée par une fonction amine (-NH₂). Un espaceur de 3 carbones est employé dans ce cas. La séquence utilisée est donc la séquence ADN complémentaire du miRNA 21 :

5' H₂N C₃ TCA ACA TCA GTC TGA TAA GCT A 3'

Matériels et méthodes

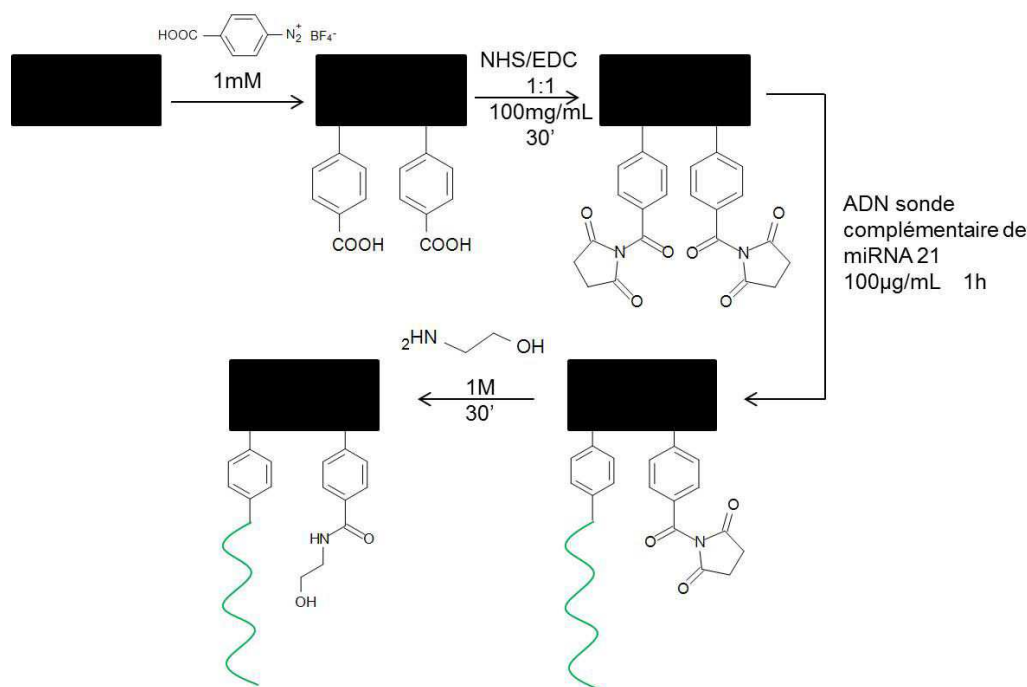


Figure II-14 : Schéma réactionnel de l'immobilisation des sondes marquées amine à la surface d'une électrode de carbone graphite par couplage peptidique avec un diazonium

b) Sondes modifiées par un thiol

Pour l'étude menée sur les UMEs d'or, l'immobilisation des sondes est réalisée par chimisorption avec des sondes modifiées par des thiols (-SH) (Figure II-15) ou des disulfures (-SS-) (Figure II-17). Dans cette étude, 4 modifications différentes de la sonde ont été évaluées pour obtenir une monocouche de sondes assez stable pour réaliser le biocapteur. Dans un premier temps, c'est la séquence suivante, complémentaire du miRNA 215 et marquée par un thiol avec un espaceur de trois atomes de carbone a été utilisée :



Dans un second temps, la séquence complémentaire du miRNA 122 modifiée par un thiol et un espaceur de 3 atomes de carbone a été utilisée :



Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

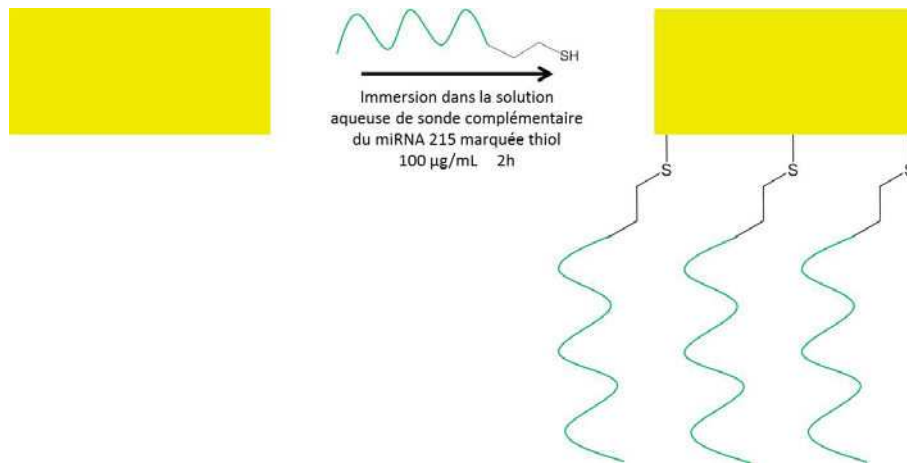


Figure II-15 : Schéma réactionnel de l'immobilisation des sondes marquées par un thiol à la surface d'une électrode d'or par chimisorption

c) Sonde modifiée par l'acide thioctique

Les autres modifications sont plus complexes puisqu'elles mettent en jeu des disulfures mais utilisent la même séquence de nucléotides complémentaires du miRNA 215. La deuxième sonde testée est modifiée par l'acide thioctique (AcTh) mais nécessite une modification plus complexe que le simple ajout de l'acide thioctique. La modification est donc détaillée ci-dessous avec la Figure II-16.

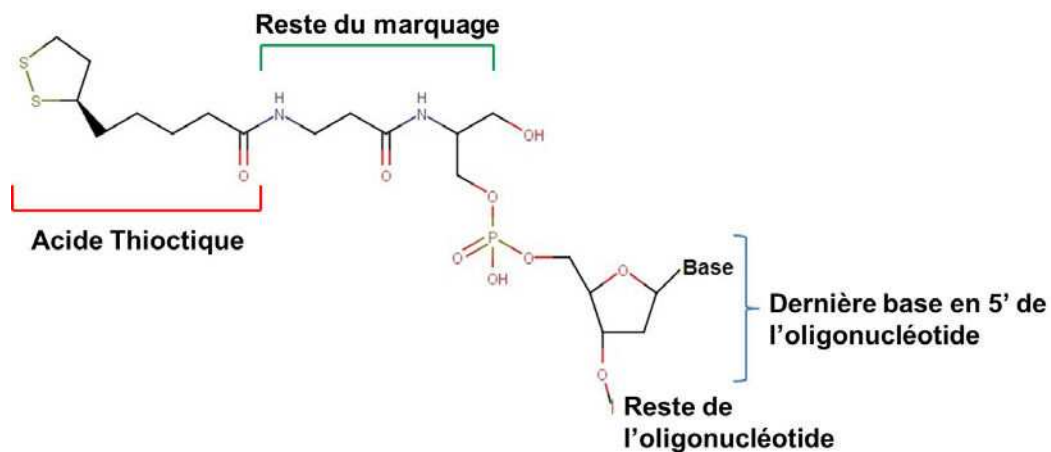


Figure II-16 : Détail de la modification (AcTh) de la sonde complémentaire du miRNA 215 par l'acide thioctique

Matériels et méthodes

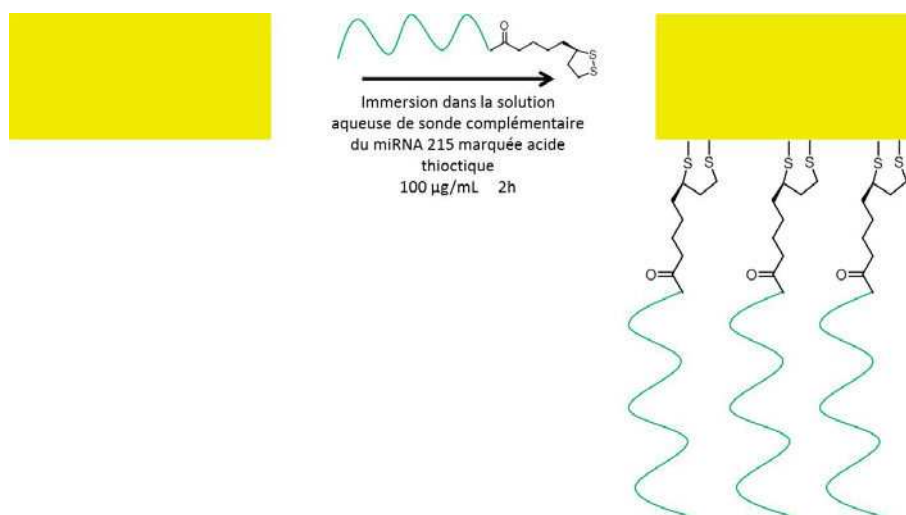


Figure II-17 : Schéma réactionnel de l'immobilisation des sondes marquées par un disulfure (exemple de l'acide thioctique) à la surface d'une électrode d'or par chimisorption

La séquence est donc la suivante :



Les sondes décrites précédemment ont été achetées à la société *Eurogentec France SASU*.

d) Sondes marquées par un ou plusieurs dithiol phosphoramidite (DTAP)

Les deux autres modifications des sondes testées reposent également sur des disulfures. Il s'agit dans ce cas d'une modification par un dithiol phosphoramidite (DTAP). Il est possible de marquer la séquence ADN complémentaire du miRNA 215 par une ou plusieurs unités DTAP contenant chacune un cycle disulfure. La modification la plus simple consiste à marquer la séquence par une unité DTAP (Figure II-18). Ce marquage est appelé 1-DTAP.

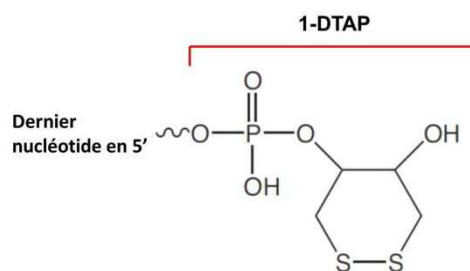


Figure II-18 : Détail de la modification 1-DTAP d'une sonde ADN

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

La séquence utilisée dans ce cas est la suivante :



La modification a également été testée avec trois unités DTAP (3-DTAP) comme indiqué sur la Figure II-19.

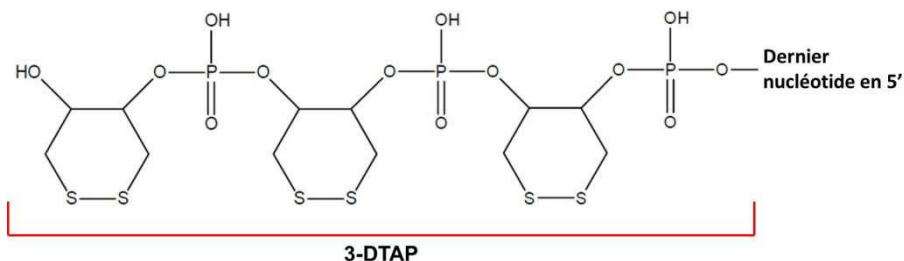


Figure II-19 : Détail de la modification 3-DTAP d'une sonde ADN

La séquence utilisée est la suivante :



Dans le cas des tests biologiques sur le miRNA 21, c'est également cette modification 1-DTAP qui a été utilisée. La séquence est la suivante :



Les sondes modifiées par le DTAP ont toutes été achetées à la société *FRIZ Biochem Gesellschaft für Bioanalytik mbH*.

Le Tableau II-2 suivant résume les séquences ciblées, ainsi que l'électrode utilisée et la modification de la sonde.

Tableau II-2 : Récapitulatif des modifications de sondes utilisées en fonction de l'électrode utilisée et de la séquence recherchée

Electrode	Cible	Modification de la sonde
Unitaire graphite	miRNA 21	Amine C ₃
Unitaire or	miRNA 122	Thiol C ₃
	miRNA 215	Thiol C ₃
		Acide thioctique (AcTh)
Réseau or	miRNA 215	Acide thioctique (AcTh)
		1-DTAP et 3-DTAP
	miRNA 21	1-DTAP

Matériels et méthodes

E. L'immobilisation

L'immobilisation des sondes à la surface de l'électrode constitue l'étape clé de la conception des biocapteurs. Il est nécessaire d'optimiser et de maîtriser parfaitement cette étape pour obtenir un capteur fiable et robuste. Deux techniques d'immobilisation ont été envisagées et optimisées en fonction du matériau d'électrode choisi.

1) L'immobilisation sur carbone

L'immobilisation sur carbone est réalisée en deux étapes comme décrit dans le chapitre précédent. La première étape consiste à réduire un sel de diazonium à la surface de l'électrode. Pour ce faire, trois différentes méthodes ; la chronoampérométrie, la voltampérométrie cyclique et l'adsorption préalable suivie d'une voltampérométrie cyclique ; ont été testées afin d'obtenir une monocouche de diazonium réduit. Ces monocouches ont été caractérisées en mesurant la réponse électrochimique du ferrocenylméthylamine couplé peptidiquement au diazonium. La seconde étape consiste au couplage peptidique de la sonde ADN décrite précédemment avec le diazonium réduit grâce au NHS et EDC. Cette méthode d'immobilisation des sondes ADN permet un greffage covalent très robuste. D'autre part, la réduction de diazonium sur graphite et le couplage peptidique sont deux méthodes très bien décrites dans la littérature et maîtrisées au laboratoire. C'est pourquoi cette technique d'immobilisation a été choisie.

a) Les réactifs

Le diazonium utilisé pour réaliser la modification de surface de l'électrode est le 4-carboxybenzenediazonium tétrafluoroborate (Figure II-20). Cette molécule est synthétisée au laboratoire par une méthode simple décrite en annexe A3.



Figure II-20 : Structure du 4-carboxybenzenediazonium tétrafluoroborate

Le ferrocenylméthylamine est une molécule non-commerciale également synthétisée au laboratoire pour contrôler le recouvrement du sel de diazonium à la surface de l'électrode. Son protocole de synthèse est également détaillé en annexe A3. Sa structure (Figure II-21)

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

composée du ferrocène la rend active en électrochimie et la fonction amine substituant le ferrocène permet le couplage au diazonium.

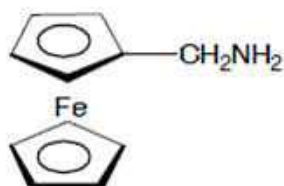


Figure II-21 : Structure du ferrocenylméthylamine

Pour la seconde étape, le couplage peptidique est réalisé en utilisant du N-hydrosuccinimide (NHS) provenant de chez *Sigma-Aldrich* et de l'hydrochlorure de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide (EDC) provenant de chez *TCI*.

Enfin, l'éthanolamine provenant de chez *Sigma-Aldrich*, permet de neutraliser les esters activés n'ayant pas réagi.

b) Réduction du diazonium

Pour les trois méthodes décrites ici, l'électrode de graphite est préalablement polie sur disque de carbure de silicium pendant une minute sur du grain 22 μm puis pendant deux minutes sur du grain 15 μm .

La première méthode de réduction du diazonium testée est la chronoampérométrie. Une solution de sel de diazonium à 1 mM est préparée dans l'acétonitrile avec le tétrafluoroborate de tétrabutylammonium à 0,1 M comme sel support. La modification de la surface de carbone est donc réalisée en imposant un potentiel de -0,6 V à l'électrode de travail immergée dans la solution en faisant varier le temps de dépôt. A la fin de ce temps, l'électrode est rincée à l'eau distillée.

La seconde méthode de dépôt est la voltampérométrie cyclique. La même solution de sel de diazonium à 1 mM est préparée dans l'acétonitrile avec le tétrafluoroborate de tétrabutylammonium à 0,1 M comme sel support. La plage de potentiel adoptée s'étend de -0,8 V jusqu'à 0,4 V. Un seul cycle est alors réalisé pour éviter la formation de multicouches. L'électrode est ensuite rincée à l'eau distillée.

La troisième méthode de fonctionnalisation par le diazonium utilise l'adsorption préalable du diazonium puis la voltampérométrie cyclique. L'électrode est d'abord immergée pendant une nuit dans une solution de diazonium à 1 mM dans l'acétonitrile. Le lendemain, la

Matériels et méthodes

voltampérométrie cyclique est réalisée dans l'acétonitrile avec uniquement le tétrafluoroborate de tétrabutylammonium à 0,1 M comme sel support. La plage de potentiel adoptée s'étend de -0,8 V jusqu'à 0,4 V. Le nombre de cycles a été optimisé au préalable il a donc été choisi de réaliser 4 cycles.

c) Couplage peptidique de la sonde et du ferrocenylméthylamine

Le couplage est réalisé en trois étapes successives, qui sont identiques pour la sonde ADN et ferrocenylméthylamine. La première consiste à immerger l'UME fonctionnalisée dans une solution volumique 1 :1 de N-Hydroxysuccinimide (NHS) à 100 mg/mL dans l'eau et d'hydrochlorure de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide (EDC) à 100 mg/mL dans l'éthanol. L'UME est immergée durant trente minutes dans cette solution pour former des esters activés sur les fonctions acide carboxylique. Puis l'UME est immédiatement immergée, sans rinçage préalable, pendant une heure dans une solution d'ADN sonde à 100 µg/mL dans NaCl 0,5 M ou dans une solution de ferrocenylméthylamine à 1,6 mM. Elle est ensuite rincée à l'eau distillée et immergée dans une solution d'éthanolamine à 1 M pendant trente minutes pour éliminer les éventuels esters activés non couplés

d) Caractérisation de la couche de diazonium

Le but de cette caractérisation est de déterminer quelle méthode de modification de surface du graphite par le 4-carboxybenzediazonium permet d'obtenir une couche la plus similaire possible à une monocouche en termes de recouvrement surfacique. Pour cela, le ferrocenylméthylamine est couplé de manière covalente par couplage peptidique au diazonium après modification de la surface. La réponse électrochimique du ferrocène est alors mesurée dans une solution de chlorure de sodium à 0,5 M. La configuration est alors celle d'une espèce électroactive adsorbée à la surface de l'électrode. En intégrant les pics de courant anodiques et cathodiques obtenus sur le voltampérogramme (Figure II-22), il est alors possible d'accéder au recouvrement surfacique moyen du diazonium sur l'électrode. Pour cela, une voltampérométrie cyclique dans un montage à trois électrodes est réalisée. L'électrode de référence est une électrode Ag/AgCl et la contre-électrode est en platine. La plage de potentiel est définie de -0,2 V à 0,8 V. Cette plage de potentiel est alors balayée jusqu'à stabilisation du courant de pic. La valeur de recouvrement surfacique du diazonium obtenue donne une idée approximative de la couche de diazonium déposée. Cependant, cette valeur peut être une sous-estimation dans le cas où toutes les molécules de diazonium greffées à la surface n'auraient pas réagi avec le ferrocenylméthylamine. A défaut de fournir une

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

valeur de recouvrement surfacique très précise, cette technique permet d'estimer quelle méthode de modification de la surface est la plus à même de produire des monocouches.

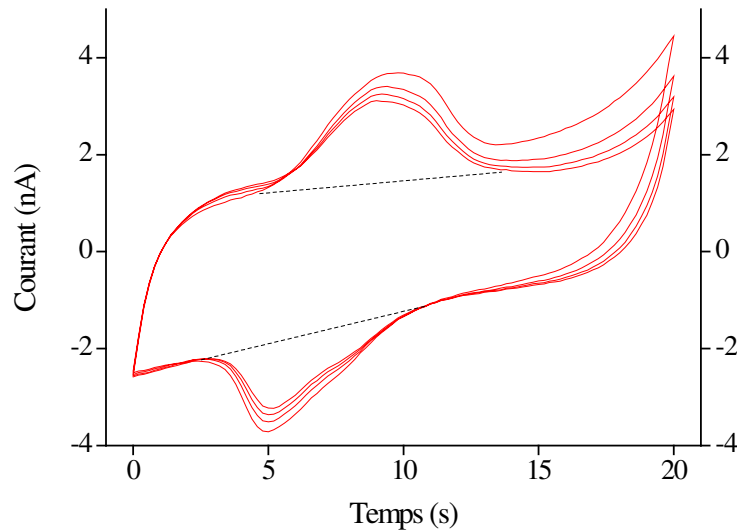


Figure II-22 : Exemple de voltampérogramme permettant de calculer la densité de la monocouche de diazonium à partir de l'intégration des pics de courant

2) L'immobilisation sur or

Pour l'immobilisation sur or, toutes les UME unitaires ont été polies sur disque de carbure de silicium pendant une minute sur du grain 800 puis pendant deux minutes sur du grain 1200. La préparation préalable des réseaux d'électrodes constitue un paramètre d'étude à part entière.

Pour immobiliser les sondes ADN à la surface des électrodes d'or, deux protocoles ont été testés. Le premier concerne les sondes modifiées par un thiol ou l'acide thioctique. Le second protocole a été appliqué pour immobiliser les sondes ADN modifiées par le 1-DTAP ou le 3-DTAP.

a) Les réactifs

Seul le protocole d'immobilisation utilisé pour les sondes modifiées par le DTAP nécessite l'utilisation de réactifs autres que la sonde modifiée. La sonde modifiée est alors immobilisée en présence d'un tampon d'immobilisation spécifique dont la composition a été donnée par le fournisseur. Ces réactifs nécessaires à l'obtention du tampon sont le chlorure de sodium (NaCl) (*Riedel-de Haën*), le phosphate de sodium tribasique dodécahydraté (Na_3PO_4 ;

Matériels et méthodes

12H₂O) (*Acros Organics*) et le sulfate de sodium (Na₂SO₄) (*Merck*). Le dernier réactif nécessaire est l'hydrochlorure de tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP HCl) (*Thermo Fisher*).

Le tampon d'immobilisation est donc composé de NaCl 0,2M, Na₃PO₄ ; 12H₂O à 0.23 M et de Na₂SO₄ à 0,5 M tamponné à pH 7,0 par l'acide chlorhydrique 37%. D'autre part, le TCEP HCl est ajouté au tampon à une concentration de 2,5 mg pour 10 nmol de sonde ADN modifiée.

b) Le protocole d'immobilisation des sondes modifiées par un thiol ou par l'acide thioctique

Dans ce protocole d'immobilisation, une solution de sonde ADN modifiée est préparée à une concentration de 100 µg/mL dans NaCl à 0,5 M. Par la suite, l'UME est immergée dans cette solution. Le temps d'immersion a été un paramètre d'étude de ce protocole. Plusieurs durées d'immersion ont donc été testées.

Dans le cas des réseaux d'électrodes, une goutte de la solution de 60 µL est déposée à la surface de l'électrode.

c) Le protocole d'immobilisation des sondes modifiées par le DTAP

Ce protocole a été conseillé par le fournisseur des sondes modifiées par le 1-DTAP et le 3-DTAP. Une solution d'ADN sonde modifiée à une concentration de 100 µg/mL est donc préparée dans le tampon d'immobilisation décrit précédemment en présence du TCEP HCl. Une goutte de la solution de 60 µL est ensuite déposée à la surface de l'électrode et est laissée pendant une nuit jusqu'à évaporation complète de la goutte. D'après le protocole déjà optimisé par le fournisseur, l'évaporation totale de la goutte est indispensable à une chimisorption satisfaisante.

3) Le protocole d'hybridation

Pour l'hybridation de la cible sur la sonde, une solution de cible à une concentration choisie est préparée dans NaCl à 0,5 M. Il est nécessaire d'utiliser un sel de fond contenant du sodium à une concentration minimale de 0,3 M pour permettre l'hybridation dans des conditions non stringentes[164]. Dans le cas des électrodes unitaires, l'électrode est immergée dans la solution décrite pendant 30 minutes puis rincée avec précaution avec la solution de NaCl 0,5 M. Dans le cas des réseaux d'électrodes, une goutte de la solution de cible de 40 µL est déposée à la surface pendant 30 minutes puis les électrodes sont rincées avec la solution de

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

NaCl 0,5 M. Le phénomène d'évaporation de la goutte est alors négligeable pour un temps d'hybridation de 30 minutes

4) Le protocole de régénération (dénaturation)

Pour régénérer le capteur après une hybridation, une solution de soude à 0,1 M est préparée. La solution de pH basique (10-12) permet de rompre les liaisons hydrogènes entre les deux brins et de régénérer la monocouche de sondes simples brins. Dans le cas des électrodes unitaires, l'électrode est immergée dans la solution pendant 10 minutes puis rincée à l'eau distillée. Dans le cas des réseaux d'électrodes, une goutte de la solution de NaOH 0,1 M de 100 μ L est déposée à la surface pendant 10 minutes puis les électrodes sont rincées à l'eau distillée.

F. Evaluation de la performance des capteurs

Pour évaluer la performance des capteurs, il est nécessaire de mesurer leur sensibilité en déterminant leur limite de détection, de montrer leur spécificité en établissant la possibilité de détecter une unique non-complémentarité de la séquence de la cible, et de montrer leur robustesse en montrant qu'ils peuvent être régénérés et permettent plusieurs mesures successives.

1) Détection de l'hybridation

Pour détecter l'hybridation de la cible complémentaire sur la sonde, il est nécessaire d'exploiter les deux mesures effectuées sur le biocapteur. La première mesure a été réalisée sur le capteur modifié par la sonde ADN (1). La seconde a été effectuée après la procédure d'hybridation (2). Ces deux mesures permettent de mesurer le courant à l'électrode avant et après hybridation entre -0,1 V et 0,1 V. Pour détecter l'hybridation il est nécessaire de calculer les différences de courant entre avant et après l'hybridation à -0,1 V (II.5) et à 0,1 V (II.6).

$$\Delta I_{cat} = -(I_{cat,2} - I_{cat,1}) \quad (II.5)$$

$$\Delta I_{an} = I_{an,2} - I_{an,1} \quad (II.6)$$

Une valeur positive de ces deux différences de courant indique, dans le mode de transduction choisi, la présence de l'hybridation avec la cible complémentaire. Une valeur négative indique une hybridation avec une cible qui n'est pas parfaitement complémentaire.

Matériels et méthodes

2) Mesure de la robustesse du capteur

Pour évaluer la robustesse du capteur, dans un premier temps, l'électrode modifiée par la sonde ADN est immergée dans le tampon d'hybridation 30 minutes en l'absence de cible à plusieurs reprises. Une mesure électrochimique dans l'électrolyte de mesure est réalisée entre chaque immersion. La stabilité du courant au fil des immersions dans le tampon d'hybridation est évaluée.

Dans un second temps, plusieurs cycles d'hybridation à la cible complémentaire et régénération sont menés successivement sur l'électrode modifiée. Une mesure est effectuée après chaque hybridation et chaque régénération. Les augmentations et diminutions successives du courant sur le capteur permettent d'évaluer la robustesse.

3) Mesure de la spécificité du capteur

La spécificité du capteur définit sa capacité à discriminer une cible parfaitement complémentaire d'une autre. Pour s'assurer de la parfaite spécificité du capteur, plusieurs cycles d'hybridation avec une cible présentant un *mismatch* et de régénération sont effectués successivement. De la même manière que pour la robustesse, les diminutions du courant après hybridation et les augmentations du courant après régénération sur le capteur permettent d'évaluer la spécificité.

4) Mesure de la sensibilité du capteur

La sensibilité du capteur définit la concentration minimale à laquelle il permet de détecter d'une part et de quantifier d'autre part l'hybridation à une cible complémentaire. Dans un premier temps, un blanc est réalisé. Ce blanc consiste à immobiliser les sondes ADN, à réaliser une mesure dans l'électrolyte, à le placer dans les conditions classiques d'hybridation (tampon d'hybridation 30 minutes), puis à réaliser une nouvelle mesure. La différence de courant ΔI mesurée et moyennée sur trois blancs différents constitue la déviation standard de la mesure σ . Ensuite, plusieurs cycles d'hybridation à une cible complémentaire à des concentrations décroissantes et de régénération sont effectués. Une courbe de calibration de la différence de courant ΔI en fonction de la concentration en cible est alors tracée. La limite de détection (Limit Of Detection LOD) définie comme la concentration correspondant à un signal égal à trois fois la déviation standard σ sur la courbe de calibration peut alors être calculée (Figure II-23). La limite de quantification (Limit Of Quantification LOQ) est définie comme la plus petite concentration appartenant au domaine de linéarité du capteur en étant supérieure ou égale à la LOD.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

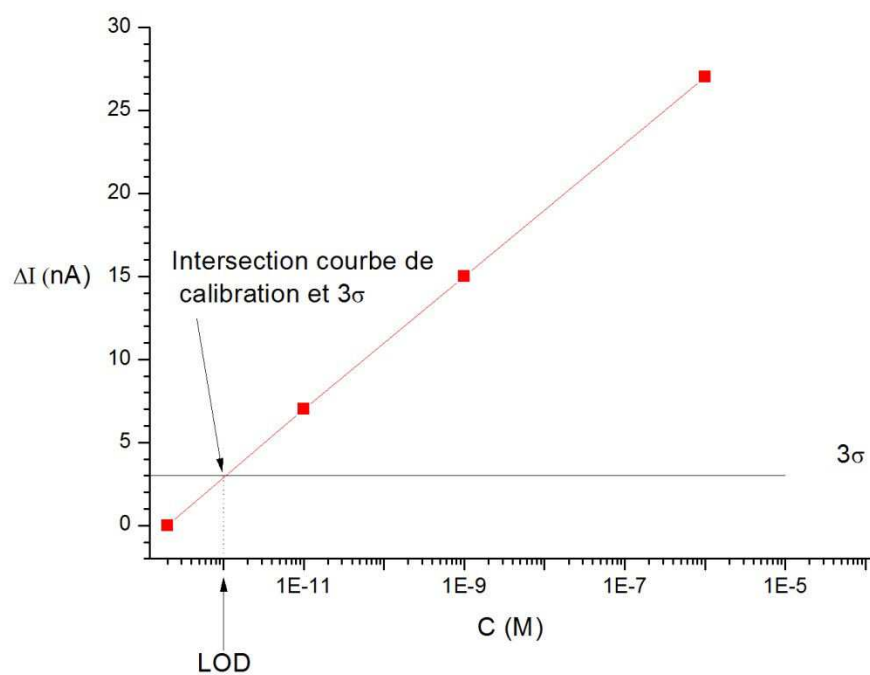


Figure II-23 : Schéma d'une courbe de calibration avec détermination graphique de la LOD

Chapitre III :

Biocapteurs sur

UMEs unitaires

III. Biocapteurs sur UMEs unitaires

Ce chapitre s'attache à exposer les résultats obtenus sur les ultramicro-électrodes de carbone graphite ou d'or qu'il s'agisse de la caractérisation, de l'immobilisation, des performances ou des diverses optimisations.

A. Configuration UME de carbone graphite

Le biocapteur est constitué d'une monocouche de sondes immobilisées à la surface de l'électrode afin d'hybrider les micro-ARNs cibles de l'échantillon dans le but de les quantifier. Les principaux verrous pour parvenir à l'obtention du capteur souhaité résident dans l'élaboration d'une monocouche assez dense pour bloquer le transfert électronique en présence de la sonde seule sans toutefois former des multicouches qui ne permettent ni un accès satisfaisant des cibles vers les sondes ni une détection assez sensible. D'autre part, la robustesse de la monocouche doit être parfaite pour éviter tout résultat faux-positif. Enfin, la reproductibilité des mesures doit être importante pour permettre de transférer cette technologie vers le diagnostic médical.

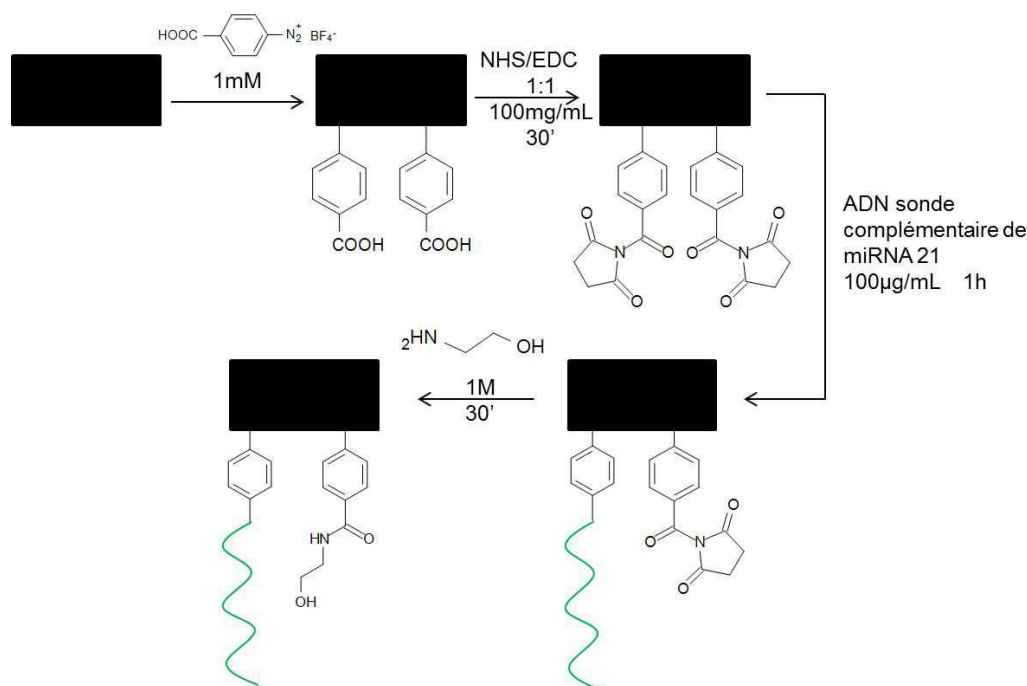


Figure III-1 : Schéma réactionnel de la modification des électrodes pour l'immobilisation des sondes ADN et la fabrication de biocapteurs sur électrodes de graphite

Dans cette première étude, le matériau d'électrode choisi est le carbone graphite sous forme de fibres de carbone. Seront exposés ici les résultats obtenus lors des différentes étapes de la conception, de la caractérisation des électrodes jusqu'aux performances du biocapteur,

Biocapteurs sur UMEs unitaires

en passant par l'optimisation et la caractérisation du greffage des sondes ADN. Pour cette partie, l'électrolyte utilisé contient 5 mM de ferri/ferrocyanure, 25 mM de céfadroxil, 10^{-6} M de proflavine et 0,5 M de NaCl. Ces conditions ont été au préalable optimisées sur électrode d'or. Le schéma général de la fabrication de la couche sensible du biocapteur est représenté sur la Figure III-1.

1) La caractérisation des électrodes

La première étape après fabrication de toute électrode consiste à sa caractérisation dans l'électrolyte de mesure.

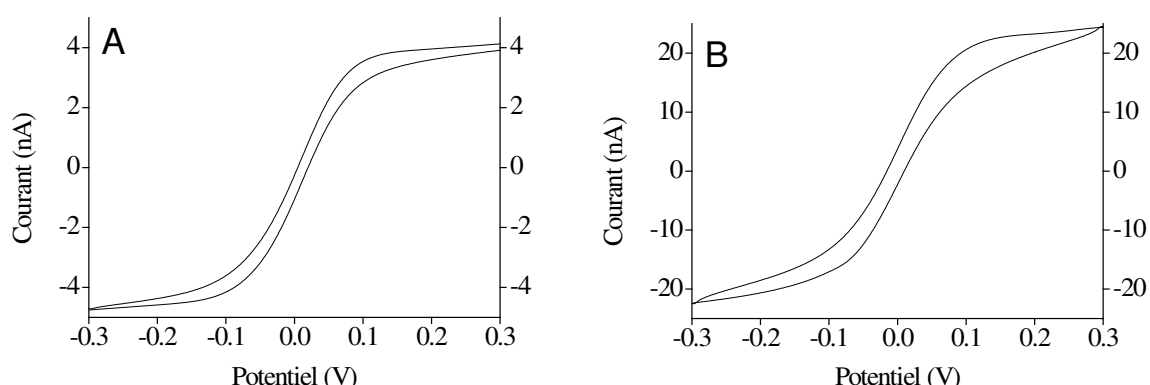


Figure III-2 : Voltampérogramme de deux électrodes de carbone graphite de diamètre 7 µm (A) et 33 µm (B) non modifiées dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM à une vitesse de balayage de 100 mV/s

La caractérisation de l'électrode de 7 µm (Figure III-2A) et le courant mesuré pour le palier de diffusion permet de déterminer son rayon par la relation (I.9) en utilisant une valeur du coefficient de diffusion égale à $1,5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Dans le cas présent, le courant obtenu de 4 nA correspond à un diamètre d'électrode de 6,4 µm pour un diamètre théorique de 7,0 µm. L'électrode est donc bien fonctionnelle avec une légère différence de diamètre due aux imprécisions de fabrication.

Les électrodes commerciales utilisées de 33 µm sont caractérisées de la même manière. Le voltampérogramme obtenu à ces UMEs est représenté sur la Figure III-2B.

De la même manière que pour les électrodes de 7 µm, le courant de palier mesuré correspond à un diamètre d'électrode de 35,6 µm très proche des 33,0 µm théoriques attendus. En prenant en compte les imprécisions de fabrication, l'électrode est bien conforme aux dimensions souhaitées. Cela montre dans les deux cas présentés que l'électrode est fonctionnelle, que toute la surface est active et que la surface active est conforme aux attentes théoriques.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

D'autre part, des caractérisations sont également réalisées entre différents biocapteurs fabriqués sur la même électrode après polissage. Comme le montre la Figure III-3, la surface active reste semblable malgré la réutilisation de l'électrode au cours du temps. Cette procédure permet un suivi de la dégradation dans le temps de l'électrode.

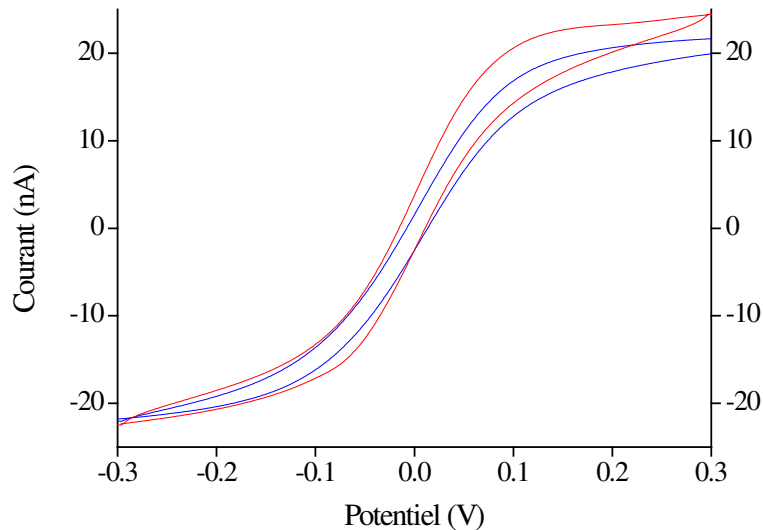


Figure III-3 : Voltampéromètre de caractérisation d'une électrode de carbone graphite non modifiée de diamètre 33 μm dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM à une vitesse de balayage de 100 mV/s immédiatement après fabrication (bleu) et après la fabrication de 4 biocapteurs à la surface de l'électrode puis polissage (rouge)

2) Le greffage du diazonium

La réduction électrochimique du 4-carboxybenzenediazonium permet la fonctionnalisation en monocouche des surfaces d'électrodes. Elle permet dans ce cas précis de notre étude de former une couche d'accroche pour la sonde ADN sur électrode de carbone graphite. Comme exposé précédemment, trois protocoles de greffage ont été essayés et comparés.

a) Greffage par chronoampérométrie

Pour évaluer les performances de cette technique, deux expériences ont été effectuées avec la même solution et avec la même électrode commerciale de 33 μm de diamètre. Sur la Figure III-4, des différences notables sont observées sur la chronoampérométrie entre les deux manipulations. Sur la première expérience, il y a présence d'une forte décroissance du courant qui n'est pas observable sur la seconde. De plus, le courant se stabilise autour de -0,1 nA pour la première expérience alors qu'il se stabilise autour de -0,5 nA pour la seconde. Il semble

Biocapteurs sur UMEs unitaires

donc difficile de reproduire, malgré des conditions identiques, le greffage du diazonium à la surface de l'électrode. En effet, pour pouvoir reproduire le greffage du diazonium, il est nécessaire de disposer d'un état de surface rigoureusement identique à chaque expérience. Cette condition ne peut être remplie dans le cas des UMEs utilisées avec polissage manuel. Le greffage ne peut donc pas être reproduit de manière satisfaisante.

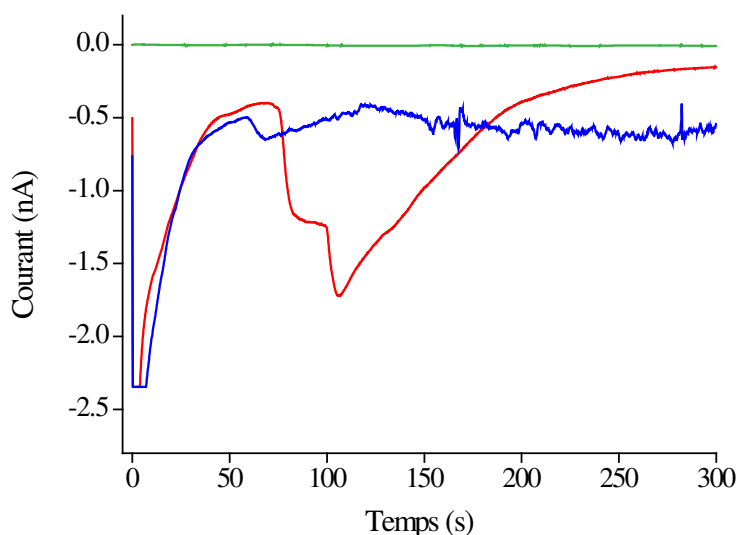


Figure III-4 : Essai de greffage du diazonium à 1 mM dans l'acétonitrile par chronoampérométrie à -0,6V pendant 5 min sur UME de carbone de diamètre 33 μm ; Essai n°1 (rouge), Essai n°2 (bleu), Blanc acétonitrile + sel support (vert)

La voltampérométrie cyclique effectuée ensuite pour évaluer l'efficacité du greffage (Figure III-5) confirme cette difficulté de reproduire le greffage. En effet, la première électrode greffée (essai 1) semble bloquer moins efficacement le courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure que la seconde. Cependant, les dépôts bloquent assez bien le transfert électronique étant donné que le palier de courant en oxydation passe de 25 nA sur électrode non greffée à 3,5 nA pour une électrode greffée, soit une réduction du courant de plus de 86 %. En réduction à -0,3 V, le courant passe de -25 nA à -7,5 nA après le greffage du diazonium soit une diminution de l'intensité de 70 %. Pour le second greffage, le courant ne dépasse pas 1,5 nA en oxydation à 0,3 V et -1,5 nA en réduction à -0,3 V pour un courant initial sur électrode non modifiée d'environ (-)25 nA à (-)0,3 V, soit une diminution du courant de plus de 90%.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

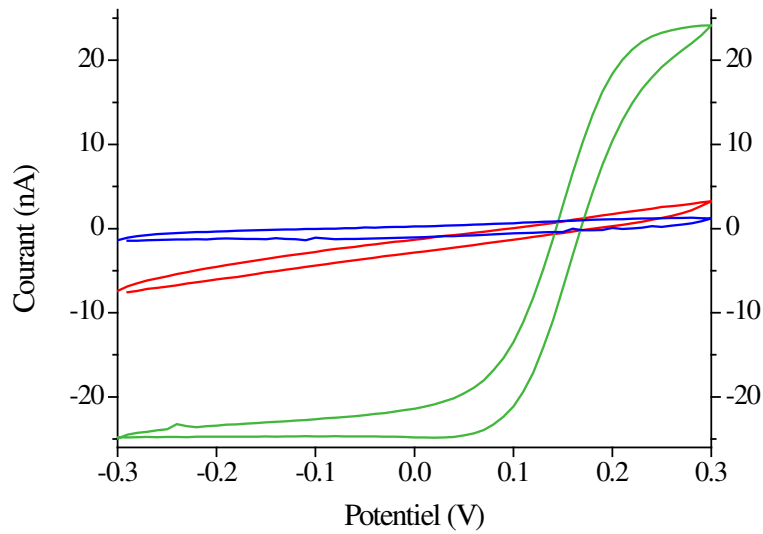


Figure III-5 : Vérification du dépôt du diazonium effectué en chronoampérométrie 5 min par évaluation du blocage du courant d'oxydo-réduction à la surface de l'électrode de carbone graphite de 33 μm par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM à 50mV/s ; Essai n°1 (rouge), Essai n°2 (bleu), UME non greffée (Vert)

Le même type de manipulations a été mené pour observer l'efficacité du greffage par chronoampérométrie sur une durée d'une minute (Figure III-6). Là aussi, des différences notables au niveau de la valeur du courant de réduction du diazonium entre 5 et 35 secondes ont été observées entre les deux courbes de greffage. Sur la première courbe, le courant augmente progressivement avec le temps alors que sur la seconde, le courant augmente assez brutalement dans les premières secondes passant de -2,3 à -1 nA en 5 secondes environ. Cependant, comme précédemment, le courant se stabilise autour de -0,1 nA pour la première manipulation et autour de -0,5 nA pour la seconde. Encore une fois, l'état de surface des UMEs utilisées pour ces deux manipulations ne permet pas de reproduire un greffage similaire du diazonium par chronoampérométrie.

Biocapteurs sur UMEs unitaires

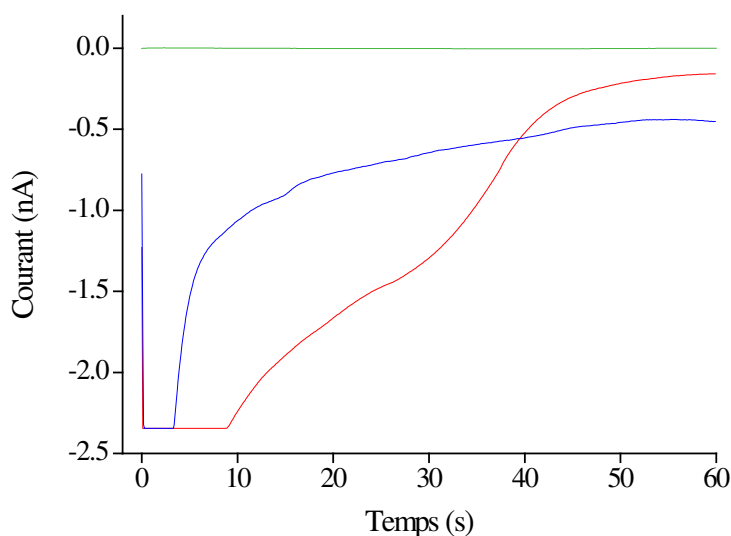


Figure III-6 : Essai de greffage du diazonium à 1 mM dans l'acétonitrile par chronoampérométrie à -0,6V pendant une minute sur UME de carbone de diamètre 33 µm ; Essai n°1 (rouge), Essai n°2 (bleu), Blanc acétonitrile + sel support (vert)

L'efficacité du greffage peut être évaluée par la voltampérométrie cyclique dont les résultats sont reportés dans le Tableau III-1. Le courant diminue mais de manière moins importante que lors d'un greffage mené pendant cinq minutes. En effet, pour les deux expériences, le courant en réduction atteint cette fois environ -10 nA à -0,3 V, soit une diminution de 60%. En oxydation, le courant dépasse légèrement les 5 nA à 0,3 V, ce qui correspond à une diminution d'environ 90%.

