

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.

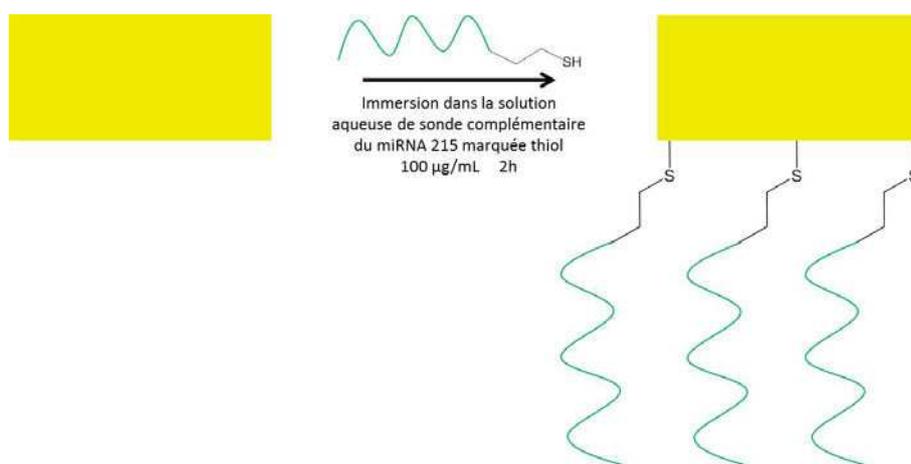


Figure III-23 : Schéma réactionnel de la formation d'une monocouche auto-assemblée de sondes ADN marquées par une fonction thiol pour former un biocapteur sur ultramicro-électrode d'or

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.

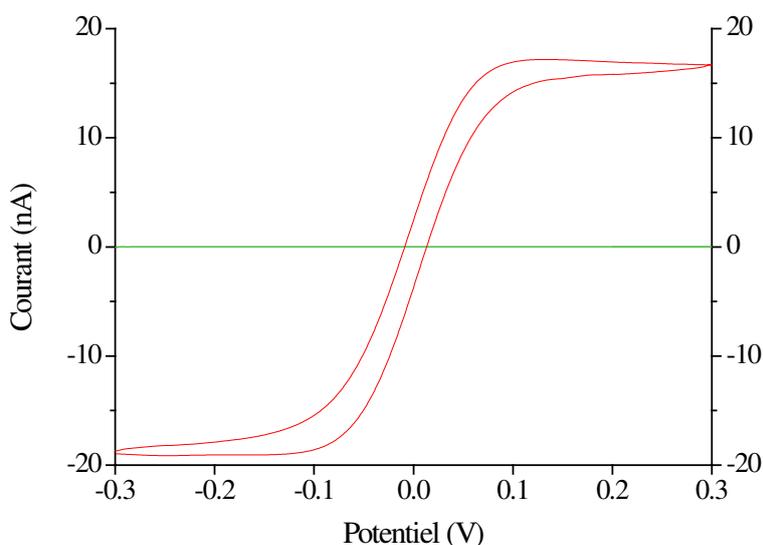


Figure III-24 : Voltampérométrie de la caractérisation d'une électrode d'or de diamètre 25 μm dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM à 100 mV/s (rouge) et blanc (vert)

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

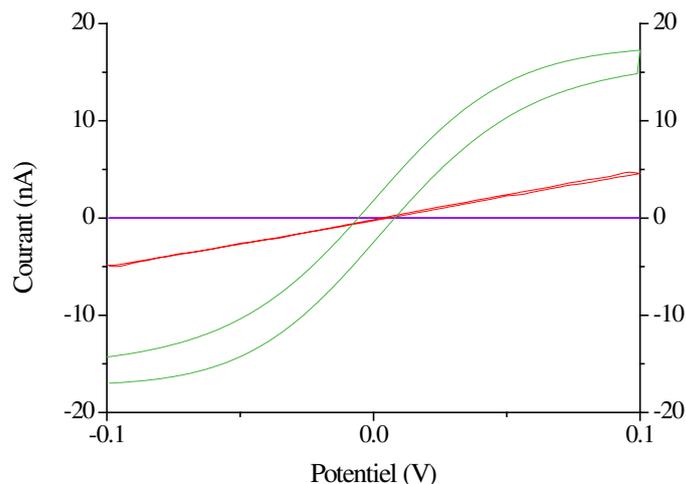


Figure III-25 : Vérification de la formation de la monocouche de sondes ADN à la surface de l'électrode d'or de 25 µm par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM à 50 mV/s ; blanc NaCl 0,5 M (violet), électrode non greffée (vert), électrode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