Tableau III-1 : Tableau récapitulatif de l'évaluation de l'efficacité des greffages du 4-carboxybenzenediazonium par chronoampérométrie sur électrode commerciale de carbone de 33 µm de diamètre

	Intensité à -0,3 V (nA)		Intensité à 0,3 V (nA)	
	Essai n°1	Essai n°2	Essai n°1	Essai n°2
Electrode non modifiée	-25	-25	25	25
Greffage 5 minutes	-7,5	-1,5	3,5	1,5
Greffage 1 minute	-10	-10	5	5

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

Les résultats obtenus par greffage par chronoampérométrie sont résumés dans le Tableau III-1. Dans un premier temps, il est à noter que le courant faradique mesuré est globalement plus faible en oxydation qu'en réduction. Cette différence entre oxydation et réduction peut s'expliquer par la structure du ferrocyanure qui porte quatre charges négatives. De ce fait, la répulsion électrostatique avec les charges négatives des carboxylates de la monocouche est importante et peu de molécules de ferrocyanure peuvent diffuser jusqu'à l'électrode pour être oxydées. Le ferricyanure ne porte que trois charges négatives et la répulsion électrostatique est moins importante qu'avec le ferrocyanure. Les molécules de ferricyanure peuvent alors diffuser plus facilement vers l'électrode pour être réduites. Le greffage est donc de meilleure qualité lorsque le potentiel est appliqué plus longtemps. Le courant est alors bloqué de manière plus efficace. Ceci peut s'expliquer par la formation d'une couche plus homogène sur la surface de l'électrode au cours du temps mais également par la formation d'une couche plus épaisse. C'est pour cette raison qu'un couplage peptidique avec le ferrocenilméthylamine est effectué afin d'estimer la densité de la couche formée (voir plus loin). Cependant, cette méthode de greffage, malgré l'apparente facilité de reproductibilité au niveau du blocage du courant, ne permet pas de reproduire des conditions identiques comme le montre la Figure III-4 et la Figure III-6. En effet, il est difficile d'attribuer des causes précises à ces différences de comportements entre expériences réalisées dans des conditions similaires tant les courants sont faibles. En effet, une impureté présente dans la solution utilisée dans un cas peut être responsable de la variation de courant observée. Cependant, il ne semble pas opportun de s'appuyer sur cette méthode présentant autant de différences inter-expériences pour fabriquer des capteurs qui nécessitent une reproductibilité maximale pour une fiabilité accrue.

b) Greffage par voltampérométrie cyclique

Cette méthode de greffage consiste à réaliser un nombre de cycles de balayage de la plage de potentiel choisie dans la solution de sel de diazonium à 1 mM dans l'acétonitrile défini. Ces essais ont été réalisés sur une UME en fibre de carbone de diamètre 7 μm fabriquée au laboratoire. Pour évaluer l'efficacité du greffage, la plage de potentiel choisie pour le greffage s'étend de -1,5 V à 0,5 V. Dans un premier temps, un seul cycle est réalisé et la manipulation est effectuée deux fois sur la même électrode.

Biocapteurs sur UMEs unitaires

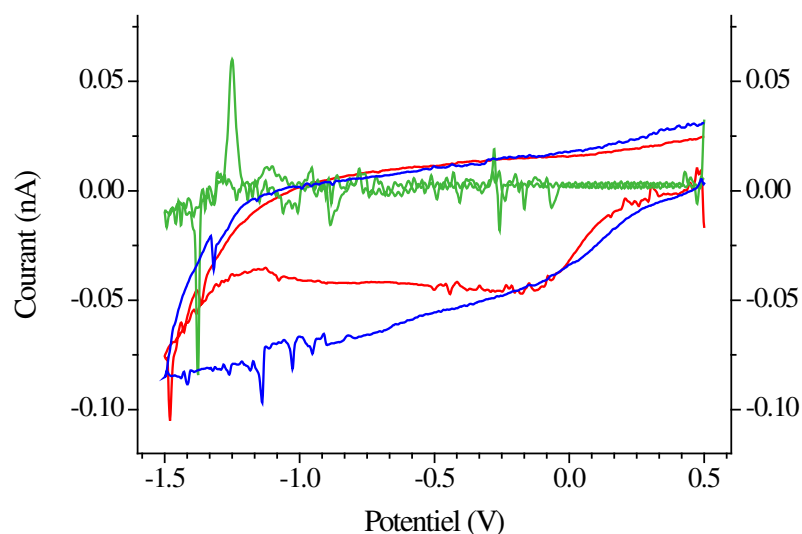


Figure III-7 : Greffage du diazonium à 1 mM dans l'acétonitrile sur électrode de carbone graphite de diamètre 7 µm par voltampérométrie cyclique 1 cycle à 100mV/s ; Essai n°1 (rouge), Essai n°2 (bleu), Blanc acétonitrile + sel support (vert)

Sur la Figure III-7, la réduction électrochimique du sel de diazonium est visible grâce aux vagues observées autour de -0,2 et -0,8 V avec un courant de 500 pA environ. La vague apparaît sur les deux essais au même potentiel (-0,2 V) et possède une intensité semblable. La reproductibilité du greffage est donc satisfaisante. De plus, la Figure III-8 montre que le courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure est bloqué de manière relativement efficace autant en réduction qu'en oxydation. Le courant mesuré est d'environ -5 nA à -0,3 V pour les deux UMEs fonctionnalisées contre -22 nA sur l'électrode non greffée, ce qui correspond à une diminution du courant de plus de 75% ; de même, le courant mesuré est de 2 à 3 nA à 0,3 V pour les deux électrodes greffées contre 15 nA pour l'UME non greffée, soit une diminution de 80%.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

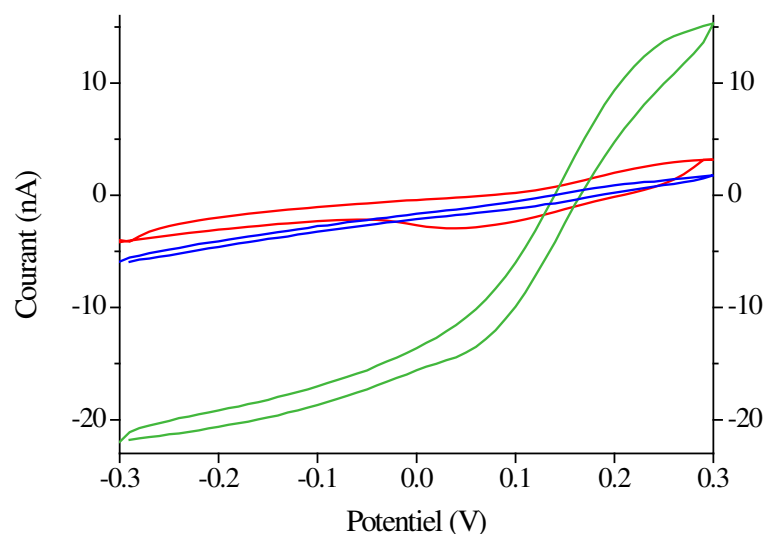


Figure III-8 : Vérification du dépôt du diazonium effectué en voltampérométrie cyclique 1 cycle par évaluation du blocage du courant d'oxydo-réduction à la surface de l'électrode de carbone graphite de 7 μm par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM à 50mV/s ; Essai n°1 (rouge), Essai n°2 (bleu), UME non greffée (vert)

Le greffage du diazonium par voltampérométrie cyclique sur un seul cycle est donc efficace, et il n'est pas nécessaire de réaliser plus de cycles lors de la fonctionnalisation de l'électrode. Cette méthode permet de reproduire de manière efficace la couche de diazonium à la surface des UMEs pour former une couche d'accroche stable pour les sondes ADN. De plus, cette méthode de greffage apparaît plus reproductible que la chronoampérométrie. La plage de potentiel du greffage peut également être réduite puisque la vague se situe aux alentours de -0.2 V. La plage de potentiel est ensuite limitée de -0,8 V jusqu'à 0,4 V

c) *Greffage par adsorption puis voltampérométrie cyclique.*

Ce type de greffage regroupe les deux méthodes précédentes et a été mis au point lors de cette thèse. Après l'adsorption du diazonium pendant 15 heures, le greffage est réalisé par voltampérométrie cyclique sur une électrode millimétrique de carbone vitreux. Des durées d'adsorption préalable plus courtes (deux heures et 6 heures) ont été testées mais n'ont pas permis de greffage satisfaisant du diazonium. Cette étude a été menée sur des électrodes millimétriques de carbone graphite.

Biocapteurs sur UMEs unitaires

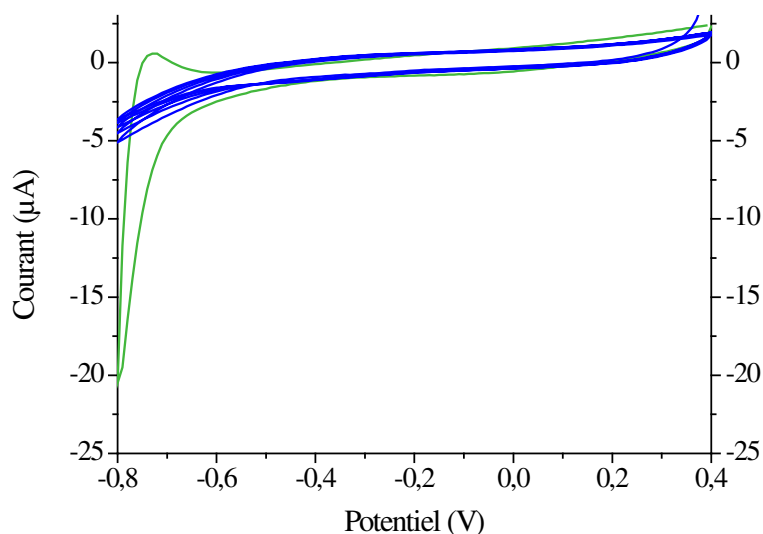


Figure III-9 : Greffage du diazonium sur électrode millimétrique de carbone vitreux à 1 mM dans l'acétonitrile par adsorption préalable pendant 15 heures puis voltampérométrie cyclique 4 cycles à 100mV/s dans une solution d'acétonitrile et sel support ; greffage (bleu), Blanc acétonitrile + sel support (vert)

Sur la courbe de greffage de la Figure III-9, aucune vague de réduction n'est visible, compte tenu de la faible quantité de molécules adsorbées à la surface de l'électrode. Cependant, le mur de réduction du solvant, observé vers -0.8 V sur le blanc, n'est plus visible sur l'électrode après l'adsorption du diazonium pendant 15 heures. Ce phénomène peut être attribué à la présence d'un film mince à la surface de l'électrode. Afin de vérifier la présence du film de diazonium greffé, une voltampérométrie est effectuée dans la solution d'électrolyte. La Figure III-10 illustre le fait que le courant est efficacement bloqué à la surface de l'électrode millimétrique et qu'il y a donc présence d'un film mince de diazonium greffé. En effet, au niveau du pic d'oxydation pour l'électrode non greffée, le courant mesuré après ce greffage est de 165 μA à environ 0,21 V par rapport à 13 μA pour l'électrode fonctionnalisée par adsorption, soit une diminution de plus de 90% de l'intensité. Au niveau du pic de réduction, le courant mesuré pour l'électrode non greffée est de -150 μA à 0,13 V contre -10 μA sur l'électrode fonctionnalisée, soit plus de 90% de diminution du courant.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

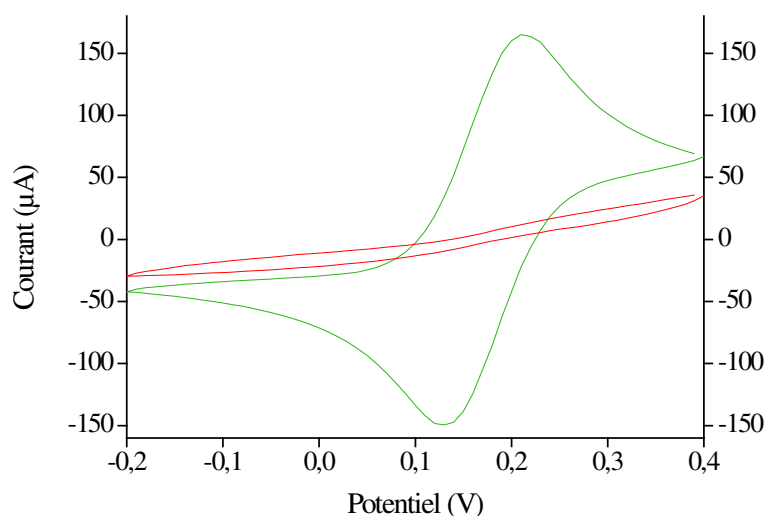


Figure III-10 : Vérification du dépôt du diazonium effectué par adsorption préalable pendant 15 heures puis voltampérométrie cyclique 4 cycles par évaluation du blocage du courant d'oxydo-réduction à la surface de l'électrode millimétrique de carbone vitreux par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM à 50 mV/s; Essai n°1 (rouge), électrode non greffée (vert)

Cette méthode présente un taux de blocage du courant très intéressant. Pour pouvoir comparer la méthode avec la voltampérométrie cyclique, un greffage par voltampérométrie cyclique (1 cycle) a été réalisé sur électrode millimétrique. Les deux méthodes sont opposées sur la Figure III-11. Sur l'électrode fonctionnalisée par voltampérométrie cyclique, le courant mesuré en oxydation à 0,21 V est de 28 μA , soit une diminution de plus de 80% et celui mesuré en réduction à 0,13 V est de -22 μA , soit une diminution de 85 %.

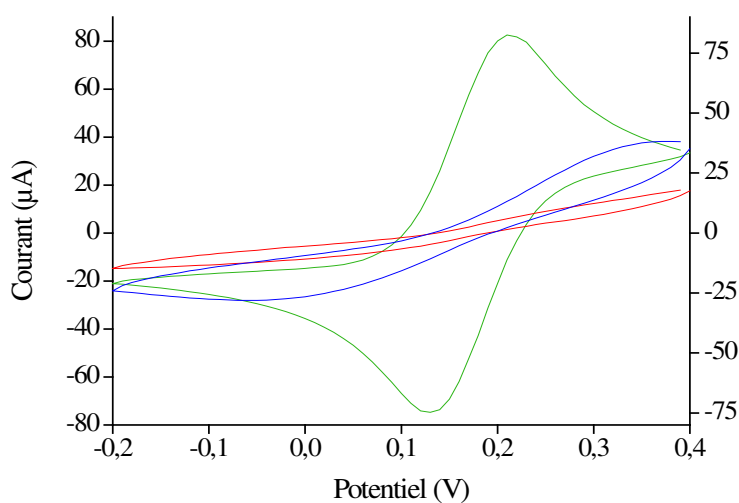


Figure III-11 : Comparaison du blocage du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure après greffage du diazonium sur électrode millimétrique de carbone vitreux par différentes méthodes ; greffage par adsorption préalable 15 heures puis voltampérométrie cyclique 4 cycles (rouge), greffage par voltampérométrie cyclique 1 cycle (bleu), électrode non greffée (vert)

Biocapteurs sur UMEs unitaires

Les résultats du blocage du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure sur les monocouches formées par les trois différentes méthodes sont regroupés dans le Tableau III-2.

Tableau III-2 : Récapitulatif des taux de blocage du courant pour chaque type de greffage du 4-carboxybenzenediazonium sur électrode de carbone

	Taux de blocage du courant à -0,3 V	Taux de blocage du courant à 0,3 V
Greffage par chronoampérométrie 5 min	80 %	85 %
Greffage par voltampérométrie cyclique	85 %	80%
Greffage par adsorption préalable puis voltampérométrie cyclique	94 %	91 %

Cette nouvelle méthode de greffage par adsorption préalable puis voltampérométrie cyclique s'est donc révélée efficace. Elle est cependant un peu plus longue pour former la monocouche d'accroche mais semble plus à même d'éviter la formation de multicouches. Il serait intéressant d'étudier si elle est transposable aux UME.

En résumé, la méthode de chronoampérométrie permet un blocage satisfaisant mais au détriment de la reproductibilité de la monocouche et n'est pas adaptée à l'application souhaitée. Parmi les deux méthodes de greffage par voltampérométrie cyclique et adsorption préalable suivie de la voltampérométrie cyclique, la plus efficace est l'adsorption préalable suivie de la voltampérométrie cyclique comme le montrent la Figure III-11 et le Tableau III-2, sous réserve qu'elle puisse être transposée aux UME. En effet, cette méthode permet d'obtenir un blocage du courant très satisfaisant et, au vu du protocole utilisé, est préférable pour obtenir un greffage homogène sur la surface. En effet, l'adsorption permet de former un film mince sur toute l'électrode avant de le greffer. Le greffage par voltampérométrie cyclique pourra toutefois être utilisé dans le cas où on ne pourrait transposer la méthode par adsorption puis voltampérométrie cyclique aux ultramicro-électrodes.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

3) Le couplage peptidique de la sonde ADN sur l'électrode greffée

Le couplage peptidique va permettre de lier de façon covalente la sonde ADN modèle aux groupements carboxyphényl greffés pour immobiliser la sonde ADN à la surface de l'UME. Ce couplage est également mis en œuvre afin d'évaluer le taux de recouvrement de la surface de l'électrode par les groupements carboxyphényl en couplant une sonde électroactive ferrocenylméthylamine (Fc-NH₂) (annexe A4).

a) Le couplage avec le ferrocène amine

Ce couplage est effectué sur des électrodes millimétriques de carbone vitreux modifiées par chacune des trois méthodes précitées. Les électrodes millimétriques sont utilisées ici pour obtenir un signal détectable de l'ordre du nanoampère. Le couplage est d'abord effectué sur une électrode modifiée par chronoampérométrie pendant 1 minute.

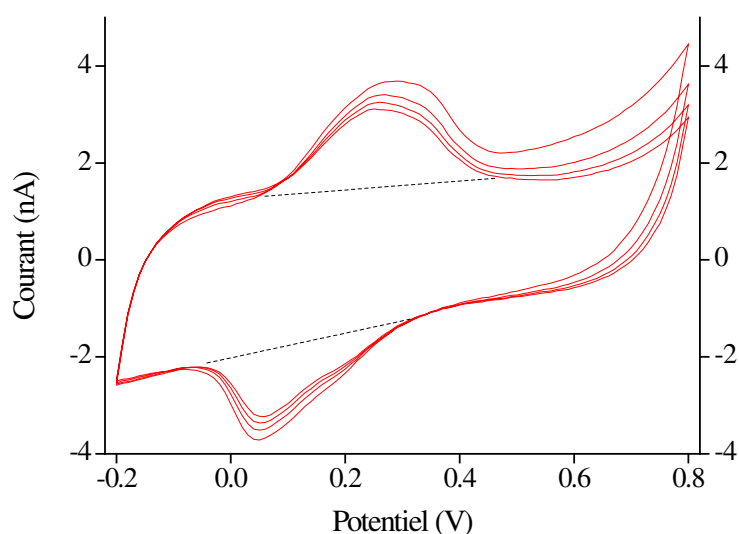


Figure III-12 : Mesure de l'électroactivité de la sonde ferrocenylméthylamine greffée par couplage peptidique sur une électrode commerciale de 33 μm en carbone graphite au préalable fonctionnalisée par le 4-carboxybenzenediazonium par chronoampérométrie à -0,6V pendant 1 minute par voltampérométrie cyclique dans NaCl 0,5M à 50 mV/s pour évaluer la densité de la couche de diazonium formée

Sur la Figure III-12, un couple de pics est observé vers 0,15 V ($E_{\text{pa}} = 0,25 \text{ V}$; $E_{\text{pc}} = 0,05 \text{ V}$) attribuable au couple Fc^+/Fc greffé. Le signal du ferrocène semble diminuer au fil des cycles. Il peut s'agir d'une stabilisation du signal due à la désorption des molécules de Fc-NH₂ simplement adsorbées physiquement à la surface. L'échelle de potentiel est convertie

Biocapteurs sur UMEs unitaires

en échelle de temps, grâce à la vitesse de balayage, pour accéder à la charge. Les lignes de base sont ensuite tracées sur le dernier cycle obtenu et on intègre alors le signal. Grâce à la loi de Faraday, la charge est reliée de manière proportionnelle au recouvrement surfacique par l'équation :

$$Fc^+ + e^- = Fc$$

$$Q = zFS\Gamma$$

Q la charge en C

z le nombre d'électrons échangés ($z = 1$)

F la constante de Faraday en $C.mol^{-1}$

S la surface de l'électrode en cm^2 ($S = 7,1 \times 10^{-2} cm^2$ ou $3,4 \times 10^{-5} cm^2$)

Γ le recouvrement surfacique en $mol.cm^{-2}$

Le recouvrement ainsi obtenu est égal à $3,9 \times 10^{-9} mol.cm^{-2}$. D'après la littérature, le recouvrement surfacique correspondant à une monocouche de ferrocène est environ égal à $4,5 \times 10^{-10} mol.cm^{-2}$ [165]. La valeur obtenue correspond donc à 9 monocouches. La couche de diazonium formée par chronoampérométrie est donc une multicouche en accord avec la littérature. Cet aspect de multicouches peut être dû à une charge trop importante délivrée à l'électrode ou encore au phénomène de croissance de la couche. En effet, il a été montré par *Allongue et al.*[166] qu'il existe une charge Q^* , appliquée à la réduction du sel de diazonium, au-delà de laquelle la formation de monocouches est observée. Il est donc probable que cette charge ait été dépassée dans les tests réalisés. D'autre part, *Pinson et al.*[167] ont montré que le phénomène de croissance de la couche pouvait entraîner la formation de multicouches en chronoampérométrie. Lors de la formation du radical à partir du diazonium, ce radical peut soit se greffer sur le substrat, soit réagir avec un groupement déjà greffé menant ainsi à la formation de multicouches. Etant donné les résultats obtenus pour une chronoampérométrie de 1 minute, il est inutile de réaliser la mesure sur une électrode modifiée pendant 5 minutes.

Dans un deuxième temps, la couche formée par voltampérométrie cyclique est étudiée avec les mêmes conditions expérimentales. Le résultat obtenu (Figure III-13) permet de

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

déterminer une valeur du recouvrement $\Gamma = 9,5 \times 10^{-10} \text{ mol. cm}^{-2}$, qui se rapproche le plus d'une monocouche. La méthode de voltampérométrie cyclique permet de former des couches plus fines mais également plus homogènes permettant d'expliquer les meilleurs blocages du courant évoqués au paragraphe précédent. La voltampérométrie cyclique permet d'atteindre des charges suffisantes pour greffer le diazonium tout en appliquant le potentiel pendant un temps beaucoup plus court. Cette méthode entraîne la croissance d'une couche plus fine. De même que pour la chronoampérométrie, il est inutile de réaliser les manipulations avec un greffage effectué en plusieurs cycles de voltampérométrie cyclique, la couche étant déjà trop épaisse par rapport à la monocouche recherchée.

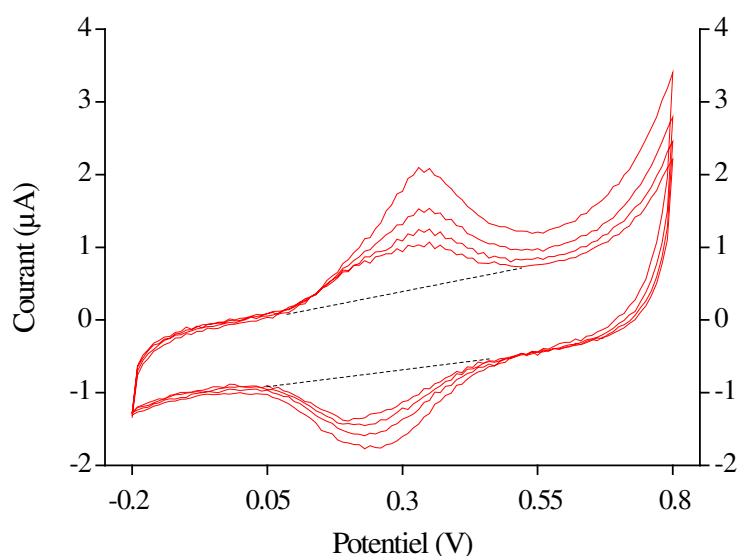


Figure III-13 : Mesure de l'électroactivité de la sonde ferrocenilméthylamine greffée par couplage peptidique sur une électrode millimétrique de carbone vitreux fonctionnalisée par le 4-carboxybenzenediazonium par voltampérométrie cyclique 1 cycle 100 mV/s par voltampérométrie cyclique dans NaCl 0,5M à 50 mV/s pour évaluer la densité de la couche de diazonium formée

Enfin, la couche de diazonium déposée par adsorption puis par voltampérométrie cyclique est étudiée. La Figure III-14 donnée ci-après permet de déterminer une valeur de recouvrement surfacique égale à $6,3 \times 10^{-10} \text{ mol. cm}^{-2}$, ce qui semble relativement proche de la valeur donnée pour une monocouche. Comme supposé dans le paragraphe précédent, le fait de limiter le greffage aux molécules préalablement adsorbées permet d'obtenir une couche plus fine que par voltampérométrie cyclique ou chronoampérométrie et également plus homogène puisque cette technique de greffage permet d'obtenir les meilleurs résultats de blocage de courant (Figure III-11). Ces résultats attestent que l'adsorption préalable suivie de la voltampérométrie cyclique est la meilleure technique pour obtenir de façon reproductible des monocouches d'accroches homogènes.

Biocapteurs sur UMEs unitaires

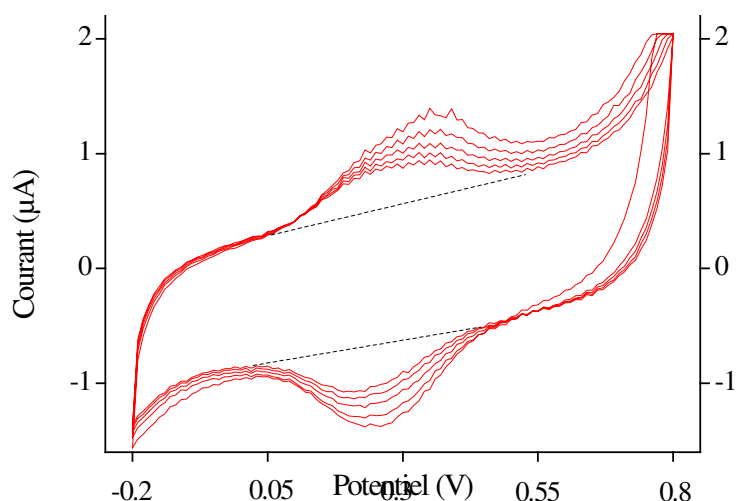


Figure III-14 : Mesure de l'électroactivité de la sonde ferrocenylméthylamine greffée par couplage peptidique sur une électrode millimétrique de carbone vitreux fonctionnalisée par le 4-carboxybenzenediazonium par adsorption préalable 15 heures puis voltampérométrie cyclique 4 cycles à 100 mV/s par voltampérométrie cyclique dans NaCl 0,5M à 50 mV/s pour évaluer la densité de la couche de diazonium formée

Les résultats obtenus par ce couplage avec une molécule de ferrocène sont toutefois à pondérer puisque les valeurs de recouvrement surfacique calculées peuvent être sous-estimées. En effet, il n'est pas sûr que les groupements carboxyphenyl greffés à l'électrode soient tous couplés à un ferrocène.

L'ensemble des résultats obtenus sur l'étude du greffage de la couche d'accroche de diazonium semble orienter le choix de la méthode de greffage vers l'adsorption préalable suivie de la voltampérométrie cyclique même si elle doit être éprouvée sur UMEs. Il aurait été intéressant de mener des études complémentaires pour l'optimisation de cette méthode de greffage ; notamment sur le temps d'adsorption préalable, la concentration de la solution de diazonium, la plage de potentiel de la voltampérométrie, la vitesse de balayage ou encore l'utilisation d'un sel de diazonium encombré stériquement. Cependant, les premiers essais de biocapteurs et de suivi de la dégradation des électrodes n'étant pas assez satisfaisants en raison de caractéristiques intrinsèques du matériau (voir plus loin), l'optimisation n'a pas été réalisée. D'autre part, l'évaluation des monocouches par couplage peptidique avec le ferrocenylméthylamine donne une information importante pour la suite. En effet, les couplages peptidiques effectués semblent fonctionner dans les conditions utilisées sans optimisation supplémentaire à réaliser.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

b) Le couplage avec la sonde ADN modèle

Le couplage peptidique effectif de l'ADN sur le diazonium peut être vérifié en mesurant l'électroactivité de l'électrolyte sur les électrodes fonctionnalisées par voltampérométrie cyclique. En effet, la présence de brins d'ADN greffés doit empêcher la diffusion du médiateur rédox et bloquer le courant. Cette étude a été menée sur une électrode en fibre de carbone fabriquée au laboratoire de diamètre 7 μm et sur une électrode commerciale en fibre de carbone de diamètre 33 μm .

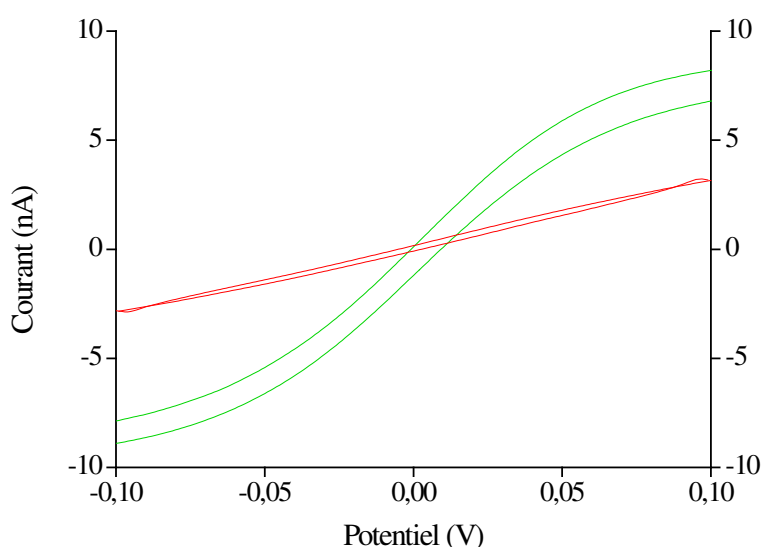


Figure III-15 : Électroactivité de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM en présence de céfadroxil en excès (25 mM) sur électrode de graphite diamètre 7 μm en présence de proflavine (Pfl) à 10^{-6} M dans NaCl 0,5 M ; fonctionnalisée par la sonde ADN (rouge) et sur électrode non greffée (vert)

Les Figure III-15 et Figure III-16 illustrent bien le blocage du courant à la surface de l'UME fonctionnalisée avec la sonde ADN monobrin même en présence d'intercalant rédox, ici la proflavine (Pfl) à 10^{-6} M. Pour l'électrode de 7 μm sur la Figure III-15, le courant mesuré à (-)0,1 V est de (-)3 nA sur l'UME fonctionnalisée contre (-)8 nA lorsqu'elle est non greffée, soit une diminution de plus de 60% autant en oxydation qu'en réduction.

Pour l'électrode commerciale de 33 μm sur la Figure III-16, le courant mesuré à 0,1 V est de 11 nA sur l'électrode fonctionnalisée contre plus de 18 nA sur l'électrode non greffée, soit une diminution de plus de 40% du courant. A -0,1 V, le courant mesuré pour l'électrode

Biocapteurs sur UMEs unitaires

munie du monobrin d'ADN est de -6 nA contre -15 nA sur l'électrode non greffée, soit une baisse du courant de 60% en réduction.

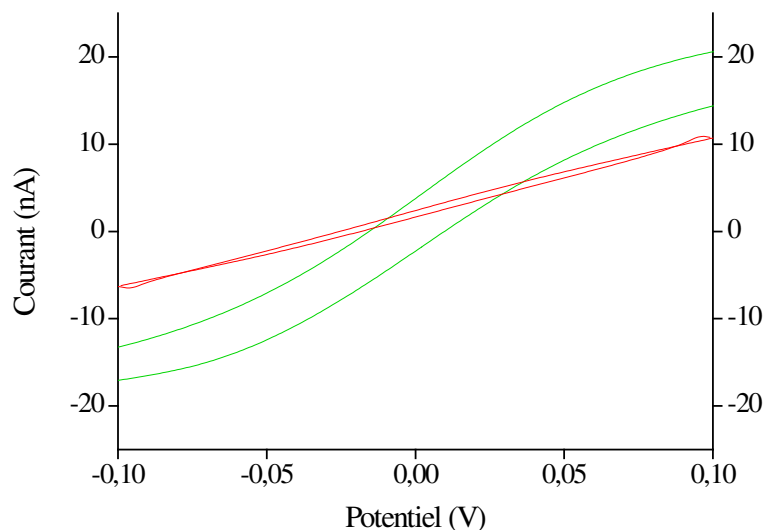


Figure III-16 : Électroactivité de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM en présence de céfadroxil en excès (25 mM) sur électrode de 33 μm en présence de proflavine (Pfl) à 10^{-6} M dans NaCl 0,5 M ; fonctionnalisée par la sonde ADN (rouge) et sur électrode non greffée (vert)

Dans les deux cas étudiés, la présence de la monocouche de sondes ADN est bien confirmée par la diminution du courant. Le couplage peptidique, aussi bien sur l'électrode de 7 μm que sur celle de 33 μm est donc efficace et donne des résultats satisfaisants.

4) La détection de miRNAs avec des biocapteurs réalisés sur UMEs en fibre de carbone

Des biocapteurs à ARNs peuvent être réalisés avec des ultramicro-électrodes de carbone après les avoir modifiées avec le diazonium et avoir couplé la sonde ADN modèle aux groupements carboxyphenyl greffés. Ces essais ont été réalisés sur des UMEs de 7 μm fabriquées au laboratoire et commerciales de 33 μm . Les mesures d'électroactivité sur ces biocapteurs sont réalisées dans la solution d'électrolyte contenant du céfadroxil en excès (25 mM) et 10^{-6} M de proflavine jouant le rôle d'intercalant rédox.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

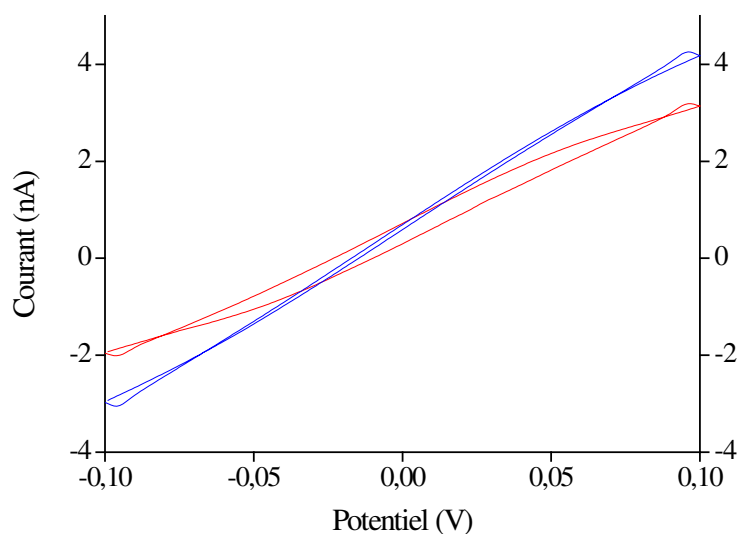


Figure III-17 : Électroactivité de $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM en présence de céfadroxil en excès (25 mM) en présence de proflavine (Pfl) à 10^{-6} M dans NaCl 0,5 M sur électrode de 7 μm ; fonctionnalisée par la sonde ADN (rouge) et fonctionnalisée par la sonde ADN hybridée avec la cible complémentaire 10^{-6} M (bleu) par voltampérométrie cyclique 50 mV/s

Sur la Figure III-17, pour le biocapteur de 7 μm de diamètre, le courant mesuré à 0,1 V est de 4,2 nA pour la sonde hybridée avec la cible contre 3 nA pour la sonde seule, soit une augmentation du courant de plus de 30% en oxydation. En réduction à -0,1 V, le courant mesuré pour la sonde hybridée est de -3 nA contre -2 nA pour la sonde seule soit une augmentation du courant de 50%. Le biocapteur semble fonctionnel avec une concentration très élevée de cible complémentaire. Cette manipulation est répétée sur l'électrode commerciale de 33 μm de diamètre.

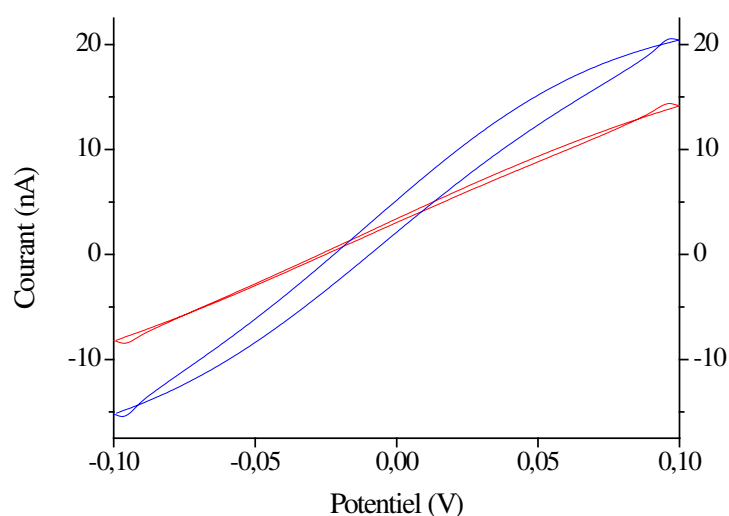


Figure III-18 : Électroactivité de $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM en présence de céfadroxil en excès (25 mM) en présence de proflavine (Pfl) à 10^{-6} M dans NaCl 0,5 M sur électrode de 33 μm ; fonctionnalisée par la sonde ADN (rouge) et fonctionnalisée par la sonde ADN hybridée avec la cible complémentaire 10^{-6} M (bleu) par voltampérométrie cyclique 50 mV/s

Biocapteurs sur UMEs unitaires

Sur la Figure III-18, pour le biocapteur de 33 μm , le même type d'allure est obtenu, à savoir que : le courant mesuré à 0,1 V est de 20,5 nA pour la sonde hybridée à la cible contre 14 nA pour la sonde seule, soit une augmentation du courant de 50% en oxydation. Pour la réduction, le courant mesuré à -0,1 V est de -15 nA pour la sonde hybridée avec la cible contre -8 nA pour la sonde seule, soit une augmentation du courant de 50%.

Cependant, des problèmes de reproductibilité ont été rencontrés sur ces biocapteurs à base de fibres de carbone greffées. En effet, le polissage mécanique, même poussé, de la surface des électrodes n'a pas permis de restaurer la surface initiale et de fabriquer à nouveau un biocapteur. Si la voltampérométrie réalisée à l'électrode de carbone de 33 μm non greffée est semblable avant et après avoir réalisé le biocapteur (Figure III-19), le greffage du diazonium ne peut être reproduit.

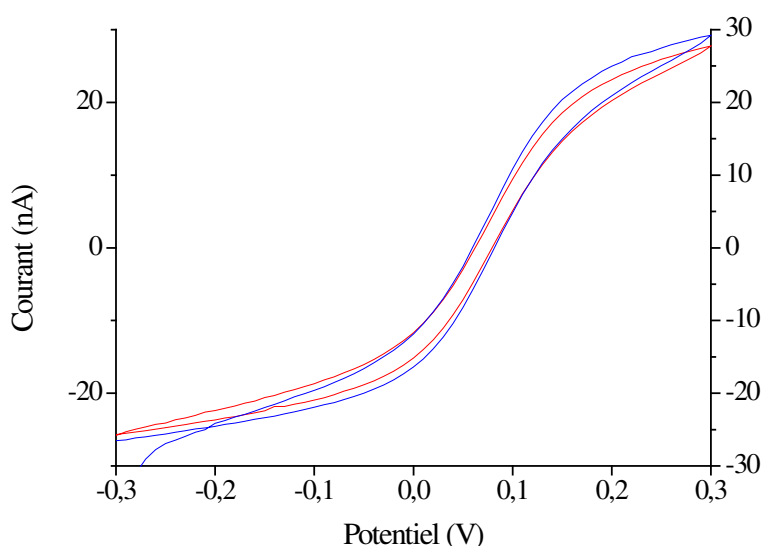


Figure III-19 : Caractérisation de l'électrode de carbone commerciale de 33 μm neuve (rouge) et après fabrication d'un biocapteur fonctionnel puis polissage (bleu) par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM à 100 mV/s

En effet, la Figure III-20 montre la différence entre le greffage réalisé sur l'électrode neuve et le greffage réalisé après le polissage et restauration de la surface de l'électrode suite au premier biocapteur. La courbe rouge montre le greffage réalisé sur l'électrode neuve. Le courant est très faible et correspond à la réduction du diazonium adsorbé à la surface de l'électrode de carbone. La courbe bleue montre l'allure des greffages réalisés après la restauration de l'électrode suite à la fabrication du premier biocapteur à ARN fonctionnel. Le courant lors du greffage est beaucoup plus élevé. Il est possible de supposer que le courant

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

observé correspond à l'électroactivité réversible d'une espèce résiduelle à l'électrode malgré le polissage. L'hypothèse mise en avant est alors que la structure en feuillets du graphite dans l'axe de la fibre conduit à une adsorption des espèces électroactives profondément sur l'électrode que le polissage ne suffit pas à éliminer.

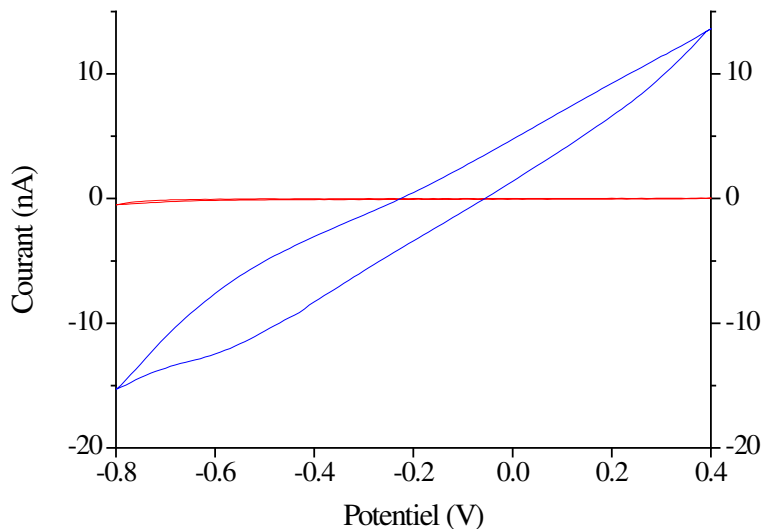


Figure III-20 : Comparaison de greffages du diazonium réalisés par adsorption préalable 15 heures puis voltampérométrie cyclique 4 cycles sur l'électrode commerciale de 33 μm neuve (rouge) et après fabrication d'un biocapteur fonctionnel puis polissage de la surface (bleu)

Pour confirmer cette hypothèse, les fibres de carbone neuves utilisées pour fabriquer les électrodes ont été observées en Microscopie Electronique à Balayage (MEB). La vue de côté de la fibre (Figure III-22) montre que celle-ci n'est pas poreuse mais bien étanche sur la longueur. Cependant, la vue de l'extrémité (Figure III-21) montre les feuillets de graphite indépendants formant la fibre. A cette extrémité, les molécules d'ADN sondes ou cibles et les molécules de l'électrolyte peuvent s'immiscer dans les espaces entre les feuillets du graphite et ne permettent pas de retrouver un greffage normal sur ces électrodes. Cette structure en feuillets assemblés ne permet donc pas de réaliser plusieurs mesures sur un même biocapteur.

Biocapteurs sur UMEs unitaires

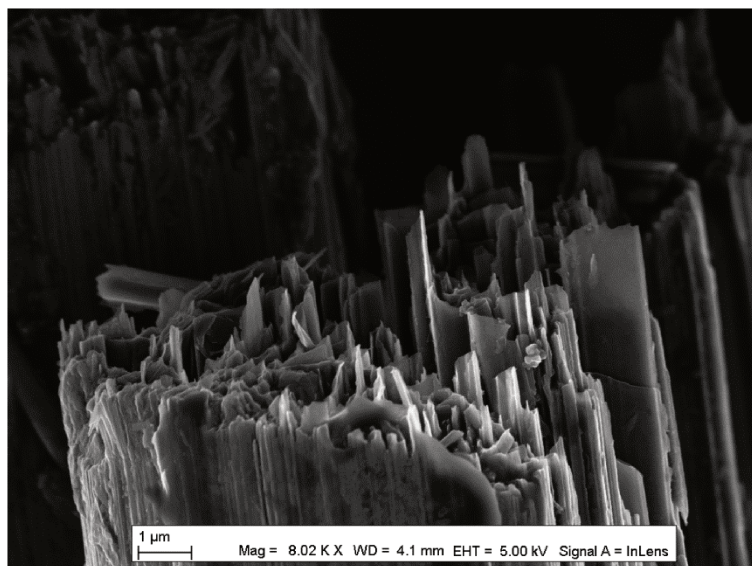


Figure III-21 : Image réalisée en microscopie électronique à balayage de l'extrémité d'une fibre de carbone de diamètre 10 μm

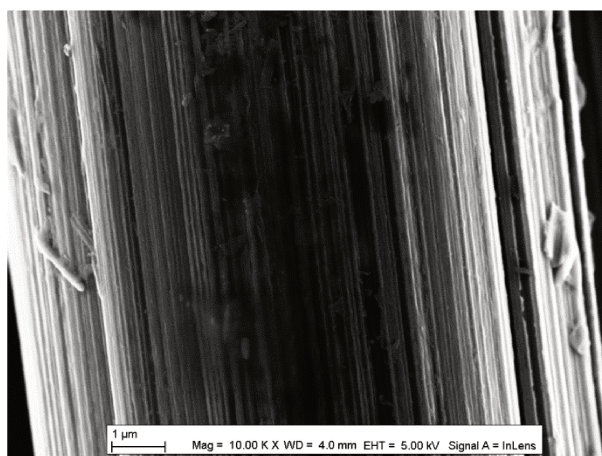


Figure III-22 : Image réalisée en microscopie électronique à balayage d'une fibre de carbone vue de côté.

Les UMEs utilisées pour ces biocapteurs deviennent donc inutilisables. A la vue des problèmes de reproductibilité rencontrés, aucune optimisation supplémentaire n'a été menée au cours de cette thèse. Cependant, il s'agit là d'une preuve de concept de la possibilité de réaliser des biocapteurs à ARN sur des UMEs de carbone.

Pour des raisons de coûts de développement et de temps de fabrication, il est impossible de changer les électrodes à chaque biocapteur. Il a donc été décidé de changer de matériau. Il est envisageable de déposer du carbone par lithographie mais ce matériau n'existe pas commercialement. Une collaboration avec un laboratoire partenaire a été mise en place

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

mais le temps de développement est important. C'est pourquoi l'or a été choisi comme nouveau matériau pour développer les biocapteurs à ARN.

B. Configuration UME d'or

Il a donc été nécessaire, dans un premier temps, de fabriquer de nouvelles UME d'or. Une fois ces électrodes fabriquées, elles ont pu être caractérisées, modifiées directement par les sondes ADN marquées en formant des monocouches auto-assemblées (Figure III-23) et testées en tant que biocapteurs.