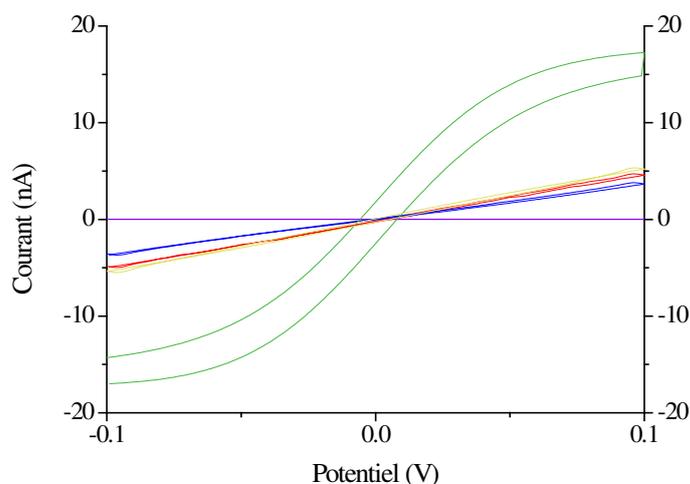


Figure III-26 : Evaluation de la reproductibilité du blocage du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure à la surface d'une électrode d'or de 25 µm modifiée par une SAM de sondes ADN marquées par un thiol par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 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.

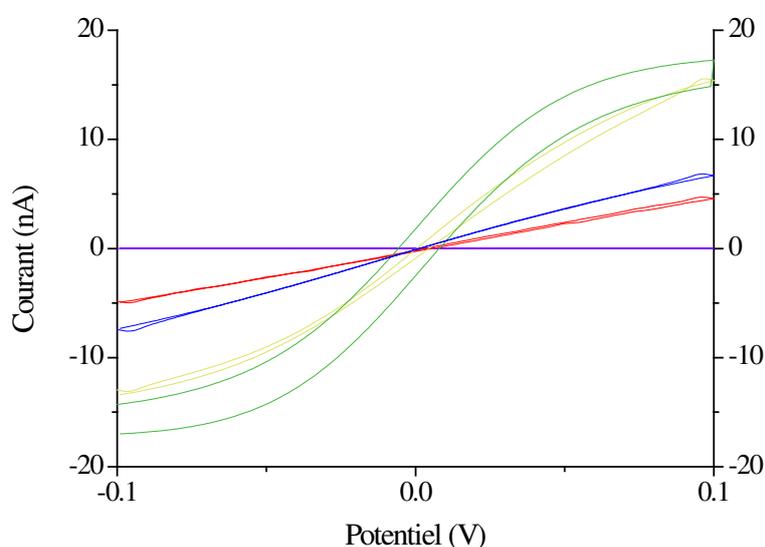


Figure III-27 : Evolution du blocage du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure à la surface d'une électrode d'or de 25 μm modifiée par une SAM de sondes ADN marquées par un thiol au cours des cycles par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 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.

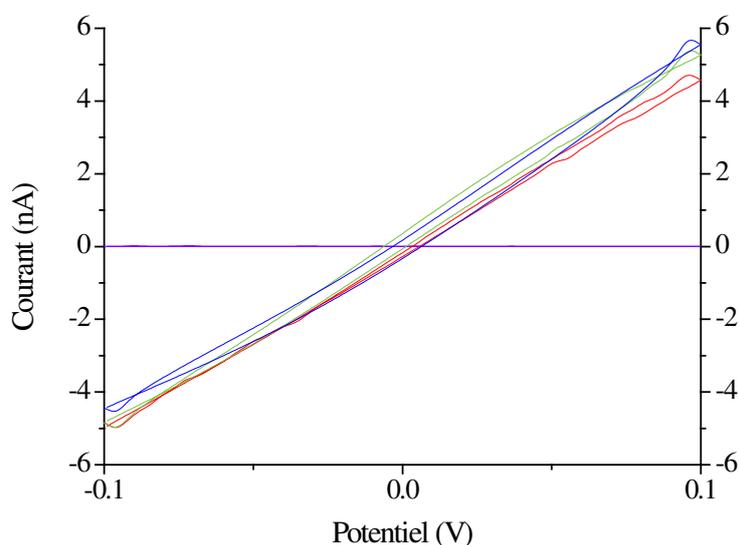


Figure III-28 : Evaluation de la reproductibilité du blocage du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure à la surface de deux électrodes d'or de 25 μm modifiées par une SAM de sondes ADN marquées par un thiol par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM à 50 mV/s ; blanc NaCl 0,5 M (violet), électrode 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.

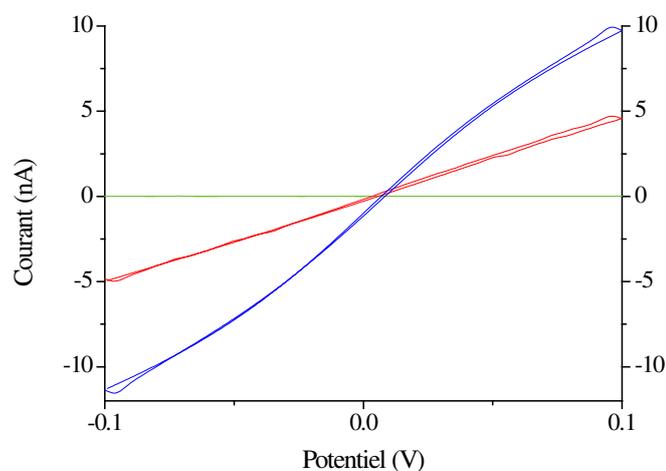


Figure III-29 : Exemple de biocapteur réalisé sur l'électrode n°1 avec une concentration en cible complémentaire de 10^{-6} M ; blanc NaCl 0,5 M (vert), électrode n°1 modifiée par la sonde ADN seule (rouge), électrode n°1 modifiée par la sonde ADN hybridée à la cible 10^{-6} M (bleu)

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.

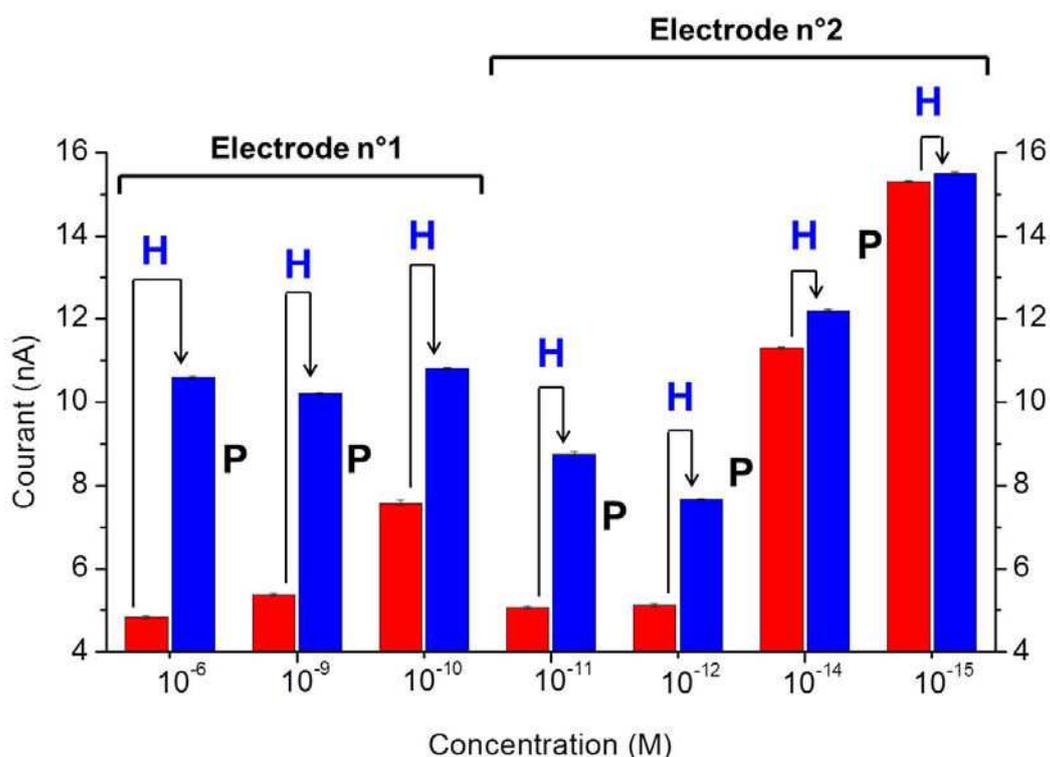


Figure III-30 : Histogramme montrant le courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure mesuré à l'électrode au cours des cycles d'hybridation et polissage de l'électrode pour les différentes concentrations ; électrode modifiée par la sonde seule (rouge), électrode modifiée par la sonde hybridée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

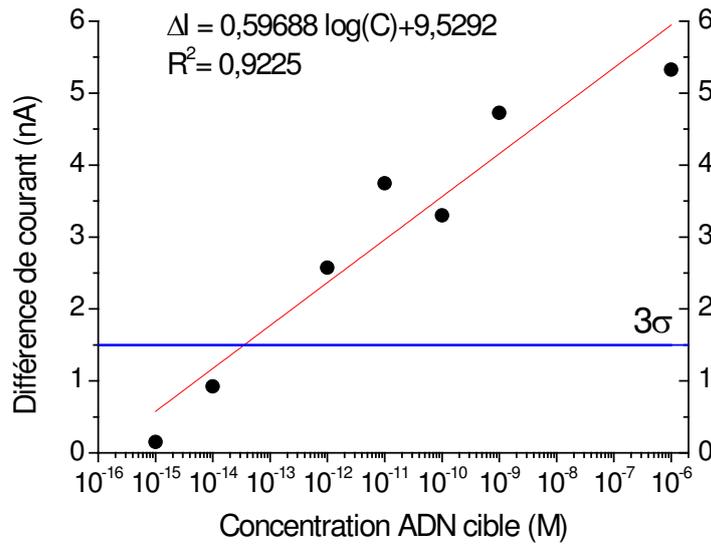


Figure III-31 : Courbe de calibration du capteur utilisé en conditions classiques ; Différence de courant pour chaque concentration (ronds noirs), courbe de tendance des points (rouge), triple de la déviation standard (bleu)