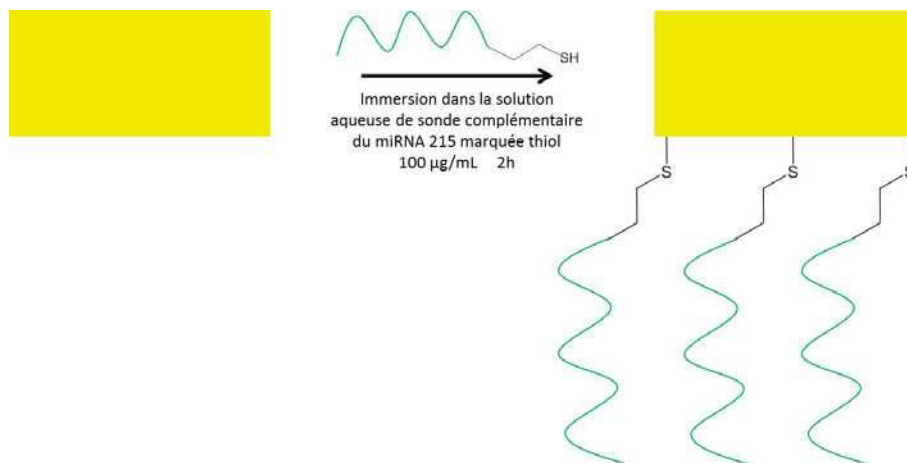


Figure III-23 : Schéma réactionnel de la formation d'une monocouche auto-assemblée de sondes ADN marquées par une fonction thiol pour former un biocapteur sur ultramicro-électrode d'or

Les principaux verrous pour parvenir à réaliser un biocapteur par cette méthode sont la robustesse de la monocouche auto-assemblée au sein de laquelle des sondes peuvent se désorber de leur substrat d'or, la densité de la monocouche qui peut faire varier drastiquement les performances du capteur, ou encore l'optimisation de l'électrolyte de mesure et notamment de la concentration en intercalant rédox qui joue un rôle primordial dans la détection.

1) Monocouches auto-assemblées à partir des sondes ADN marquées par un thiol (conditions classiques)

Après la décision de changer de matériau d'électrode, la démarche choisie a été de s'approcher le plus possible de la procédure décrite dans les précédents travaux de l'équipe datant de 2013 pour des UMEs d'or[136] tout en conservant les aspects satisfaisants de l'étude sur UMEs de carbone (monocouche de sondes ADN robuste et reproductible). Les méthodes de mesure et d'hybridation sonde/cible ainsi que les sels supports sont conservés. En revanche, la méthode de greffage change pour s'adapter au matériau. L'électrolyte utilisé

Biocapteurs sur UMEs unitaires

dans un premier temps est constitué de 5 mM de ferrocyanure, 5 mM de ferricyanure, 10^{-6} M de bleu de méthylène dans 0,5 M de NaCl.

a) Caractérisation des électrodes

De même que pour les UMEs de carbone, les UMEs d'or sont caractérisées par voltampérométrie cyclique. La caractérisation est effectuée préalablement au greffage pour vérifier le comportement de l'électrode. L'exemple d'une électrode de 25 μm est donné sur la Figure III-24.

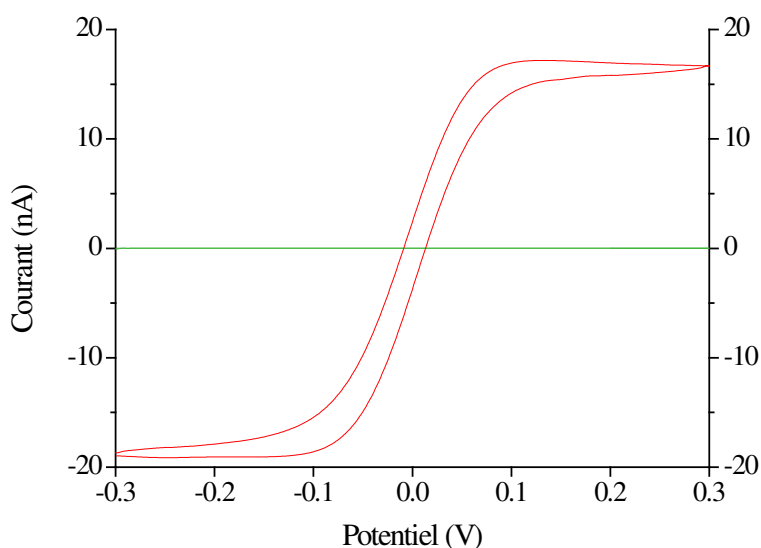


Figure III-24 : Voltampérométrie de la caractérisation d'une électrode d'or de diamètre 25 μm dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM à 100 mV/s (rouge) et blanc (vert)

Toujours par la loi de Faraday, le rayon effectif de l'électrode est calculé et une valeur de 26,6 μm est obtenue. L'électrode est donc prête à être utilisée pour la fabrication de biocapteurs.

b) Formation de la monocouche auto-assemblée sur l'électrode

La formation de la monocouche repose sur l'interaction forte existant entre l'or et les fonctions thiols. Dans un premier temps, la formation de la monocouche se fait par adsorption de la sonde ADN marquée en deux heures (cf. page 81). La vérification de la formation de la monocouche est réalisée par voltampérométrie cyclique en observant le blocage du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure à la surface de l'électrode (Figure III-25).

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

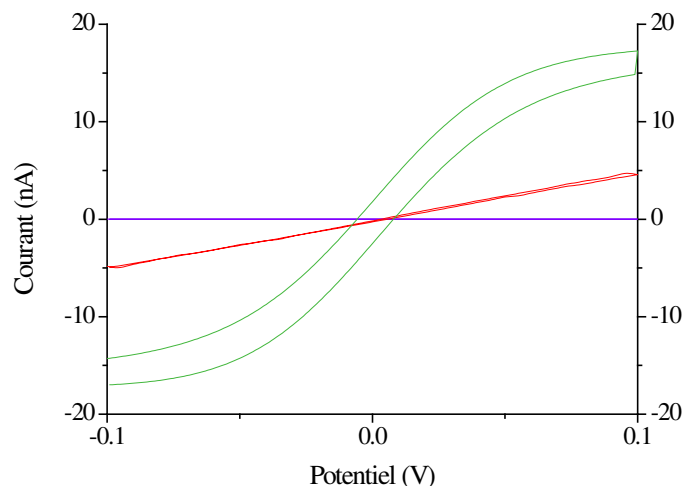


Figure III-25 : Vérification de la formation de la monocouche de sondes ADN à la surface de l'électrode d'or de 25 µm par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM à 50 mV/s ; blanc NaCl 0,5 M (violet), électrode non greffée (vert), électrode modifiée par la monocouche de sondes (rouge)

La voltampérométrie cyclique effectuée montre une forte diminution du courant sur l'électrode modifiée (rouge) par rapport à l'électrode non greffée (vert). En effet, le courant est passé de 16 nA à 4,7 nA à 0,1 V. Cette baisse de l'intensité du courant représente un blocage du courant de 71% dû à la formation de la monocouche. En réduction, à -0,1 V, le courant a diminué de 69 % passant de -15,6 nA à -5 nA. Le blocage du courant semble donc assez important mais il reste malgré tout un courant de fuite. La monocouche formée reste cependant satisfaisante et semble être assez homogène. De plus, la formation de la SAM semble être assez reproductible comme le montre la Figure III-26.

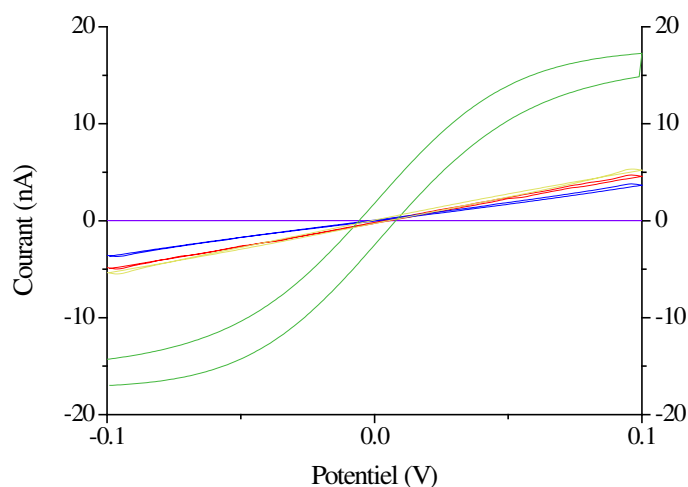


Figure III-26 : Evaluation de la reproductibilité du blocage du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure à la surface d'une électrode d'or de 25 µm modifiée par une SAM de sondes ADN marquées par un thiol par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM à 50 mV/s ; blanc NaCl 0,5 M (violet), électrode non greffée (vert), modification n°1 (rouge), modification n°2 (bleu), modification n°3 (jaune)

Biocapteurs sur UMEs unitaires

En effet, pour le deuxième essai, on observe même un blocage légèrement meilleur que pour le premier essai à 76 % en oxydation à 0,1 V pour 71 % au premier essai. En réduction, à -0,1 V, le courant est également bloqué à 76 % pour le deuxième test contre 69 % au premier. Pour le troisième essai, le courant mesuré est de 5,33 nA, soit un blocage du courant de 67 %, en oxydation. En réduction, l'intensité mesurée vaut -5,42 nA, soit un blocage de 67 %, en réduction. La faible variation constatée, de l'ordre de 5 %, permet de reproduire facilement la monocouche de sondes ADN pour reproduire deux biocapteurs.

Une observation importante a cependant pu être faite au cours de l'étude des monocouches formées. Il s'agit de la variabilité des couches et du blocage au cours du temps et surtout au cours des différents cycles de polissage et de modification de l'électrode. Ce vieillissement ne pose pas un problème majeur dans la mesure où c'est la différence de courant entre avant et après l'hybridation qui permet de quantifier l'hybridation. Cependant, lorsque le blocage devient trop faible, il n'est plus possible de mesurer l'augmentation du courant. C'est l'évolution du blocage du courant au cours des cycles qui est présenté sur la Figure III-27.

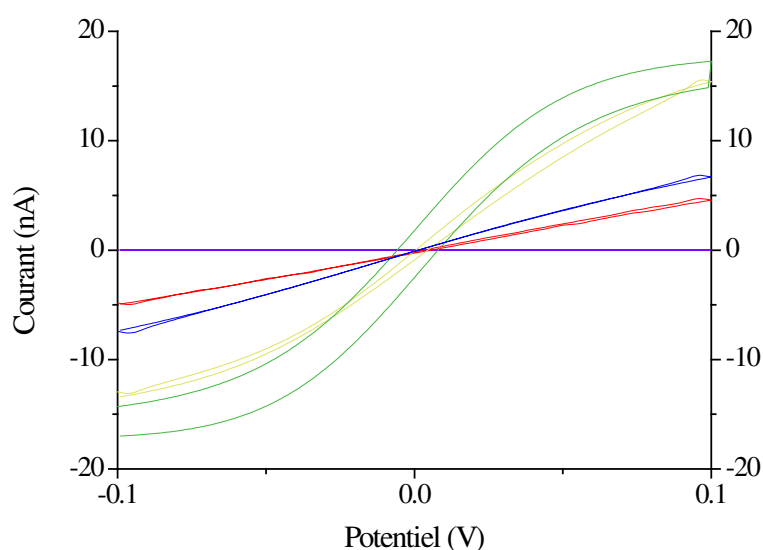
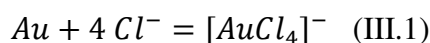


Figure III-27 : Evolution du blocage du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure à la surface d'une électrode d'or de 25 µm modifiée par une SAM de sondes ADN marquées par un thiol au cours des cycles par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM à 50 mV/s ; blanc NaCl 0,5 M (violet), électrode non greffée (vert), après 1 cycle (rouge), après 5 cycles (bleu), après 10 cycles (jaune)

Il semble qu'il soit de plus en plus difficile de bloquer efficacement le courant au cours du vieillissement de l'électrode. Alors que le courant est bloqué en oxydation et en

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

réduction à 71 % et 69 % respectivement après le premier cycle, le courant n'est plus bloqué qu'à 58 % et 53 % après 5 cycles. Ce phénomène est encore plus notable après 10 cycles puisque le courant n'est que faiblement bloqué, à 2,5 % et 15 %. Ce phénomène peut s'expliquer par plusieurs raisons. Il peut s'agir d'un vieillissement de l'électrode ; il faut alors envisager un décapage plus poussé de l'électrode pour retrouver un état de surface satisfaisant. Il peut également s'agir d'une augmentation de la surface de l'électrode due aux conditions agressives du milieu où est utilisée l'électrode. En effet, la présence de chlorure dans l'électrolyte peut engendrer la corrosion de l'électrode (III.1). Ce point a été approfondi et sera développé par la suite. Il peut également s'agir de la désorption des sondes marquées par une fonction thiol.



Ce vieillissement de l'électrode a permis de se pencher sur la reproductibilité de la formation des SAM sur des électrodes différentes présentant les mêmes caractéristiques. En effet, dans la mesure où les électrodes ne peuvent être réutilisées de nombreuses fois, il est intéressant d'avoir une bonne reproductibilité entre les électrodes. C'est cette étude qui est représentée sur la Figure III-28.

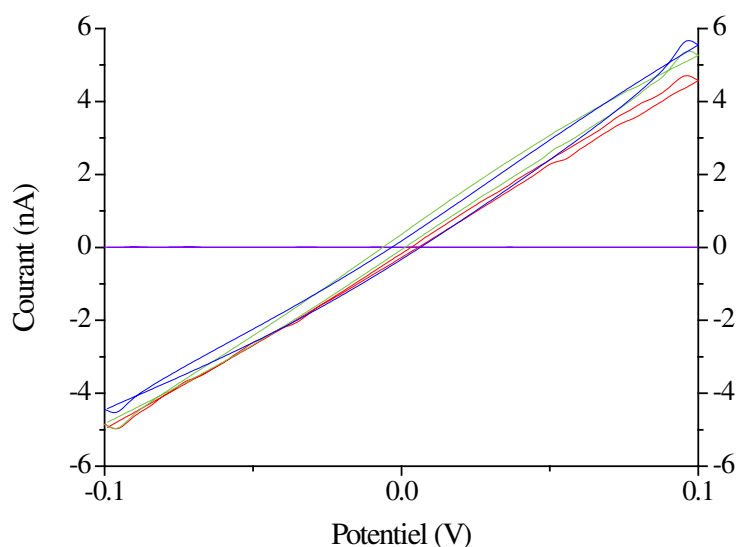


Figure III-28 : Evaluation de la reproductibilité du blocage du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure à la surface de deux électrodes d'or de 25 µm modifiées par une SAM de sondes ADN marquées par un thiol par voltampérométrie cyclique dans [Fe(CN)₆³⁻] 5 mM et [Fe(CN)₆⁴⁻] 5 mM à 50 mV/s ; blanc NaCl 0,5 M (violet), électrode n°1 modifiée après 1 cycle (rouge), électrode n°2 modifiée après 1 cycle (bleu), électrode n°2 modifiée après deux cycles (vert)

Biocapteurs sur UMEs unitaires

La Figure III-28 montre bien la similarité du blocage du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure entre l'électrode n°1 et l'électrode n°2 au même stade de vieillissement. L'électrode 1 montre un blocage en oxydation et en réduction de 71 % et 69 % respectivement. L'électrode n°2 présente, pour le premier cycle, un courant de 5,67 nA soit un blocage de 63 % en oxydation et un courant de -4,46 nA soit un blocage de 69 % en réduction. D'autre part, sur l'électrode n°2, pour le second cycle, le courant mesuré à 0,1 V est 5,38 nA soit un blocage du courant de 65 % et à -0,1 V, le courant vaut -4,88 nA soit un blocage du courant de 66 %. Il est donc clair que le comportement des monocouches est le même entre diverses électrodes au même stade de vieillissement tant au niveau du blocage du courant que de l'augmentation du courant mesuré au cours des cycles. En résumé, entre les électrodes, la reproductibilité des monocouches de sondes ADN est observée sur les premières utilisations. C'est donc un moyen temporaire de poursuivre les études en attendant d'étudier la raison du vieillissement des électrodes.

c) Courbe de calibration

Trois courbes de calibration ont été réalisées pour des concentrations comprises entre 10^{-6} M et 10^{-15} M en cible complémentaire. Ces trois courbes ont été réalisées sur des électrodes différentes. Pour une même série, les expériences ont été réalisées sur la même électrode après polissage et formation d'une nouvelle monocouche auto-assemblée de sondes ADN. Dans le cas d'un vieillissement important de l'électrode, une deuxième a été employée pour terminer la courbe de calibration. Chaque concentration, en partant de 10^{-6} M, a été quantifiée pour évaluer la différence de courant comme sur la Figure III-29.

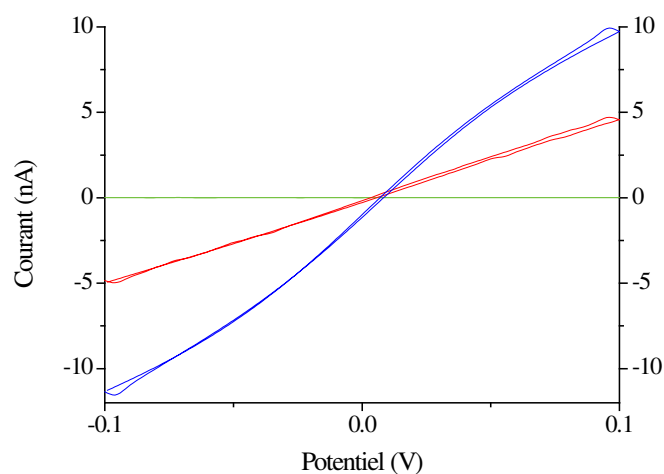


Figure III-29 : Exemple de biocapteur réalisé sur l'électrode n°1 avec une concentration en cible complémentaire de 10^{-6} M ; blanc NaCl 0,5 M (vert), électrode n°1 modifiée par la sonde ADN seule (rouge), électrode n°1 modifiée par la sonde ADN hybridée à la cible 10^{-6} M (bleu)

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

Sur la Figure III-29 représentant le premier biocapteur réalisé pour détecter une concentration en cible de 1 μM , le courant mesuré à 0,1 V pour l'électrode modifiée par la sonde ADN seule est de 4,71 nA. Après hybridation avec la cible complémentaire pendant 30 minutes, le courant mesuré est de 9,94 nA. Cela représente une forte augmentation du courant de 111 % due à la catalyse du transfert d'électrons par le bleu de méthylène en présence du duplex d'ADN. En réduction, le courant mesuré avant hybridation est de -4,94 nA contre -11,4 nA après l'hybridation. C'est une augmentation de 130 % observée à -0,1 V sur ce biocapteur. Ce sont des valeurs satisfaisantes pour une valeur de concentration en cible du haut de la gamme.

L'étape suivante consiste à polir l'électrode et fabriquer un nouveau biocapteur qui sera utilisé pour détecter une concentration inférieure. L'enchaînement des biocapteurs sur la même électrode pour les différentes concentrations est représenté sur Figure III-30. Ce graphe a été réalisé en moyennant pour chaque biocapteur la valeur absolue du courant mesuré à -0,1 et 0,1 V. Une valeur moyenne de l'augmentation de l'intensité du courant est alors obtenue.

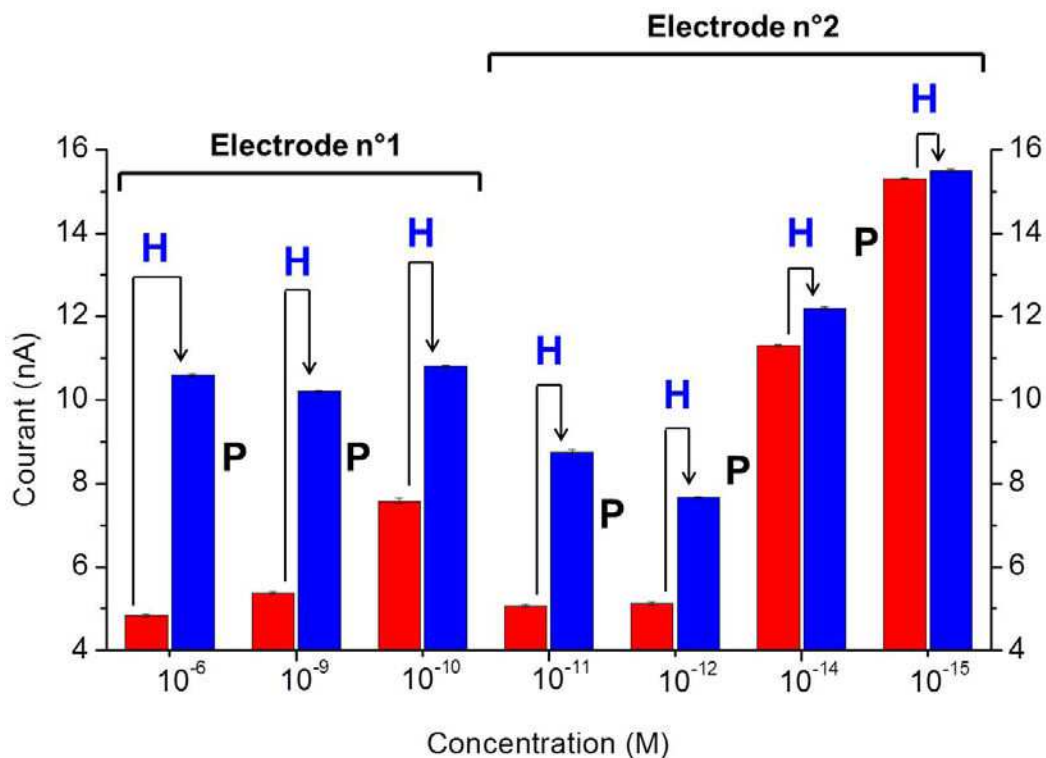


Figure III-30 : Histogramme montrant le courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure mesuré à l'électrode au cours des cycles d'hybridation et polissage de l'électrode pour les différentes concentrations ; électrode modifiée par la sonde seule (rouge), électrode modifiée par la sonde hybridée (bleu), H : Hybridation de la cible, P : Polissage de l'électrode

Biocapteurs sur UMEs unitaires

Cette Figure III-30 montre le courant mesuré sur les différents biocapteurs qui ont permis de réaliser une des trois courbes d'étalonnages. Ce tracé est intéressant parce qu'il permet d'observer deux choses. La première et certainement la plus évidente est la diminution de la différence de courant avec la concentration en cible complémentaire qui confirme le fonctionnement du biocapteur en adéquation avec la transduction choisie. L'augmentation du courant passe d'environ 5,8 nA pour une concentration en cible de 10^{-6} M à seulement 0,2 nA pour une concentration de 10^{-15} M.

Un autre point intéressant est visible sur ce graphe : pour les premiers cycles, quelle que soit l'électrode, la valeur du courant mesuré sur l'électrode modifiée par la sonde ADN seule est identique. En effet, sur l'électrode n°1, le courant mesuré sur l'électrode modifiée par la sonde ADN seule vaut 4,84 nA pour le premier cycle et 5,38 nA pour le second cycle. Sur l'électrode n°2 modifiée par la sonde seule, le courant mesuré vaut 5,07 nA au premier cycle et 5,13 nA au cours du second cycle. Les monocouches de sondes ADN marquées sont donc bien reproductibles sur des électrodes différentes. En revanche, après quelques cycles sur les électrodes, cette valeur du courant mesuré sur l'électrode modifiée par la sonde seule augmente, mettant en avant le vieillissement de l'électrode abordé précédemment. C'est pour cette raison que deux électrodes ont été utilisées pour réaliser la courbe de calibration. De cette façon, moins de cinq cycles ont été réalisés sur chaque électrode limitant ainsi l'influence du vieillissement (Figure III-27).

A l'aide de ces résultats, la courbe de calibration du capteur défini dans ce paragraphe et appelé capteur en conditions classiques est tracée pour obtenir sa limite de détection (Figure III-31). La droite indiquant la limite de confiance choisie pour le biocapteur (trois fois la déviation standard σ) a été tracée en bleu. Les différences de courant mesurées entre avant et après hybridation de la cible pour chaque concentration ont été représentées par les carrés noirs. Une courbe de régression (droite rouge) a été calculée à partir de ces points et montre l'adéquation entre le modèle choisi et les données expérimentales. Les points expérimentaux sont dispersés autour de la droite de modélisation montrant une variabilité assez importante avec ces UMEs unitaires modifiées par une monocouche de sondes ADN marquées par une fonction thiol. Cette variabilité peut être attribuée à la robustesse de la monocouche qu'il convient d'améliorer mais surtout au phénomène de vieillissement des électrodes qui induit une erreur importante dans la mesure du courant à la surface du biocapteur.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

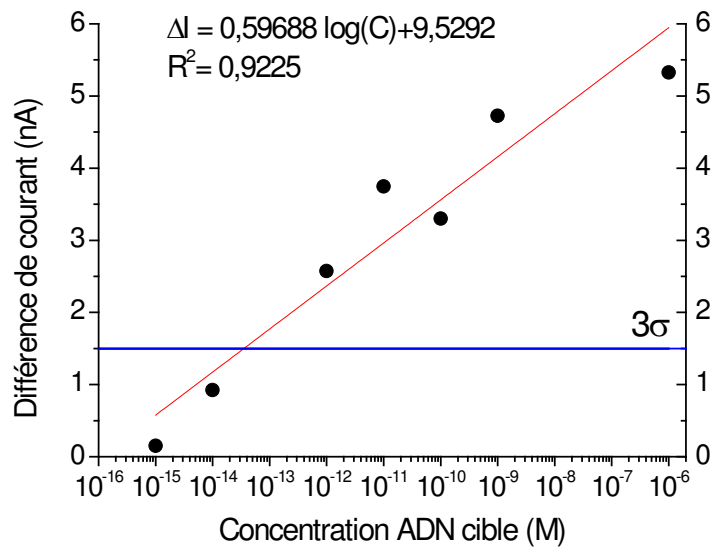


Figure III-31 : Courbe de calibration du capteur utilisé en conditions classiques ; Différence de courant pour chaque concentration (ronds noirs), courbe de tendance des points (rouge), triple de la déviation standard (bleu)

La courbe de calibration à l'intersection avec la droite 3σ permet d'obtenir la limite de détection qui est égale, pour le capteur dans ces conditions, à $3,5 \times 10^{-14}$ M. Cette limite de détection se trouve dans la gamme de concentration de certains micro-ARNs dans les fluides biologiques. C'est donc un résultat satisfaisant étant donné le peu d'optimisation réalisé jusqu'ici. Cependant, cette LOD est insuffisante pour parvenir au but recherché et la variabilité des mesures dans les conditions choisies est bien trop élevée. La preuve en est les deux courbes de calibration suivantes réalisées dans les mêmes conditions mais sur d'autres électrodes. Dans les points exposés sur la Figure III-32, des mesures en doublons ont été réalisées pour visualiser la variabilité de deux mesures pour une même concentration.

Biocapteurs sur UMEs unitaires

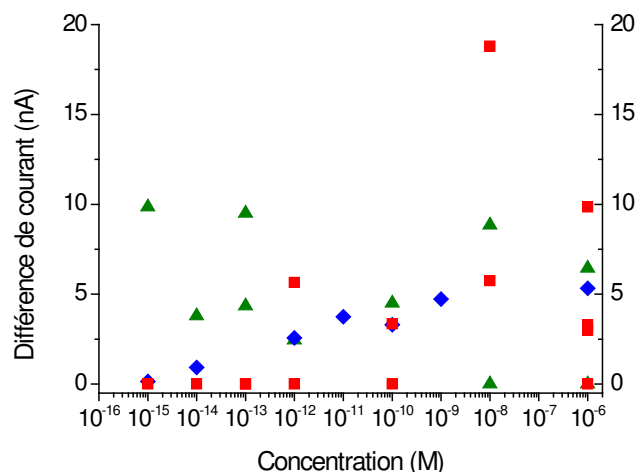


Figure III-32 : Représentation de tous les résultats obtenus en conditions classiques pour obtenir des courbes de calibration et permettant d'observer la dispersion des mesures ; 1^{ère} série (bleu), 2^{ème} série (rouge), 3^{ème} série (vert)

En observant ces résultats, il est clair que le capteur n'est pas encore fiable ni robuste et qu'il est inutilisable tel quel dans un but de diagnostic médical. Il est donc nécessaire d'améliorer certains paramètres pour optimiser ses performances. Le premier paramètre à être étudié est le couple médiateur/intercalant rédox.

2) Optimisation de la composition de l'électrolyte

L'électrolyte joue un rôle important dans la détection des micro-ARNs. En effet, c'est la répulsion électrostatique entre le médiateur rédox et les sondes ADN qui conditionne le blocage du courant à la surface de l'électrode. Plus le blocage est important à l'électrode, et plus le capteur peut être sensible. En effet, la différence de courant pré et post-hybridation, à concentration égale en cible, sera plus importante avec un blocage du courant plus efficace. Il sera donc possible de détecter des concentrations plus faibles et d'améliorer la LOD. Comme précisé dans le chapitre II, le céfadroxil, complexant du fer, peut être employé pour induire une gêne stérique plus importante et permettre d'améliorer le blocage du courant avant hybridation.

D'autre part, le changement d'intercalant rédox peut permettre d'améliorer la catalyse du transfert d'électrons et ainsi augmenter le courant après hybridation pour obtenir une meilleure LOD. C'est pour cette raison que des essais ont été menés avec la proflavine.

Il s'agit donc ici de présenter les résultats de l'étude menée sur les 4 différents couples médiateur/intercalant rédox avec différentes concentrations en intercalant.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

L'étude a été menée en réalisant des biocapteurs indépendants sur différentes électrodes. Chaque expérience utilise un électrolyte différent en terme soit de médiateur rédox, soit d'intercalant rédox, soit de concentration d'intercalant. Le but de l'étude est donc de trouver le couple qui offre la meilleure sensibilité et la meilleure efficacité du transfert électronique. La sensibilité est évaluée par la différence de courant mesurée entre l'électrode modifiée par la sonde après hybridation (I_{ds}) et l'électrode modifiée par la sonde seule (I_{ss}). L'efficacité du transfert électronique est évaluée par le rapport $\frac{I_{ds}}{I_{ss}}$. Chaque capteur permet d'obtenir une valeur à -0,1 V et une valeur à 0,1 V. Les deux valeurs absolues du courant sont alors moyennées. De plus chaque capteur a été réalisé deux fois et la valeur indiquée dans le tableau de résultats (Tableau III-3) est la moyenne de la valeur de chaque capteur.

Tableau III-3 : Récapitulatif des résultats de l'étude d'optimisation de l'électrolyte menée sur le couple médiateur/intercalant rédox

Ligand du fer	Intercalant	Concentration d'intercalant (M)	Efficacité du transfert électronique (I_{ds}/I_{ss})	Sensibilité (nA) ($I_{ds} - I_{ss}$)
CN ⁻	MB	10 ⁻⁶	0,9	-0,4
		10⁻⁸	1,8	1,5
		10 ⁻¹⁰	1,8	1,0
	Pfl	10 ⁻⁶	0,9	-0,1
		10 ⁻⁷	0,8	-0,2
		10 ⁻⁸	0,8	-0,2
CD ⁻	MB	10 ⁻⁶	1,0	-0,2
		10 ⁻⁷	0,8	-0,4
		10 ⁻⁸	0,9	-0,1
	Pfl	10⁻⁶	6,0	0,8
		10 ⁻⁷	6,2	0,6
		10 ⁻⁸	6,1	0,2

Les résultats obtenus permettent de définir deux couples pour obtenir la meilleure efficacité du transfert d'électrons et sensibilité. L'un utilise le couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ et le bleu de méthylène à 10⁻⁸ M, soit les conditions précédentes dénommées classiques. L'autre utilise le couple $\text{Fe}(\text{CD})(\text{CN})_3^-/\text{Fe}(\text{CD})(\text{CN})_3^{2-}$ et la proflavine comme intercalant à une

Biocapteurs sur UMEs unitaires

concentration de 10^{-6} M. Ces conditions semblent présenter une efficacité trois fois supérieure aux conditions classiques alors que la sensibilité mesurée est deux fois plus faible. Il est néanmoins intéressant de poursuivre l'étude par une courbe de calibration pour comparer les limites de détection et la dispersion des résultats.

D'autre part, ces résultats montrant la possibilité d'utiliser la proflavine comme intercalant permettent de s'interroger sur le mécanisme de catalyse du transfert d'électrons. Comme indiqué à la page 68, Barton et son groupe ont proposé un mécanisme de catalyse du transfert d'électrons par l'intercalant rédox (dans ce cas le bleu de méthylène) dans lequel l'intercalant subit une transformation électrochimique puis transfère les électrons au médiateur en solution (Figure II-12). Cependant, la proflavine ne présente pas de signature rédox sur l'or sur la plage de potentiel utilisée, ce qui laisse penser qu'elle permet de catalyser le transfert électronique sans subir de transformation électrochimique. Le mécanisme suivant est alors proposé pour expliquer cette observation. Le duplex ADN est construit de manière à former un empilement π avec ses différentes bases agencées de manière similaire à des plans de graphène. L'empilement des bases peut être assimilé à un semi-conducteur. L'intercalant rédox vient alors se placer entre ces bases par liaison π et se comporte comme un dopant, qui réduit le *gap* entre la bande de conduction et de valence dans un semi-conducteur, en diminuant l'énergie nécessaire pour transférer les électrons. Le transfert des électrons à travers le duplex ADN est alors favorisé par l'ajout de l'intercalant qui ne subit alors aucune transformation électrochimique et catalyse le transfert d'électrons. Ce mécanisme s'adapte aussi bien à la proflavine qu'au bleu de méthylène. De plus, il correspond mieux aux observations qui ont été menées lors l'optimisation de l'électrolyte. Cependant, ce mécanisme n'est qu'une supposition et il serait nécessaire de mener des études mécanistiques complètes pour confirmer que c'est bien ce mécanisme qui régit la catalyse du transfert d'électrons.

Pour effectuer cette nouvelle courbe de calibration avec l'électrolyte CD/Pfl, la méthode adoptée diffère légèrement puisque le protocole de dénaturation (*cf.* p.85) a pu être amélioré et permet d'effectuer plusieurs biocapteurs avec une même monocouche en réalisant des cycles d'hybridation, dénaturation. Une mesure de contrôle du courant est réalisée après la dénaturation et tient lieu de courant avant hybridation. Quelques-uns de ces cycles d'hybridation/dénaturation sont représentés sur la Figure III-33.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

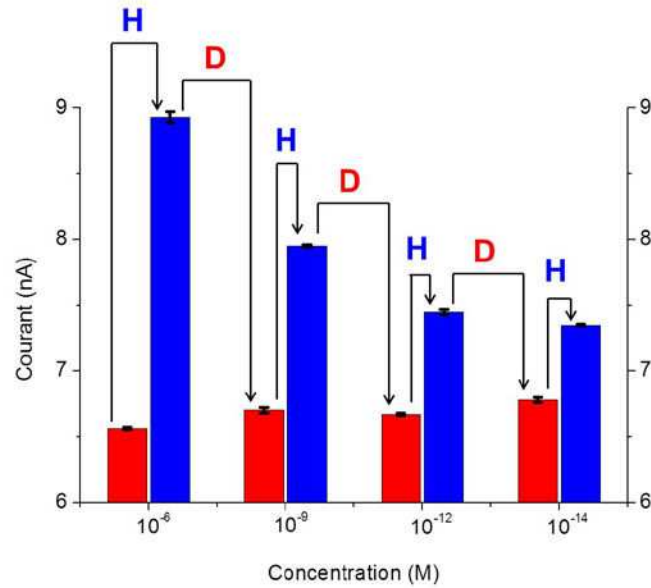


Figure III-33 : Histogramme montrant le courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure mesuré à l'électrode au cours des cycles d'hybridation et dénaturation de l'électrode pour les différentes concentrations ; électrode modifiée par la sonde seule (rouge), électrode modifiée par la sonde hybridée (bleu), H : Hybridation de la cible, D : Dénaturation du duplex ADN

La Figure III-33, dans un premier temps, permet d'observer que la dénaturation est bien efficace. En effet, après chaque dénaturation, le courant mesuré revient quasiment à la valeur initiale mesurée juste après avoir réalisé la monocouche. Une légère augmentation de cette valeur est toutefois observée. Il est probable que cette augmentation du courant sur l'électrode modifiée par la sonde seule soit due à la désorption de quelques sondes ADN durant la dénaturation. Cependant, ce procédé permet de travailler sur une seule monocouche et ainsi de gagner beaucoup de temps mais également de gagner en reproductibilité. En effet, dans ce cas, la calibration est réalisée sur la même monocouche, avec le même agencement des sondes. D'autre part ce graphe permet d'observer la décroissance du signal sur l'électrode hybridée avec la décroissance de la concentration de cible. La courbe de calibration de ce capteur présentée sur la Figure III-34 peut maintenant être établie.

Biocapteurs sur UMEs unitaires

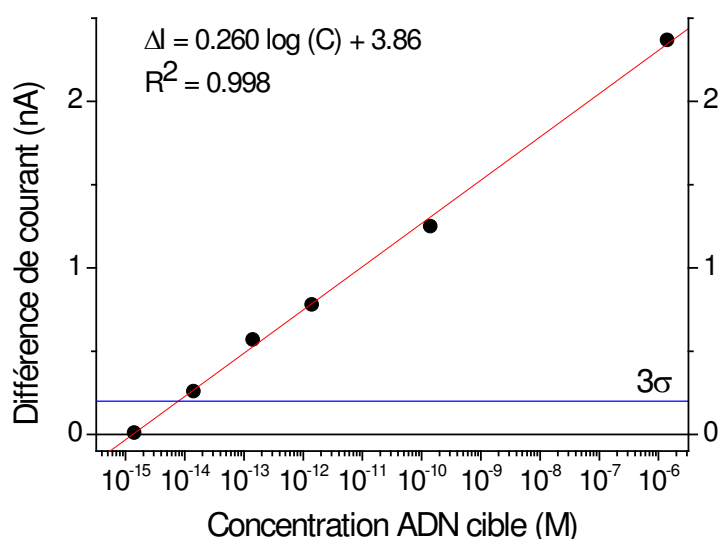


Figure III-34 : Courbe de calibration du capteur utilisé avec l'électrolyte contenant le couple $\text{Fe}(\text{CD})(\text{CN})_3^- / \text{Fe}(\text{CD})(\text{CN})_3^{2-}$ à 5 mM chacun et la proflavine à 10^{-6} M ; Différence de courant pour chaque concentration (ronds noirs), courbe de tendance des points (rouge), triple de la déviation standard (bleu)

La courbe de calibration à l'intersection avec la droite 3σ permet d'obtenir la limite de détection qui est égale, pour le capteur dans ces conditions, à $8,5 \times 10^{-15}$ M. L'optimisation du procédé de dénaturation du duplex ADN a permis un gain de temps et de reproductibilité. L'optimisation du couple médiateur/intercalant rédox a également permis d'améliorer légèrement la limite de détection du biocapteur.

3) Détection d'un unique mismatch

Après l'optimisation de l'électrolyte et la courbe de calibration réalisée dans ces conditions optimisées, la détection d'un unique mismatch a été étudiée avec l'électrolyte contenant le céfadroxil et la proflavine. Cet aspect est primordial dans l'optique d'obtenir un biocapteur très sélectif et d'éviter les faux positifs. C'est pour cela que cette étude a fait l'objet d'une attention particulière. Dans cette étude comme pour la courbe de calibration précédente, des cycles d'hybridation des sondes avec une cible présentant une unique non-complémentarité au milieu de brin puis de dénaturation dans la soude ont été réalisés. Les concentrations des solutions de cible sont les plus élevées disponibles à savoir 10^{-6} M. La deuxième concentration de 10^{-8} M est utilisée pour observer l'influence de la concentration. Pour une meilleure lisibilité des résultats, les courants mesurés ont été normalisés par rapport au courant mesuré sur l'électrode modifiée par la sonde seule à chaque cycle. Les résultats obtenus lors de ces manipulations sont reportés sur la Figure III-35.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

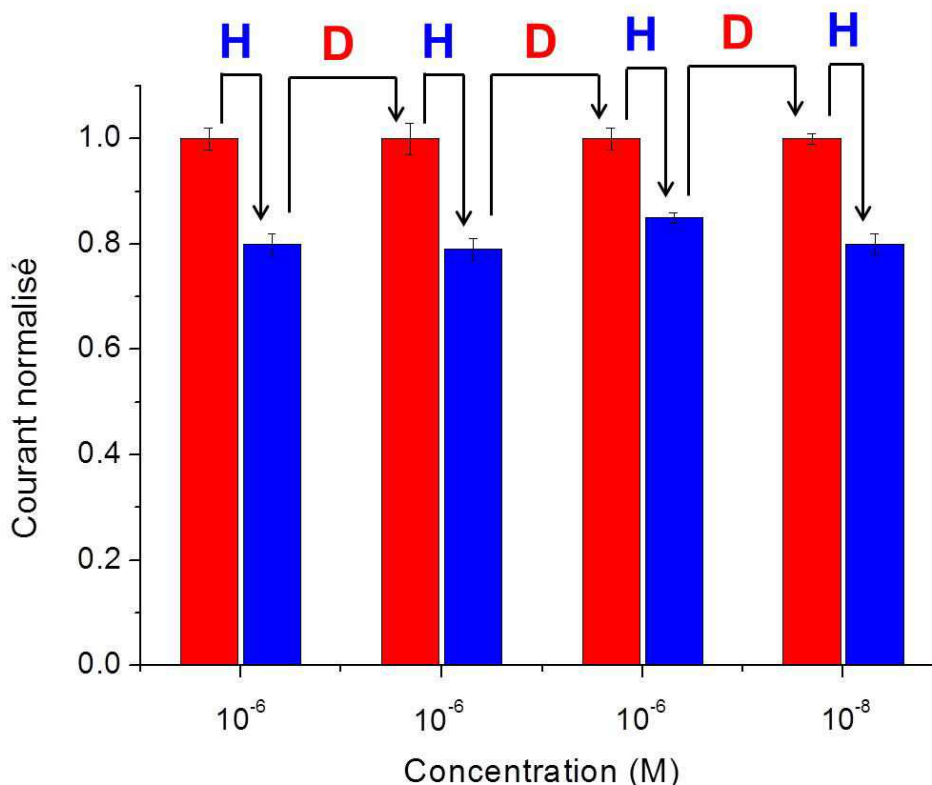


Figure III-35 : Histogramme montrant le courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure mesuré à l'électrode au cours des cycles d'hybridation et dénaturation de l'électrode pour les différentes concentrations de cible présentant un mismatch ; électrode modifiée par la sonde seule (rouge), électrode modifiée par la sonde hybridée (bleu), H : Hybridation de la cible, D : Dénaturation du duplex ADN

La Figure III-35 permet de confirmer les résultats attendus et observés dans une étude antérieure à cette thèse. En effet, pour une concentration en cible avec mismatch de 10⁻⁶ M, une diminution du courant de l'ordre de 20 % est observée pour chaque expérience. La même diminution du courant est observée pour une concentration en cible de 10⁻⁸ M. La concentration de la cible présentant une unique non-complémentarité ne semble donc pas influencer le comportement du biocapteur. La diminution du courant observée est due à la rupture des interactions π au sein du duplex ADN, ce qui empêche la catalyse du transfert électronique. L'encombrement stérique et la densité de charges négatives à la surface de l'électrode augmentent bloquant le transfert d'électrons plus fortement et permettant d'observer la baisse du courant.

En résumé, la différence de comportement est importante entre le biocapteur hybridé à la cible complémentaire et celui hybridé à la cible avec mismatch ; pour le premier, c'est une augmentation du courant de 10 % au minimum qui est observée alors que dans le second cas, une diminution importante du courant de 20 % est observée. Il est donc impossible de

Biocapteurs sur UMEs unitaires

confondre la détection du brin complémentaire et d'un autre brin. Le capteur présente donc une excellente sélectivité vis-à-vis de sa cible.

Cependant, après une étude de la stabilité de l'électrolyte, il a été observé une dégradation assez rapide (de l'ordre de quelques heures) de l'électrolyte (Figure III-36). L'électrolyte change alors de couleur et prend une teinte brunâtre et des particules en suspension sont observées. Il peut s'agir d'un changement de conformation du complexe de fer, d'une oligomérisation des complexes ou d'une aggrégation des complexes. Cette dégradation peut être un problème dans le cadre de cette étude. En effet, les manipulations pour les courbes de calibration par hybridation/dénaturation sont réalisées sur toute la durée de la journée. Si l'électrolyte n'est pas stable durant cette période, les résultats s'en verront faussés. Dans le cadre des courbes de calibration réalisées précédemment, c'est toujours une solution fraîche et limpide qui a été utilisée. Pour réaliser les biocapteurs suivants, c'est l'électrolyte classique composé de ferri/ferrocyanure et de bleu de méthylène qui sera utilisé.

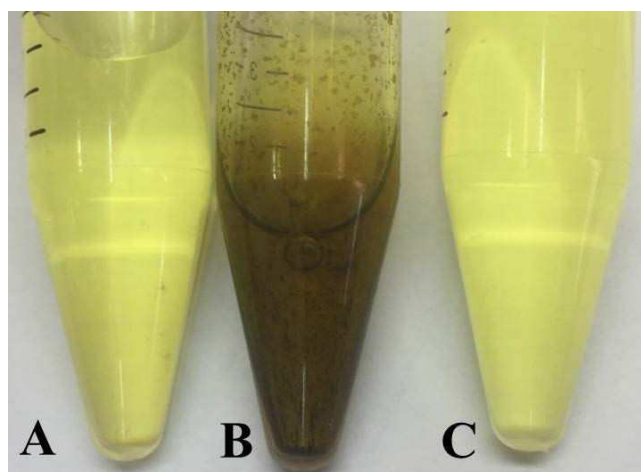


Figure III-36 : Observation de la dégradation des électrolytes de mesures à 5 mM en Fe^{II} et 5 mM en Fe^{III} ; électrolyte classique (ferro/ferricyanure dans NaCl) après 6 jours à 4°C (A), électrolyte contenant du céfadroxil en excès (25 mM) et de la proflavine 10^{-6} M après 6 jours à 4°C (B), électrolyte contenant du céfadroxil en excès (25 mM) et de la proflavine 10^{-6} M fraîchement réalisé (C)

Il est nécessaire alors de se demander si la légère amélioration de la LOD due à l'électrolyte vaut la peine de devoir refaire l'électrolyte plusieurs fois dans la journée. Enfin, cette optimisation a également permis de faire diminuer drastiquement la variabilité et la dispersion des résultats obtenus présentés sur la Figure III-37 du fait de l'utilisation du procédé de dénaturation.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

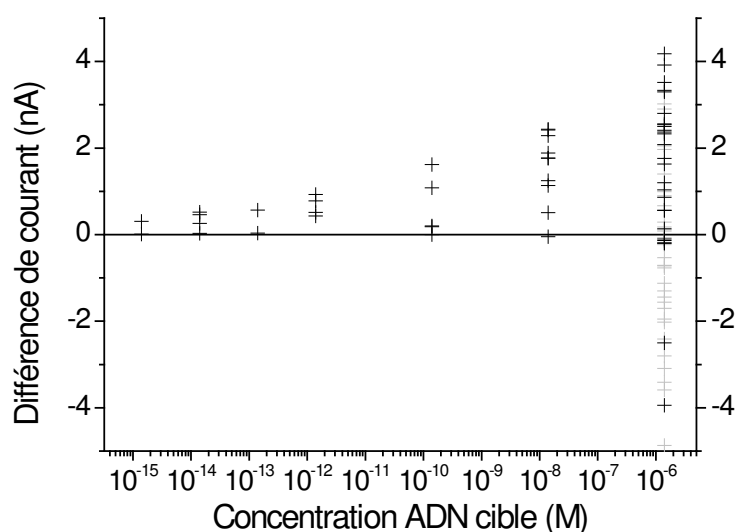


Figure III-37 : Représentation de tous les résultats obtenus avec l'électrolyte contenant le couple $\text{Fe}(\text{CD})(\text{CN})_3^- / \text{Fe}(\text{CD})(\text{CN})_3^{2-}$ et la proflavine pour obtenir des courbes de calibration et permettant d'observer la dispersion des mesures ; électrodes utilisées moins de 10 cycles (noir), électrodes utilisées plus de 10 cycles (gris)

Sur la Figure III-37, il est possible d'évaluer la dispersion des résultats et de constater qu'elle est moins importante que dans les conditions classiques utilisant le ferri/ferrocyanure et le bleu de méthylène (Figure III-32). En effet, en termes d'amplitude d'une part, les différences de courant mesurées sont groupées entre 0 et 4 nA pour les capteurs ayant réalisés moins de 10 cycles (noir) à part deux exceptions où les capteurs n'étaient pas fonctionnels. D'autre part, contrairement au cas des conditions classiques, la dispersion des résultats est proportionnelle à la concentration en cible. En effet, plus la concentration est faible, plus la différence de courant mesurée est faible et dans le cas de l'électrolyte CD/Pfl, plus la dispersion est faible. Enfin, ce graphe permet de confirmer la durée de vie des électrodes en montrant que les biocapteurs non fonctionnels (différence de courant négative) sont presque tous réalisés sur des électrodes utilisées plus de 10 cycles (gris). Enfin, sur l'ensemble des électrodes utilisées plus de 10 cycles, quasiment les deux tiers (21 sur 33) sont non fonctionnelles. Cette observation confirme donc celle réalisée à partir de la Figure III-27 ; à savoir que le vieillissement des électrodes, à partir de 10 cycles, devient néfaste pour la fabrication de biocapteurs. Ce vieillissement ne semble pas être dû au couple médiateur/intercalant rédox puisqu'il est observé quel que soit le couple choisi. Il est donc important de déterminer l'origine exacte de ce phénomène et de comprendre pourquoi le courant varie autant après 10 cycles sur une électrode. A ce stade de l'étude, la compréhension de ce phénomène est alors devenue la priorité pour diminuer la dispersion des résultats et améliorer la robustesse et la fiabilité des capteurs. Une optimisation du sel de fond

Biocapteurs sur UMEs unitaires

utilisé et de la molécule d'ancrage de la monocouche de sondes ADN sera menée pour pallier ce problème de vieillissement.