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

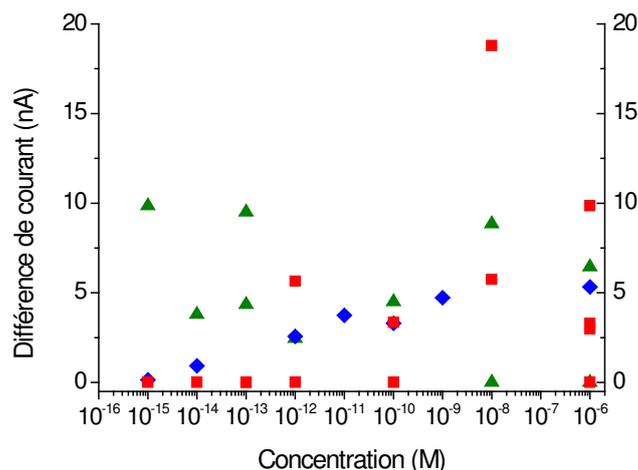


Figure III-32 : Représentation de tous les résultats obtenus en conditions classiques pour obtenir des courbes de calibration et permettant d'observer la dispersion des mesures ; 1^{ère} série (bleu), 2^{ème} série (rouge), 3^{ème} série (vert)

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

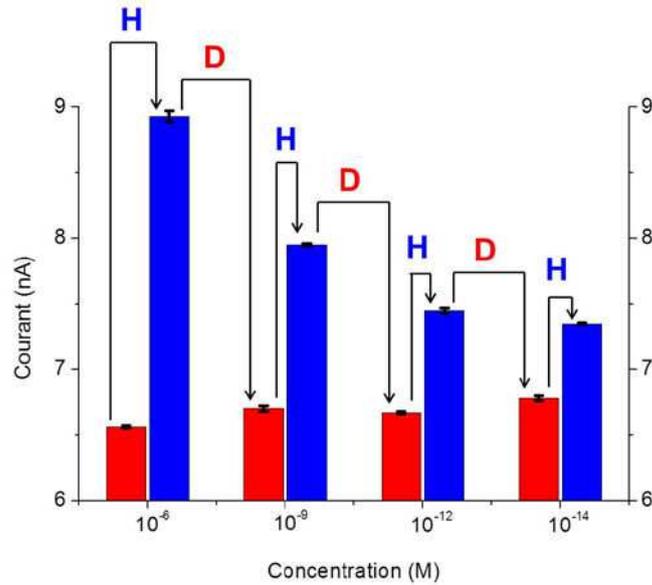


Figure III-33 : Histogramme montrant le courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure mesuré à l'électrode au cours des cycles d'hybridation et dénaturation de l'électrode pour les différentes concentrations ; électrode modifiée par la sonde seule (rouge), électrode modifiée par la sonde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

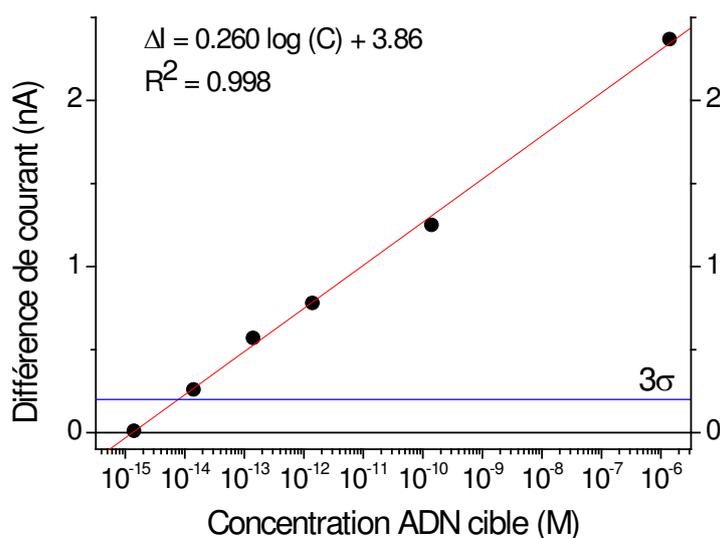


Figure III-34 : Courbe de calibration du capteur utilisé avec l'électrolyte contenant le couple $\text{Fe}(\text{CD})(\text{CN})_3^- / \text{Fe}(\text{CD})(\text{CN})_3^{2-}$ à 5 mM chacun et la proflavine à 10^{-6} M ; Différence de courant pour chaque concentration (ronds noirs), courbe de tendance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