4) Vieillissement des électrodes

Etant donné le protocole mis en place pour l'utilisation des électrodes et le couple médiateur/intercalant rédox semblant être étranger au phénomène de vieillissement de l'électrode, la première hypothèse envisagée est que le sel support, en l'occurrence NaCl, dégrade les électrodes. Ce sel est connu pour corroder les métaux et semble donc être une piste probable. Pour commencer, il s'agit d'observer et de comprendre quelle modification physique de l'électrode entraîne l'augmentation du courant. Pour cela, il est nécessaire d'observer l'électrode dans le détail. Etant donné leur faible diamètre, les électrodes ont été observées par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) à l'*Institut de Physique du Globe de Paris (IPGP)*. Les électrodes observées sont soit des électrodes commerciales neuves, soit des électrodes utilisées plus de 10 cycles. Les images correspondant aux électrodes neuves sont données en Figure III-38.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

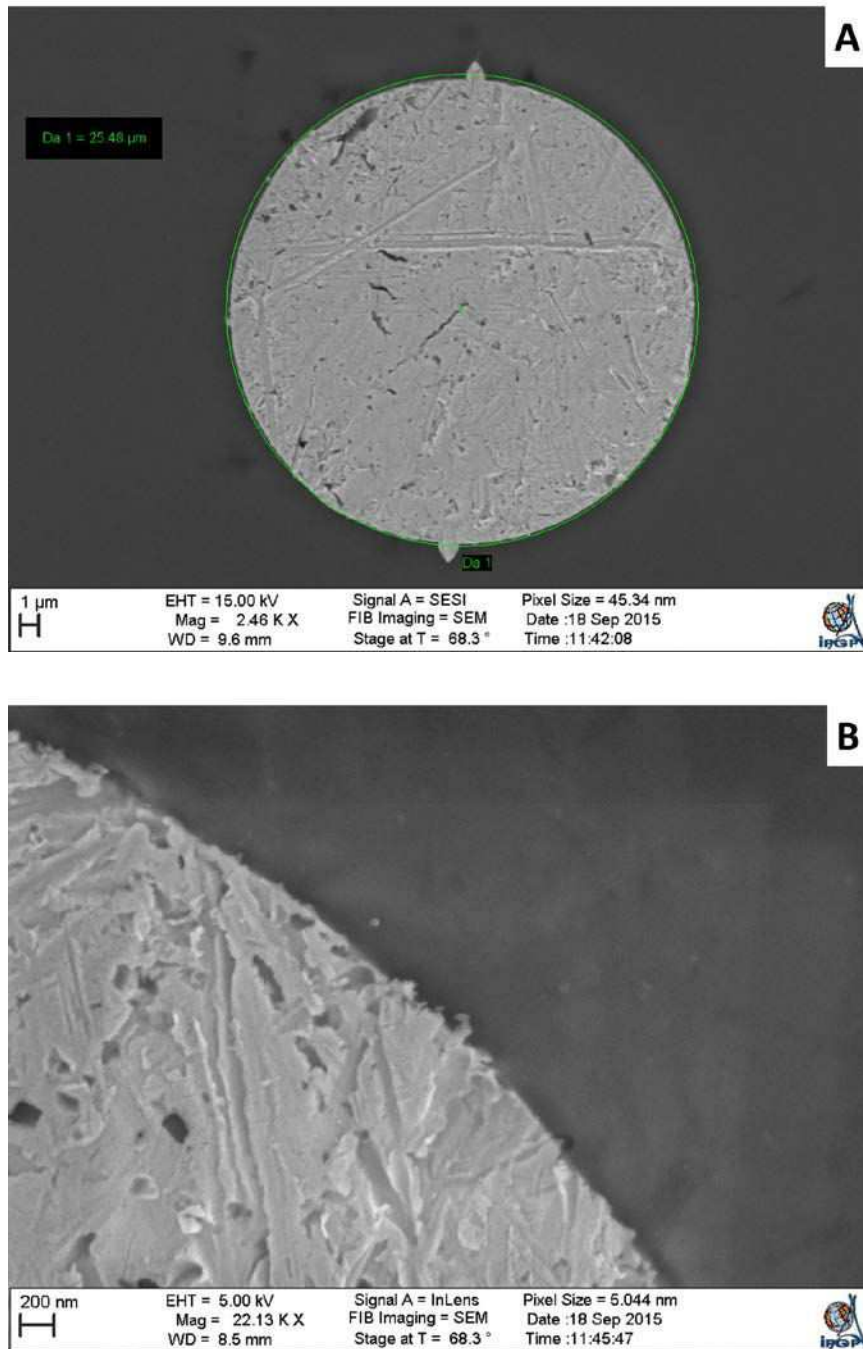


Figure III-38 : Images réalisées en microscopie électronique à balayage d'une électrode d'or commerciale de diamètre 25 μm neuve ; vue globale X3300 (A), zoom sur l'interface scellée or-verre X33000 (B)

Sur les images MEB de la Figure III-38, l'extrémité d'une électrode disque commerciale neuve de 25 μm de diamètre est observée. Sur cette image, l'électrode d'or est bien circulaire et présente un diamètre conforme à celui annoncé par le fournisseur. De plus, la seconde image permet d'observer le sertissage du métal dans le verre. Dans le cas présent, le sertissage est parfait. En effet, le verre épouse parfaitement le fil métallique conférant à

Biocapteurs sur UMEs unitaires

l'électrode une étanchéité optimale et limitant strictement la surface active à un disque de 25 μm de diamètre.

La Figure III-39 présente des images de la même électrode commerciale observée après avoir servi à réaliser 12 biocapteurs différents avec polissage entre chaque capteur. L'observation a été réalisée sans rinçage ni polissage préalable en microscopie électronique à balayage. Les images permettent, comme précédemment, d'observer une vue globale de l'extrémité de l'électrode.

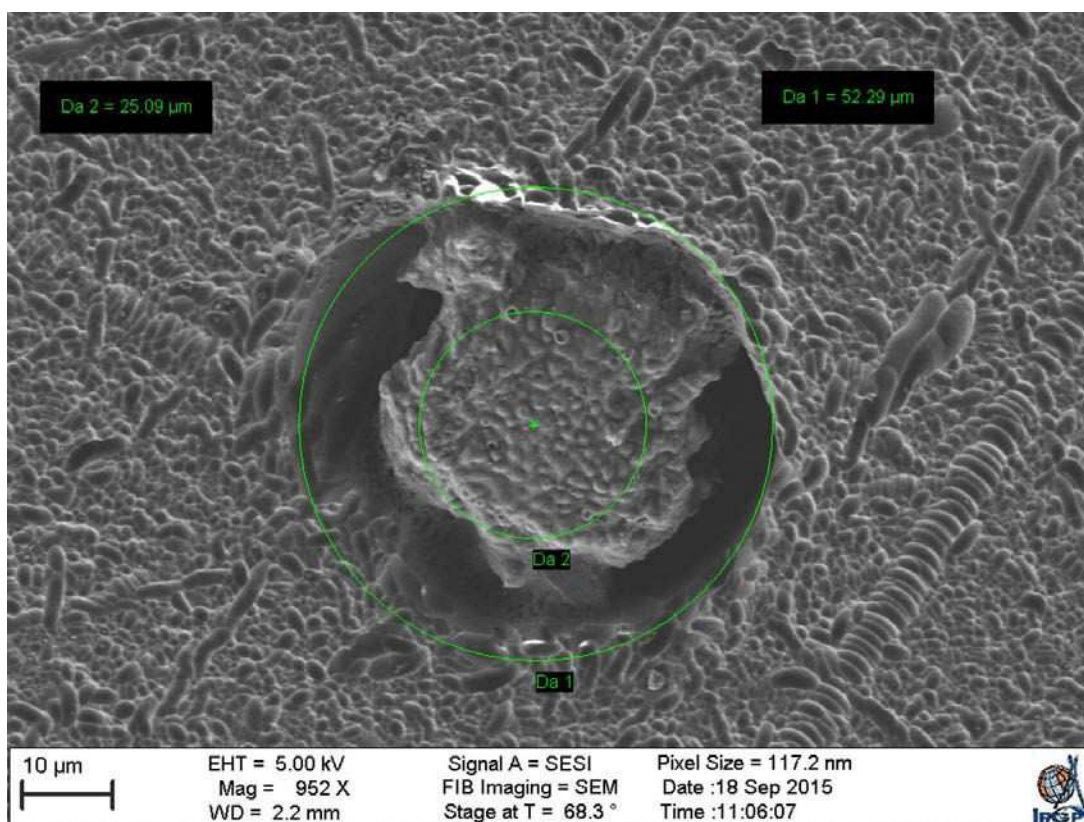


Figure III-39 : Image réalisée en microscopie électronique à balayage d'une électrode d'or commerciale de diamètre 25 μm après 12 cycles d'hybridation/polissage non polie en vue globale X1650

Il est possible de discerner sur cette image ce qui est probablement un film d'ADN. L'absence de rinçage avant l'imagerie a permis de conserver les sondes ADN déposées à la surface du verre autour de l'électrode qui sont visibles sur la Figure III-39. D'autre part, le diamètre du fil d'or de l'électrode est mesuré grâce aux images. La mesure du diamètre montre que ce dernier ne correspond plus à la mesure initiale et que le fil a été déformé et présente un diamètre de 31 μm , soit 20 % plus important que le diamètre théorique. De plus, le sertissage ne remplit plus son rôle d'étanchéité. En effet, il semble que l'or ait été corrodé à la surface de l'électrode rompant ainsi l'étanchéité. Le sertissage est ensuite détruit car assuré sur quelques millimètres seulement. Etant donné l'échelle de l'image, le creux formé mesure

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

environ 12 μm de largeur. Il est difficile d'évaluer sa profondeur puisque les images ne permettent pas d'observer le fond du creux. C'est probablement ce creux qui est indirectement responsable de l'augmentation du diamètre du fil d'or à l'extrémité. En effet, l'hypothèse la plus probable est que le polissage de l'électrode en l'absence de sertissage a entraîné l'écrasement du fil à l'extrémité et par conséquent une augmentation locale de son diamètre.

Les mêmes observations ont été menées sur une électrode ayant réalisé 12 cycles d'hybridation puis dénaturation Figure III-40. L'observation réalisée est sensiblement identique avec la formation d'un creux autour de l'électrode. Dans ce cas, le creux mesure environ 6 μm de largeur et la profondeur ne peut être mesurée précisément mais semble être de quelques microns. Le creux semble donc plus petit que pour l'électrode précédente. Cependant, l'augmentation du diamètre de l'extrémité de l'électrode est supérieure à l'augmentation pour l'électrode précédente avec un diamètre mesuré de 37 μm au lieu des 25 μm attendus. Globalement, le sertissage a été dégradé sur environ 18 μm de largeur et quelques microns de profondeur, de manière comparable à l'électrode précédente. Cette électrode n'a subi qu'un seul cycle d'immobilisation des sondes puis des dénaturations, menant à penser que la dégradation proviendrait probablement des procédures de mesures électrochimiques ou moins probablement du procédé d'hybridation.

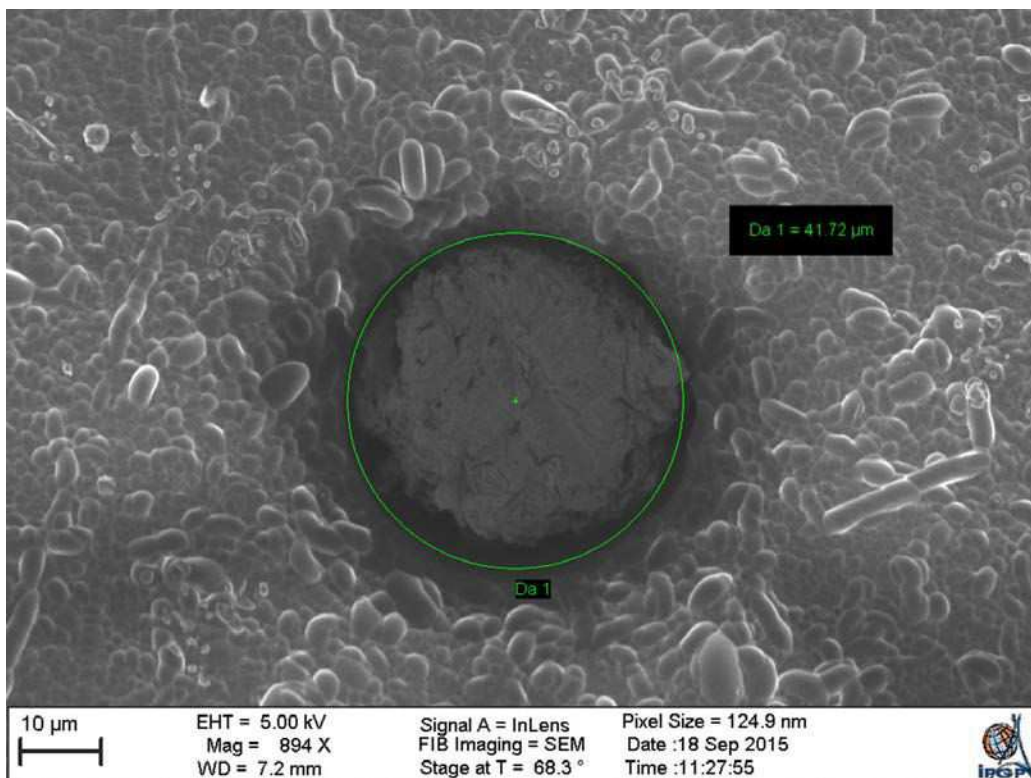


Figure III-40 : Image réalisée en microscopie électronique à balayage d'une électrode d'or commerciale de diamètre 25 μm après 12 cycles d'hybridation/dénaturation non polie en vue globale X1650

Biocapteurs sur UMEs unitaires

La corrosion de l'or peut donc expliquer les observations des manipulations précédentes concernant le vieillissement de l'électrode. En effet, l'augmentation du diamètre à l'extrémité d'une part et l'augmentation de la surface d'or exposée par la formation du creux d'autre part augmentent la surface active de l'électrode de manière incontrôlée et non mesurable. Cela explique donc en partie la variabilité des résultats observés puisque d'une mesure à l'autre, la surface de l'électrode peut sensiblement varier. D'autre part, la formation du creux autour de l'électrode entraîne l'adsorption des diverses molécules utilisées (sondes ADN, médiateur et intercalant rédox) sur le fil d'or qui n'est plus serti. Le polissage ne permet alors plus de retrouver une surface parfaitement propre et reproductible d'une mesure à l'autre. En effet, le nombre de sondes ADN et de médiateurs rédox adsorbés dans le creux vont créer une variabilité de la réponse de l'électrode. Il est donc nécessaire de résoudre ce problème soit en déterminant la cause exacte de la corrosion de l'or et en poursuivant les essais sur UMEs unitaires, soit en fabricant des électrodes unitaires peu soumises à ce problème de dégradation du sertissage entraînant l'augmentation de la surface exposée. Pour cela, l'utilisation d'électrodes lithographiées à usage unique est envisagée. C'est à l'exploration de ces deux voies que s'attacheront les paragraphes suivants.

5) Changement de sel support dans l'électrolyte

Dans un premier temps, la première piste suivie pour éviter la dégradation du verre consiste à modifier l'électrolyte utilisé pour les mesures puisqu'il semble être responsable de la dégradation de l'électrode. Comme évoqué précédemment, le couple médiateur/intercalant rédox semble être hors de cause dans la mesure où même en modifiant ce couple, la dégradation est toujours observée. Il est donc intéressant de modifier le sel support de l'électrolyte, actuellement le chlorure de sodium, connu pour être corrosif[168]. Pour tenter de pallier la dégradation, des essais sont réalisés avec du tétrafluoroborate de sodium 0,5 M, du nitrate de sodium 0,5 M et de l'hydrogénocarbonate de sodium 0,5 M. Les sels supports testés contiennent tous du sodium indispensable à l'hybridation des deux brins d'ADN. Pour évaluer l'efficacité du changement de sel support, une manipulation simple est réalisée pour reproduire le protocole de fabrication d'un biocapteur. L'électrode est d'abord modifiée par la monocouche de sondes ADN. Ensuite, le courant est mesuré dans l'électrolyte contenant le nouveau sel support. Puis, l'électrode est immergée pendant 30 minutes dans le tampon d'hybridation également modifié avec le nouveau sel support ne contenant pas d'ADN cible et enfin, le courant est de nouveau mesuré et l'électrode est polie pour réaliser un nouveau cycle. Ce cycle est répété 12 fois sur trois électrodes neuves avec les trois différents sels supports

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

puis les électrodes sont observées par MEB. Les images obtenues pour l'électrolyte contenant du tétrafluoroborate de sodium sont données sur la Figure III-41.

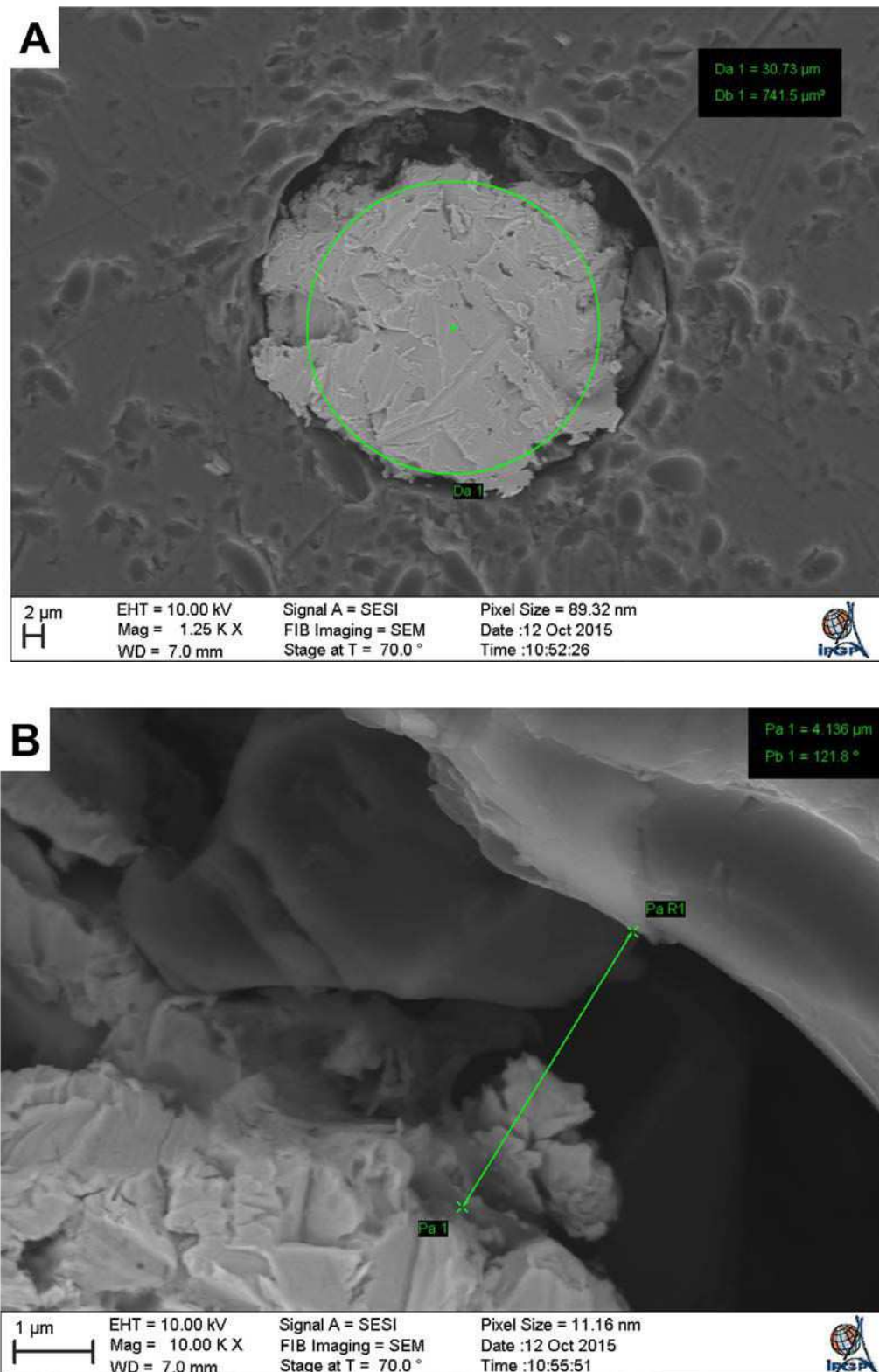
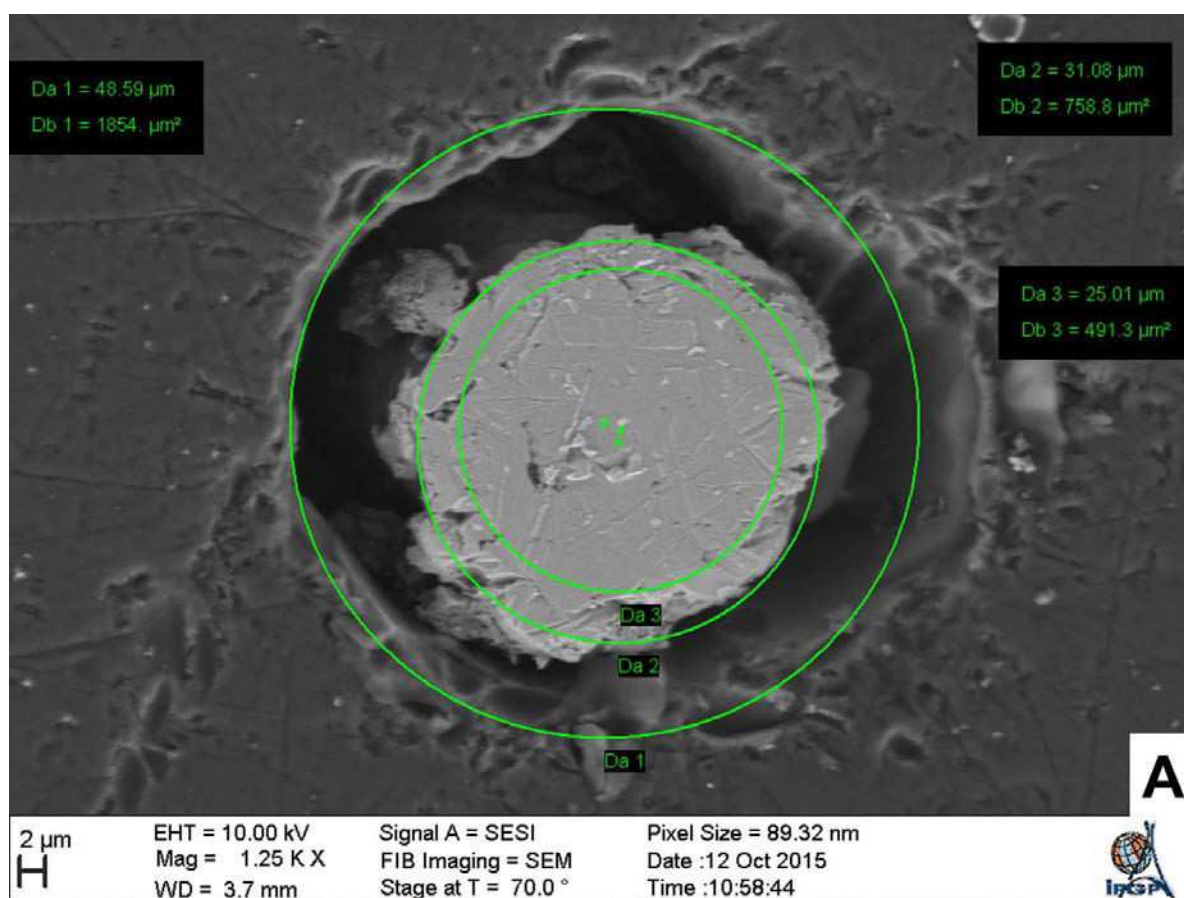


Figure III-41 : Image réalisée en microscopie électronique à balayage d'une électrode d'or commerciale de diamètre 25 μm après 12 cycles d'hybridation/polissage avec NaBF_4 comme sel support ; en vue globale X1750 (A) et en zoom sur le creux autour de l'électrode X19000 (B)

Biocapteurs sur UMEs unitaires

Sur ces images, la formation d'un creux autour du fil d'or peut être observée tout comme avec le chlorure de sodium. Cependant, le creux formé ici semble un peu plus petit que celui formé avec NaCl. Il mesure 4 μm de largeur d'un côté mais est presque inexistant de l'autre côté. De plus, la déformation de l'extrémité de l'électrode est plus irrégulière qu'avec NaCl. La surface présente une largeur d'environ 30 μm et une longueur de 40 μm environ. Globalement, le verre a été dégradé sur environ 20 microns de largeur. Ce sel support semble donc être aussi agressif que NaCl et ne permet pas d'éliminer la dégradation de l'électrode.



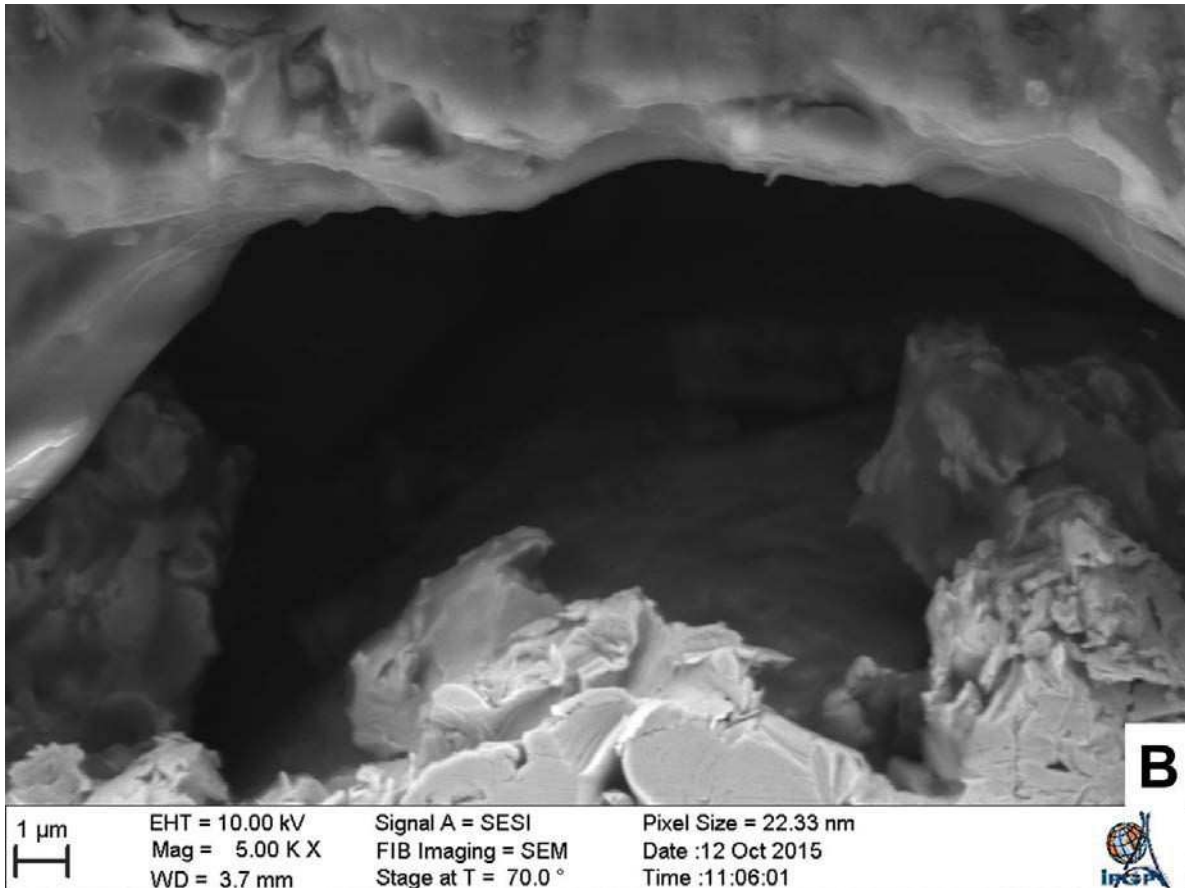


Figure III-42 : Image réalisée en microscopie électronique à balayage d'une électrode d'or commerciale de diamètre 25 μm après 12 cycles d'hybridation/polissage avec NaNO₃ comme sel support ; en vue globale X2000 (A) et en zoom sur le creux autour de l'électrode X7000 (B)

Sur la Figure III-42 sont présentées les images de l'électrode utilisée avec l'électrolyte contenant le nitrate de sodium. Dans ce cas aussi, la dégradation de l'extrémité de l'électrode est observée. La dégradation semble un peu moins importante que sur les électrodes utilisées dans NaCl avec un creux d'environ 9 μm de largeur et quelques microns de profondeur. L'élargissement de l'extrémité de l'électrode est moins conséquent avec un diamètre de 31 μm contre 25 μm théoriquement. Globalement le verre a été dégradé sur une largeur de 12 μm au lieu d'une vingtaine avec NaCl. Le nitrate de sodium est donc un peu moins corrosif pour les électrodes mais ne permet pas de résoudre le problème de vieillissement de l'électrode.

Biocapteurs sur UMEs unitaires

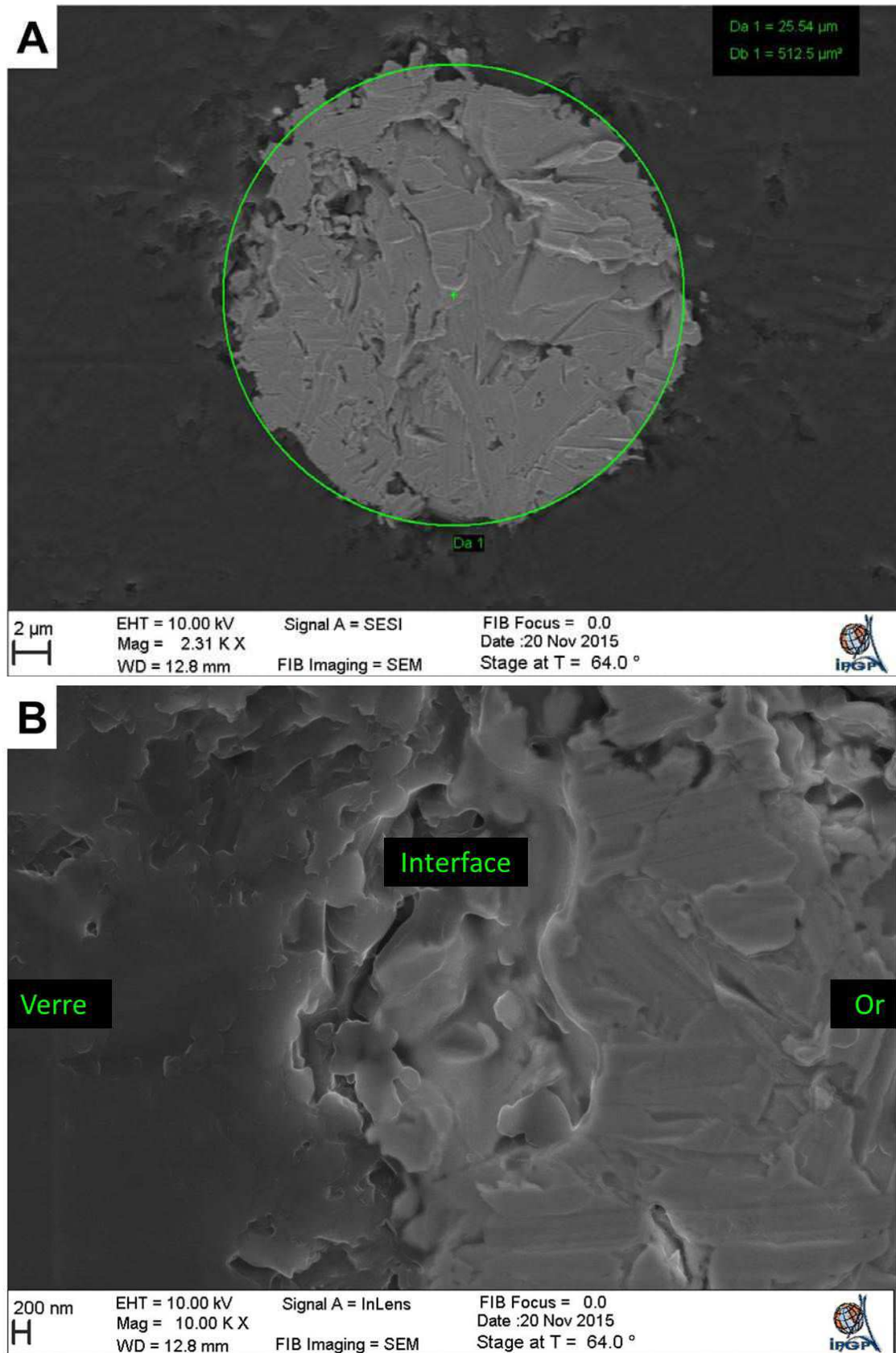


Figure III-43 : Image réalisée en microscopie électronique à balayage d'une électrode d'or commerciale de diamètre 25 µm après 12 cycles d'hybridation/polissage avec NaHCO₃ comme sel support ; en vue globale X3250 (A) et en zoom sur le sertissage autour de l'électrode X15000

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

Enfin, les images MEB réalisées après les tests de l'électrolyte contenant l'hydrogénécarbonate de sodium sont présentées sur la Figure III-43. Les observations en microscopie montrent des résultats satisfaisants. En effet, comme le montre la première image, le diamètre du disque d'or est de 25,5 μm soit très proche du diamètre théorique de 25 μm . D'autre part, il ne semble pas s'être formé de creux important autour du fil d'or. On observe une très légère dégradation du sertissage qui ne semble toutefois pas augmenter de manière significative la surface de l'électrode. Ces observations sont intéressantes pour deux raisons principales. La première est que l'absence de dégradation de l'électrode en changeant le sel support confirme bien que le sel support, plus précisément le contre-anion contenu dans l'électrolyte et le tampon d'hybridation est responsable du vieillissement de l'électrode. D'autre part, la dégradation des électrodes sur les 10 premiers cycles est évitée grâce à l'utilisation de l'hydrogénécarbonate de sodium. Ainsi, la variabilité des résultats est diminuée permettant une fiabilité accrue ainsi qu'une meilleure robustesse des capteurs. L'amélioration de l'électrolyte donnant lieu à des résultats plus reproductibles a permis d'entrevoir une légère possibilité d'amélioration de la reproductibilité en améliorant la stabilité de la monocouche de sonde ADN (Figure III-37).

6) Changement d'ancrage des sondes ADN

Optimisation du greffage de l'acide thioctique seul

En effet, suite à l'amélioration de la durée de vie des électrodes en utilisant l'hydrogénécarbonate de sodium comme sel support, l'optimisation de la formation et de la robustesse de la SAM peut être envisagée. Pour cela, de nouveaux groupements d'ancrages des sondes ADN ont été utilisés. Ces groupements sont des disulfures connus dans la littérature pour former des monocouches plus stables que les simples thiols. D'autre part, ils permettent d'obtenir deux points d'ancrages de la sonde ADN au lieu d'un seul. Dans un premier temps, c'est l'acide thioctique (Figure III-44) qui a fait l'objet de tests avant de former des SAMs avec des sondes ADN marquées par l'acide thioctique.

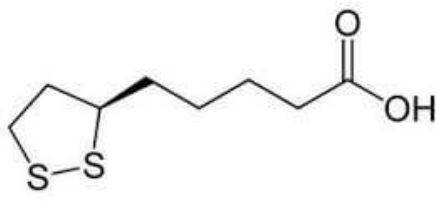


Figure III-44 : Structure de l'acide thioctique

Biocapteurs sur UMEs unitaires

Pour réaliser ces tests, l'adsorption de l'acide thioctique pour former une monocouche a été réalisée en faisant varier différents paramètres comme le temps d'adsorption, le solvant utilisé ou la concentration. Le courant a ensuite été mesuré à la surface de l'électrode dans l'électrolyte optimisé contenant NaHCO_3 comme sel support à 0,5 M et $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ comme médiateur rédox pour des raisons de simplicité mais également pour mieux comparer les performances du nouvel ancrage. En effet, en minimisant la gêne stérique du médiateur rédox, il est plus facile de comparer les performances de blocage de courant entre les différents ancrages des SAMs. L'électrode est ensuite immergée dans le tampon d'hybridation sans ADN cible pendant 30 minutes pour mimer une hybridation. Enfin, le courant est à nouveau mesuré et comparé à celui précédemment mesuré pour estimer la robustesse de la SAM. La même procédure est ensuite effectuée pour les autres ancrages testés.

Le premier test pour la formation d'une monocouche d'acide thioctique est réalisé en utilisant une solution aqueuse à 1 mM en acide thioctique et en immergeant l'UME durant deux heures. Le voltampérogramme obtenu est présenté sur la Figure III-45.

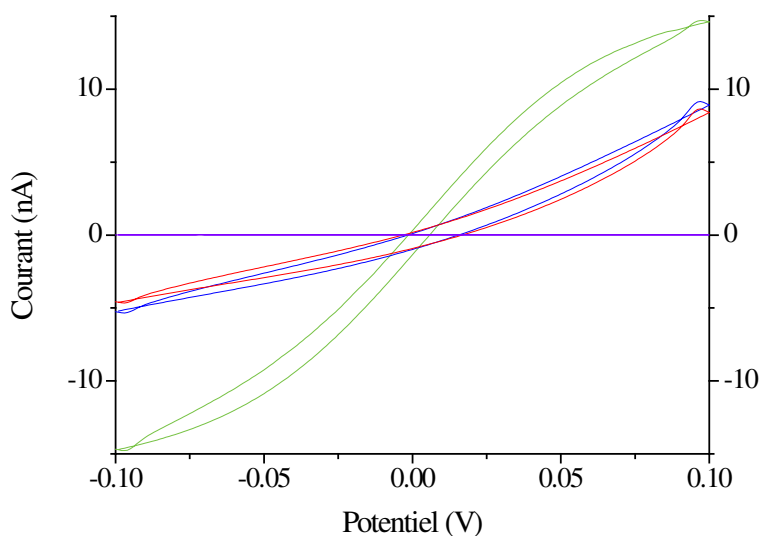


Figure III-45 : Vérification de la formation de la monocouche d'acide thioctique à 1 mM réalisée en deux heures à la surface de l'électrode d'or de 25 μm par évaluation du blocage du courant d'oxydo-réduction à la surface de l'électrode par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM à 50 mV/s; blanc NaHCO_3 0,5 M (violet), électrode non greffée (vert), électrode modifiée par la monocouche juste après adsorption (rouge), électrode modifiée par la monocouche après 30 minutes dans le tampon d'hybridation (bleu)

De la même façon que pour le greffage du diazonium ou que pour les sondes ADN marquées par un thiol, la qualité de la SAM formée est évaluée par le blocage du courant à la surface de l'électrode. En effet, à pH neutre, l'acide thioctique est sous sa forme carboxylate et permet donc la répulsion électrostatique entre le médiateur rédox et la SAM. Dans ces

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

premières conditions utilisées, un blocage correct du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure est mesuré mais pas suffisant pour égaler ou dépasser les performances des thiols surtout en oxydation. En effet, le courant mesuré sur l'électrode modifiée à 0,1 V est de 8,65 nA contre 14,7 nA sur l'électrode non greffée, ce qui correspond à un blocage du courant d'environ 41 %. Cependant, il semble que le blocage du courant soit plus fort en réduction à -0,1 V. A ce potentiel, le courant mesuré sur l'électrode modifiée vaut -4,63 nA contre -14,7 nA sur l'électrode non greffée donnant un blocage du courant à la surface de l'électrode de 69 %. Ce blocage n'est donc pas très éloigné des valeurs obtenues avec la monocouche de sondes ADN thiolées. Ces performances de blocage du transfert électronique assez faibles en comparaison avec les monocouches de thiols sont causées par une densité de la monocouche trop faible. Il est donc intéressant de faire varier les conditions de formation de la monocouche pour permettre d'obtenir de meilleures performances et ainsi faire diminuer le courant résiduel à la surface des biocapteurs. L'optimisation des conditions commence par la concentration d'acide thioctique dans la solution. Une solution aqueuse à 5 mM en acide thioctique a donc été réalisée pour former une SAM sur deux heures. L'évaluation des performances de cette SAM est donnée sur la Figure III-46.

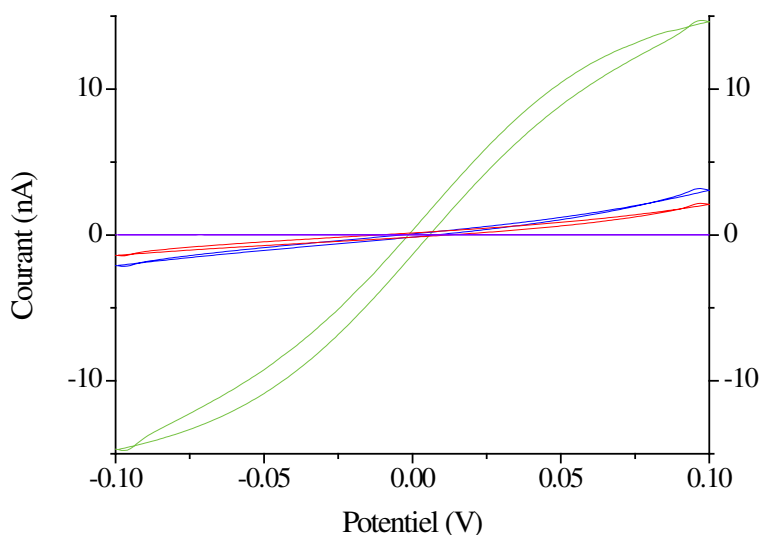


Figure III-46 : Vérification de la formation de la monocouche d'acide thioctique à 5 mM réalisée en deux heures à la surface de l'électrode d'or de 25 μm par évaluation du blocage du courant d'oxydo-réduction à la surface de l'électrode par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM à 50 mV/s ; blanc NaHCO_3 0,5 M (violet), électrode non greffée (vert), électrode modifiée par la monocouche juste après adsorption (rouge), modifiée par la monocouche après 30 minutes dans le tampon d'hybridation (bleu)

L'augmentation de la concentration en acide thioctique a permis d'obtenir un blocage du courant plus important à la surface de l'UME tout en conservant la robustesse de la SAM.

Biocapteurs sur UMEs unitaires

En effet, en oxydation, le courant mesuré est de 2,17 nA correspondant à une diminution du courant de 85 % à la surface de l'électrode. En réduction, à -0,1 V, le courant mesuré est -1,41 nA, donnant un blocage du courant efficace à 92 %. Il semble donc que l'augmentation de la concentration à 5 mM permette de former en deux heures des monocouches d'acide thioctique plus compactes qu'avec 1 mM et donc permettant un meilleur blocage du courant comme le montre la Figure III-47.

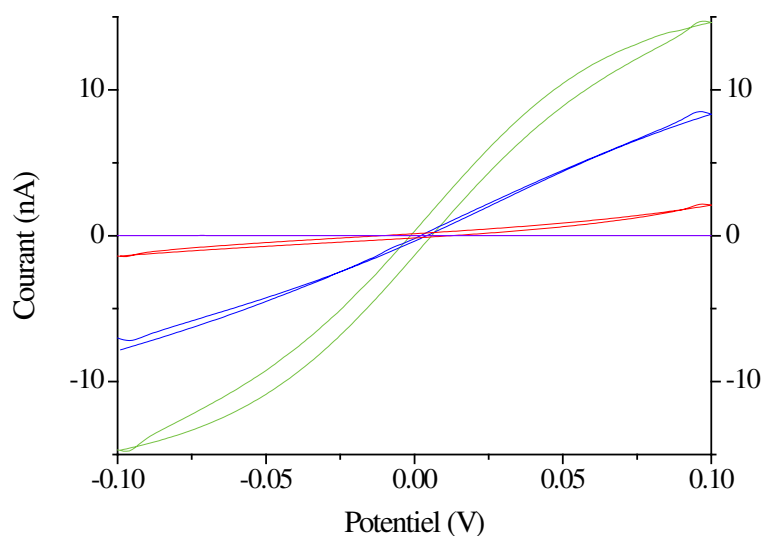


Figure III-47 : Comparaison des performances de monocouches formées à la surface de l'électrode d'or de 25 µm par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM à 50 mV/s ; blanc NaHCO_3 0,5 M (violet), électrode non greffée (vert), électrode modifiée par la monocouche d'acide thioctique à 5 mM réalisée en deux heures (rouge), électrode modifiée par la monocouche de sondes ADN thiolées réalisée en deux heures (bleu)

Il a également été testé une solution aqueuse à 10 mM en acide thioctique. Cependant, la solubilisation de l'acide thioctique n'est pas complète malgré l'utilisation d'un bain à ultrasons. La concentration d'acide thioctique dans l'eau sera donc limitée à 5 mM et des concentrations plus élevées seront testées avec l'étude sur l'influence du solvant dans lequel est réalisée la monocouche.

La variation du temps d'immersion de l'UME dans la solution d'acide thioctique est un paramètre à étudier pour la formation des monocouches. Des temps d'adsorption de deux heures et 24 heures ont donc été comparés en utilisant une solution aqueuse à 5 mM en acide thioctique. Les résultats de cette comparaison sont donnés ci-dessous avec la Figure III-48.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

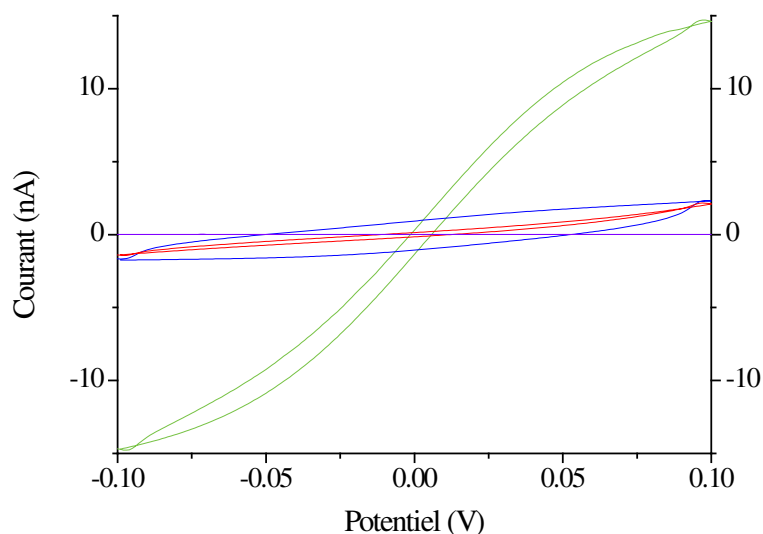


Figure III-48 : Comparaison des performances de monocouches formées à la surface de l'électrode d'or de 25 μm par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM à 50 mV/s ; blanc NaHCO_3 0,5 M (violet), électrode non greffée (vert), électrode modifiée par la monocouche d'acide thioictique à 5 mM réalisée en deux heures (rouge), électrode modifiée par la monocouche d'acide thioictique à 5 mM réalisée en 24h (bleu)

La variation du temps d'adsorption de l'acide thioictique à la surface de l'électrode ne semble pas modifier les performances des monocouches formées. En effet, pour le dépôt réalisé en deux heures, le blocage est efficace à 85 % et à 92 % respectivement en oxydation à 0,1 V et en réduction à -0,1 V. Pour la monocouche formée après 24 heures d'adsorption de l'acide thioictique, le courant mesuré à 0,1 V est de 2,33 nA soit un blocage du courant de 84 %. En réduction, à -0,1 V, le courant mesuré est de -1,71 nA correspondant à un blocage efficace à 88 %. L'efficacité du blocage du courant pour les monocouches formées en deux heures et en 24 heures est très proche et semble indiquer que l'augmentation du temps d'adsorption au-delà de deux heures ne permet pas d'améliorer la formation de la SAM. Cette observation tend à confirmer qu'il n'est pas nécessaire d'immerger les UMEs plus de deux heures pour former une monocouche auto-assemblée comme indiqué dans la littérature.

Enfin, il est possible de faire varier un dernier paramètre pour optimiser la formation de SAMs qui est le solvant utilisé pour dissoudre l'acide thioictique. En effet, la solubilité de cette molécule dans l'eau n'est pas très élevée (proche de 1 mM)[169] et il peut être intéressant d'envisager un solvant organique comme l'éthanol pour mieux la solubiliser et évaluer les performances des monocouches formées à partir de solutions concentrées. L'utilisation de l'éthanol devrait permettre une meilleure solubilisation de l'acide thioictique (AT)[170] et devrait donc donner la possibilité d'expérimenter des solutions de concentrations plus élevées. Des essais ont donc été menés avec des solutions d'AT à 5 mM et 10 mM dans

Biocapteurs sur UMEs unitaires

l'éthanol avec une immersion de l'UME pendant deux heures. Les résultats de ces tests sont présentés sur la Figure III-49 ci-dessous.

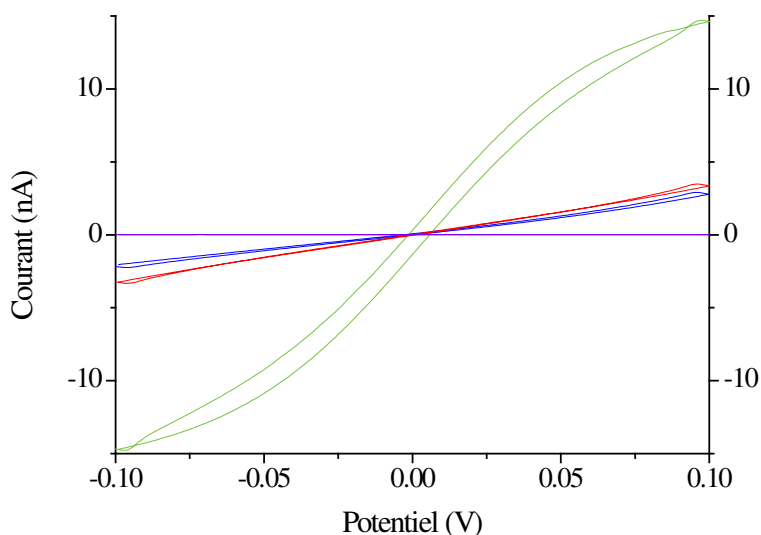


Figure III-49 : Comparaison des performances de monocouches formées à la surface de l'électrode d'or de 25 µm par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM à 50 mV/s ; blanc NaHCO_3 0,5 M (violet), électrode non greffée (vert), électrode modifiée par la monocouche d'acide thioctique à 5 mM dans l'éthanol réalisée en deux heures (rouge), électrode modifiée par la monocouche d'acide thioctique à 10 mM dans l'éthanol réalisée en deux heures (bleu)

En premier lieu et comme attendu, l'éthanol permet de mieux solubiliser l'acide thioctique et permet d'obtenir une solution à 10 mM sans utiliser les ultrasons, contrairement aux solutions aqueuses pour lesquelles les ultrasons étaient nécessaires dès 5 mM. D'autre part, les monocouches formées par l'acide thioctique semblent présenter des performances intéressantes. Pour la monocouche formée avec l'acide thioctique à 5 mM, le courant mesuré en oxydation à 0,1 V est de 3,48 nA soit un blocage du courant de 76 %. A -0,1 V, le courant mesuré est de -3,23 nA, ce qui représente un blocage du courant de 78 %. En résumé, dans des conditions de concentration et de temps d'adsorption similaires, la monocouche formée dans l'éthanol bloque le courant moins efficacement que celle formée dans l'eau (85 % en oxydation et 92 % en réduction). Il semble donc que les monocouches formées dans l'éthanol sont moins compactes que celles formées dans l'eau.

Ce phénomène peut provenir de la solvataion de l'acide thioctique dans les deux solvants. En effet, dans l'eau, la solvataion de cette molécule présentant une chaîne carbonée assez longue n'est pas optimale. Il est donc probable que lors de l'adsorption sur la surface d'or, les molécules d'acide thioctique se place dans une configuration où elles sont très proches les unes des autres pour limiter les interactions avec l'eau formant une couche très

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

dense. Au contraire dans l'éthanol apolaire où la solvataion de la chaîne carbonée est meilleure, la couche formée est moins dense en raison des interactions favorables existant avec le solvant.

Il est intéressant de comparer les monocouches formées dans l'eau avec l'acide thioctique à 5 mM pendant deux heures et dans l'éthanol avec l'acide thioctique à 10 mM pendant deux heures. D'après la Figure III-49, le blocage du courant est plus efficace avec la solution à 10 mM dans l'éthanol qu'avec celle à 5 mM dans l'éthanol. A 0,1 V, le courant mesuré vaut 2,91 nA et le courant est bloqué à 80 %. Pour la réduction à -0,1 V, le courant est bloqué à 85 % avec une valeur de courant de -2,14 nA. Encore une fois le blocage est très satisfaisant puisque supérieur à 80% mais ces valeurs sont inférieures à celles obtenue pour la monocouche formée dans l'eau avec une solution à 5 mM (85 % en oxydation et 92 % en réduction). L'éthanol permet donc préparer des solutions d'acide thioctique plus concentrées que dans l'eau mais ce solvant ne permet pas de former des couches aussi denses qu'avec les solutions aqueuses. Les performances entre monocouches formées dans l'eau à 5 mM et dans l'éthanol à 10 mM sont quasiment semblables mais légèrement meilleures avec l'eau. Il n'est donc pas nécessaire de conserver des conditions utilisant un solvant plus cher et consommant plus de réactif. Les conditions optimisées pour la formation de monocouches d'acide thioctique sont donc l'immersion de l'UME polie dans une solution aqueuse d'acide thioctique à 5 mM pendant deux heures.

Biocapteurs avec sondes ADN marquées par l'acide thioctique

Maintenant que ces conditions de greffage sont optimisées, la fabrication de biocapteurs en utilisant des sondes ADN marquées par l'acide thioctique est réalisée. Cependant, la concentration de la solution aqueuse d'ADN marqué ne peut atteindre 5 mM étant livrée à 10^{-4} M. La concentration utilisée sera donc 10^{-5} M, la plus concentrée possible. L'utilisation de cette concentration de 10^{-5} M ne change rien à l'étape de formation de la monocouche, le nombre de fonctions Acide Thioctique étant toujours en large excès par rapport à la surface d'électrode utilisée. Dans un premier temps, un essai pour évaluer le blocage du courant par la monocouche de sondes marquées est réalisé. Les résultats sont présentés sur la Figure III-50.

Biocapteurs sur UMEs unitaires

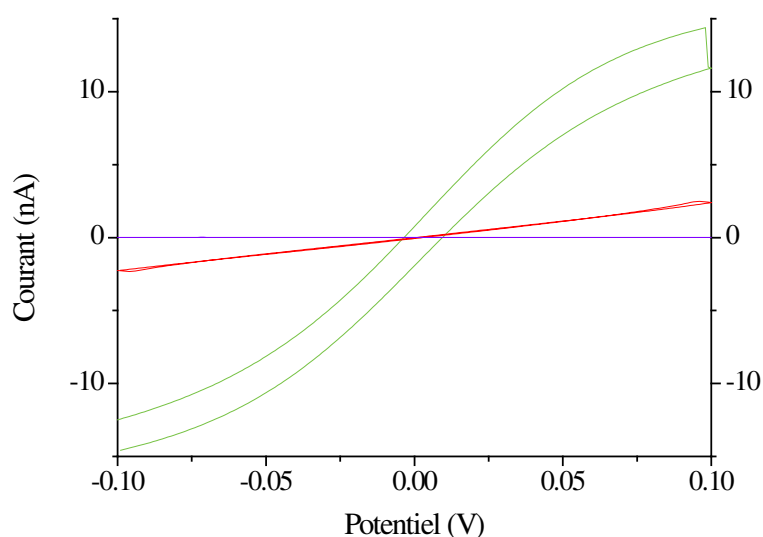


Figure III-50 : Vérification de la formation de la monocouche de sondes ADN marquées par l'acide thioctique à 10^{-5} M réalisée en deux heures à la surface d'une électrode d'or commerciale de $25 \mu\text{m}$ par évaluation du blocage du courant d'oxydo-réduction à la surface de l'électrode par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM à 50 mV/s ; blanc NaHCO_3 0,5 M (violet), électrode non greffée (vert), électrode modifiée par la monocouche juste après adsorption (rouge)

Il s'agit simplement ici de vérifier que la monocouche est bien formée et bloque suffisamment le courant malgré une concentration plus faible en disulfure que lors de l'optimisation des conditions. Le courant mesuré en oxydation à 0,1 V à la surface de l'électrode modifiée par la monocouche de sondes ADN marquées par l'acide thioctique est de 2,48 nA soit un blocage du courant de 81 %. En réduction, le courant mesuré à -0,1 V vaut -2,29 nA représentant un blocage du courant de 83 %. Le blocage du courant à la surface de la monocouche est donc efficace même si la concentration en sondes est plus faible que pour l'acide thioctique. Les sondes ADN sont beaucoup plus volumineuses que la molécule d'acide thioctique et sont aussi plus chargées négativement. C'est la raison pour laquelle le blocage du courant est très satisfaisant et permet de poursuivre par l'utilisation de la monocouche pour former un biocapteur. Un premier biocapteur a donc été fabriqué pour détecter la cible à une concentration de 10^{-6} M. Le voltampérogramme obtenu est présenté sur la Figure III-51.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

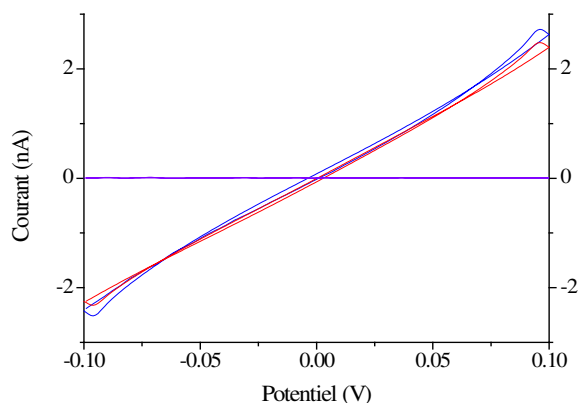


Figure III-51 : Exemple de biocapteur réalisé sur une électrode d'or commerciale de 25 µm avec une concentration en cible complémentaire de 10^{-6} M ; blanc NaHCO₃ 0,5 M (violet), électrode modifiée par la sonde ADN marquée par l'acide thioctique seule (rouge), électrode modifiée par la sonde ADN marquée par l'acide thioctique hybridée à la cible 10^{-6} M (bleu)

La différence de courant avant et après l'hybridation est faible. En effet, en oxydation, le courant passe de 2,48 à 2,72 nA, soit une augmentation faible d'à peine 10 %. En réduction, le courant passe de -2,29 à -2,45 nA soit une augmentation de l'ordre de 7 %. Ces augmentations sont très faibles pour une concentration aussi importante en cible et laissent penser que le capteur n'est pas fonctionnel. C'est pourquoi ce capteur a été fabriqué deux autres fois après polissage pour évaluer le fonctionnement. Les résultats obtenus sur les trois biocapteurs sont résumés par la Figure III-52. Les valeurs absolues du courant en oxydation et réduction sont moyennées comme pour l'histogramme des biocapteurs en conditions classiques.

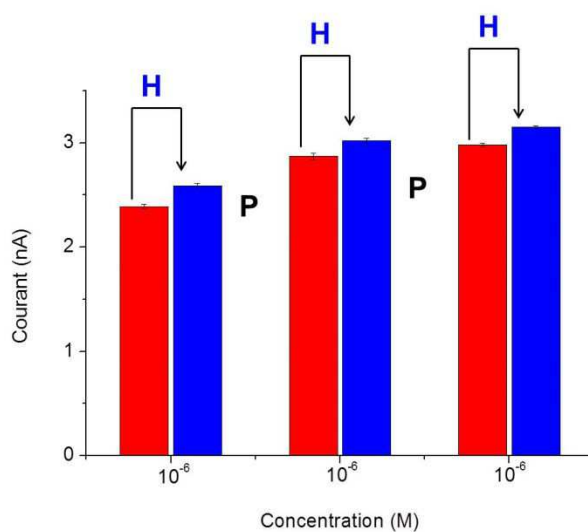


Figure III-52 : Histogramme montrant le courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure mesuré à l'électrode au cours des cycles d'hybridation et polissage de l'électrode pour une concentration en cible de 10^{-6} M ; électrode modifiée par la sonde marquée par l'acide thioctique seule (rouge), électrode modifiée par la sonde marquée par l'acide thioctique hybridée (bleu), H : Hybridation de la cible, P : Polissage de l'électrode

Biocapteurs sur UMEs unitaires

Les résultats sur les trois biocapteurs testés sont semblables. Le courant moyen pour la sonde seule varie entre 2,39 et 2,98 nA pour les différents biocapteurs. Le blocage du courant est similaire et les monocouches sont bien formées et efficaces. Le courant à la surface de l'électrode après hybridation varie entre 2,59 et 3,15 nA. L'augmentation moyenne du courant pour le premier capteur est de 8 %. Dans le deuxième cas, l'augmentation moyenne est de 5 % et dans le troisième cas, l'augmentation moyenne du courant est de 6 %. Le comportement de ces biocapteurs est donc très semblable et montre un dysfonctionnement du système dans ces conditions.

Pour confirmer de manière certaine que le capteur ne fonctionne pas, il est nécessaire de comparer le courant entre une électrode modifiée par la sonde ADN simple brin, et modifiée par la sonde ADN déjà hybridée en solution à sa cible en excès. L'hybridation préalable de la sonde et de la cible permet d'être sûr de la présence du duplex à la surface de l'électrode et d'obtenir la catalyse du transfert d'électrons en présence de l'intercalant. Le résultat attendu est donc un courant plus élevé dans le cas du duplex que dans le cas de la sonde seule. Le résultat obtenu est présenté sur la Figure III-53.

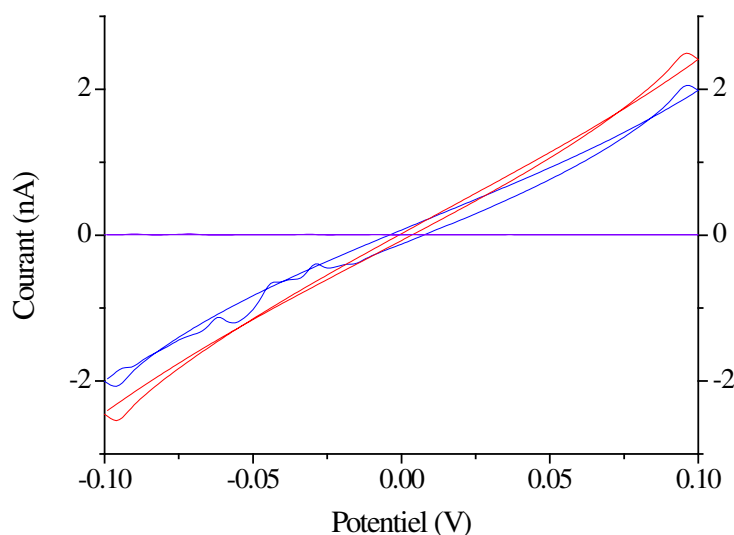


Figure III-53 : Comparaison des voltampérogrammes obtenus pour une électrode modifiée par la sonde ADN marquée AT seule (rouge) et pour une électrode modifiée par le duplex ADN marqué AT préalablement formé (bleu)

Dans cette expérience, contrairement au résultat attendu, le courant sur la surface modifiée par le duplex est légèrement inférieur à celui sur la surface modifiée par la sonde seule. En effet, à 0,1 V, le courant mesuré à la surface de l'électrode modifiée par le duplex est de 2,05 nA contre 2,50 nA sur l'électrode modifiée par la sonde seule. En réduction à

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

-0,1 V, le courant mesuré sur l'électrode modifiée par le duplex est de -1,97 nA contre -2,44 nA sur l'électrode modifiée par la sonde seule. Il n'y a donc pas d'augmentation du courant malgré la présence du duplex ADN et de bleu de méthylène. Ce résultat confirme donc le problème de fonctionnement du capteur observé dans l'expérience précédente.

Deux raisons semblent maintenant probables pour expliquer ce phénomène. La première est que la nature de cette nouvelle monocouche de sondes marquées par l'acide thioctique empêche le transfert électronique d'avoir lieu malgré la présence d'intercalant rédox. En effet, le seul paramètre modifié par rapport aux premiers biocapteurs fonctionnels est le marquage de la sonde pour l'adsorption sur l'électrode. Il est donc probable que le marquage commercial de la sonde ADN soit responsable du blocage du transfert électronique en raison de sa longueur trop importante, ou de sa conformation.

La seconde raison envisageable est la présence d'une erreur au sein de la séquence ADN de la nouvelle sonde marquée. En effet, la cible ayant déjà été utilisée est hors de cause. Ainsi, l'hybridation de la sonde et de la cible est impossible et le biocapteur n'est pas fonctionnel. Cette hypothèse est facilement vérifiable en effectuant une électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Pour cela, quelques gouttes de la solution de sonde ADN et quelques gouttes d'une solution de sonde et de cible complémentaire en excès sont déposées à la surface du gel poreux. En appliquant un potentiel de part et d'autre du gel, les brins d'ADN migrent à travers le gel. Les brins de plus faible masse molaire migrent alors plus loin que ceux de masse molaire plus élevée. Afin de suivre la migration des brins, un indicateur spécifique fluorescent sous rayonnement ultra-violet (UV) est utilisé. Ainsi deux fronts de migration différents pour les ADN simple brin et double brin sont observables permettant de savoir s'il y a eu hybridation de la sonde et de la cible complémentaire. Les résultats de l'électrophorèse sont présentés sur la Figure III-54.

Biocapteurs sur UMEs unitaires

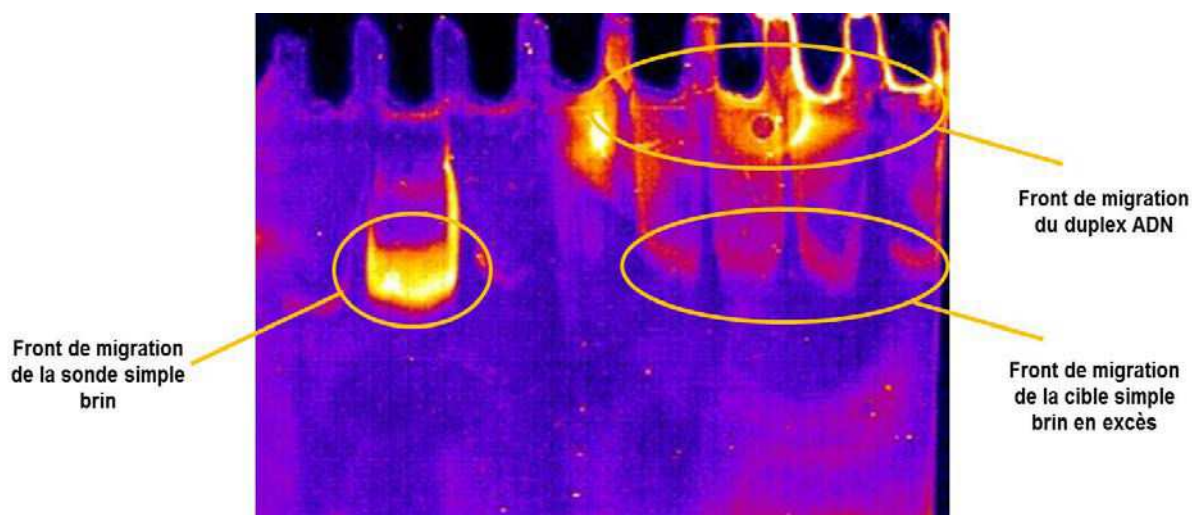


Figure III-54 : Photo du gel de polyacrylamide utilisé pour réaliser l'électrophorèse de la sonde ADN marquée par l'acide thioctique seule et de la sonde marquée par l'acide thioctique en présence de sonde complémentaire en excès

Lors de cette électrophorèse, un dépôt de sonde marquée simple brin a été effectué sur la gauche du gel dans un puits. Sur la droite, un dépôt de solution de sonde marquée et de cible complémentaire en excès a été réalisé dans trois puits pour être sûr d'observer la migration. Après l'application du potentiel pendant deux heures, trois fronts de migration différents sont observés. A gauche, le front de migration est bien net et correspond donc à la sonde marquée acide thioctique seule qui a migré à travers le gel. L'intensité est forte au niveau du front et faible dans le puits. La totalité de la solution déposée a donc migré dans le gel. Du côté droit, deux fronts distincts sont nettement distingués. Le front le plus bas représente une migration similaire à celle observée du côté gauche du gel. Ce front correspond à la migration des cibles complémentaires en excès et non hybridées. Il est donc normal de retrouver ce front correspondant à un simple brin de même longueur à la même hauteur que la sonde seule. De plus, l'intensité relativement faible confirme qu'il s'agit de l'excès de cible. Enfin, le second front du côté droit est beaucoup moins net. La migration a été très faible voire quasi-nulle puisqu'il reste de la solution dans les puits. Cela indique donc que l'ADN déposé dans ces puits possède un poids moléculaire beaucoup plus élevé. Cela correspond donc bien à un duplex ADN. Le duplex est volumineux et migre difficilement sur la hauteur du gel du fait de la réticulation. C'est pourquoi la diffusion des duplex est observée à droite et à gauche des puits de dépôt. L'intensité est élevée et du même ordre que celle observée pour la sonde seule à gauche. La quantité d'ADN hybridée à droite est donc semblable à celle de sonde seule à gauche. La totalité de l'ADN sonde déposé est donc hybridée.

En résumé, la sonde et la cible ADN utilisées sont bien complémentaires et ce n'est donc pas pour cette raison que le transfert électronique n'a pas lieu dans les biocapteurs. Dans

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

le même temps, la structure du marquage de la sonde a été demandée auprès du fournisseur. Cette structure est fournie sur la Figure III-55.

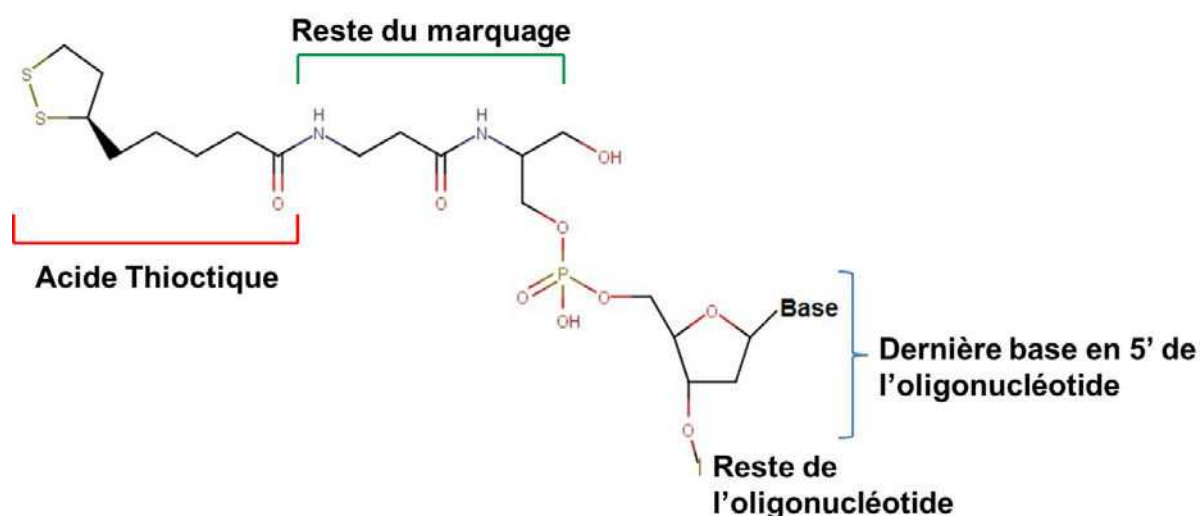


Figure III-55 : Détail de la modification (AcTh) de la sonde complémentaire du miRNA 215 par l'acide thioctique

Cette Figure III-55 détaillant la modification effectuée sur la sonde ADN pour obtenir un ancrage acide thioctique présente 17 atomes depuis le soufre dans le cycle jusqu'à l'oxygène du groupement phosphate côté nucléotide. Cette chaîne majoritairement carbonée non conjuguée est donc très longue et n'est pas favorable au transfert électronique. Une fois les électrons parvenus jusqu'au groupement phosphate par le duplex ADN, ils ne peuvent être transférés à la surface de l'électrode par effet tunnel, la distance étant trop grande. C'est donc la longueur de la chaîne non conjuguée du marquage de l'ADN qui est probablement responsable du blocage du transfert d'électrons. Il est alors nécessaire de trouver le moyen de raccourcir cette chaîne ou de changer d'ancrage pour la sonde ADN. Pour pallier ce problème, ces deux voies ont été envisagées, à commencer par raccourcir la chaîne en utilisant l'acide thioctique et le couplage peptidique d'une sonde ADN marquée amine. Dans un deuxième temps, de nouvelles sondes marquées par les unités DTAP ont été utilisées.

Biocapteurs avec ancrage acide thioctique et couplage peptidique de la sonde ADN

La stratégie employée ici consiste à utiliser le greffage de l'acide thioctique optimisé un peu plus tôt et à utiliser le couplage peptidique avec la sonde ADN marquée par une amine pour l'immobilisation. Cette technique permet de raccourcir la chaîne carbonée non conjuguée mais amène un paramètre de plus à gérer concernant l'efficacité et la robustesse du couplage. Dans ce cas, 11 atomes forment la chaîne carbonée non conjuguée entre la surface

Biocapteurs sur UMEs unitaires

d'or et la sonde ADN. La réponse du biocapteur dans ces conditions peut alors être étudiée. Les voltampérogrammes obtenus pour ce biocapteur sont présentés sur la Figure III-56.

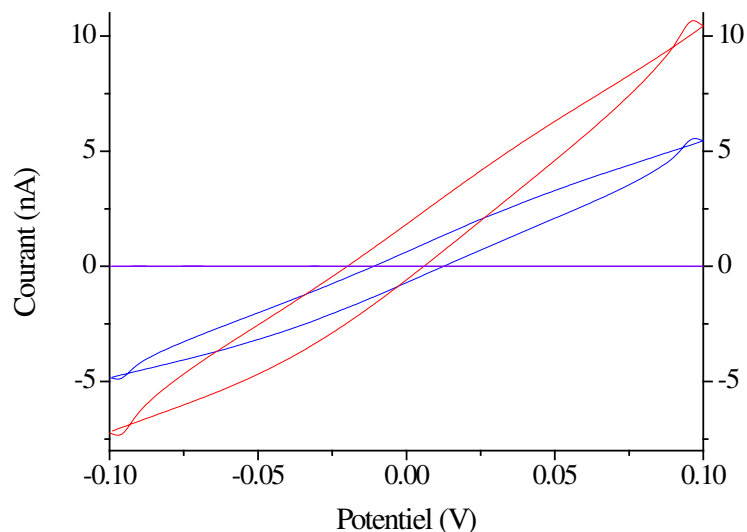


Figure III-56 : Exemple de biocapteur réalisé sur une électrode d'or commerciale de 25 μm avec une concentration en cible complémentaire de 10^{-6} M ; blanc NaHCO_3 0,5 M (violet), électrode modifiée par l'acide thioctique et couplage peptidique de la sonde marquée par une amine seule (rouge), électrode modifiée par l'acide thioctique et couplage peptidique de la sonde marquée par une amine hybridée à la cible 10^{-6} M (bleu)

Le courant mesuré après hybridation est plus faible que celui mesuré sur l'électrode modifiée par la sonde seule. En effet, à 0,1 V, le courant mesuré après hybridation est de 10,7 nA avant hybridation contre 5,50 nA après hybridation. De la même façon en réduction, le courant avant hybridation vaut -7,24 nA contre -4,85 nA après hybridation. Le courant diminue donc après l'hybridation. Ce type de comportement se rapproche de celui observé avec les sondes marquées par l'acide thioctique où la longueur de chaîne non conjuguée ne permettait pas le transfert électronique. Ce biocapteur a été réalisé à trois reprises présentant les mêmes résultats de diminution du courant. Avec 11 atomes, la chaîne carbonée non conjuguée est donc encore trop longue et empêche le transfert des électrons par effet tunnel entre la dernière base de l'ADN et la surface de l'électrode. Il est donc nécessaire de trouver d'autres moyens d'ancrage des sondes ADN sur la surface d'or.

Biocapteurs utilisant une sonde ADN marquée par une unité DTAP

C'est la dernière voie explorée pour optimiser les biocapteurs sur électrodes unitaires d'or. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser des sondes ADN marquées par une molécule présentant un cycle avec un disulfure et une chaîne carbonée non conjuguée assez courte. Le DTAP (Figure III-57) correspond parfaitement à cette description et a donc été utilisé pour

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

marquer les sondes ADN. Le protocole décrit dans le chapitre II (p.81) a déjà été optimisé pour la formation de monocouches sur des électrodes d'or. Aucune autre optimisation n'a donc été réalisée et les essais se sont donc limités à fabriquer des biocapteurs.

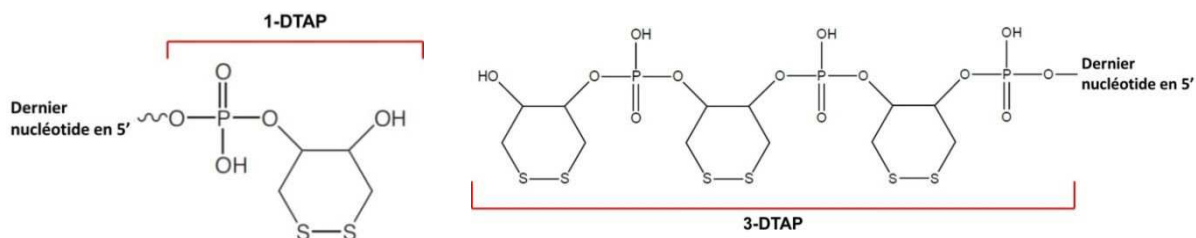


Figure III-57 : Détail de la modification d'une sonde ADN par le 1-DTAP (gauche) ou le 3-DTAP (droite)

Après la formation de la monocouche pendant 15 heures, le courant est mesuré à la surface de l'UME modifiée pour évaluer le blocage du courant. Les résultats sont présentés sur la Figure III-58.

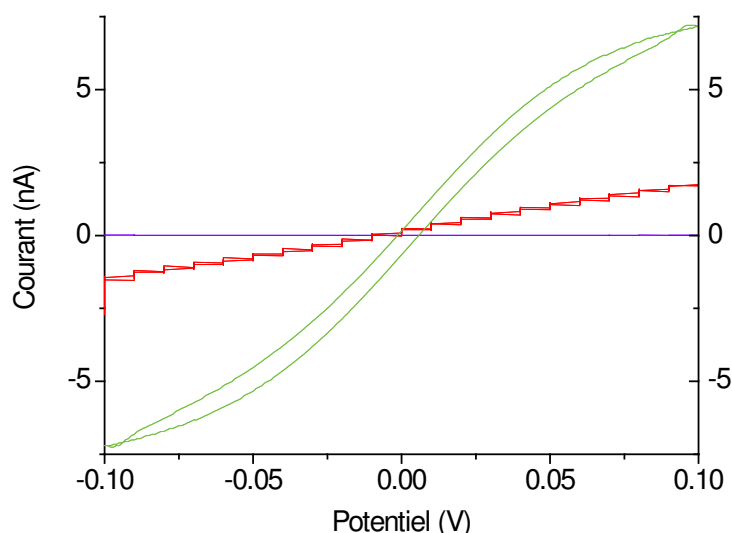


Figure III-58 : Vérification de la formation de la monocouche de sondes ADN marquées par le 1-DTAP à 10^{-5} M réalisée en 15 heures à la surface d'une électrode d'or commerciale de $25 \mu\text{m}$ par évaluation du blocage du courant d'oxydo-réduction à la surface de l'électrode par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM à 50 mV/s ; blanc NaHCO_3 0,5 M (violet), électrode non greffée (vert), électrode modifiée par la monocouche juste après adsorption (rouge)

La monocouche formée présente un blocage du courant satisfaisant. En effet, en oxydation, à 0,1 V, le courant mesuré vaut 1,82 nA et représente un blocage du courant à la surface de l'électrode de 75 %. En réduction, le courant mesuré est -1,48 nA et le courant est donc bloqué à 80 %. Les performances de la monocouche de sondes ADN marquées par le 1-DTAP sont satisfaisantes et meilleures que celles observées sur les dispositifs précédemment présentés. Il est alors possible de passer à la fabrication de biocapteurs utilisant

Biocapteurs sur UMEs unitaires

ces sondes ADN marquées 1-DTAP. Dans un premier temps, le biocapteur est testé pour une concentration en cible complémentaire de 10^{-6} M. Les résultats obtenus pour ce premier essai sont présentés sur la Figure III-59.

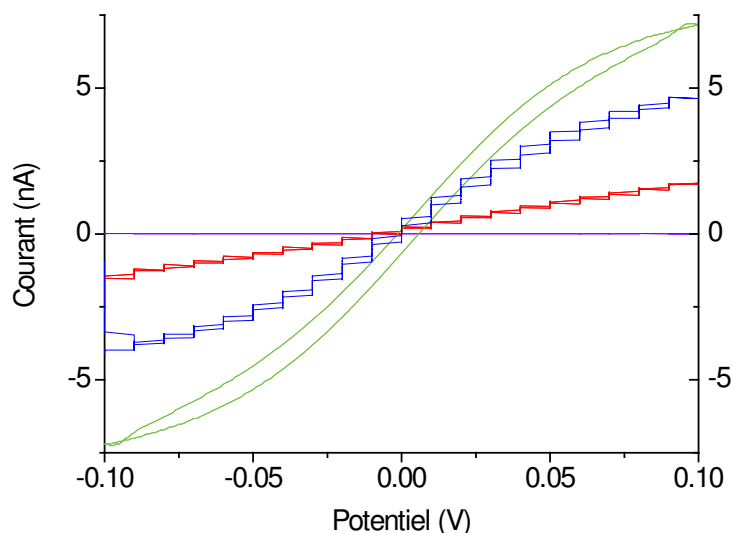


Figure III-59 : Exemple de biocapteur réalisé sur une électrode d'or commerciale de $25 \mu\text{m}$ avec une concentration en cible complémentaire de 10^{-6} M ; blanc NaCl 0,5 M (violet), UME non greffée (vert), électrode modifiée par la sonde ADN marquée par le 1-DTAP seule (rouge), électrode modifiée par la sonde ADN marquée par le 1-DTAP hybridée à la cible 10^{-6} M (bleu)

Dans le cas de ce premier biocapteur réalisé, une nette augmentation du courant est remarquable entre avant et après l'hybridation. A 0,1 V en oxydation, le courant passe de 1,82 nA avant hybridation à 4,78 nA après hybridation. Cela représente une augmentation du courant de 163 %. Dans le cas de la réduction, à -0,1 V, le courant passe de -1,79 nA avant hybridation à une valeur de 3,72 nA après hybridation, soit une augmentation du courant de 108 %. Il s'agit d'une augmentation de courant satisfaisante qui laisse espérer une LOD intéressante. Cette augmentation de courant est légèrement meilleure que celle observée sur les biocapteurs en conditions classiques. Il est donc intéressant de répéter les cycles de dénaturation puis hybridation pour observer les performances du biocapteur sur des concentrations plus faibles. Les résultats obtenus sur les différentes concentrations testées sont résumés par la Figure III-60.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

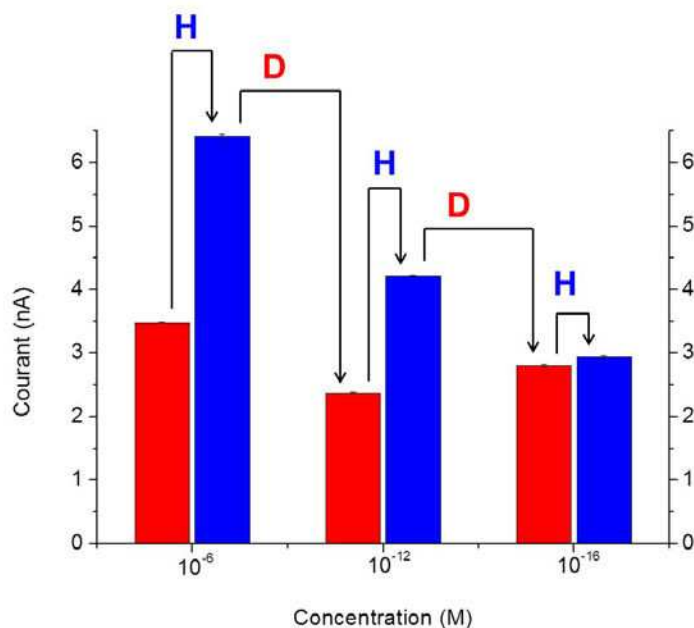


Figure III-60 : Histogramme montrant le courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure mesuré à l'électrode au cours des cycles d'hybridation et dénaturation de l'électrode pour les différentes concentrations en cible; électrode modifiée par la sonde seule (rouge), électrode modifiée par la sonde hybridée (bleu), H : Hybridation de la cible, D : Dénaturation du duplex ADN

Comme pour les autres biocapteurs, ce graphe permet d'observer que le courant mesuré sur l'électrode modifiée par la sonde seule après dénaturation est similaire au cours des différents cycles. D'autre part, l'augmentation du courant due à l'hybridation diminue comme attendu avec la concentration en cible dans l'échantillon. Aussi, le nouveau marquage des sondes utilisé permet de limiter la dispersion des résultats et d'améliorer encore la robustesse du capteur. La dispersion des résultats est donnée sur la Figure III-61.

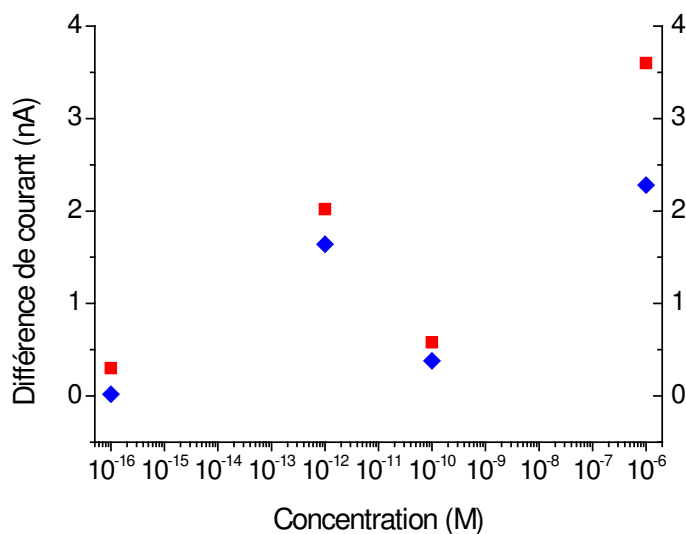


Figure III-61 : Représentation de tous les résultats obtenus avec les sondes marquées 1-DTAP permettant d'observer la dispersion des mesures

Biocapteurs sur UMEs unitaires

Ce graphe montre que pour des essais réalisés deux fois pour la même concentration en cible complémentaire, la dispersion des mesures est plus faible qu'en utilisant les sondes marquées par les fonctions thiols. En effet, l'écart est compris entre 0,2 et 0,35 nA, soit entre 4,5 et 9 % sur toutes les mesures. Il est cependant à noter qu'il a été mesuré un écart de 1,3 nA, soit 20 % pour la plus forte concentration de cible (10^{-6} M). Cependant, cet écart est pondéré par la valeur du courant plus forte mesurée sur cette expérience. Ces conditions semblent permettre d'obtenir une dispersion plus faible des résultats.

Cette étude des sondes marquées par le 1-DTAP mérite d'être poursuivie. En effet, peu de mesures ont été réalisées car ces sondes ont été testées de manière plus approfondie sur les réseaux d'électrodes développés parallèlement. Ces résultats sont exposés dans la partie suivante de ce manuscrit. Cependant, une étude par microbalance à quartz a également été menée sur les électrodes unitaires d'or pour quantifier le taux d'hybridation des différentes cibles marquées par un simple thiol ou par les unités DTAP et montrer l'apport de cette nouvelle sonde marquée 1-DTAP dans l'élaboration des biocapteurs.

Etude par microbalance à quartz (QCM) de l'hybridation des cibles

L'étude par microbalance a pour objectif d'étudier et confirmer l'hybridation de la cible sur la sonde. Pour cela, la fréquence de vibration d'un quartz sur lequel est fixée une électrode d'or est mesurée (Figure III-62).

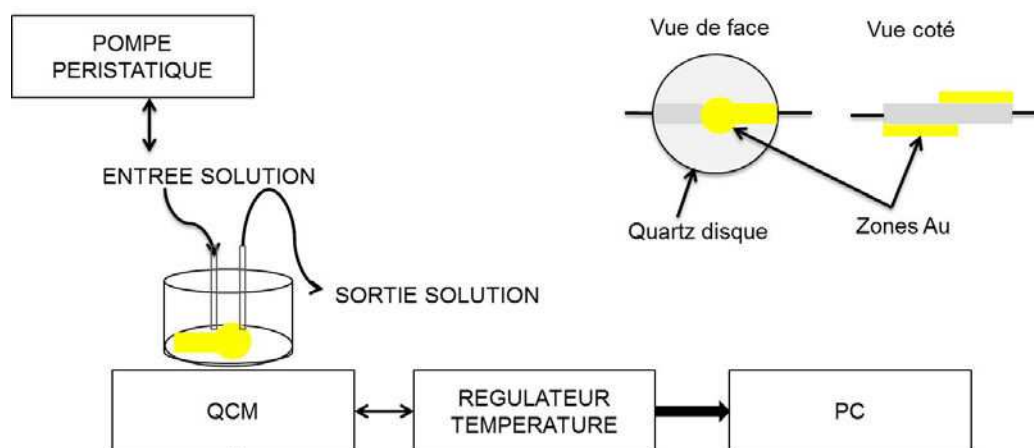


Figure III-62 : Schéma du montage utilisé pour réaliser les expériences de QCM

Selon la quantité de matière présente à la surface du disque d'or, la fréquence de vibration du quartz varie. Comme indiqué dans l'annexe A5, l'équation de *Sauerbrey* permet d'exprimer la variation de fréquence mesurée en fonction de la différence de masse due à l'hybridation à la surface de l'électrode. En suivant la fréquence de vibration du quartz et en

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

faisant circuler une solution de cible à la surface du disque d'or modifié par la sonde, la quantité de cible hybridée à la sonde sur l'or après stabilisation du signal est estimée. Les résultats d'hybridation de la cible sur les sondes marquées 1-DTAP sont présentés sur la Figure III-63.

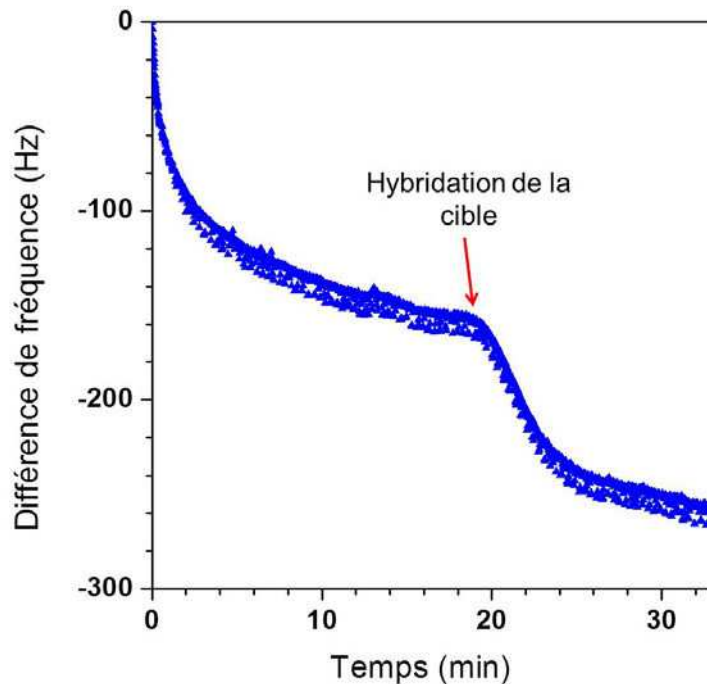


Figure III-63 : Représentation graphique de la différence de fréquence mesurée sur le quartz en fonction du temps durant l'hybridation d'une cible complémentaire sur l'électrode modifiée par la sonde 1-DTAP

La circulation par la pompe péristaltique de la solution d'ADN cible commence après une stabilisation du signal. Après environ 20 minutes, la circulation de la solution de cible commence à un débit de 5 mL/h. Peu après, aux alentours de 22 minutes, le début de l'hybridation sur la sonde adsorbée est détecté. La différence de fréquence mesurée par rapport à la fréquence de résonance du quartz diminue de -160 Hz à -250 Hz en 6 minutes environ. Ce changement brutal de la fréquence mesurée correspond à l'hybridation de la sonde. Cette hybridation est donc bien efficace et mesurable par QCM à la surface de l'électrode modifiée par la sonde 1-DTAP. D'autre part, cette expérience de QCM montre que l'hybridation s'effectue très rapidement sur l'électrode, en moins de 10 minutes, avec une solution circulante. Les conditions choisies pour le biocapteur, à savoir une hybridation avec une solution statique pendant 30 minutes, sont bien adaptées et permettent l'hybridation. Cette méthode permet de comparer les taux d'hybridation observés sur des électrodes d'or

Biocapteurs sur UMEs unitaires

modifiées par les différentes sondes thiol, 1-DTAP et 3-DTAP. Les résultats de ces tests sont résumés dans le Tableau III-4.