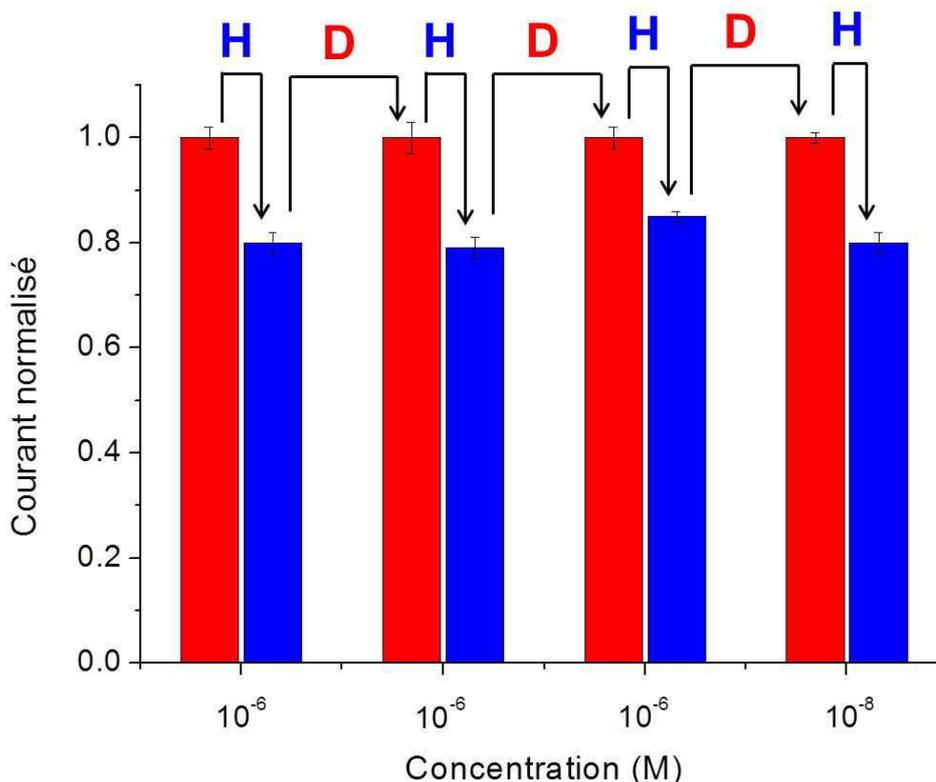


Figure III-35 : Histogramme montrant le courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure mesuré à l'électrode au cours des cycles d'hybridation et dénaturation de l'électrode pour les différentes concentrations de cible présentant un mismatch ; électrode modifiée par la sonde seule (rouge),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

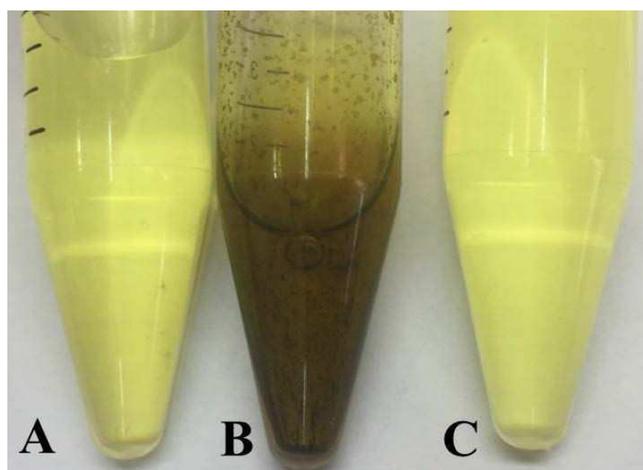


Figure III-36 : Observation de la dégradation des électrolytes de mesures à 5 mM en Fe^{II} et 5 mM en Fe^{III} ; électrolyte classique (ferro/ferricyanure dans NaCl) après 6 jours à 4°C (A), électrolyte contenant du céfadroxil en excès (25 mM) et de la proflavine 10^{-6} M après 6 jours à 4°C (B), électrolyte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