Tableau III-4 : Tableau récapitulatif des mesures du taux d'hybridation de la cible sur les différentes sondes par QCM

	1-DTAP			3-DTAP			3' SH		
Δf (sonde) (Hz)	-177	-161	-250	-171	-177	-189	-166	-177	-187
Δf (cible) (Hz)	-287	-252	-395	-277	-285	-288	-210	-220	-226
Δf (cible)- Δf (sonde) (Hz)	-110	-91	-144	-98	-108	-99	-44	-43	-39
Taux d'hybridation (%)	64	60	59	57	63	54	27	25	21
Moyenne	62% ± 2%			56% ± 4%			25% ± 2%		

Le Tableau III-4 donne le taux d'hybridation de la cible moyenné sur trois expériences sur chacune des différentes sondes utilisées pour l'étude des biocapteurs sur UME unitaire d'or. Le taux d'hybridation représente le pourcentage de sondes adsorbées à la surface de l'électrode hybridées à une cible complémentaire. Les résultats obtenus lors de cette étude par QCM montrent que les sondes marquées par un disulfure permettent d'obtenir des taux d'hybridation bien supérieurs à ceux mesurés avec des sondes thiolées. En effet, les sondes marquées par les unités DTAP montrent un taux d'hybridation de 56 et 62 % alors que les sondes thiolées présentent un taux d'hybridation de 25 %. Le taux d'hybridation sur l'UME est donc multiplié par 2,5 environ. Cette amélioration du taux d'hybridation est explicable du fait de la structure de la monocouche formée avec les sondes DTAP. En effet, les sondes thiolées forment des couches très compactes, et l'hybridation d'une telle sonde entraîne un encombrement stérique tel que les sondes voisines ne peuvent plus s'hybrider (Figure III-64 A). En revanche, avec les sondes marquées par le disulfure, l' (ou les) unité(s) DTAP présente(s) à la base du brin d'ADN est (sont) assez encombrante(s). La monocouche ainsi formée est moins compacte qu'avec les sondes thiolées et les brins d'ADN sont plus espacés

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

les uns des autres. Ainsi, une part plus importante des sondes peut être appariée à la cible (Figure III-64 B). Cette amélioration du taux d'hybridation grâce aux nouvelles sondes permet d'obtenir une hybridation plus efficace et devrait donc améliorer la LOD de nos biocapteurs.

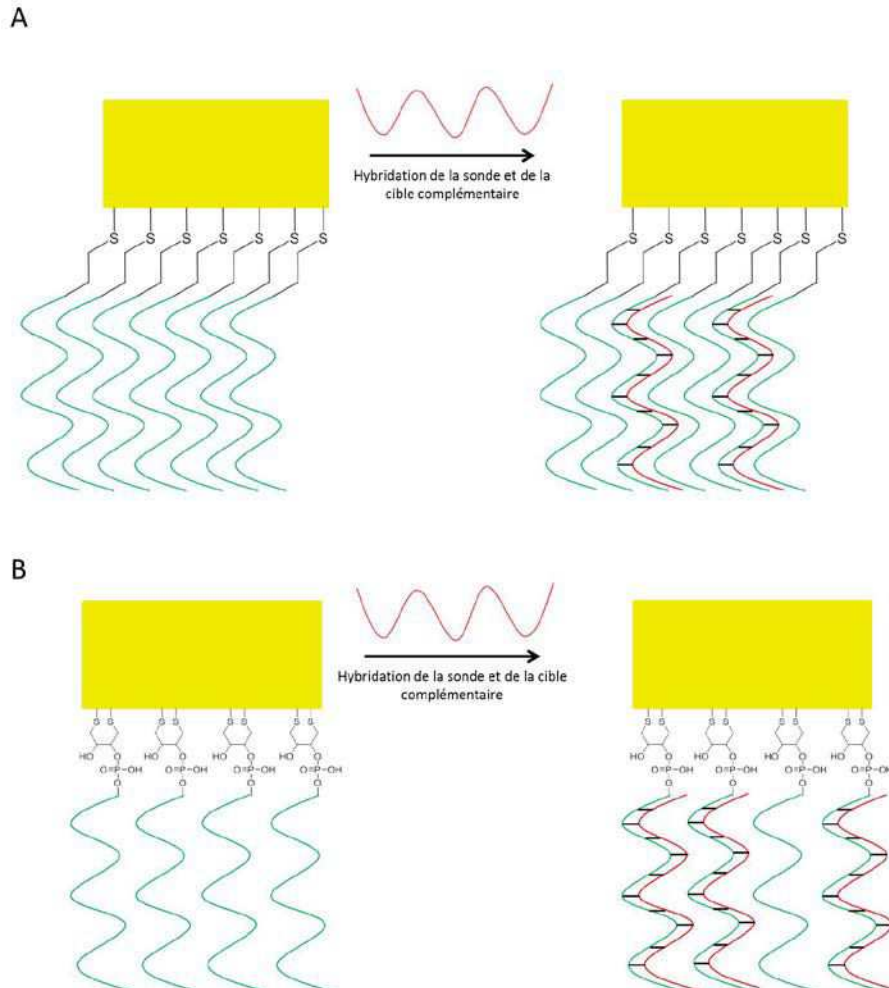


Figure III-64 : Schéma de l'hybridation sur une électrode modifiée par la sonde marquée thiol (A) et 1-DTAP (B)

D'autre part, il est à noter que les sondes marquées par une seule unité DTAP présentent un taux d'hybridation légèrement meilleur que les sondes marquées par trois unités DTAP. Le taux d'hybridation est supérieur de 6 % avec le 1-DTAP. Cet écart ne semble pas assez important pour être significatif au vu des barres d'erreur sur ces mesures de taux d'hybridation. Néanmoins, la suite des études se poursuivra avec la sonde marquée par le 1-DTAP.

Seules peu d'expériences ont été réalisées avec les sondes marquées par les unités DTAP sur les UMEs d'or unitaires. En effet, ces sondes ont été expérimentées parallèlement sur les réseaux d'électrodes d'or développés au laboratoire. Ces réseaux permettent d'obtenir une dizaine de mesures simultanément et leur utilisation a donc été privilégiée au détriment de

Biocapteurs sur UMEs unitaires

l'utilisation des UMEs afin de gagner du temps en réalisant une seule immobilisation des sondes d'une durée de 15 heures et afin d'améliorer la fiabilité des résultats en moyennant les 10 valeurs mesurées.

En résumé, les biocapteurs sur UMEs unitaires ont permis de mettre au point la technologie, d'optimiser un grand nombre de paramètres et de mieux comprendre leur influence sur les performances du dispositif. Ils ont aussi permis d'améliorer la limite de détection observée dans la littérature pour ce type de capteur ; cependant, cette limite reste insuffisante pour l'utilisation du dispositif tel quel en diagnostic médical. D'autre part, l'utilisation d'ultramicro-électrodes unitaires induit une variabilité trop importante au niveau de la surface de travail (polissage, vieillissement) et au niveau du comportement des biocapteurs au cours du temps. C'est pour cette raison qu'ont été envisagés les réseaux d'électrodes bandes interdigitées.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

Chapitre IV :

Biocapteurs sur

réseaux

d'électrodes

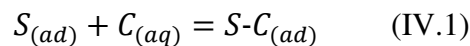
d'or

IV. Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

En parallèle des UMEs unitaires, des dispositifs de réseaux d'électrodes d'or en bandes ont été développés avec le laboratoire *PASTEUR* de l'*ENS* en collaboration avec *Laurent THOUIN* et *Eric AIT-YAHIAENE*. Ces électrodes lithographiées sont utilisées comme électrodes de travail dans le montage à deux électrodes. Dans un premier temps, chaque électrode est utilisée indépendamment. Chaque expérience est donc réalisée sur 10 électrodes permettant de moyenniser les résultats d'une même expérience. Deux expériences peuvent également être menées simultanément en utilisant deux puits distincts sur le même dispositif. Ce réseau d'électrodes permet donc d'augmenter la reproductibilité et la fiabilité des mesures mais aussi d'augmenter la rapidité du diagnostic en réalisant simultanément les différentes mesures. De plus, même si une bande présente un défaut et ne fonctionne pas, il est possible d'observer le dysfonctionnement et d'obtenir un résultat avec les 9 autres bandes sans refaire l'intégralité du protocole. Dans cette partie, le sel de fond utilisé sera systématiquement le chlorure de sodium à 0,5 M. En effet, les dispositifs permettent d'obtenir 10 résultats en une seule hybridation et les effets de la corrosion ne sont pas observables. L'électrolyte classique est donc utilisé.

A. Considérations préliminaires sur l'hybridation et sa cinétique

Avant la fabrication des réseaux lithographiés et afin d'établir des designs adaptés à l'application souhaitée, il a été nécessaire de prendre en considération la réaction d'hybridation des cibles en solution ($C_{(aq)}$) sur les sondes adsorbées à l'électrode ($S_{(ad)}$) donnant un duplex immobilisé à l'électrode ($S-C_{(ad)}$) (IV.1) et sa cinétique.



En effet, pour définir les dimensions des bandes constituant les électrodes (largeur w , longueur L) ainsi que le nombre d'électrodes (N), il a été indispensable de s'intéresser à la quantité de cibles pouvant s'hybrider durant le protocole classique d'hybridation en 30 minutes avec un échantillon de 40 μ L du fait de la cinétique de cette réaction de formation du duplex d'ADN. Pour cela, il est nécessaire de se placer dans les conditions les plus extrêmes que le dispositif sera amené à rencontrer. Ces calculs ont donc été réalisés en considérant une concentration en cible de 10^{-17} M. Cette valeur correspond au cas des micro-ARNs les plus faiblement concentrés. Dans cette partie, les calculs de nombre de duplex ADN formés au cours de l'hybridation sont présentés pour différents designs de réseaux (largeur de bande $w = 25$ ou 50μ m, espacement des bandes $g = 200 \mu$ m, longueur de bande par puits $L = 1$ ou 5

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

mm). Enfin, de la même manière que lors de la comparaison entre ultra-microélectrodes et électrodes millimétriques, le phénomène de transport de masse par la convection naturelle est négligé pour comparer plus aisément les différents designs de ces réseaux.

Pour évaluer l'hybridation sur ce dispositif, deux modèles d'hybridation de l'ADN ont été utilisés. Le premier modèle est basé sur la première loi de *Fick* ne considérant que la diffusion des espèces et ne tenant pas compte de la cinétique d'hybridation de l'ADN. Ce modèle tend à minorer le nombre d'hybridation des cibles sur les sondes immobilisées sur le capteur. Le second modèle est issu d'une étude comparant des systèmes microfluidiques et des systèmes classiques de l'équipe de *Squires* à l'université de Californie et utilise un modèle diffusif prenant en compte la constante cinétique d'hybridation et la densité de sondes à la surface de l'électrode[171]. Ce modèle tend à majorer le nombre de duplex ADN formés lors de l'étape d'hybridation.

Pour le premier modèle, il est nécessaire de calculer la grandeur $J_{C(aq)} \times S_{él}$ (IV.2) produit du flux surfacique de la cible par la surface de l'électrode modifiée en mol.s^{-1} pour finalement parvenir au nombre de cibles hybridées sur une sonde ($N_{(S-C)ad}$). Ce modèle considère que chaque approche d'une cible vers une sonde complémentaire produit un duplex d'ADN.

$$J_{C(aq)} \times S_{él} = \pi D_{C(aq)} C_{C(aq)} L \times \frac{2}{\ln\left(64 \frac{D_{C(aq)} t}{w^2}\right)} \quad (\text{IV.2})$$

Avec $J_{C(aq)}$ le flux surfacique de cible en solution en $\text{mol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$

$S_{él}$ la surface d'une électrode bande dans un puits en cm^2

$D_{C(aq)}$ le coefficient de diffusion de la cible ADN en solution en $\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$

$C_{C(aq)}$ la concentration en cible en solution en mol.cm^{-3}

L la longueur d'une bande dans un puits en cm

t le temps d'hybridation en s

w la largeur d'une électrode bande en cm

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

Il est ensuite possible d'accéder au nombre de cibles hybridées en multipliant par le nombre d'électrodes (N) et par le nombre d'Avogadro (N_A) et par le temps d'hybridation (t) (IV.3).

$$N_{S-C(ad)} = J_{C(aq)} \times S_{él} \times N \times t \times N_A \quad (IV.3)$$

Avec $N_{S-C(ad)}$ le nombre de cibles hybridées à une sonde

N le nombre d'électrodes bandes dans un puits

t le temps d'hybridation en s

N_A le nombre d'Avogadro en mol^{-1}

Le nombre de cibles hybridées est donné par l'équation (IV.4).

$$N_{S-C(ad)} = \pi D_{C(aq)} C_{C(aq)} L \times \frac{2}{\ln\left(64 \frac{D_{C(aq)} t}{w^2}\right)} \times N \times t \times N_A \quad (IV.4)$$

Pour parvenir à déterminer la valeur de $N_{S-C(ad)}$, les paramètres sont choisis comme suit. Le coefficient de diffusion de l'ADN d'une vingtaine de bases vaut $1,2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [172], la concentration en cible en solution vaut $10^{-20} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ ($10^{-17} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), la longueur des bandes vaut $0,5 \text{ cm}$, le temps d'hybridation vaut 1800 s , la largeur des bandes vaut $25 \times 10^{-4} \text{ cm}$, le nombre de bandes est $N = 10$ et le nombre d'Avogadro vaut $6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$.

Avec ces différentes données, le nombre de cibles hybridées sur les électrodes est calculé. Les résultats pour les 4 différents designs envisagés sont résumés dans le Tableau IV-1.

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

Tableau IV-1 : Tableau récapitulatif du nombre de cibles hybridées pour les différents designs d'électrodes calculé par le modèle utilisant la loi de Fick

Longueur des bandes	L = 1 mm		L = 5 mm	
	w = 25 μ m	w = 50 μ m	w = 25 μ m	w = 50 μ m
Nombres de cibles hybridées N_{s-c}	8	10	41	47

Les résultats obtenus indiquent que le paramètre prépondérant pour choisir le design des électrodes est la longueur des bandes. Le nombre de cibles hybridées est plus important avec des électrodes de 5 mm de longueur. Les puits choisis présenteront donc un diamètre de 5 mm. De plus ce modèle indique que le paramètre largeur de bande influe dans une moindre mesure sur le nombre de sondes hybridées. Le nombre de cibles hybridées estimé pour un puits de diamètre 5 mm est de 41 pour des électrodes de 25 μ m de large contre 47 pour des électrodes de 50 μ m de large. Une largeur de bande de 50 μ m avec un espace inter-bandes de 200 μ m de garantit pas l'indépendance des bandes entre elles. Il est donc préférable de choisir des bandes de 25 μ m de large. Dans ce cas, les calculs indiquent que 41 cibles pourraient diffuser et s'hybrider aux sondes immobilisées sur les électrodes. Ce nombre est très faible et il n'est pas certain que les biocapteurs permettent de détecter si petits nombre de duplex.

Le second modèle est proportionnel à la surface d'électrodes et ne présente pas de limitation due au volume de la goutte d'échantillon utilisée. Il tient compte des constantes cinétiques, de la géométrie de l'électrode et du nombre de sondes immobilisées. Dans ce modèle de *Squires*[171], le flux de cibles à la surface de l'électrode est donné par l'équation (IV.5).

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

$$J_{C(aq)} \times S_{él} = k_h \times C_s \times b_{S(ad)} \times L \times w \quad (IV.5)$$

Avec k_h la constante cinétique d'hybridation de la cible sur la sonde en $L.mol^{-1}.s^{-1}$

C_s la concentration en cible à la surface de l'électrode en $mol.L^{-1}$

$b_{S(ad)}$ la quantité surfacique de sondes ADN adsorbées à la surface de l'électrode en $mol.cm^{-2}$

Il est alors possible, comme précédemment, d'accéder au nombre de cibles hybridées grâce à l'équation (IV.6)

$$N_{S-C(ad)} = k_h \times C_s \times b_{S(ad)} \times L \times w \times N \times t \times N_A \quad (IV.6)$$

Pour parvenir à déterminer la valeur de $N_{S-C(ad)}$, les paramètres sont choisis comme suit. La constante cinétique d'hybridation vaut $10^5 L.mol^{-1}.s^{-1}$ [173], le quantité de sondes immobilisées est considéré égale à une monocouche $b_{S(ad)} = 1 \times 10^{-10} mol.cm^{-2}$ [165]. Enfin, la concentration en cible à la surface de l'électrode peut être estimée par l'équation (IV.7) fournie dans le modèle[171].

$$C_s = \frac{C_{C(aq)}}{1 + \frac{k_h \times b_{S(ad)} \times \delta}{D_{C(aq)}}} \quad (IV.7)$$

Avec $\delta = \sqrt{D_{C(aq)} \times t}$ l'épaisseur de la couche de diffusion en cm

k_h la constante cinétique d'hybridation de la cible sur la sonde en $cm^3.mol^{-1}.s^{-1}$

Par cette formule, la concentration en cible à la surface de l'électrode obtenue vaut $7 \times 10^{-18} mol.L^{-1}$. Le nombre de cibles hybridées est obtenu pour les différents designs. Les résultats sont résumés dans le Tableau IV-2.

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

Tableau IV-2 : Tableau récapitulatif du nombre de cibles hybridées pour les différents designs d'électrodes calculé par le modèle de *Squires*

Longueur des bandes	L = 1 mm		L = 5 mm	
	w = 25 μm	w = 50 μm	w = 25 μm	w = 50 μm
Nombres de cibles hybridées N_{s-c}	189	379	948	1896

Les résultats obtenus sont identiques au modèle de *Fick* pour la longueur des électrodes puisque le nombre de duplex formés est proportionnel à la longueur des électrodes. Il est donc préférable de travailler avec des puits de 5 mm de diamètre selon le modèle de *Squires* aussi. Cependant, Le nombre de cibles hybridées dans ce modèle pour une longueur d'électrode de 5 mm et une largeur de 50 μm est estimé à 1896 contre 948 avec des électrodes de 25 μm de largeur. Selon ce modèle, il est donc préférable de travailler avec des bandes de 50 μm de large pour faciliter la quantification des échantillons de faible concentration.

Ces deux modèles indiquent des quantités de duplex ADN formés très différentes et nécessiteraient d'être complétés pour obtenir de meilleures approximations. Le premier modèle sous-estime probablement la quantité de cibles hybridées car la diffusion planaire vers les électrode de cibles adsorbées sur le substrat de verre, qui est un phénomène connu[174], est négligée ; de même que le transport de matière par la convection naturelle qui permet un apport de cibles ADN à la surface du capteur plus important que celui estimé par la modèle. En ce qui concerne le second modèle, le nombre d'hybridations calculé est probablement plus élevé que la réalité puisque la concentration en cible à la surface est une approximation et est certainement plus faible dans la réalité. Les estimations des nombres d'hybridation ont toutefois permis de valider le design des réseaux utilisés. D'après le premier modèle, la configuration la plus adaptée est un réseau d'électrodes de 50 μm de large avec des puits de 5 mm de diamètre pour obtenir un nombre d'hybridation le plus important possible (47). Cependant, le nombre d'hybridations obtenu avec des bandes de 25 μm de large (41) est très proche. Le design utilisant les bandes de 25 μm de large sera donc privilégié dans le but de

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

conserver un design avec une dimension caractéristique w la plus proche possible des électrodes unitaires de diamètre $25\ \mu\text{m}$ sur lesquelles l'immobilisation des sondes ADN a été optimisée au préalable. La seconde estimation tendrait à privilégier des bandes de $50\ \mu\text{m}$ de large mais le nombre d'hybridations estimé avec des bandes de $25\ \mu\text{m}$ est de 948 signifiant que toutes les cibles pourraient être hybridées. De la même façon qu'avec le premier modèle, le design en bandes de $25\ \mu\text{m}$ de large et $5\ \text{mm}$ de long permet donc d'obtenir un compromis entre un nombre maximal d'hybridations et la possibilité d'utiliser un design présentant une dimension caractéristique semblable à celle des UMEs utilisées pour l'optimisation de l'immobilisation des sondes ADN. C'est donc ce design qui sera utilisé pour mener les premiers essais.

B. Caractérisation des réseaux d'électrodes

Avant toute chose, il est nécessaire de caractériser les réseaux fournis par le laboratoire de l'ENS et de choisir celui dont les caractéristiques de largeur de bande et d'espacement des bandes convient. Les électrodes ont été caractérisées sans traitement préalable dans un premier temps. Le premier dispositif à être caractérisé est le réseau de bandes d'or de $25\ \mu\text{m}$ chacune espacée des autres de $200\ \mu\text{m}$ (appelé par la suite 25_200). Dans un premier temps, le réseau est caractérisé dans l'électrolyte sur une plage de potentiel entre $-0,3$ et $0,3\ \text{V}$. Les résultats de cette caractérisation sont présentés sur la Figure IV-1.

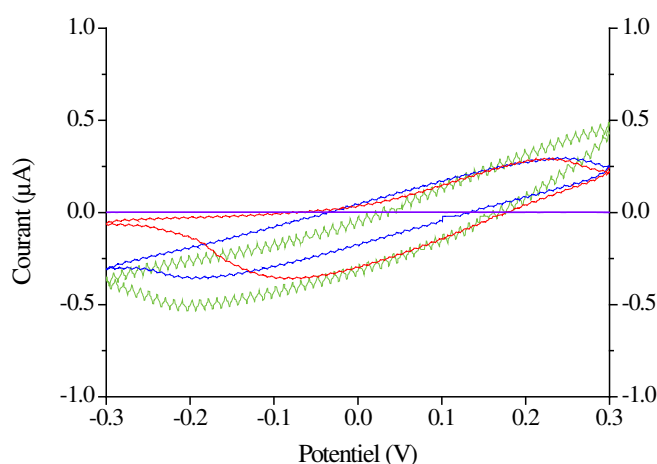


Figure IV-1 : Caractérisation du réseau d'électrodes d'or en bandes de largeur $25\ \mu\text{m}$ espacées de $200\ \mu\text{m}$ pour trois bandes différentes sans traitement préalable par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ $5\ \text{mM}$ et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ $5\ \text{mM}$ à $100\ \text{mV/s}$; blanc NaCl $0,5\ \text{M}$ (violet), bande 1 (rouge), bande 2 (bleu), bande 3 (vert)

La caractérisation réalisée ici n'est pas satisfaisante. En effet, les paliers de diffusions de la sonde rédox en solution ne sont pas observés et le courant semble faible par rapport aux

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

attentes basées sur la surface de l'électrode mise en jeu. Les voltampérogrammes obtenus laissent même penser que l'électrode pourrait être passivée. Une des solutions envisagées pour pallier ce problème est l'exécution d'un recuit très sommaire réalisé avec une flamme[175]. Ce recuit a pour but de changer la configuration des atomes d'or déposés par lithographie. Une nouvelle caractérisation est donc effectuée après le recuit sur le même réseau d'électrodes que précédemment. Les résultats de cette seconde caractérisation sont présentés sur la Figure IV-2.

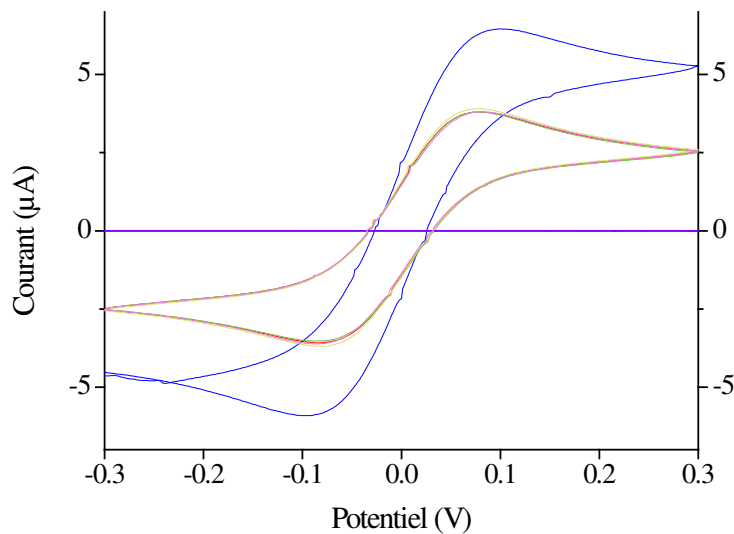


Figure IV-2 : Caractérisation du réseau d'électrodes d'or en bandes de largeur 25 µm espacées de 200 µm pour les 5 bandes après recuit par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM à 100 mV/s ; blanc NaCl 0,5 M (violet), bande 1 (rouge), bande 2 (bleu), bande 3 (vert), bande 4 (jaune), bande 5 (rose)

Dans un premier temps, la caractérisation des différentes bandes effectuée est bien plus satisfaisante puisque le comportement habituel d'une électrode est retrouvé avec l'apparition des paliers de diffusion. D'autre part, le courant mesuré à la surface des différentes bandes est semblable à la valeur prévue lors de l'élaboration du modèle de réseau. De plus, la caractérisation est parfaitement similaire entre quatre des cinq bandes du dispositif. La cinquième bande présente un courant supérieur à cause d'une mauvaise étanchéité du PDMS ayant augmenté la surface active de l'électrode. Il est maintenant intéressant de définir si les bandes sont indépendantes les unes des autres ou bien s'il y a recouvrement des sphères de diffusion entre elles. Pour cela, une nouvelle caractérisation du dispositif est réalisée en court-circuitant les 4 électrodes de travail ayant montré une caractérisation similaire précédemment (bandes n° 1, 3, 4 et 5). Le voltampérogramme obtenu

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

est comparé à la somme des courants des 4 mêmes bandes mesurés lors des caractérisations des bandes individuellement. La comparaison est présentée sur la Figure IV-3.

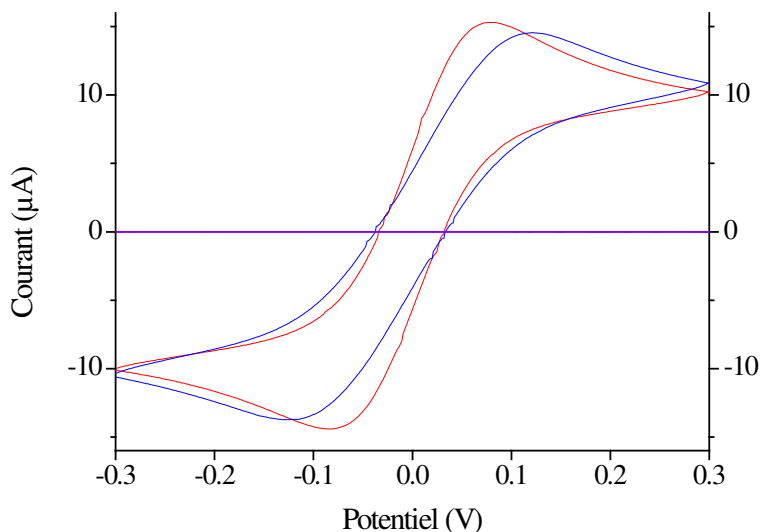


Figure IV-3 : Comparaison des voltampérogrammes obtenus sur le réseau d'électrodes 25_200 par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM à 100 mV/s pour la somme des courants des bandes 1, 3, 4, 5 (rouge) et pour la mesure sur les bandes 1, 3, 4, 5 court-circuitées (bleu)

Sur la Figure IV-3, les deux courbes sont très proches. En termes de courant, il est identique pour les deux voltampérogrammes. En effet, à 0,3 V, le courant mesuré est de 10,3 μA pour les bandes court-circuitées et de 10,0 μA pour la somme des 4 bandes. La différence entre les deux courants n'est que de 3 %. En réduction, à -0,3 V, le courant mesuré vaut -10,6 μA pour les bandes court-circuitées et vaut -10,1 μA pour la somme des 4 bandes. La différence de courant à ce potentiel est de 5 %. Le courant des bandes court-circuitées est donc le même que la somme du courant pour chaque bande. Les potentiels de pics des deux courbes peuvent également être comparés. Pour la mesure sur les bandes court-circuitées, les potentiels de pics sont légèrement supérieurs en valeur absolue à ceux des bandes individuelles. En effet, en oxydation, le potentiel de pic mesuré pour les bandes court-circuitées est de 0,12 V alors qu'il n'est que de 0,08 V pour les bandes individuelles. De même, en réduction, le potentiel de pic pour les bandes court-circuitées est de -0,13 V et il vaut -0,09 V pour les bandes individuelles. En oxydation comme en réduction, le potentiel de pic est plus élevé de 40 mV pour la mesure sur les bandes court-circuitées. La différence de morphologie des deux voltampérogrammes peut s'expliquer par un léger recouvrement des cylindres de diffusion des électrodes entraînant un appauvrissement local en espèce rédox pour chaque bande. La charge est donc légèrement moins importante sur chaque bande comparée à celle mesurée sur une bande seule et l'aire de la courbe intensité-potential est

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

inférieure. Malgré ce léger écart des valeurs de potentiels de pics, les voltampérogrammes sont assez semblables pour affirmer que les bandes sont indépendantes les unes des autres. Cette indépendance des bandes est intéressante car cette propriété des dispositifs permet d'envisager un adressage des différentes bandes pour une détection simultanée de plusieurs miRNAs. En effet, en modifiant chaque bande par une séquence ADN différente, plusieurs biocapteurs peuvent être conçus au sein d'un même puits du dispositif. L'indépendance des électrodes les unes par rapport aux autres est alors une condition *sine qua non* pour cette multidétection. Ainsi, le non-recouvrement des sphères de diffusion permet d'affirmer avec certitude que les réactions d'oxydo-réduction produites à la surface d'une bande n'influent pas la mesure effectuée sur une bande adjacente. En conditions réelles, cela permet d'éviter que le courant faradique fort à la surface d'une bande détectant un miRNA très concentré n'influe sur la quantification d'un miRNA peu concentré (mesure d'un petit courant faradique) sur une bande adjacente.

C. Formation des SAMs sur les réseaux d'électrodes d'or

Après avoir établi le traitement préalable nécessaire à l'utilisation des réseaux et avoir caractérisé les bandes d'or, des monocouches de sondes ADN peuvent être formées à leur surface afin de fabriquer des biocapteurs en utilisant ces dispositifs comme électrodes de travail.

1) Monocouches d'acide thioctique

Dans un premier temps, et parallèlement aux études sur UMEs unitaires, l'étude de monocouches auto-assemblées d'acide thioctique a été menée. De la même manière, une solution d'acide thioctique à 5 mM a été placée au contact des bandes dans le puits en PDMS pendant deux heures. Le voltampérogramme obtenu est présenté sur la Figure IV-4.

Ce voltampérogramme permet d'observer les disparités entre les formations de SAM à la surface des bandes d'or. En effet, en réduction, à -0,1 V, les courants mesurés sont compris entre -30 (bande n°5) et -140 nA (bande n°1). De même, à 0,1 V en oxydation, les courants mesurés sur les différentes électrodes sont compris entre 30 (bande n°5) et 160 nA (bande n°1).

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

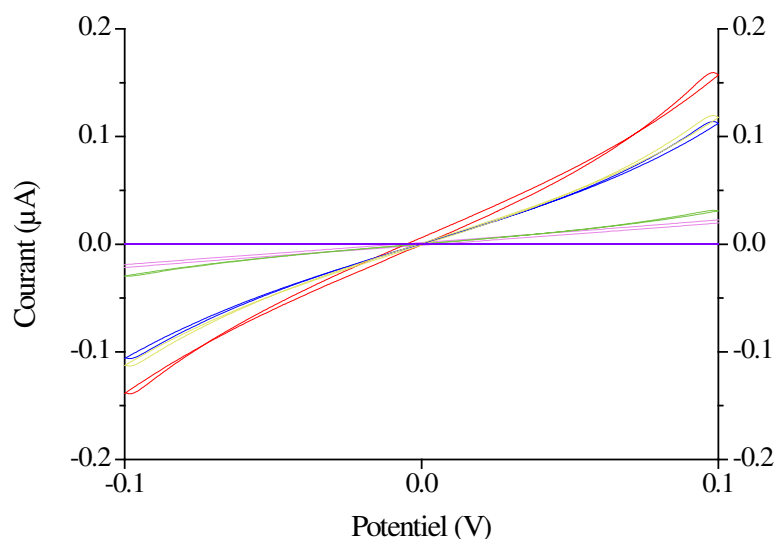


Figure IV-4 : Vérification de la formation de la monocouche d'acide thioctique à 5 mM réalisée en deux heures à la surface du réseau d'électrodes d'or 25_200 par évaluation du blocage du courant d'oxydo-réduction à la surface des électrodes par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM à 50 mV/s ; blanc NaCl 0,5 M (violet), bande n°1 modifiée par l'acide thioctique (rouge), bande n°2 modifiée par l'acide thioctique (bleu), bande n°3 modifiée par l'acide thioctique (vert), bande n°4 modifiée par l'acide thioctique (jaune), bande n°5 modifiée par l'acide thioctique (rose)

La formation de la monocouche n'est donc pas uniforme à la surface des bandes d'or. Ces différences peuvent être causées par le positionnement du PDMS sur le réseau. En effet, selon la surface active de l'électrode, la proximité d'une paroi du puits, des différences dans la compacité de la SAM sont observées. Cependant, pour toutes les bandes de ce dispositif, le blocage du courant est efficace comme le montre la Figure IV-5.

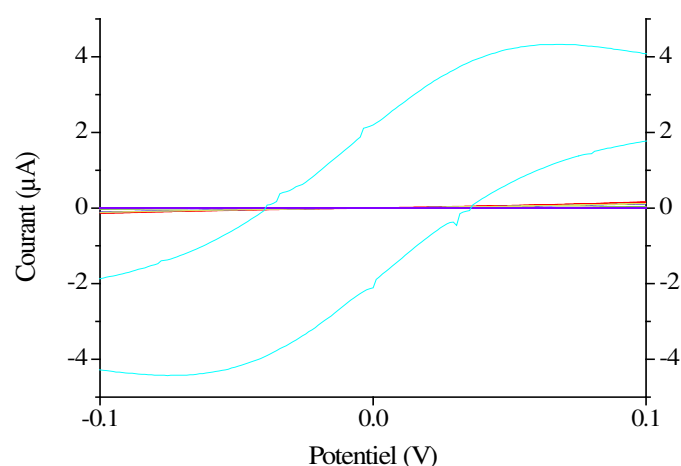


Figure IV-5 : Vérification du blocage du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure à la surface du réseau d'électrodes d'or 25_200 modifiées par la monocouche d'acide thioctique à 5 mM réalisée en deux heures par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM à 50 mV/s ; blanc NaCl 0,5 M (violet), bande non greffée (cyan), bande n°1 modifiée par l'acide thioctique (rouge), bande n°2 modifiée par l'acide thioctique (bleu), bande n°3 modifiée par l'acide thioctique (vert), bande n°4 modifiée par l'acide thioctique (jaune), bande n°5 modifiée par l'acide thioctique (rose)

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

En effet, le graphe précédent permet de montrer que la diminution du courant due à la modification des bandes par l'acide thioctique est comprise entre 95 et 99 % en réduction. De même, cette diminution du courant est comprise entre 94 et 99 % en oxydation à 0,1 V. Malgré les disparités du greffage montrant des courants variant du simple au triple, la modification des électrodes permet un blocage quasi-total du transfert électronique à la surface du réseau. Comme pour les électrodes unitaires, la modification par l'acide thioctique donne des résultats très satisfaisants. Cependant, au vu des résultats obtenus pour la fabrication de biocapteurs avec des sondes marquées par l'acide thioctique sur les UMEs unitaires, les expérimentations sur les réseaux avec l'acide thioctique n'ont pas été poursuivies. Cependant, ces manipulations ajoutées aux précédentes ont permis de valider le modèle de dispositif d'électrodes en réseau et de l'améliorer. Désormais, les dispositifs sont composés de 10 bandes d'or de 25 μm de largeur chacune espacée de 200 μm .

2) Monocouches de sondes ADN marquées par le 1-DTAP

Dans un second temps, ce sont donc les sondes ADN marquées par les unités DTAP qui ont été étudiées sur les réseaux. De la même façon que pour l'acide thioctique, l'évaluation du blocage du courant a été réalisée et est donnée par la Figure IV-6. Pour plus de lisibilité du graphique, seules 5 courbes sont présentées en prenant soin d'inclure le meilleur blocage et le moins bon.

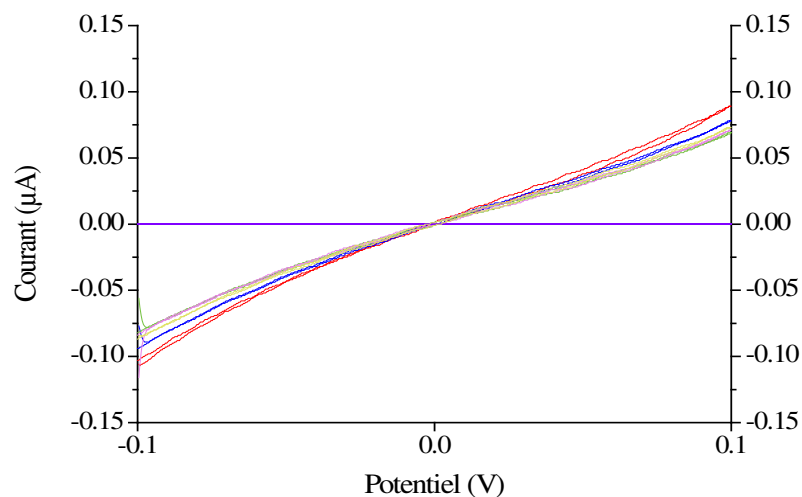


Figure IV-6 : Vérification de la formation de la monocouche de sonde ADN marquée par le 1-DTAP à 10^{-5} M réalisée en 15 heures à la surface du réseau d'électrodes d'or 25_200 par évaluation du blocage du courant d'oxydo-réduction à la surface des électrodes par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM à 50 mV/s ; blanc NaCl 0,5 M (violet), bande n°1 modifiée par la sonde ADN seule (rouge), bande n°2 modifiée par la sonde ADN seule (bleu), bande n°3 modifiée par la sonde ADN seule (vert), bande n°4 modifiée la sonde ADN seule (jaune), bande n°5 modifiée par la sonde ADN seule (rose)

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

Contrairement à ce qui avait été observé sur les monocouches d'acide thioctique, des disparités existent entre les SAMs formées sur les différentes bandes mais elles sont beaucoup plus faibles. Sur le dispositif modifié par la sonde ADN marquée par le 1-DTAP, en oxydation à 0,1 V, le courant mesuré est compris entre 69 et 89 nA ; ce qui correspond à un blocage du courant compris entre 97 et 98 %. De la même façon en réduction, le courant mesuré est compris entre -82 et -103 nA ; ce qui correspond à un blocage du courant également compris entre 97 et 98 %. Les SAMs formées par la sonde marquée par le 1-DTAP sont donc bien compactes et bloquent parfaitement le transfert électronique en l'absence de cible complémentaire. La robustesse de ces monocouches peut alors être évaluée en étudiant la désorption des sondes constituant la SAM. Pour cela, les SAMs formées sont immergées dans le tampon d'hybridation (NaCl 0,5 M) pendant 30 minutes. Les voltampérogrammes avant et après immersion sont alors comparés. Pour éviter de représenter 20 courbes (10 avant immersion et 10 après), une courbe moyenne est calculée à partir des mesures effectuées sur les 10 bandes. Ce sont ces courbes moyennes qui sont représentées sur la Figure IV-7.

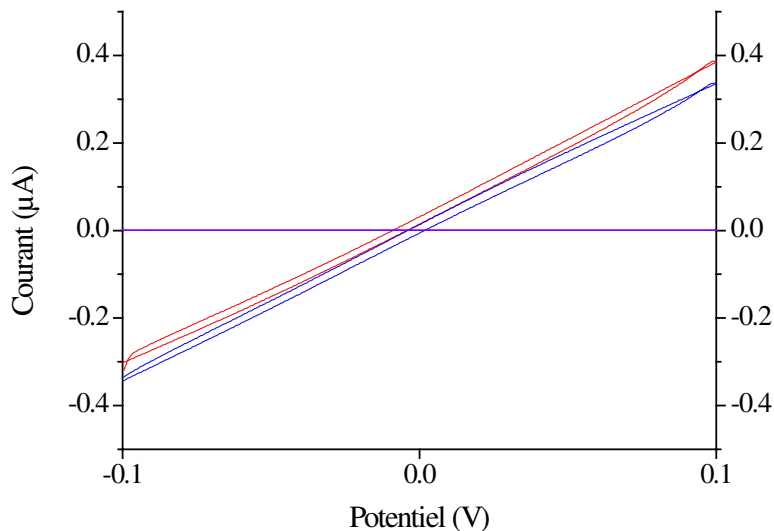


Figure IV-7 : Comparaison des voltampérogrammes moyens obtenus à la surface du réseau d'électrodes d'or 25_200 modifiées par la sonde ADN marquée 1-DTAP juste après adsorption (rouge) et après immersion 30 minutes dans NaCl 0,5 M (bleu), blanc NaCl 0,5 M (violet)

Ce graphe permet d'évaluer la dégradation de la monocouche de sondes ADN au cours du processus d'hybridation et de montrer la robustesse de la monocouche de sondes. Dans le cas présent, le courant mesuré en oxydation à 0,1 V est de 387 nA avant immersion et de 337 nA. En réduction, le courant passe de -311 nA à -340 nA. La variation de courant moyenne après immersion est de 1,5 %. La désorption est donc quasi-inexistante sur ces monocouches de sondes ADN marquées par le 1-DTAP.

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

3) Monocouches de sondes ADN marquées par le 3-DTAP

De la même façon, la formation des SAMs de sondes ADN marquées par le 3-DTAP est étudiée. Seuls 5 voltampérogrammes sont représentés dont le meilleur blocage et le moins bon des 10 électrodes. Les résultats du blocage du courant avec cette seconde sonde sont présentés sur la Figure IV-8.

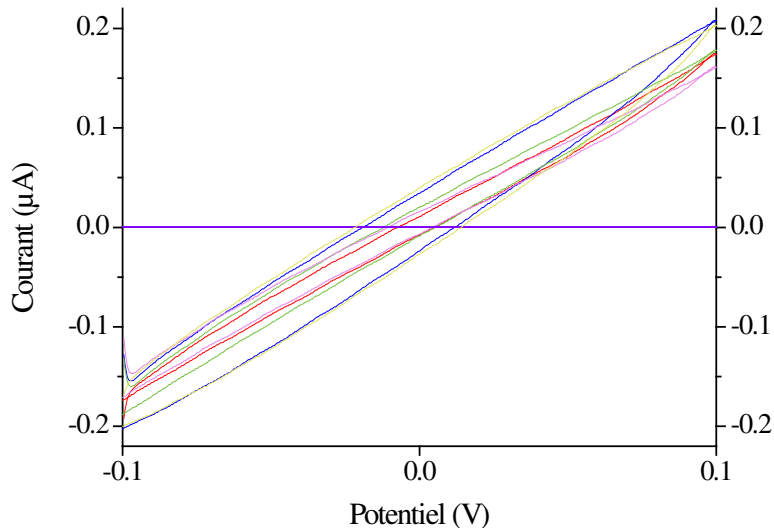


Figure IV-8 : Vérification de la formation de la monocouche de sonde ADN marquée par le 3-DTAP à 10^{-5} M réalisée en 15 heures à la surface du réseau d'électrodes d'or 25_200 par évaluation du blocage du courant d'oxydo-réduction à la surface des électrodes par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM à 50 mV/s ; blanc NaCl 0,5 M (violet), bande n°1 modifiée par la sonde ADN seule (rouge), bande n°2 modifiée par la sonde ADN seule (bleu), bande n°3 modifiée par la sonde ADN seule (vert), bande n°4 modifiée la sonde ADN seule (jaune), bande n°5 modifiée par la sonde ADN seule (rose)

Comme pour les sondes ADN marquées par le 1-DTAP, il existe très peu de différences entre les monocouches formées sur les différentes électrodes. Pour l'oxydation à 0,1 V, les courants mesurés sont compris entre 162 et 208 nA ; ce qui représente un blocage du courant compris entre 93 et 94 %. En réduction à -0,1 V, les courants mesurés à la surface des bandes modifiées sont compris entre -171 et -203 nA. Le blocage du courant correspondant est donc compris entre 93 et 94 %. Les monocouches formées sont donc très homogènes entre elles. En comparaison avec les sondes marquées par le 1-DTAP, le transfert électronique est un peu moins efficacement bloqué avec les sondes marquées par le 3-DTAP. Cette légère différence peut s'expliquer par la différence d'ancrage. Le 3-DTAP présente un encombrement stérique plus important et la compacité de la SAM formée est un peu moins importante. En conséquence, le transfert électronique est moins efficacement bloqué à cause d'une densité de charges négatives en surface des électrodes un peu moins importante. En ce

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

qui concerne la robustesse de la couche formée par ces sondes 3-DTAP, les voltampérogrammes moyens de l'expérience de désorption sont présentés sur la Figure IV-9.