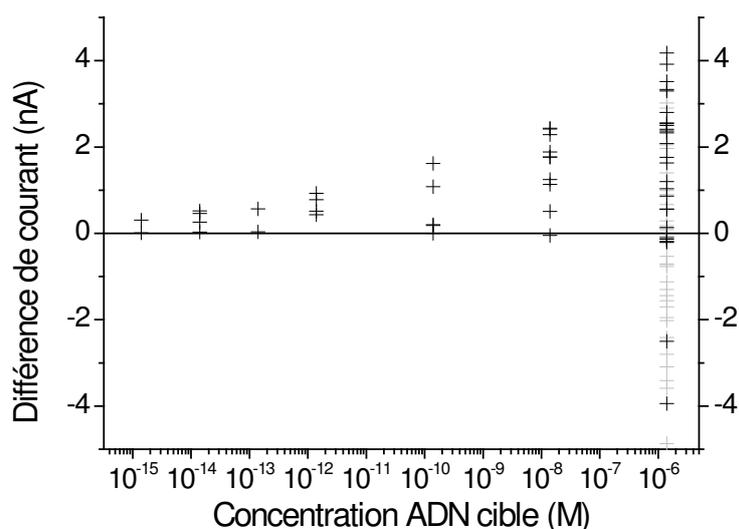


Figure III-37 : Représentation de tous les résultats obtenus avec l'électrolyte contenant le couple $\text{Fe}(\text{CD})(\text{CN})_3^- / \text{Fe}(\text{CD})(\text{CN})_3^{2-}$ et la proflavine pour obtenir des courbes de calibration et permettant d'observer la dispersion des mesures ; électrodes utilisées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

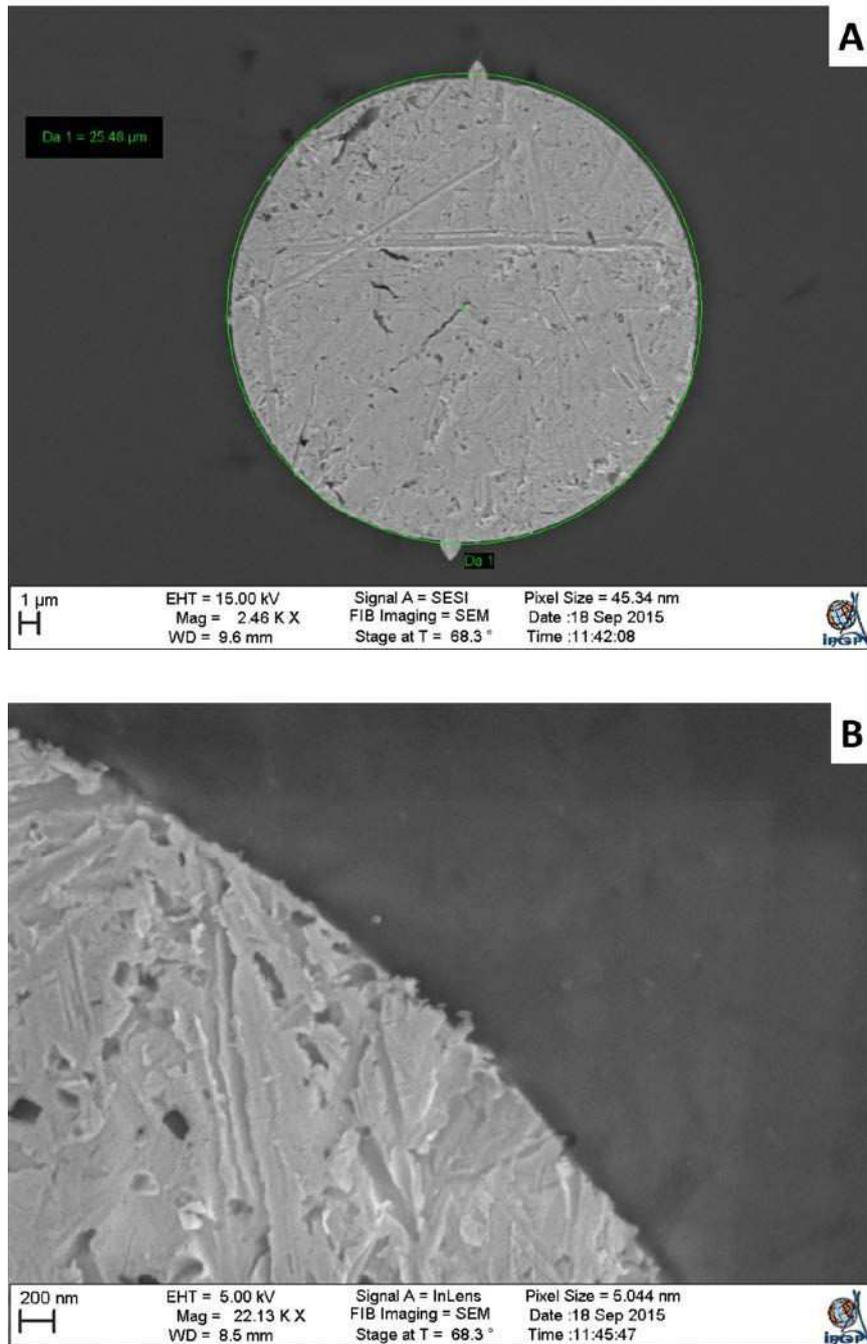


Figure III-38 : Images réalisées en microscopie électronique à balayage d'une électrode d'or commerciale de diamètre 25 μm neuve ; vue globale X3300 (A), zoom sur l'interface scellée or-verre X33000 (B)

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.

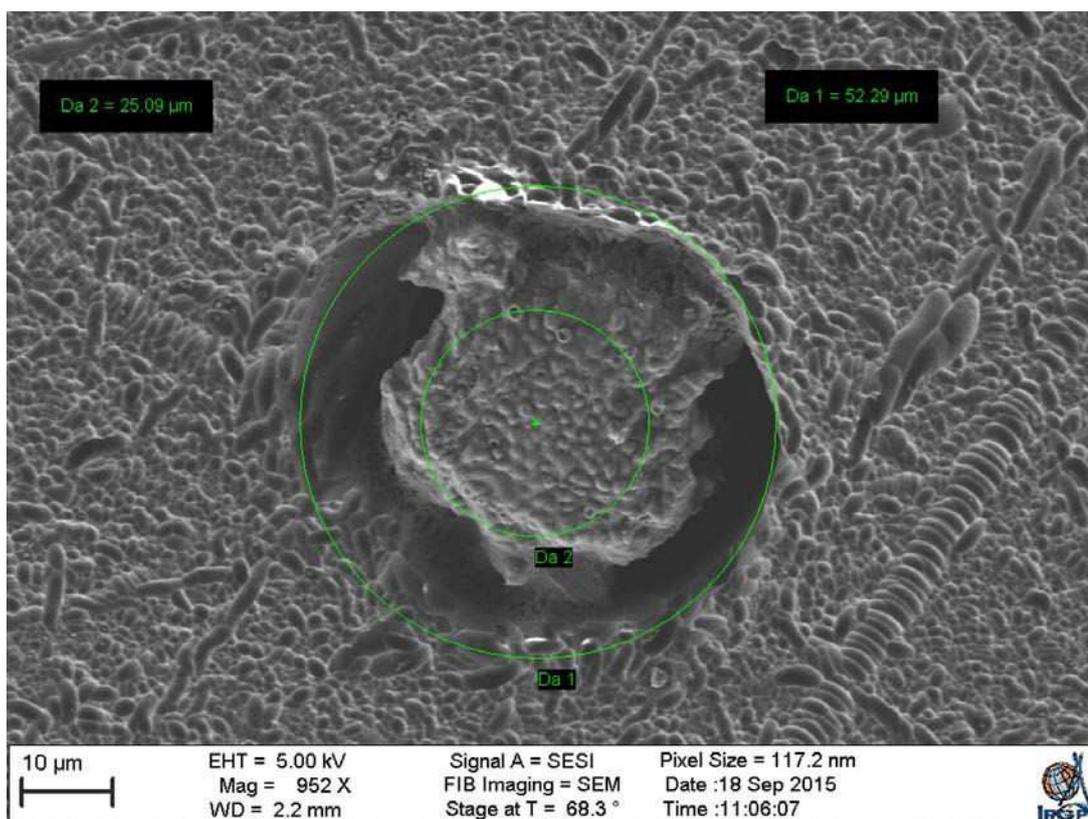


Figure III-39 : Image réalisée en microscopie électronique à balayage d'une électrode d'or commerciale de diamètre 25 μm après 12 cycles d'hybridation/polissage non polie en vue globale X1650

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.