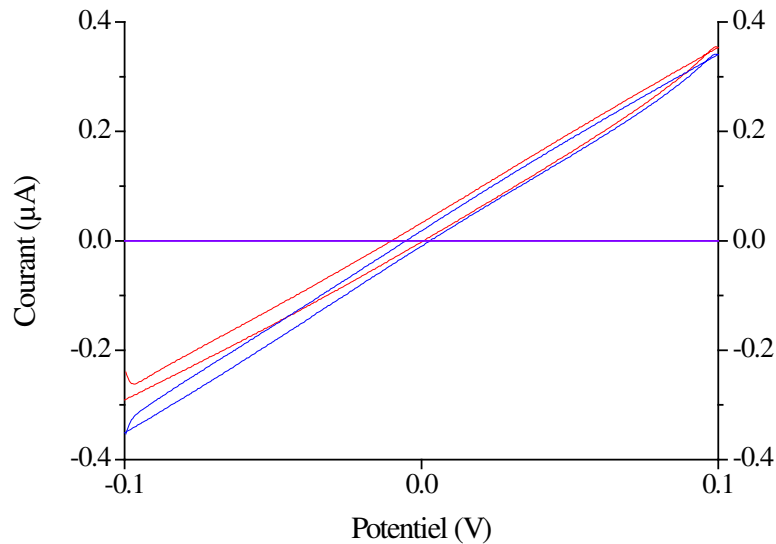


Figure IV-9 : Comparaison des voltampérogrammes moyens obtenus à la surface du réseau d'électrodes d'or 25_200 modifiées par la sonde ADN marquée 3-DTAP juste après adsorption (rouge) et après immersion 30 minutes dans NaCl 0,5 M (bleu), blanc NaCl 0,5 M (violet)

Les courbes avant et après immersion dans NaCl 0,5 M sont assez semblables comme pour la monocouche préparée avec les sondes 1-DTAP. En oxydation à 0,1 V, le courant mesuré avant hybridation est de 355 nA contre 341 nA après immersion. Les courants sont identiques et ne montrent pas de désorption des sondes. En réduction, à -0,1 V, le courant mesuré vaut -291 nA alors qu'il vaut -351 nA après immersion. Cette légère augmentation du courant indique une faible désorption des sondes de la monocouche. Cependant, en comparant avec l'oxydation où aucune désorption n'est observée, il est possible de conclure qu'il n'y a que peu de désorption pour cette monocouche même si elle est un peu moins robuste que celle préparée avec les sondes 1-DTAP.

Les monocouches formées sur les réseaux d'électrodes 25_200 qu'elles soient formées avec de l'acide thioctique ou des sondes ADN marquées par les unités DTAP permettent d'obtenir un blocage du transfert électronique plus efficace qu'avec les UMEs unitaires et également plus robustes. Le format des nouvelles électrodes en réseau permet donc un gain de temps en effectuant jusqu'à 10 mesures simultanément, un gain de robustesse et devrait permettre d'avoir une meilleure sensibilité puisque le transfert électronique est plus efficacement bloqué avant hybridation. Au vu des résultats intéressants de formation et de robustesse des monocouches formées avec les sondes ADN marquées par les unités DTAP, il

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

est maintenant nécessaire d'étudier les performances de biocapteurs fabriqués avec ces sondes.

D. Biocapteurs élaborés à partir des sondes marquées par les unités DTAP

Par la suite des biocapteurs ont été fabriqués afin d'évaluer leurs performances. Les biocapteurs ont été réalisés avec les sondes ADN marquées par le 1-DTAP d'une part et par le 3-DTAP d'autre part. Pour accéder au courant quasi-stationnaire traversant les électrodes de type bande et comme décrit page 65, la chronoampérométrie est utilisée et permet de mesurer le courant en fonction du temps pendant 60 secondes. Dans chacun des cas, une courbe de calibration a été réalisée permettant de mesurer la limite de détection du biocapteur concerné.

1) Biocapteurs réalisés à partir de sondes ADN marquées par le 1-DTAP

Les premiers biocapteurs réalisés avec les sondes marquées par le 1-DTAP ont été élaborés avec l'électrolyte classique. Cependant, les premiers essais pour détecter la cible complémentaire à 10^{-6} M ne se sont pas montrés concluants comme présenté sur la Figure IV-10. Pour simplifier la représentation, les courbes de chronoampérométrie obtenues sur les 10 bandes du réseau ont été moyennées. Les courbes représentées sont la moyenne des 10 mesures avant hybridation et la moyenne des 10 mesures après hybridation.

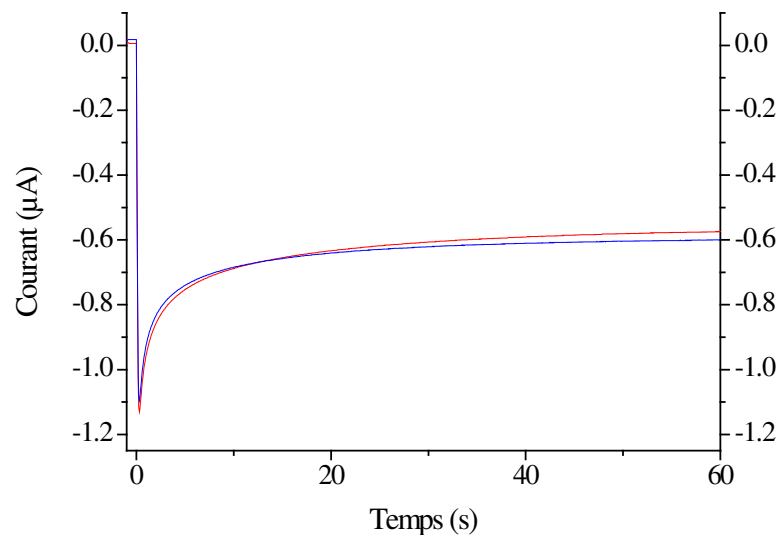


Figure IV-10 : Chronoampérogrammes moyens obtenus par mesure du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure à la surface des réseaux d'électrodes d'or 25_200 modifiés par les sondes ADN marquées par le 1-DTAP dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM à -0,1 V avant hybridation (rouge) et après hybridation (bleu)

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

Sur la Figure IV-10, les courbes de chronoampérométrie moyenne avant et après hybridation sont semblables. Le courant quasi-stationnaire obtenu après avoir imposé un potentiel de $-0,1$ V pendant 60 secondes est de -574 nA avant hybridation contre seulement -600 nA après hybridation. L'augmentation du courant après hybridation n'est que de 4 %. Il n'y a donc pas de différence significative entre le courant avant et après hybridation et la détection d'une concentration pourtant élevée de cible complémentaire n'est pas réalisée. L'hypothèse envisagée pour expliquer ce comportement est une concentration en intercalant rédox, le bleu de méthylène, trop faible. En effet, la concentration utilisée de 10^{-8} M dans l'électrolyte classique a été optimisée sur des UMEs unitaires. Dans le cas des réseaux, la surface concernée est beaucoup plus importante de même que le nombre de sondes ADN adsorbées. De ce fait, la concentration en bleu de méthylène doit être optimisée avec les dispositifs en réseau.

a) Optimisation de la concentration en bleu de méthylène dans l'électrolyte

Pour trouver la concentration suffisante en bleu de méthylène pour obtenir une détection de la cible, trois concentrations différentes ont été essayées. Des solutions d'électrolyte à 10^{-6} , $5 \cdot 10^{-6}$ et 10^{-5} M ont été réalisées et utilisées pour détecter la cible complémentaire à 1 μ M. Comme précédemment, les courbes de chronoampérométrie moyennes sont présentées. Pour cette étude d'optimisation, les mesures ne sont effectuées qu'à $-0,1$ V et non à $0,1$ V pour limiter le nombre de mesures. Les résultats pour la première concentration de 10^{-6} M en bleu de méthylène sont présentés sur la Figure IV-11.

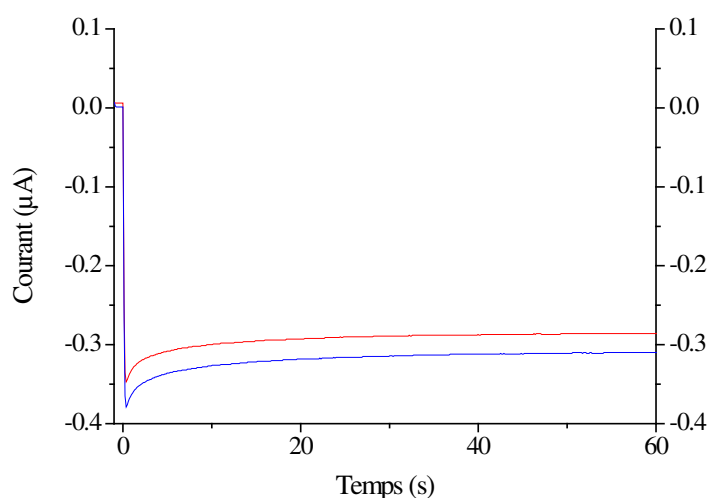


Figure IV-11 : Chronoampérogrammes moyens obtenus par mesure du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure à la surface des réseaux d'électrodes d'or 25_200 modifiés par les sondes ADN marquées par le 1-DTAP dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM contenant 10^{-6} M de MB à $-0,1$ V avant hybridation (rouge) et après hybridation (bleu)

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

Après cette première modification de la concentration en intercalant, les résultats semblent montrer une légère amélioration. En effet, le courant mesuré avant hybridation est de -288 nA contre -310 nA après hybridation à la cible complémentaire. L'augmentation du courant est de 8 % et a donc été multipliée par deux. Le changement de concentration du bleu de méthylène semble donc être la bonne piste mais doit encore être optimisée pour atteindre une détection satisfaisante.

La seconde concentration en bleu de méthylène de 5.10^{-6} M est donc testée par la suite. Les résultats obtenus avec ce nouvel électrolyte sont présentés sur la Figure IV-12.

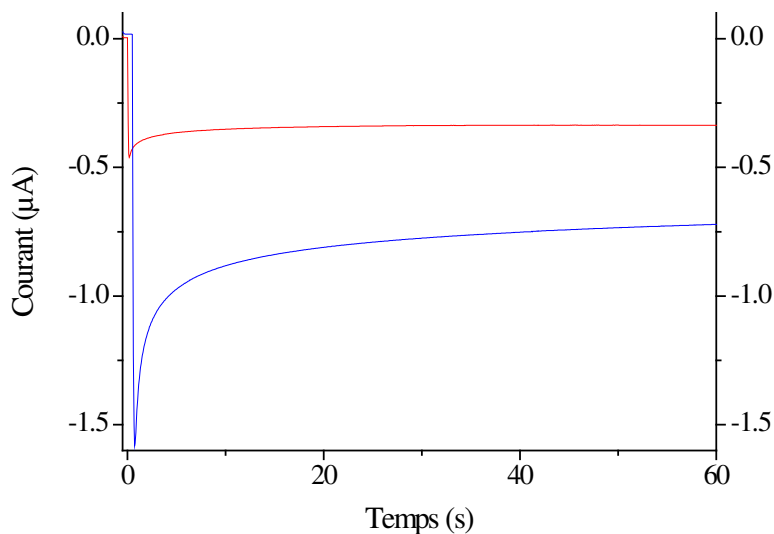


Figure IV-12 : Chronoampérogrammes moyens obtenus par mesure du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure à la surface des réseaux d'électrodes d'or 25_200 modifiés par les sondes ADN marquées par le 1-DTAP dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM contenant 5.10^{-6} M de MB à -0,1 V avant hybridation (rouge) et après hybridation (bleu)

Avec la nouvelle composition de l'électrolyte, la différence de courant entre les chronoampérogrammes moyens avant et après hybridation est beaucoup plus importante. En effet, le courant quasi-stationnaire mesuré après 60 secondes d'imposition du potentiel -0,1 V avant hybridation vaut -337 nA alors qu'après hybridation, la valeur mesurée est de -722 nA. L'augmentation du courant est donc flagrante puisqu'elle est de 114 % pour une solution de cible à 10^{-6} M. Une concentration en bleu de méthylène de 5.10^{-6} M semble donc suffisante pour obtenir une détection de la cible satisfaisante. Cependant, la dernière composition de l'électrolyte est testée pour terminer l'optimisation et définir s'il est nécessaire d'augmenter encore la concentration d'intercalant rédox.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

Les résultats obtenus avec une concentration en bleu de méthylène de 10^{-5} M sont présentés sur la Figure IV-13.

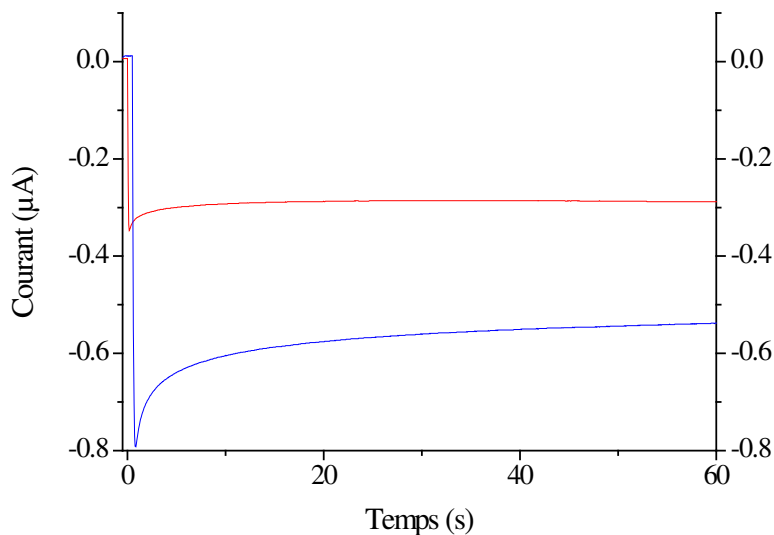


Figure IV-13 : Chronoampérogrammes moyens obtenus par mesure du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure à la surface des réseaux d'électrodes d'or 25_200 modifiés par les sondes ADN marquées par le 1-DTAP dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM contenant 10^{-5} M de MB à -0,1 V avant hybridation (rouge) et après hybridation (bleu)

Pour cette manipulation, comme précédemment, l'augmentation de courant entre avant et après l'hybridation est assez importante. Le courant moyen mesuré à la fin de la chronoampérométrie est de -288 nA avant hybridation alors qu'il vaut -538 nA après hybridation. Cela représente donc une augmentation du courant de 87 %. Cette augmentation du courant est satisfaisante et permet de réaliser des biocapteurs fonctionnels. Néanmoins, l'augmentation n'est pas aussi importante qu'avec une concentration en MB de $5 \cdot 10^{-6}$ M.

Les résultats obtenus pour cette étude d'optimisation de la concentration en bleu de méthylène sont reportés dans le Tableau IV-3.

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

Tableau IV-3 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour l'optimisation de la concentration en intercalant rédox (bleu de méthylène) dans l'électrolyte pour réaliser des biocapteurs détectant une concentration en cible de 10^{-6} M

Concentration en bleu de méthylène (M)	Différence de courant avant/après hybridation (nA)	Pourcentage d'augmentation du courant par rapport au courant sur électrode modifiée par la sonde ADN seule
10^{-8}	6	4 %
10^{-6}	22	8 %
$5 \cdot 10^{-6}$	385	114 %
10^{-5}	250	87 %

L'hypothèse d'une concentration en intercalant rédox catalysant le transfert d'électrons trop faible a été vérifiée grâce aux optimisations réalisées sur la quantité de bleu de méthylène dans l'électrolyte. En effet, en augmentant légèrement la quantité de MB dans l'électrolyte de mesure, la catalyse du transfert d'électrons est de meilleure qualité et l'augmentation de courant mesurée est plus importante. Dans le cas des réseaux d'électrodes d'or 25_200, la concentration optimale est $5 \cdot 10^{-6}$ M. Pour la suite des expérimentations menées, l'électrolyte est donc composé de $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}] / [\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ à une concentration de 5 mM chacun, de bleu de méthylène à $5 \cdot 10^{-6}$ M et de NaCl comme sel de fond à 0,5 M.

b) Evaluation des performances des biocapteurs réalisés avec la sonde 1-DTAP

Après l'optimisation réalisée sur l'électrolyte, un biocapteur a été réalisé afin d'évaluer ses performances en réalisant des cycles d'hybridation à différentes concentrations puis dénaturation comme effectué sur les biocapteurs unitaires. La gamme de concentration explorée lors de cette étude s'étend de 10^{-6} à 10^{-18} M. Les résultats obtenus sur ce biocapteur sont regroupés sur la Figure IV-14. Les valeurs de courant données sur cet histogramme représente la moyenne de 20 mesures ; 1 mesure par bande à -0,1 V et à 0,1 V.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

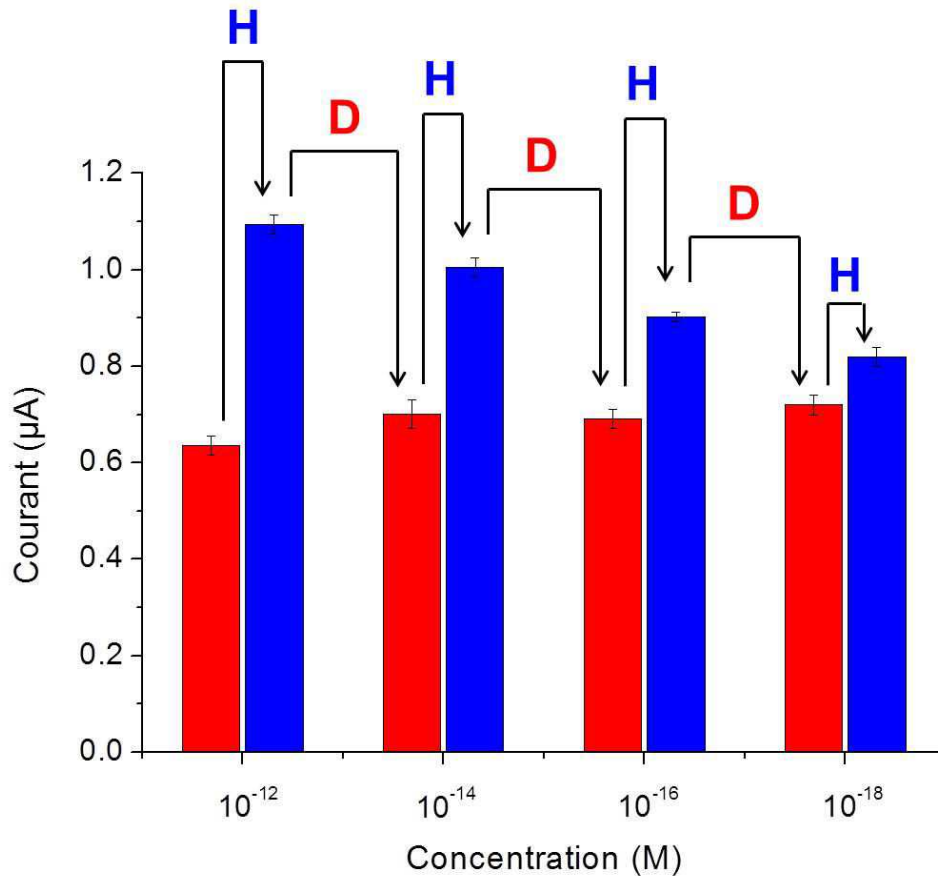


Figure IV-14 : Histogramme montrant le courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure moyen mesuré à la surface du réseau d'électrodes d'or 25_200 au cours des cycles d'hybridation et dénaturation de l'électrode pour les différentes concentrations en cible; électrode modifiée par la sonde marquée 1-DTAP seule (rouge), électrode modifiée par la sonde hybridée (bleu), H : Hybridation de la cible, D : Dénaturation du duplex ADN

Cet histogramme permet d'observer la diminution de la différence de courant avec la concentration en cible. L'histogramme permet également d'observer les performances du biocapteur en termes de robustesse. Le courant mesuré avant hybridation reste relativement stable au cours des cycles de dénaturation. En effet, les courants mesurés sont compris entre 636 et 720 nA. Toutes les concentrations étudiées ne sont pas représentées. En effet, au-dessus de 10⁻¹² M le biocapteur est saturé. En effet, la différence de courant reste semblable quelle que soit la concentration étudiée. Pour plus de clarté de la figure, seule la gamme dynamique du capteur a été représentée. La même représentation est utilisée pour la courbe de calibration présentée sur la Figure IV-15.

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

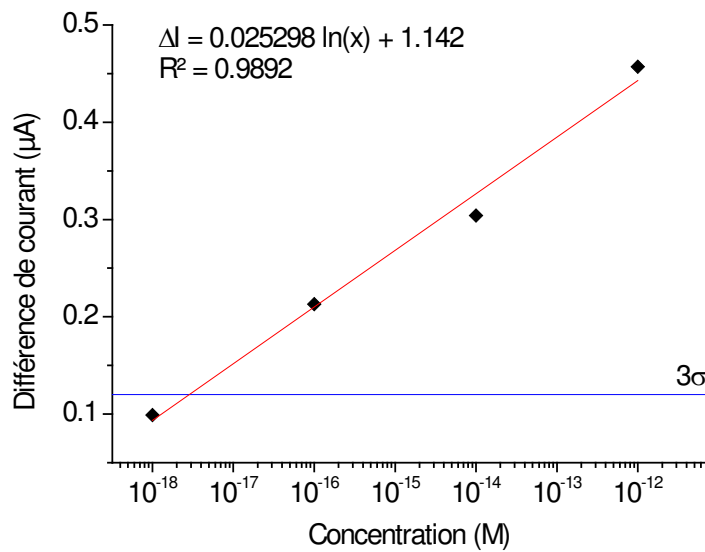


Figure IV-15 : Courbe de calibration du biocapteur fabriqué sur le réseau d'électrodes d'or 25_200 modifié par les sondes ADN marquées par le 1-DTAP ; Différence de courant pour chaque concentration (losanges noirs), courbe de tendance des points (rouge), triple de la déviation standard (bleu)

Cette courbe de calibration permet de mesurer les performances du capteur en termes de sensibilité. La LOD est obtenue graphiquement et la limite de détection obtenue pour le biocapteur sur le réseau 25_200 avec les sondes ADN 1-DTAP et l'électrolyte optimisé vaut $3 \cdot 10^{-18}$ M. Cette limite de détection correspond aux performances recherchées pour détecter les miRNAs dans les fluides biologiques. D'autre part, la fiabilité du capteur est correcte puisque chaque point est la moyenne d'une vingtaine de mesures. Ces résultats, issus de l'optimisation des différents paramètres ainsi que de la géométrie des électrodes sont très satisfaisants. A la suite de ces résultats, l'étude des biocapteurs conçus avec les sondes ADN marquées par le 3-DTAP a été réalisée.

2) Biocapteurs réalisés à partir de sondes ADN marquées par le 3-DTAP

Pour évaluer les performances du biocapteur réalisé avec les sondes 3-DTAP, la même méthode est utilisée. En revanche, la gamme de concentration étudiée est réduite à la gamme dynamique des biocapteurs avec la sonde 1-DTAP, c'est-à-dire entre 10^{-12} M et 10^{-18} M. Les résultats obtenus sont regroupés sur la Figure IV-16.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

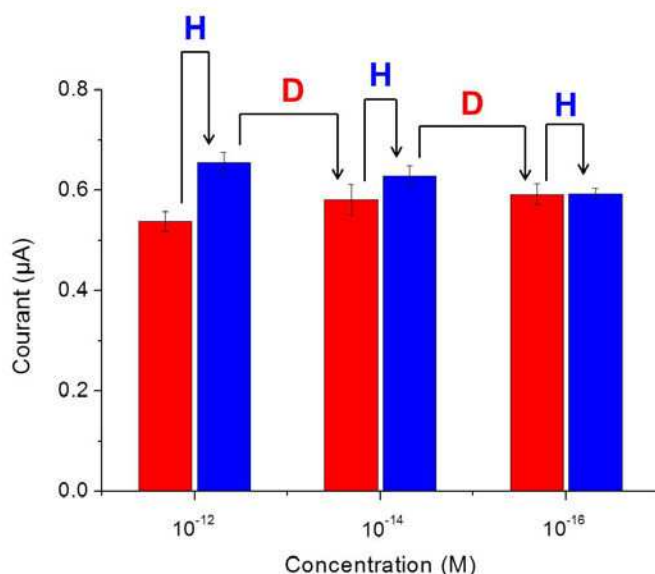


Figure IV-16 : Histogramme montrant le courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure moyen mesuré à la surface du réseau d'électrodes d'or 25_200 au cours des cycles d'hybridation et dénaturation de l'électrode pour les différentes concentrations en cible; électrode modifiée par la sonde marquée 3-DTAP seule (rouge), électrode modifiée par la sonde hybridée (bleu), H : Hybridation de la cible, D : Dénaturation du duplex ADN

L'histogramme de la Figure IV-16 regroupant les différentes quantifications réalisées sur le biocapteur fabriqué à partir des sondes 3-DTAP montre que l'augmentation du courant due à l'hybridation est faible dès 10⁻¹⁴ M et devient nulle à une concentration en cible de 10⁻¹⁶ M. Aucune mesure n'est alors réalisée avec une concentration en cible de 10⁻¹⁸ M comme pour le capteur précédent. Une différence de sensibilité importante existe donc entre les biocapteurs réalisés à partir des deux sondes marquées par les unités DTAP. Cette diminution de sensibilité est confirmée par la courbe de calibration permettant le calcul de la LOD représentée sur la Figure IV-17.

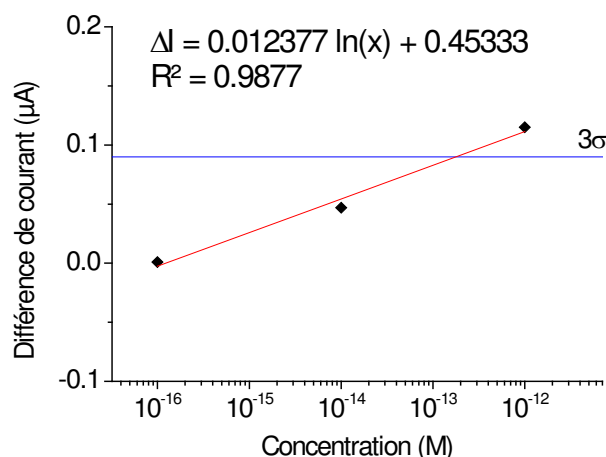


Figure IV-17 : Courbe de calibration du biocapteur fabriqué sur le réseau d'électrodes d'or 25_200 modifié par les sondes ADN marquées par le 3-DTAP; Différence de courant pour chaque concentration (losanges noirs), courbe de tendance des points (rouge), triple de la déviation standard (bleu)

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

En effet, la tendance observée sur l'histogramme précédent est confirmée par la courbe de calibration et la définition graphique de la LOD. Pour ce biocapteur réalisé avec les sondes marquées par le 3-DTAP, la limite de détection est de 2.10^{-13} M, soit 5 ordres de grandeur supérieure à celle des biocapteurs précédents. Il semble donc que la gamme dynamique du capteur avec les sondes 3-DTAP se situe à des concentrations plus élevées. Ceci peut s'expliquer par la concentration surfacique en sondes ADN plus faible avec les sondes marquées par le 3-DTAP. Comme expliqué un peu plus haut, la molécule de 3-DTAP permettant l'adsorption des sondes ADN est plus encombrante que le 1-DTAP. Aussi, moins de sondes ADN sont présentes à la surface des électrodes et la sensibilité en est diminuée. C'est cette hypothèse qui semble la plus pertinente pour expliquer la différence entre ces monocouches de sondes ADN.

Conclusion et Perspectives

En résumé, le travail effectué au cours de cette thèse a permis de montrer d'une part qu'il est possible de réaliser des biocapteurs à la fois avec des électrodes unitaires de carbone graphite en utilisant un sel de diazonium réduit et le couplage peptidique et aussi avec des électrodes d'or en formant des monocouches auto-assemblées à leur surface. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les UMEs d'or dans des conditions optimisées pour l'immobilisation et la détection avec une LOD de l'ordre de 10^{-14} M. D'autre part, les UMEs composées de fibre de carbone permettent la fabrication d'un biocapteur à usage unique sans possibilité de réaliser des cycles d'hybridation et dénaturation. L'emploi du carbone graphite a de ce fait été abandonné. Toutefois, il serait très intéressant de poursuivre le travail initié sur ce matériau en mettant au point la lithographie du carbone pour former des réseaux d'électrodes.

Aussi, ces travaux ont permis de réaliser un comparatif du comportement de deux couples médiateur/intercalant rédox pour la mesure électrochimique. Au terme de l'étude, le couple céfadroxil-proflavine présente de meilleures performances en termes de discrimination entre ADN simple brin et ADN double brin et, par conséquent, en termes de limite de détection. Malheureusement, l'électrolyte composé de ce couple subit une dégradation assez rapide dans le temps et induisant ainsi un problème de reproductibilité. L'utilisation de la proflavine a permis de proposer un mécanisme de catalyse du transfert d'électrons différent de celui proposé dans la littérature avec le bleu de méthylène. Il serait toutefois pertinent et intéressant de réaliser une étude mécanistique supplémentaire pour valider l'hypothèse émise et confirmer ce mécanisme. Par ailleurs, plusieurs marquages des sondes ADN ont été étudiés pour former des monocouches auto-assemblées sur l'or. Les résultats obtenus ont confirmé que les marquages utilisant un disulfure cyclique permettent l'obtention de monocouches plus robuste dans le temps et présentant moins de désorption par rapport aux thiols. De plus, le marquage par le 1-DTAP permet d'obtenir un meilleur taux d'hybridation que les autres marquages. Aussi, il a été montré durant cette thèse que la longueur de la chaîne atomique constituant le marquage des sondes a une importance primordiale. En effet, une chaîne d'une longueur supérieure à la dizaine d'atomes et non conjuguée ne permet pas d'observer le transfert d'électrons longue distance même en présence de l'intercalant rédox.

La sélectivité des biocapteurs conçus durant ces travaux de thèse est très bonne puisque la détection d'un unique défaut d'appariement (*mismatch*) dans la séquence de

Conclusion et Perspectives

nucléotides de la cible a pu être détectée de manière reproductible à des concentrations un million de fois supérieures aux concentrations rencontrées en milieu biologique. Contrairement à la détection de la cible complémentaire qui se manifeste par une augmentation du courant faradique d'oxydo-réduction de la sonde rédox en solution, la détection d'une cible présentant au moins un *mismatch* se manifeste par une diminution significative comprise entre 30 et 40 % de l'électro-activité de la sonde rédox.

Finalement, ces travaux ont permis de montrer la possibilité d'utiliser des réseaux d'électrodes de types bandes en or lithographiées pour réaliser les biocapteurs. Les résultats obtenus après optimisation des divers paramètres sont meilleurs qu'avec les UMEs unitaires d'or avec une LOD calculée de 3.10^{-18} M qui est pour l'heure la plus basse limite de détection connue dans la littérature pour les capteurs par transfert d'électrons longue distance catalysé.

Des perspectives de développement de ces dispositifs concernent dans un premier temps l'optimisation. Il est possible d'élargir encore les études sur l'électrolyte avec de nouveaux couples sonde/intercalant rédox et sur l'ancrage des sondes qui restent relativement chères. Cependant, les principales perspectives consistent à tester le dispositif utilisant les sondes marquées 1-DTAP dans des conditions réelles sur des échantillons issus d'un service d'analyses médicales hospitalier pour comparer ses performances avec la technique conventionnelle, la PCR. Cela permettrait alors de mettre en évidence d'éventuels axes d'amélioration du dispositif. Dans un second temps, il est primordial de travailler sur l'industrialisation du montage électrochimique de manière à obtenir des réseaux de microélectrodes et des puits en PDMS normalisés. Pour cela, il est nécessaire de mettre au point une méthode de fabrication des puits reproductible, il est également indispensable d'améliorer les contacts électriques avec les plots lithographiés et enfin de développer un potentiostat intégrant les contre-électrodes (et électrodes de référence) permettant l'adressage individuel de chaque bande.

Enfin, toujours dans l'optique du diagnostic médical, il serait intéressant de développer une méthode de fonctionnalisation des différentes bandes individuellement avec différentes séquences de sondes ADN pour parvenir à une détection simultanée de différents microARNs d'intérêt.

Finalement, l'intégration de ce type de capteur dans un système microfluidique pour l'élaboration d'un laboratoire sur puce intégrant la purification de l'échantillon biologique, la quantification simultanée des différents miRNAs d'intérêt et enfin le traitement des données

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

pour obtenir un dispositif clés en main très facile d'utilisation pour les cliniciens et médecins constituera l'aboutissement du développement.

Annexes

A1. Fabrication des puits en PolyDiMethylSiloxane (PDMS)

Les réseaux d'électrodes d'or sont surmontés d'un bloc de PDMS dans lequel sont taillés des puits qui permettent de réaliser l'immobilisation des sondes, l'hybridation des cibles et les mesures en assurant l'étanchéité de l'ensemble et en fixant la surface active d'électrodes.

1) Le PolyDiMethylSiloxane (PDMS)

Le PolyDiMethylSiloxane (Figure xviii) est un polymère organo-minéral transparent de la famille des siloxanes, très utilisé en microfluidique. Selon son taux de réticulation, il permet d'obtenir un bloc de polymère très souple ou au contraire rigide en jouant sur la quantité de réticulant et le temps de chauffage. Il est donc très apprécié car il permet des utilisations très diversifiées du fait de cette propriété. C'est également un polymère hydrophobe et donc très peu mouillable qui lui confère de former une barrière étanche avec les solvants aqueux.

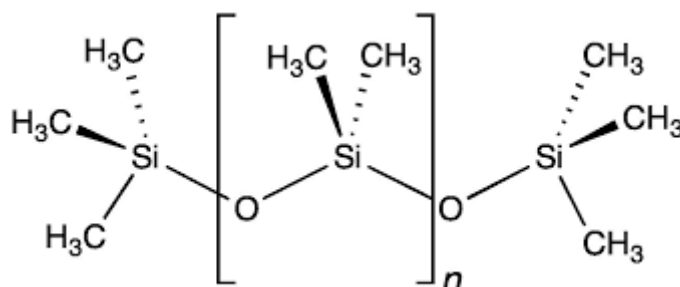


Figure xviii : Structure chimique du PDMS

Ce polymère présente plusieurs autres avantages. Il peut se coller de manière étanche sur le verre, permettant de former des puits de travail ou des micro-canaux. Il est considéré comme biocompatible et présente donc un intérêt particulier pour les applications biologiques. Il est déformable et facile à mouler et s'adapte très bien à de nombreux montages. Il est relativement inerte chimiquement et électrochimiquement à des pH biologiques. Enfin, il est très peu coûteux et permet donc de fabriquer des dispositifs micro-fluidiques à faibles coûts.

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

2) Fabrication des puits en PDMS

Le PDMS utilisé au cours de cette thèse est un kit prêt à l'emploi Elecolit RTV615. Il suffit de mélanger le monomère et le réticulant fourni puis le gel est versé dans une boîte de Petri et mis à l'étuve à 150°C pendant 20 minutes environ. Le bloc obtenu présente une hauteur d'environ 8 mm et peut être découpé à la taille d'une lame de microscope (76 mm x 26 mm) pour s'adapter sur les réseaux d'électrodes. 5 puits de 5 mm de diamètre sont ensuite taillés dans la longueur du bloc à l'aide d'un emporte-pièce de 6 mm de diamètre (le polymère s'étend après la découpe). Le bloc de PDMS (Figure xix) est ensuite collé par simple pression manuelle en alignant les puits sur les bandes d'électrodes. Le dispositif n'est soumis à aucune pression et le bloc ne se décolle pas.



Figure xix : Photo des puits de mesures taillés dans un bloc de PDMS

Annexes

A2. Lithographie des réseaux d'électrodes d'or en bandes interdigitées

Les dispositifs de réseaux d'électrodes d'or en bandes interdigitées ont été réalisés en partenariat avec *L. Thouin* et *E. Aït-Yahiatène* du laboratoire *PASTEUR* de l'*ENS*.

Un design comprenant dix microbandes d'or interdigitées sur une lame de verre (Figure xx) a été réalisé par des techniques de lithographie optique et de *lift-off*. Le design est défini par un masque optique en négatif, obtenu par lithographie avec un faisceau d'électrons haute résolution. Ce masque a ensuite été répliqué par lithographie optique sur un substrat en verre en une fine couche de matériau AZ-5214 photo-résistant déposé par centrifugation. Ensuite, une couche de titane de 5 nm d'épaisseur est déposée sur le substrat en verre développé pour augmenter l'adhésion de l'or sur le dispositif. Ensuite, une couche d'or d'une épaisseur de 20 nm est déposée par évaporation à la surface du dispositif. Après cette étape, la couche photo-résistante est dissoute, ne laissant alors que les dépôts métalliques en contact direct avec le verre. Toutes les bandes présentent des dimensions identiques (5 cm de longueur, 25 μm de largeur) et sont séparées par un espace de 200 μm .

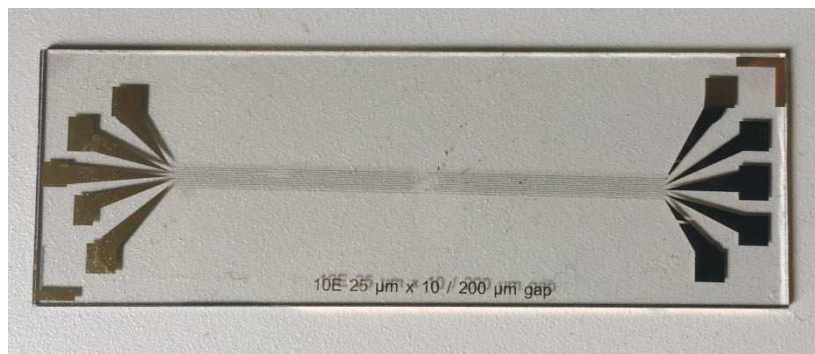


Figure xx : Photo des réseaux d'électrodes d'or lithographiés obtenus

A3. Synthèse du 4-carboxybenzenediazonium

Le sel de 4-carboxybenzenediazonium est synthétisé au laboratoire. Il s'agit du 4-carboxybenzenediazonium tétrafluoroborate. Il est muni d'une fonction acide carboxylique sur le cycle aromatique pour permettre un couplage peptidique des sondes ADN fonctionnalisées par une amine.

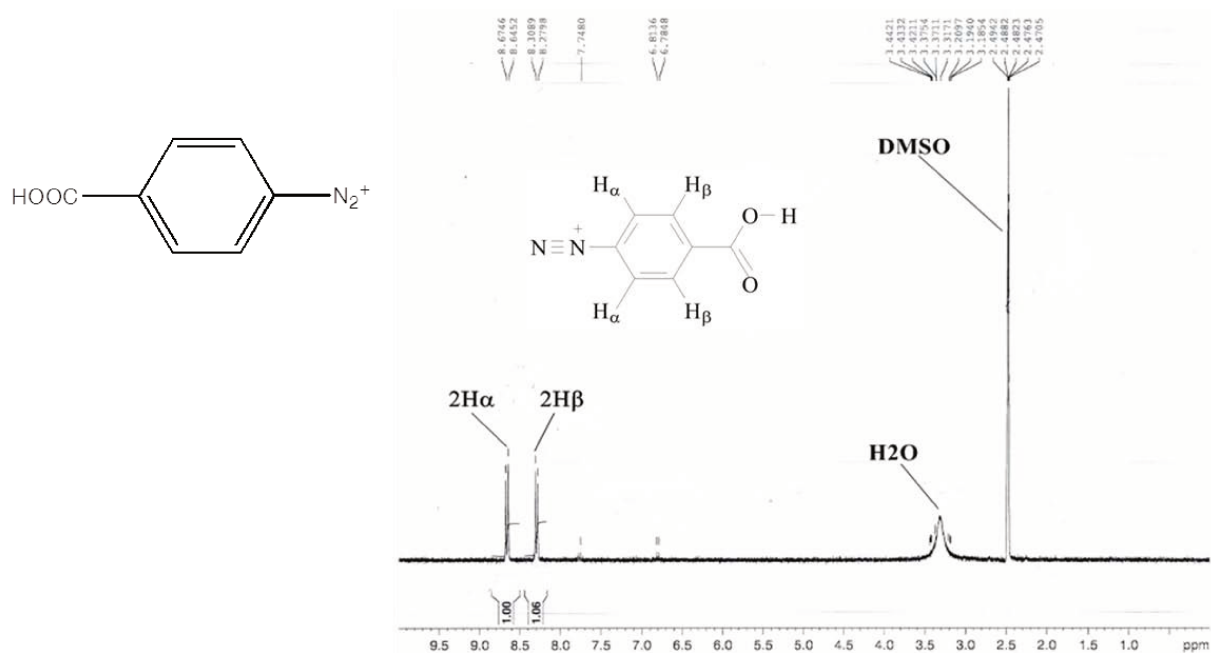


Figure xxi : Structure du sel de diazonium choisi et spectre RMN correspondant

Protocole de synthèse du 4-carboxybenzenediazonium tétrafluoroborate

Produits utilisés : 4-aminobenzoic acid (M = 137,14 g/mol)

Sodium nitrite (M = 69,01 g/mol)

HBF₄ à 48 % dilué au 5^{ème}

Annexes

Protocole :

4 mmol (0,548 g) de 4-aminobenzoic acid sont dissous dans 4 mL de HBF_4 dilué et la solution est placée dans un bain de glace. Après avoir attendu 15 minutes environ que la solution refroidisse, la solution de nitrite de sodium est ajoutée goutte à goutte (4,5 mmol soit 0,311 g dissous dans 0,8 mL d'eau distillée).

Laisser réagir pendant 60 minutes.

Un précipité de couleur beige est obtenu, récupéré sur Büchner et rincé avec du diethyl ether glacé. Le précipité est récupéré puis redissous dans 5 mL d'acétonitrile sur lequel est ajouté un excès de diethyl ether glacé (100 mL). La phase organique obtenue est placée au congélateur pendant 8 à 10 heures puis le précipité formé est de nouveau récupéré sur Büchner.

A4. Synthèse du ferrocenylmethylamine [176]

Le ferrocenylmethylamine (Figure xxii) est synthétisé au laboratoire. Il s'agit d'une molécule de ferrocène électro-active substituée par un groupement méthylamine pour permettre le couplage peptidique avec les 4-carboxybenzenediazonium. L'électro-activité du ferrocène permet d'évaluer le nombre de diazonium greffé après couplage peptidique.

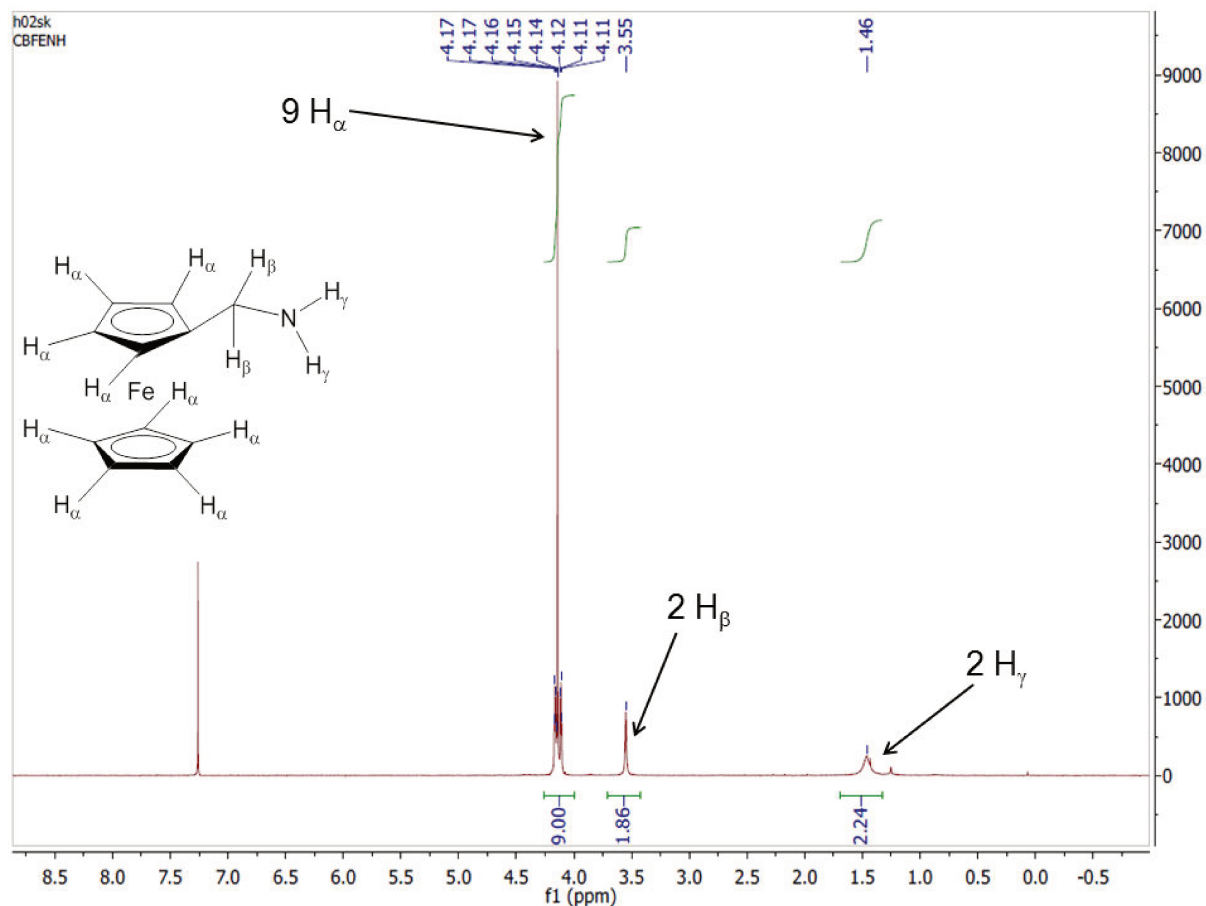


Figure xxii : Structure chimique et spectre RMN ¹H du ferrocenylmethylamine

C'est une huile orangée.

¹H NMR (CDCl₃): δ 4,11-4,17 (9H, m, C_p), 3,55 (2H, s, CH₂), 1,46 (2H, s, NH₂).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 90,8 , 68,3 , 67,7 , 67,1 , 41,1.

Protocole de synthèse du ferrocenylmethylamine

Un mélange de ferrocène carboxaldéhyde (1,00 g), d'hydroxyde de sodium (1,10 g) et de chlorhydrate d'hydroxylamine (0,65 g) dans 50 mL d'éthanol est chauffé à reflux pendant trois heures. Après refroidissement, le mélange est hydrolysé et extrait par le dichlorométhane (3 × 100 mL). La phase organique est séchée avec du sulfate de sodium (Na₂SO₄) et le

Annexes

solvant est évaporé sous vide. L'oxime de ferrocenylcarboxaldéhyde, un solide orange, est obtenue. Ce solide (0,459 g) dissous dans le THF anhydre est ensuite ajouté goutte à goutte à LiAlH_4 (0,403 g) dissous dans 10 mL de THF anhydre. Le mélange est chauffé à reflux pendant 6 heures. Après refroidissement, le mélange est hydrolysé et extrait par le diéthyléther (3×100 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et le solvant est évaporé sous vide pour donner le ferrocenylméthylamine sous forme d'une huile orange.

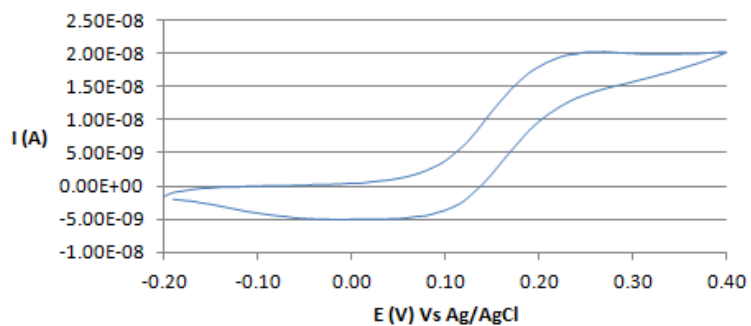


Figure xxiii : Electroactivité du ferrocenylméthylamine dans NaCl 0,5 M sur électrode de carbone graphite par voltampérométrie cyclique à 50mV/s

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

A5. Mesures par microbalance à cristal de quartz (QCM)

1) Principe de la microbalance à quartz

La microbalance à cristal de quartz (QCM) permet de mesurer la variation de masse à la surface du quartz avec une grande précision. Le cristal de quartz présente des propriétés piézoélectriques qui permettent de corrélérer les variations de la fréquence d'oscillation et la masse déposée sur la surface active du quartz.

Sauerbrey a établi dès 1959 une équation reliant les variations de masse et de fréquence, dans l'air, en considérant que la variation de masse consécutive à un dépôt est assimilable à une augmentation de masse du quartz lui-même[177]. Cette considération repose sur l'hypothèse que le matériau utilisé pour réaliser le dépôt est purement élastique et fin. La relation entre la masse du matériau, Δm , et la translation de la fréquence de résonance, Δf_m , du quartz est linéaire et peut s'exprimer selon :

$$\Delta f_m = -k_s \times \Delta m = -\left(\frac{2 \times f_0^2}{S \times n \times \sqrt{\mu \times \rho}}\right) \times \Delta m$$

Δf_m : variation de la fréquence de résonance de la microbalance (Hz)

f_0 : fréquence de résonance de la microbalance dans l'air (Hz)

S : surface active de l'électrode métallique déposée sur le quartz (cm²)

n : numéro de l'harmonique

μ : module de cisaillement du quartz (2,947.10¹¹ g.s⁻².cm⁻¹)

k_s : coefficient de sensibilité de la microbalance (Hz.g⁻¹.cm²)

2) Dispositif de la cellule de mesure par QCM

La mesure est effectuée sur une électrode constituée d'une couche d'or déposée sur un résonateur à quartz opérant à une fréquence de 9 MHz de marque *AWSensors* correspondant à la référence AWS SNS 000019C. Le cristal est taillé sous forme d'un disque relativement fin dont le diamètre est de 14 mm. Sur chacune des faces, l'or a été déposé par évaporation sous vide, sous la forme d'un disque de 5 mm de diamètre prolongé par une bande servant à la

Annexes

connexion électrique (Figure xxiv). Une sous-couche de titane est intercalée entre le cristal et l'or en raison de la faible adhérence de l'or sur le quartz. En général, l'électrode d'or a une épaisseur de 100 à 200 nm et la sous-couche de titane est environ dix fois plus fine. La zone de dépôt est reliée à un oscillateur de 27 MHz pour réaliser les mesures avec la troisième harmonique du résonateur. L'ensemble constitué par le quartz et l'oscillateur est appelé **microbalance à quartz**. Les microbalances utilisées lors de ces études ont toutes été réalisées au Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques (LISE). Ce type de dispositif permet d'effectuer des mesures gravimétriques, voire électrogravimétriques, en suivant la variation de la fréquence de la microbalance lors de la polarisation de l'interface.

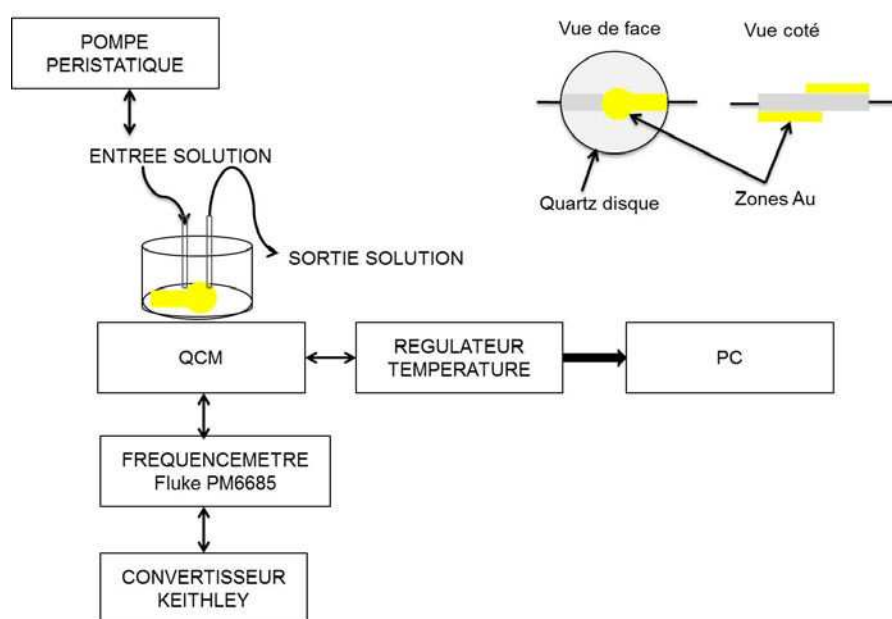


Figure xxiv : Schéma général de la microbalance à quartz utilisée

Références

- [1] « OMS | Cancer », *WHO*. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/>. [Consulté le: 09-févr-2017].
- [2] « Les chiffres clés du cancer en France », *Ligue contre le cancer*. [En ligne]. Disponible sur: /article/6397_les-chiffres-cles-des-cancers. [Consulté le: 19-juin-2017].
- [3] OMS, « Fact Sheets by Cancer », 2012. [En ligne]. Disponible sur: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. [Consulté le: 10-juill-2017].
- [4] « Infarctus du myocarde ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/thematiques/physiopathologie-metabolisme-nutrition/dossiers-d-information/infarctus-du-myocarde>. [Consulté le: 19-juin-2017].
- [5] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, et G. S. Wilson, « Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification1 », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, n° 1-2, p. 121-131, janv. 2001.
- [6] F. Miescher, *In die Histochemischen und Physiologischen Arbeiten von Friedrich Miescher*, Vogel. 1869.
- [7] R. Dahm, « Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research », *Hum. Genet.*, vol. 122, n° 6, p. 565-581, janv. 2008.
- [8] J. D. Watson et F. H. C. Crick, « Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid », *Nature*, vol. 171, n° 4356, p. 737-738, avril 1953.
- [9] J. Madic, « L'ADN tumoral circulant comme biomarqueur de l'évolution tumorale: application au mélanome uvéal métastatique », *Lett. Cancérologue*, vol. 21, n° 10, p. 486-490, 2012.
- [10] F. Jacob et J. Monod, « Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins », *J. Mol. Biol.*, vol. 3, n° 3, p. 318-356, juin 1961.
- [11] N. H. Williams, « DNA Hydrolysis: Mechanism and Reactivity », in *Artificial Nucleases*, D. M. A. Zenkova, Éd. Springer Berlin Heidelberg, 2004, p. 3-17.

- [12] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, et V. Ambros, « The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* », *Cell*, vol. 75, n° 5, p. 843-854, décembre 1993.
- [13] H. Vaucheret, C. Béclin, et M. Fagard, « Post-transcriptional gene silencing in plants », *J. Cell Sci.*, vol. 114, n° 17, p. 3083-3091, sept. 2001.
- [14] J. Lu *et al.*, « MicroRNA expression profiles classify human cancers », *Nature*, vol. 435, n° 7043, p. 834-838, juin 2005.
- [15] C. Li, F. Pei, X. Zhu, D. D. Duan, et C. Zeng, « Circulating microRNAs as novel and sensitive biomarkers of acute myocardial Infarction », *Clin. Biochem.*, vol. 45, n° 10-11, p. 727-732, juillet 2012.
- [16] X. W. Wang, N. H. H. Heegaard, et H. Ørum, « MicroRNAs in Liver Disease », *Gastroenterology*, vol. 142, n° 7, p. 1431-1443, juin 2012.
- [17] Y. Saito, H. Suzuki, et T. Hibi, « The role of microRNAs in gastrointestinal cancers », *J. Gastroenterol.*, vol. 44, n° S19, p. 18-22, janv. 2009.
- [18] M. Tsujiura *et al.*, « Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers », *Br. J. Cancer*, vol. 102, n° 7, p. 1174-1179, mars 2010.
- [19] R. K. Saiki *et al.*, « Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia », *Science*, vol. 230, n° 4732, p. 1350-1354, déc. 1985.
- [20] T. D. Brock et H. Freeze, « *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Nonsporulating Extreme Thermophile », *J. Bacteriol.*, vol. 98, n° 1, p. 289-297, janv. 1969.
- [21] Brooklyn Academic, « Polymerase Chain Reaction ». [En ligne]. Disponible sur: <http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/genetic-engin/pcr.html>. [Consulté le: 10-juill-2017].
- [22] V. Potapov et J. L. Ong, « Examining Sources of Error in PCR by Single-Molecule Sequencing », *PLOS ONE*, vol. 12, n° 1, p. e0169774, janv. 2017.

- [23] L. Lin *et al.*, « Novel BOD optical fiber biosensor based on co-immobilized microorganisms in ormosils matrix », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, n° 9, p. 1703-1709, mars 2006.
- [24] A. Hreniak, K. Maruszewski, J. Rybka, A. Gamian, et J. Czyżewski, « A luminescence endotoxin biosensor prepared by the sol-gel method », *Opt. Mater.*, vol. 26, n° 2, p. 141-144, juillet 2004.
- [25] A. Ulatowska-Jarża et H. Podbielska, « Biosensor for urea detection based on sol-gel technology », *Opt. Appl.*, n° Vol. 32, nr 4, p. 685-690, 2002.
- [26] R. L. Bunde, E. J. Jarvi, et J. J. Rosentreter, « Piezoelectric quartz crystal biosensors », *Talanta*, vol. 46, n° 6, p. 1223-1236, août 1998.
- [27] J. Li, K. Sun, Z. Chen, J. Shi, D. Zhou, et G. Xie, « A fluorescence biosensor for VEGF detection based on DNA assembly structure switching and isothermal amplification », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 89, Part 2, p. 964-969, mars 2017.
- [28] S.-J. Chen, C.-C. Huang, et H.-T. Chang, « Enrichment and fluorescence enhancement of adenosine using aptamer-gold nanoparticles, PDGF aptamer, and Oligreen », *Talanta*, vol. 81, n° 1-2, p. 493-498, avril 2010.
- [29] X. Chu *et al.*, « A self-assembly aptasensor based on thick-shell quantum dots for sensing of ochratoxin A », *Nanoscale*, vol. 8, n° 7, p. 4127-4133, févr. 2016.
- [30] S. Dai, S. Wu, N. Duan, et Z. Wang, « A near-infrared magnetic aptasensor for Ochratoxin A based on near-infrared upconversion nanoparticles and magnetic nanoparticles », *Talanta*, vol. 158, p. 246-253, sept. 2016.
- [31] Y. Teng, X. Jia, S. Zhang, J. Zhu, et E. Wang, « A nanocluster beacon based on the template transformation of DNA-templated silver nanoclusters », *Chem. Commun.*, vol. 52, n° 8, p. 1721-1724, janv. 2016.
- [32] Y. Wang, N. Gan, Y. Zhou, T. Li, Y. Cao, et Y. Chen, « Novel single-stranded DNA binding protein-assisted fluorescence aptamer switch based on FRET for homogeneous detection of antibiotics », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 87, p. 508-513, janv. 2017.

- [33] Z. Hashemian, T. Khayamian, M. Saraji, et M. P. Shirani, « Aptasensor based on fluorescence resonance energy transfer for the analysis of adenosine in urine samples of lung cancer patients », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 79, p. 334-340, mai 2016.
- [34] T. Liebermann, W. Knoll, P. Sluka, et R. Herrmann, « Complement hybridization from solution to surface-attached probe-oligonucleotides observed by surface-plasmon-field-enhanced fluorescence spectroscopy », *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 169, n° 1-3, p. 337-350, sept. 2000.
- [35] Q. Chen *et al.*, « A label-free electrochemiluminescence aptasensor for thrombin detection based on host-guest recognition between tris(bipyridine)ruthenium(II)- β -cyclodextrin and aptamer », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 54, p. 547-552, avril 2014.
- [36] Z. Li *et al.*, « Electrogenerated chemiluminescence aptasensor for ultrasensitive detection of thrombin incorporating an auxiliary probe », *Talanta*, vol. 130, p. 370-376, décembre 2014.
- [37] S. Cai *et al.*, « Platinum(II)-Oligonucleotide Coordination Based Aptasensor for Simple and Selective Detection of Platinum Compounds », *Anal. Chem.*, vol. 87, n° 20, p. 10542-10546, oct. 2015.
- [38] X. Huang, Y. Liang, L. Ruan, et J. Ren, « Chemiluminescent detection of cell apoptosis enzyme by gold nanoparticle-based resonance energy transfer assay », *Bioanal. Chem.*, vol. 406, n° 23, p. 5677-5684, sept. 2014.
- [39] D. Quesada-González et A. Merkoçi, « Nanoparticle-based lateral flow biosensors », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 73, p. 47-63, nov. 2015.
- [40] S. Song *et al.*, « Multiplex Lateral Flow Immunoassay for Mycotoxin Determination », *Anal. Chem.*, vol. 86, n° 10, p. 4995-5001, mai 2014.
- [41] J. Jeong, H. Kim, D. J. Lee, B. J. Jung, et J. B. Lee, « RCA-Based Biosensor for Electrical and Colorimetric Detection of Pathogen DNA », *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 11, n° 1, p. 242, mai 2016.

- [42] M. Lazerges, H. Perrot, N. Zeghib, E. Antoine, et C. Compere, « In situ QCM DNA-biosensor probe modification », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 120, n° 1, p. 329-337, décembre 2006.
- [43] W. Shan *et al.*, « An aptamer-based quartz crystal microbalance biosensor for sensitive and selective detection of leukemia cells using silver-enhanced gold nanoparticle label », *Talanta*, vol. 126, p. 130-135, août 2014.
- [44] H. Li *et al.*, « Aptamer-based microcantilever biosensor for ultrasensitive detection of tumor marker nucleolin », *Talanta*, vol. 146, p. 727-731, janv. 2016.
- [45] H. Hirayama, J. Tamaoka, et K. Horikoshi, « Improved Immobilization of DNA to Microwell Plates for DNA-DNA Hybridization », *Nucleic Acids Res.*, vol. 24, n° 20, p. 4098-4099, oct. 1996.
- [46] Z. Li, H. Wang, S. Dong, et E. WANG, « Electrochemical investigation of DNA adsorbed on conducting polymer modified electrode », *Anal. Sci.*, vol. 13, n° Supplement, p. 305-310, 1997.
- [47] J. Wang, X. Cai, G. Rivas, et H. Shiraishi, « Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization processes », *Anal. Chim. Acta*, vol. 326, n° 1-3, p. 141-147, juin 1996.
- [48] M. I. Pividori, A. Merkoçi, et S. Alegret, « Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 15, n° 5-6, p. 291-303, août 2000.
- [49] G. Marrazza, I. Chianella, et M. Mascini, « Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection1 », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 14, n° 1, p. 43-51, janv. 1999.
- [50] S. Liu, J. Ye, P. He, et Y. Fang, « Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode », *Anal. Chim. Acta*, vol. 335, n° 3, p. 239-243, décembre 1996.
- [51] M. Lazerges, H. Perrot, N. Rabehagaso, et C. Compère, « Thiol- and Biotin-Labeled Probes for Oligonucleotide Quartz Crystal Microbalance Biosensors of Microalga *Alexandrium Minutum* », *Biosensors*, vol. 2, n° 3, p. 245-254, juill. 2012.

- [52] J. DeChancie et K. N. Houk, « The Origins of Femtomolar Protein–Ligand Binding: Hydrogen-Bond Cooperativity and Desolvation Energetics in the Biotin–(Strept)Avidin Binding Site », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, n° 17, p. 5419-5429, mai 2007.
- [53] A. J. Downard, « Electrochemically Assisted Covalent Modification of Carbon Electrodes », *Electroanalysis*, vol. 12, n° 14, p. 1085-1096, oct. 2000.
- [54] M. Delamar, R. Hitmi, J. Pinson, et J. M. Saveant, « Covalent modification of carbon surfaces by grafting of functionalized aryl radicals produced from electrochemical reduction of diazonium salts », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 114, n° 14, p. 5883-5884, juillet 1992.
- [55] P. A. Brooksby et A. J. Downard, « Electrochemical and Atomic Force Microscopy Study of Carbon Surface Modification via Diazonium Reduction in Aqueous and Acetonitrile Solutions », *Langmuir*, vol. 20, n° 12, p. 5038-5045, juin 2004.
- [56] R. G. Nuzzo et D. L. Allara, « Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 105, n° 13, p. 4481-4483, juin 1983.
- [57] H. Häkkinen, « The gold-sulfur interface at the nanoscale », *Nat. Chem.*, vol. 4, n° 6, p. 443-455, juin 2012.
- [58] E. Pensa *et al.*, « The Chemistry of the Sulfur–Gold Interface: In Search of a Unified Model », *Acc. Chem. Res.*, vol. 45, n° 8, p. 1183-1192, août 2012.
- [59] M. R. Ivanov et A. J. Haes, « Anionic Functionalized Gold Nanoparticle Continuous Full Filling Separations: Importance of Sample Concentration », *Anal. Chem.*, vol. 84, n° 3, p. 1320-1326, février 2012.
- [60] J. Sharma, R. Chhabra, C. S. Andersen, K. V. Gothelf, H. Yan, et Y. Liu, « Toward Reliable Gold Nanoparticle Patterning On Self-Assembled DNA Nanoscaffold », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, n° 25, p. 7820-7821, juin 2008.
- [61] D. Capitaio, R. Sahli, N. Raouafi, B. Limoges, C. Fave, et B. Schöllhorn, « Electro-assisted Deposition of Binary Self-Assembled 1,2-Dithiolane Monolayers on Gold with Predictable Composition », *ChemElectroChem*, vol. 3, n° 9, p. 1422-1428, sept. 2016.
- [62] « Bard et al. - 1944 - ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications.pdf » . .

- [63] C. Amatore, C. Pebay, L. Thouin, A. Wang, et J.-S. Warkocz, « Difference between Ultramicroelectrodes and Microelectrodes: Influence of Natural Convection », *Anal. Chem.*, vol. 82, n° 16, p. 6933-6939, août 2010.
- [64] K. Aoki et J. Osteryoung, « Diffusion-controlled current at the stationary finite disk electrode », *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, vol. 122, p. 19-35, mai 1981.
- [65] D. Shoup et A. Szabo, « Chronoamperometric current at finite disk electrodes », *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, vol. 140, n° 2, p. 237-245, nov. 1982.
- [66] K. Aoki et J. Osteryoung, « Formulation of the diffusion-controlled current at very small stationary disk electrodes », *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, vol. 160, n° 1, p. 335-339, janv. 1984.
- [67] A. J. Bard et L. R. Faulkner, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, 2nd ed. New York: Wiley, 2001.
- [68] International Electrotechnical Commission, International Electrotechnical Commission, et Technical Committee 65, *Expression of performance of electrochemical analyzers. Expression des qualités de fonctionnement des analyseurs électrochimiques. Part 3, Partie 3, Part 3, Partie 3.* Geneva: International Electrotechnical Commission, 2002.
- [69] H. H. Girault, *Electrochimie physique et analytique*. PPUR presses polytechniques, 2007.
- [70] M. Lazerges et F. Bedioui, « Analysis of the evolution of the detection limits of electrochemical DNA biosensors », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, n° 11, p. 3705-3714, janv. 2013.
- [71] J. Weng, J. Zhang, H. Li, L. Sun, C. Lin, et Q. Zhang, « Label-Free DNA Sensor by Boron-Doped Diamond Electrode Using an ac Impedimetric Approach », *Anal. Chem.*, vol. 80, n° 18, p. 7075-7083, sept. 2008.
- [72] H. Berney, J. West, E. Haefele, J. Alderman, W. Lane, et J. K. Collins, « A DNA diagnostic biosensor: development, characterisation and performance », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 68, n° 1-3, p. 100-108, août 2000.

- [73] F. Davis, M. A. Hughes, A. R. Cossins, et S. P. J. Higson, « Single Gene Differentiation by DNA-Modified Carbon Electrodes Using an AC Impedimetric Approach », *Anal. Chem.*, vol. 79, n° 3, p. 1153-1157, février 2007.
- [74] Z. Gao *et al.*, « Silicon Nanowire Arrays for Label-Free Detection of DNA », *Anal. Chem.*, vol. 79, n° 9, p. 3291-3297, mai 2007.
- [75] W. M. Hassen, C. Chaix, A. Abdelghani, F. Bessueille, D. Leonard, et N. Jaffrezic-Renault, « An impedimetric DNA sensor based on functionalized magnetic nanoparticles for HIV and HBV detection », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 134, n° 2, p. 755-760, sept. 2008.
- [76] C.-P. Chen *et al.*, « Ultrasensitive in Situ Label-Free DNA Detection Using a GaN Nanowire-Based Extended-Gate Field-Effect-Transistor Sensor », *Anal. Chem.*, vol. 83, n° 6, p. 1938-1943, mars 2011.
- [77] C. J. Burrows et J. G. Muller, « Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission », *Chem. Rev.*, vol. 98, n° 3, p. 1109-1152, mai 1998.
- [78] S. Steenken, « Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e⁻ and OH adducts », *Chem. Rev.*, vol. 89, n° 3, p. 503-520, mai 1989.
- [79] A. Abbaspour et A. Noori, « Electrochemical studies on the oxidation of guanine and adenine at cyclodextrin modified electrodes », *The Analyst*, vol. 133, n° 12, p. 1664, 2008.
- [80] J. Wang, G. Rivas, J. R. Fernandes, J. L. Lopez Paz, M. Jiang, et R. Waymire, « Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor », *Anal. Chim. Acta*, vol. 375, n° 3, p. 197-203, nov. 1998.
- [81] E. Alipour, M. H. Pournaghi-Azar, M. Parvizi, S. M. Golabi, et M. S. Hejazi, « Electrochemical detection and discrimination of single copy gene target DNA in non-amplified genomic DNA », *Electrochimica Acta*, vol. 56, n° 5, p. 1925-1931, février 2011.
- [82] D. O. Ariksoysal, H. Karadeniz, A. Erdem, A. Sengonul, A. A. Sayiner, et M. Ozsoz, « Label-Free Electrochemical Hybridization Genosensor for the Detection of Hepatitis B Virus Genotype on the Development of Lamivudine Resistance », *Anal. Chem.*, vol. 77, n° 15, p. 4908-4917, août 2005.

- [83] X. Cai *et al.*, « Electrochemical analysis of formation of polynucleotide complexes in solution and at electrode surfaces », *Anal. Chim. Acta*, vol. 344, n° 1–2, p. 65-76, mai 1997.
- [84] D. Ozkan *et al.*, « Allele-Specific Genotype Detection of Factor V Leiden Mutation from Polymerase Chain Reaction Amplicons Based on Label-Free Electrochemical Genosensor », *Anal. Chem.*, vol. 74, n° 23, p. 5931-5936, décembre 2002.
- [85] A. Erdem, P. Papakonstantinou, et H. Murphy, « Direct DNA Hybridization at Disposable Graphite Electrodes Modified with Carbon Nanotubes », *Anal. Chem.*, vol. 78, n° 18, p. 6656-6659, sept. 2006.
- [86] R. Y. Lai, D. S. Seferos, A. J. Heeger, G. C. Bazan, et K. W. Plaxco, « Comparison of the Signaling and Stability of Electrochemical DNA Sensors Fabricated from 6- or 11-Carbon Self-Assembled Monolayers », *Langmuir*, vol. 22, n° 25, p. 10796-10800, décembre 2006.
- [87] C. Xu, H. Cai, P. He, et Y. Fang, « Electrochemical detection of sequence-specific DNA using a DNA probe labeled with aminoferrocene and chitosan modified electrode immobilized with ssDNA », *Analyst*, vol. 126, n° 1, p. 62-65, janv. 2001.
- [88] E. Farjami, L. Clima, K. Gothelf, et E. E. Ferapontova, « “Off–On” Electrochemical Hairpin-DNA-Based Genosensor for Cancer Diagnostics », *Anal. Chem.*, vol. 83, n° 5, p. 1594-1602, mars 2011.
- [89] A. Anne et C. Demaille, « Dynamics of Electron Transport by Elastic Bending of Short DNA Duplexes. Experimental Study and Quantitative Modeling of the Cyclic Voltammetric Behavior of 3'-Ferrocenyl DNA End-Grafted on Gold », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, n° 2, p. 542-557, janv. 2006.
- [90] A. Anne et C. Demaille, « Electron Transport by Molecular Motion of redox-DNA Strands: Unexpectedly Slow Rotational Dynamics of 20-mer ds-DNA Chains End-Grafted onto Surfaces via C6 Linkers », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, n° 30, p. 9812-9823, juill. 2008.
- [91] Y. Qian, D. Tang, L. Du, Y. Zhang, L. Zhang, et F. Gao, « A novel signal-on electrochemical DNA sensor based on target catalyzed hairpin assembly strategy », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 64, p. 177-181, février 2015.

- [92] C. Fan, K. W. Plaxco, et A. J. Heeger, « Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, n° 16, p. 9134-9137, mai 2003.
- [93] D. M. Jenkins, B. Chami, M. Kreuzer, G. Presting, A. M. Alvarez, et B. Y. Liaw, « Hybridization Probe for Femtomolar Quantification of Selected Nucleic Acid Sequences on a Disposable Electrode », *Anal. Chem.*, vol. 78, n° 7, p. 2314-2318, avril 2006.
- [94] Y. Jin, X. Yao, Q. Liu, et J. Li, « Hairpin DNA probe based electrochemical biosensor using methylene blue as hybridization indicator », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, n° 6, p. 1126-1130, janv. 2007.
- [95] D. Kang, X. Zuo, R. Yang, F. Xia, K. W. Plaxco, et R. J. White, « Comparing the Properties of Electrochemical-Based DNA Sensors Employing Different Redox Tags », *Anal. Chem.*, vol. 81, n° 21, p. 9109-9113, nov. 2009.
- [96] A.-J. ATTIAS, « Polymères conjugués et électronique organique », *Tech. Ing.*, vol. E1862 V2.
- [97] H. Korri-Youssoufi, F. Garnier, P. Srivastava, P. Godillot, et A. Yassar, « Toward Bioelectronics: Specific DNA Recognition Based on an Oligonucleotide-Functionalized Polypyrrole », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, n° 31, p. 7388-7389, août 1997.
- [98] C. dos S. Riccardi, C. Kranz, J. Kowalik, H. Yamanaka, B. Mizaikoff, et M. Josowicz, « Label-Free DNA Detection of Hepatitis C Virus Based on Modified Conducting Polypyrrole Films at Microelectrodes and Atomic Force Microscopy Tip-Integrated Electrodes », *Anal. Chem.*, vol. 80, n° 1, p. 237-245, janv. 2008.
- [99] H. Korri-Youssoufi et B. Makrouf, « Electrochemical biosensing of DNA hybridization by ferrocenyl groups functionalized polypyrrole », *Anal. Chim. Acta*, vol. 469, n° 1, p. 85-92, sept. 2002.
- [100] dos S. Riccardi, H. Yamanaka, M. Josowicz, J. Kowalik, B. Mizaikoff, et C. Kranz, « Label-Free DNA Detection Based on Modified Conducting Polypyrrole Films at Microelectrodes », *Anal. Chem.*, vol. 78, n° 4, p. 1139-1145, février 2006.

- [101] H. Q. A. Lê, S. Chebil, B. Makrouf, H. Sauriat-Dorizon, B. Mandrand, et H. Korri-Youssoufi, « Effect of the size of electrode on electrochemical properties of ferrocene-functionalized polypyrrole towards DNA sensing », *Talanta*, vol. 81, n° 4–5, p. 1250–1257, juin 2010.
- [102] J. Wilson, S. Radhakrishnan, C. Sumathi, et V. Dharuman, « Polypyrrole–polyaniline–Au (PPy–PANi–Au) nano composite films for label-free electrochemical DNA sensing », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 171–172, p. 216–222, août 2012.
- [103] L. Bouffier, B. S. Wang, A. Roget, T. Livache, M. Demeunynck, et P. Mailley, « Electrochemical transduction of DNA hybridization at modified electrodes by using an electroactive pyridoacridone intercalator », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, n° 4, p. 1163–1172, sept. 2013.
- [104] A. Miodek, N. Mejri, M. Gomgnimbou, C. Sola, et H. Korri-Youssoufi, « E-DNA Sensor of Mycobacterium tuberculosis Based on Electrochemical Assembly of Nanomaterials (MWCNTs/PPy/PAMAM) », *Anal. Chem.*, vol. 87, n° 18, p. 9257–9264, sept. 2015.
- [105] M. M. Rahman, Y. J. Kim, et J.-J. Lee, « Sensitivity Control of Label-free DNA Hybridization Detection Based on Poly(thionine)-Modified Glassy Carbon and Gold Electrodes », *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 38, n° 1, p. 27–32, janv. 2017.
- [106] H.-A. Rafiee-Pour, M. Behpour, et M. Keshavarz, « A novel label-free electrochemical miRNA biosensor using methylene blue as redox indicator: application to breast cancer biomarker miRNA-21 », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 77, p. 202–207, mars 2016.
- [107] A. Erdem, K. Kerman, B. Meric, U. S. Akarca, et M. Ozsoz, « Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus », *Anal. Chim. Acta*, vol. 422, n° 2, p. 139–149, nov. 2000.
- [108] B. Meric *et al.*, « Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue », *Talanta*, vol. 56, n° 5, p. 837–846, avril 2002.
- [109] N. Zhu, A. Zhang, Q. Wang, P. He, et Y. Fang, « Electrochemical detection of DNA hybridization using methylene blue and electro-deposited zirconia thin films on gold electrodes », *Anal. Chim. Acta*, vol. 510, n° 2, p. 163–168, mai 2004.

- [110] N. Zhu, Z. Chang, P. He, et Y. Fang, « Electrochemically fabricated polyaniline nanowire-modified electrode for voltammetric detection of DNA hybridization », *Electrochimica Acta*, vol. 51, n° 18, p. 3758-3762, mai 2006.
- [111] N. Wei *et al.*, « An electrochemical biosensor for detection of PML/RARA fusion gene using capture probe covalently immobilized onto poly-calcon carboxylic acid modified glassy carbon electrode », *Talanta*, vol. 78, n° 4-5, p. 1227-1234, juin 2009.
- [112] L. Lin *et al.*, « Electrochemical biosensor based on nanogold-modified poly-eriochrome black T film for BCR/ABL fusion gene assay by using hairpin LNA probe », *Talanta*, vol. 80, n° 5, p. 2113-2119, mars 2010.
- [113] Q. Wang *et al.*, « Electrochemical characterization and DNA sensing application of a sphere-like CeO₂-ZrO₂ and chitosan nanocomposite formed on a gold electrode by one-step electrodeposition », *Electrochimica Acta*, vol. 62, p. 250-255, février 2012.
- [114] C.-X. Xu, Q.-G. Zhai, Y.-J. Liu, K.-J. Huang, L. Lu, et K.-X. Li, « A novel electrochemical DNA biosensor construction based on layered CuS-graphene composite and Au nanoparticles », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, n° 27, p. 6943-6951, nov. 2014.
- [115] « Eley et Spivey - 1962 - Semiconductivity of organic substances. Part 9.—Nu.pdf ». .
- [116] J. M. Robertson, *Organic crystals and molecules: theory of X-ray structure analysis with applications to organic chemistry*. Cornell University Press, 1953.
- [117] J. Wang, « Electrical conductivity of double stranded DNA measured with ac impedance spectroscopy », *Phys. Rev. B*, vol. 78, n° 24, p. 245304, décembre 2008.
- [118] H. Chang, Y. Yuan, N. Shi, et Y. Guan, « Electrochemical DNA Biosensor Based on Conducting Polyaniline Nanotube Array », *Anal. Chem.*, vol. 79, n° 13, p. 5111-5115, juillet 2007.
- [119] K. Maruyama, Y. Mishima, K. Minagawa, et J. Motonaka, « DNA Sensor with a Dipyrrophenazine Complex of Osmium(II) as an Electrochemical Probe », *Anal. Chem.*, vol. 74, n° 15, p. 3698-3703, août 2002.

- [120] K. M. Millan et S. R. Mikkelsen, « Sequence-selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators », *Anal. Chem.*, vol. 65, n° 17, p. 2317-2323, sept. 1993.
- [121] K. Hashimoto, K. Ito, et Y. Ishimori, « Sequence-Specific Gene Detection with a Gold Electrode Modified with DNA Probes and an Electrochemically Active Dye », *Anal. Chem.*, vol. 66, n° 21, p. 3830-3833, nov. 1994.
- [122] J. Wang *et al.*, « Peptide Nucleic Acid Probes for Sequence-Specific DNA Biosensors », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 118, n° 33, p. 7667-7670, janv. 1996.
- [123] E. L. S. Wong, P. Erohkin, et J. J. Gooding, « A comparison of cationic and anionic intercalators for the electrochemical transduction of DNA hybridization via long range electron transfer », *Electrochem. Commun.*, vol. 6, n° 7, p. 648-654, juillet 2004.
- [124] E. L. S. Wong et J. J. Gooding, « Electrochemical Transduction of DNA Hybridization by Long-Range Electron Transfer », *Aust. J. Chem.*, vol. 58, n° 4, p. 280-287, 2005.
- [125] F. Li, W. Chen, P. Dong, et S. Zhang, « A simple strategy of probe DNA immobilization by diazotization-coupling on self-assembled 4-aminothiophenol for DNA electrochemical biosensor », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, n° 7, p. 2160-2164, mars 2009.
- [126] S. Liu, J. Liu, X. Han, Y. Cui, et W. Wang, « Electrochemical DNA biosensor fabrication with hollow gold nanospheres modified electrode and its enhancement in DNA immobilization and hybridization », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 25, n° 7, p. 1640-1645, mars 2010.
- [127] F. Li, Y. Feng, P. Dong, L. Yang, et B. Tang, « Gold nanoparticles modified electrode via simple electrografting of in situ generated mercaptophenyl diazonium cations for development of DNA electrochemical biosensor », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, n° 5, p. 1947-1952, janv. 2011.
- [128] S. O. Kelley, N. M. Jackson, M. G. Hill, et J. K. Barton, « Long-Range Electron Transfer through DNA Films », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 38, n° 7, p. 941-945, avril 1999.
- [129] S. O. Kelley et J. K. Barton, « Electron transfer between bases in double helical DNA », *Science*, vol. 283, n° 5400, p. 375-381, 1999.

- [130] S. O. Kelley, E. M. Boon, J. K. Barton, N. M. Jackson, et M. G. Hill, « Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA », *Nucleic Acids Res.*, vol. 27, n° 24, p. 4830-4837, janv. 1999.
- [131] A. Blake et A. R. Peacocke, « The interaction of aminoacridines with nucleic acids », *Biopolymers*, vol. 6, n° 9, p. 1225-1253, sept. 1968.
- [132] X. Zhang *et al.*, « Application of graphene–pyrenebutyric acid nanocomposite as probe oligonucleotide immobilization platform in a DNA biosensor », *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, n° 7, p. 3851-3857, oct. 2013.
- [133] V. Dharuman et J. H. Hahn, « Label free electrochemical DNA hybridization discrimination effects at the binary and ternary mixed monolayers of single stranded DNA/diluent/s in presence of cationic intercalators », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 23, n° 8, p. 1250–1258, mars 2008.
- [134] Z. Fang et S. O. Kelley, « Direct Electrocatalytic mRNA Detection Using PNA-Nanowire Sensors », *Anal. Chem.*, vol. 81, n° 2, p. 612-617, janv. 2009.
- [135] P. Wipawakarn, H. Ju, et D. K. Y. Wong, « A label-free electrochemical DNA biosensor based on a Zr(IV)-coordinated DNA duplex immobilised on a carbon nanofibrelchitosan layer », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 402, n° 9, p. 2817-2826, févr. 2012.
- [136] M. Lazerges, V. T. Tal, P. Bigey, D. Scherman, et F. Bedioui, « Electrochemical DNA-biosensors: Two-electrode setup well adapted for miniaturized devices », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 182, p. 510-513, juin 2013.
- [137] J. Heinze, « Ultramicroelectrodes in Electrochemistry », *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 32, n° 9, p. 1268-1288, sept. 1993.
- [138] C. Pebay, C. Sella, L. Thouin, et C. Amatore, « Mass Transport at Infinite Regular Arrays of Microband Electrodes Submitted to Natural Convection: Theory and Experiments », *Anal. Chem.*, vol. 85, n° 24, p. 12062-12069, déc. 2013.
- [139] R. E. Buck et K. E. Price, « Cefadroxil, a New Broad-Spectrum Cephalosporin », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 11, n° 2, p. 324-330, janv. 1977.

- [140] M. A. Zayed et S. M. Abdallah, « Synthesis, characterization and electronic spectra of cefadroxil complexes of d-block elements », *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 60, n° 10, p. 2215-2224, août 2004.
- [141] M. Andrasi, P. Buglyo, L. Zekany, et A. Gaspar, « A comparative study of capillary zone electrophoresis and pH-potentiometry for determination of dissociation constants », *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 44, n° 5, p. 1040-1047, sept. 2007.
- [142] S. O. Kelley, J. K. Barton, N. M. Jackson, et M. G. Hill, « Electrochemistry of Methylene Blue Bound to a DNA-Modified Electrode », *Bioconjug. Chem.*, vol. 8, n° 1, p. 31-37, janv. 1997.
- [143] A. A. Gorodetsky, M. C. Buzzeo, et J. K. Barton, « DNA-Mediated Electrochemistry », *Bioconjug. Chem.*, vol. 19, n° 12, p. 2285-2296, déc. 2008.
- [144] P. Tang, C.-L. Juang, et G. S. Harbison, « Intercalation Complex of Proflavine with DNA: Structure and Dynamics by Solid-State NMR », *Science*, vol. 249, n° 4964, p. 70-72, 1990.
- [145] V. Dharuman et J. H. Hahn, « Label free electrochemical DNA hybridization discrimination effects at the binary and ternary mixed monolayers of single stranded DNA/diluent/s in presence of cationic intercalators », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 23, n° 8, p. 1250-1258, mars 2008.
- [146] K. Musilova et M. Mraz, « MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex », *Leukemia*, vol. 29, n° 5, p. 1004-1017, mai 2015.
- [147] M. V. Iorio *et al.*, « MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer », *Cancer Res.*, vol. 65, n° 16, p. 7065-7070, août 2005.
- [148] M. V. Iorio *et al.*, « MicroRNA Signatures in Human Ovarian Cancer », *Cancer Res.*, vol. 67, n° 18, p. 8699-8707, sept. 2007.
- [149] I. A. Asangani *et al.*, « MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer », *Oncogene*, vol. 27, n° 15, p. 2128-2136, oct. 2007.

- [150] S. Volinia *et al.*, « A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, n° 7, p. 2257-2261, févr. 2006.
- [151] F. Meng, R. Henson, H. Wehbe-Janek, K. Ghoshal, S. T. Jacob, et T. Patel, « MicroRNA-21 Regulates Expression of the PTEN Tumor Suppressor Gene in Human Hepatocellular Cancer », *Gastroenterology*, vol. 133, n° 2, p. 647-658, août 2007.
- [152] M. T. Tetzlaff *et al.*, « Differential Expression of miRNAs in Papillary Thyroid Carcinoma Compared to Multinodular Goiter Using Formalin Fixed Paraffin Embedded Tissues », *Endocr. Pathol.*, vol. 18, n° 3, p. 163-173, sept. 2007.
- [153] Y. Hu *et al.*, « Prognostic significance of differentially expressed miRNAs in esophageal cancer », *Int. J. Cancer*, vol. 128, n° 1, p. 132-143, janv. 2011.
- [154] J. A. Chan, A. M. Krichevsky, et K. S. Kosik, « MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells », *Cancer Res.*, vol. 65, n° 14, p. 6029-6033, juill. 2005.
- [155] S. Roy *et al.*, « MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue », *Cardiovasc. Res.*, vol. 82, n° 1, p. 21-29, avr. 2009.
- [156] M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, J. Meyer, A. Borkhardt, et T. Tuschl, « New microRNAs from mouse and human », *RNA*, vol. 9, n° 2, p. 175-179, janv. 2003.
- [157] F. Pichiorri *et al.*, « Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 Impairs the p53/MDM2 Autoregulatory Loop in Multiple Myeloma Development », *Cancer Cell*, vol. 18, n° 4, p. 367-381, oct. 2010.
- [158] Z. Jin *et al.*, « MicroRNA-192 and -215 are upregulated in human gastric cancer in vivo and suppress ALCAM expression in vitro », *Oncogene*, vol. 30, n° 13, p. 1577-1585, mars 2011.
- [159] K. Wang *et al.*, « Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, n° 11, p. 4402-4407, mars 2009.

- [160] J. Chang *et al.*, « miR-122, a Mammalian Liver-Specific microRNA, is Processed from hcr mRNA and May Downregulate the High Affinity Cationic Amino Acid Transporter CAT-1 », *RNA Biol.*, vol. 1, n° 2, p. 106-113, juillet 2004.
- [161] H. Kutay *et al.*, « Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas », *J. Cell. Biochem.*, vol. 99, n° 3, p. 671-678, oct. 2006.
- [162] S. C. Forster, M. D. Tate, et P. J. Hertzog, « MicroRNA as Type I Interferon-Regulated Transcripts and Modulators of the Innate Immune Response », *Front. Immunol.*, vol. 6, 2015.
- [163] C. L. Jopling, M. Yi, A. M. Lancaster, S. M. Lemon, et P. Sarnow, « Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA », *Science*, vol. 309, n° 5740, p. 1577-1581, sept. 2005.
- [164] « Nucleic Acid Hybridizations ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ndsu.edu/pubweb/~mcclean/plsc731/dna/dna6.htm>. [Consulté le: 03-juill-2017].
- [165] C. E. D. Chidsey, C. R. Bertozzi, T. M. Putvinski, et A. M. Muzice, « Coadsorption of ferrocene-terminated and unsubstituted alkanethiols on gold: electroactive self-assembled monolayers », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 112, n° 11, p. 4301-4306, mai 1990.
- [166] P. Allongue, C. Henry de Villeneuve, G. Cherouvrier, R. Cortès, et M.-C. Bernard, « Phenyl layers on H-Si(111) by electrochemical reduction of diazonium salts: monolayer versus multilayer formation », *J. Electroanal. Chem.*, vol. 550, p. 161-174, juill. 2003.
- [167] D. Bélanger et J. Pinson, « Electrografting: a powerful method for surface modification », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, n° 7, p. 3995-4048, juin 2011.
- [168] R. Ericsson, « The influence of sodium chloride on the atmospheric corrosion of steel », *Mater. Corros.*, vol. 29, n° 6, p. 400-403, juin 1978.
- [169] DrugBank, Éd., « Lipoic Acid », *DrugBank*. 11-juin-2017.
- [170] « (±)- α -Lipoic acid T5625 », *Sigma-Aldrich*. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t5625>. [Consulté le: 13-juin-2017].

- [171] T. M. Squires, R. J. Messinger, et S. R. Manalis, « Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors », *Nat. Biotechnol.*, vol. 26, n° 4, p. 417-426, avr. 2008.
- [172] N. C. Stellwagen, S. Magnúsdóttir, C. Gelfi, et P. G. Righetti, « Measuring the translational diffusion coefficients of small DNA molecules by capillary electrophoresis », *Biopolymers*, vol. 58, n° 4, p. 390-397, avr. 2001.
- [173] A. Estévez-Torres, « Un microlaboratoire électrophorétique pour l'étude du couplage entre transport et cinétique chimique : application à la réaction d'hybridation d'oligonucléotides », phdthesis, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007.
- [174] V. Chan, D. J. Graves, et S. E. McKenzie, « The biophysics of DNA hybridization with immobilized oligonucleotide probes », *Biophys. J.*, vol. 69, n° 6, p. 2243-2255, déc. 1995.
- [175] F. Bondu, « Etude de la conformation d'adsorption de l'acide isonicotinique sur Au(111) par spectroscopie d'impédance-Raman et modulation de capacité. », Université Pierre et Marie Curie, 2013.
- [176] A. Baramee, A. Coppin, M. Mortuaire, L. Pelinski, S. Tomavo, et J. Brocard, « Synthesis and in vitro activities of ferrocenic aminohydroxynaphthoquinones against *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* », *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 14, n° 5, p. 1294-1302, mars 2006.
- [177] G. Sauerbrey, « Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung », *Z. Für Phys.*, vol. 155, n° 2, p. 206-222, avr. 1959.

Résumé

Le diagnostic précoce de nombreuses pathologies comme l'infarctus aigu du myocarde ou le cancer est un enjeu majeur dans le domaine de la santé. Pour répondre à ce besoin, de nouveaux dispositifs de diagnostic doivent être mis au point. Cette thèse a pour but de concevoir un biocapteur électrochimique de micro ARNs. Les micro-ARNs sont de petits ARNs monobrans d'une vingtaine de bases intervenant dans de nombreux processus biologiques. De ce fait, ils sont d'excellents biomarqueurs mais leur concentration dans les fluides biologiques est comprise entre 10^{-12} et 10^{-17} M et c'est un réel défi de les quantifier sans amplification préalable. Le biocapteur développé dans ce travail permet une détection sensible et très spécifique (détection d'un unique mismatch) des miARNs sans amplification préalable sur un dispositif miniaturisé à deux électrodes grâce au transfert d'électrons longue distance. Les travaux de thèse présentés ici peuvent être divisés en trois aspects.

Le premier aspect consiste au développement d'un biocapteur sur ultramicro électrodes (UMEs) de carbone graphite modifiées par une monocouche de 4-carboxybenzenediazonium permettant l'immobilisation d'une sonde ADN complémentaire du miARN visé par couplage peptidique. Les sondes ADN sont donc immobilisées de manière covalente à la surface de l'électrode.

Le second aspect concerne le développement et l'optimisation du biocapteur sur UMEs d'or unitaires en formant une monocouche auto-assemblée (SAM) de sondes ADN marquées par des atomes de soufre. L'optimisation des différents paramètres comme les conditions de formation de la SAM ou la composition de l'électrolyte a permis d'atteindre une LOD de $8,5 \cdot 10^{-15}$ M.

Le troisième aspect de ces travaux est la transposition des biocapteurs depuis les UMEs unitaires vers des réseaux d'électrodes d'or lithographiées permettant 10 mesures simultanées en une seule expérience et conférant au dispositif une fiabilité et une LOD accrue. La limite de détection dans ces conditions est alors de $3 \cdot 10^{-18}$ M.

Mots Clés

Electrochimie, Biocapteur, ADN, Diagnostic Médical

Abstract

Early diagnosis for many diseases such as acute myocardial infarction or cancer is a major health issue. To answer this need, new diagnosis devices have to be developed. The goal of this thesis is to design a microRNA electrochemical biosensor. MicroRNAs are small single-stranded RNAs of about 20 bases involved in many biological processes. That's why they are excellent biomarkers but their concentration in biological fluids is between 10^{-12} and 10^{-17} M and it is a real challenge to quantify them without previous amplification.

The biosensor developed in this work allows a sensitive and very specific (single mismatch detection) detection of miRNAs without previous amplification on a miniaturized two-electrode device thanks to long-range electron transfer. This work can be divided into three parts.

The first one consists in developing a biosensor on graphite ultramicro-electrodes (UMEs) modified by a 4-carboxybenzenediazonium monolayer allowing miRNA's complementary DNA probe immobilization by peptide coupling. DNA probes are then covalently grafted on the electrode surface.

The second part deals with development and optimisation of the biosensor on unit gold UMEs by formation of a self-assembled monolayer (SAM) of sulfur-labeled DNA probes. Optimisation of parameters such as SAM formation conditions or electrolyte composition allows raising a LOD of $8,5 \cdot 10^{-15}$ M.

The third part of this work is transposition of biosensors from unit UMEs to lithographed gold electrodes network allowing to perform 10 simultaneous measurements in a single experiment. By this way, increased reliability and LOD are obtained with a value of $3 \cdot 10^{-18}$ M for LOD.

Keywords

Electrochemistry, Biosensor, DNA, Medical Diagnosis