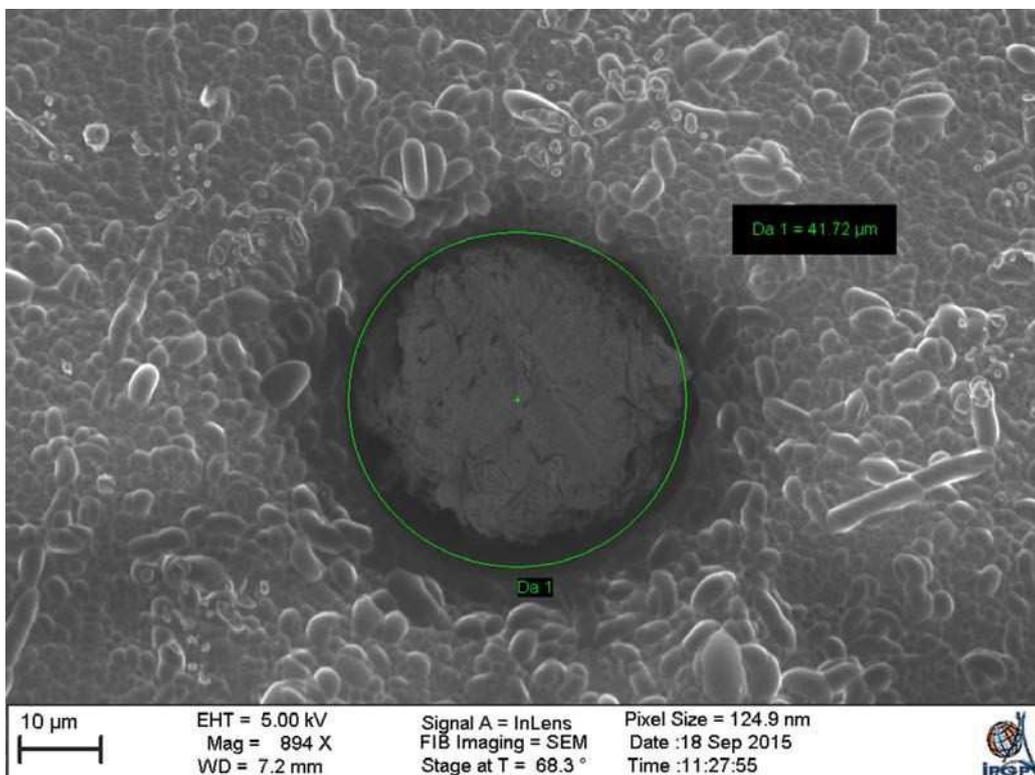


Figure III-40 : Image réalisée en microscopie électronique à balayage d'une électrode d'or commerciale de diamètre 25 μm après 12 cycles d'hybridation/dénaturation non polie en vue globale X1650

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.

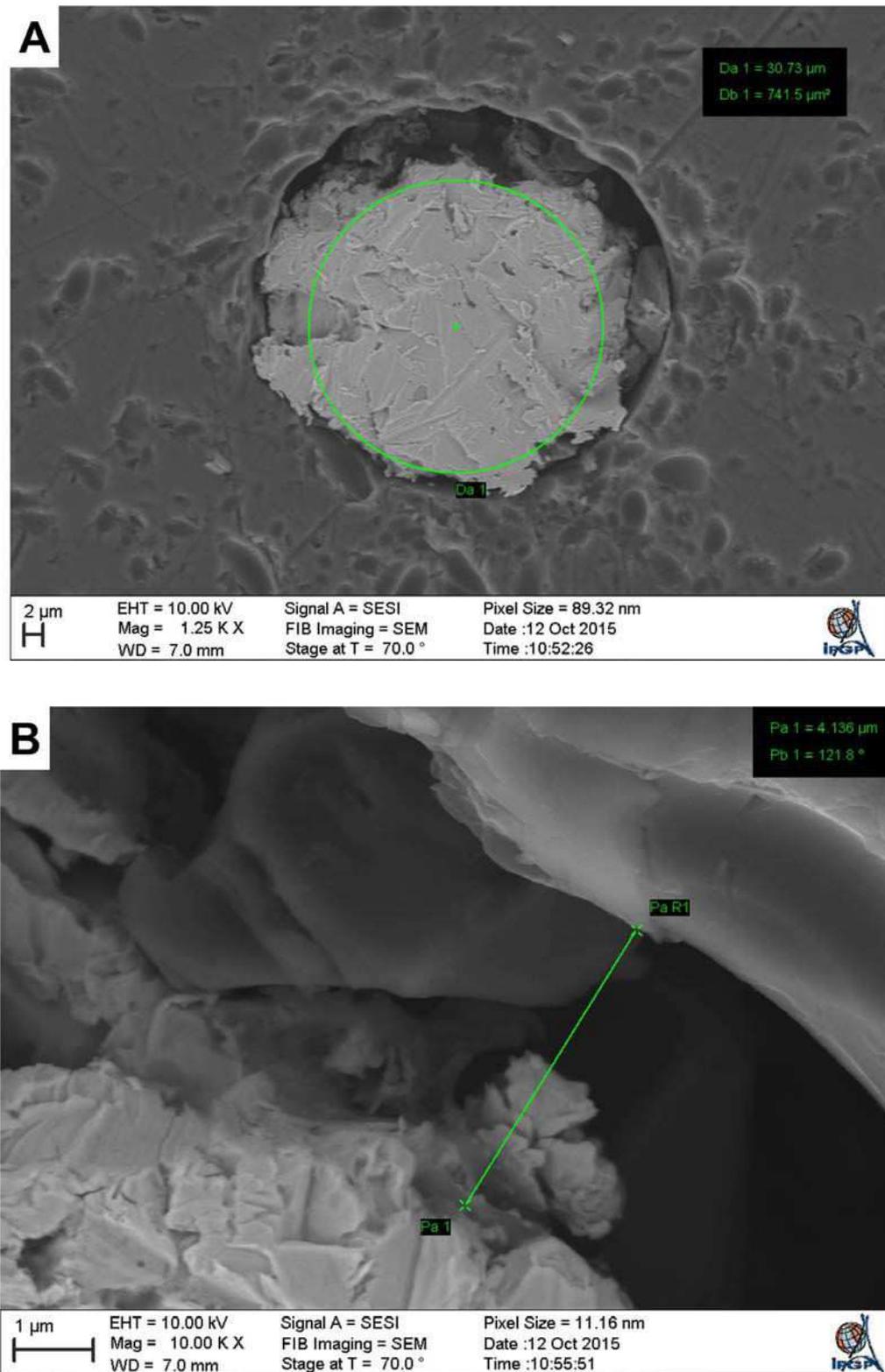
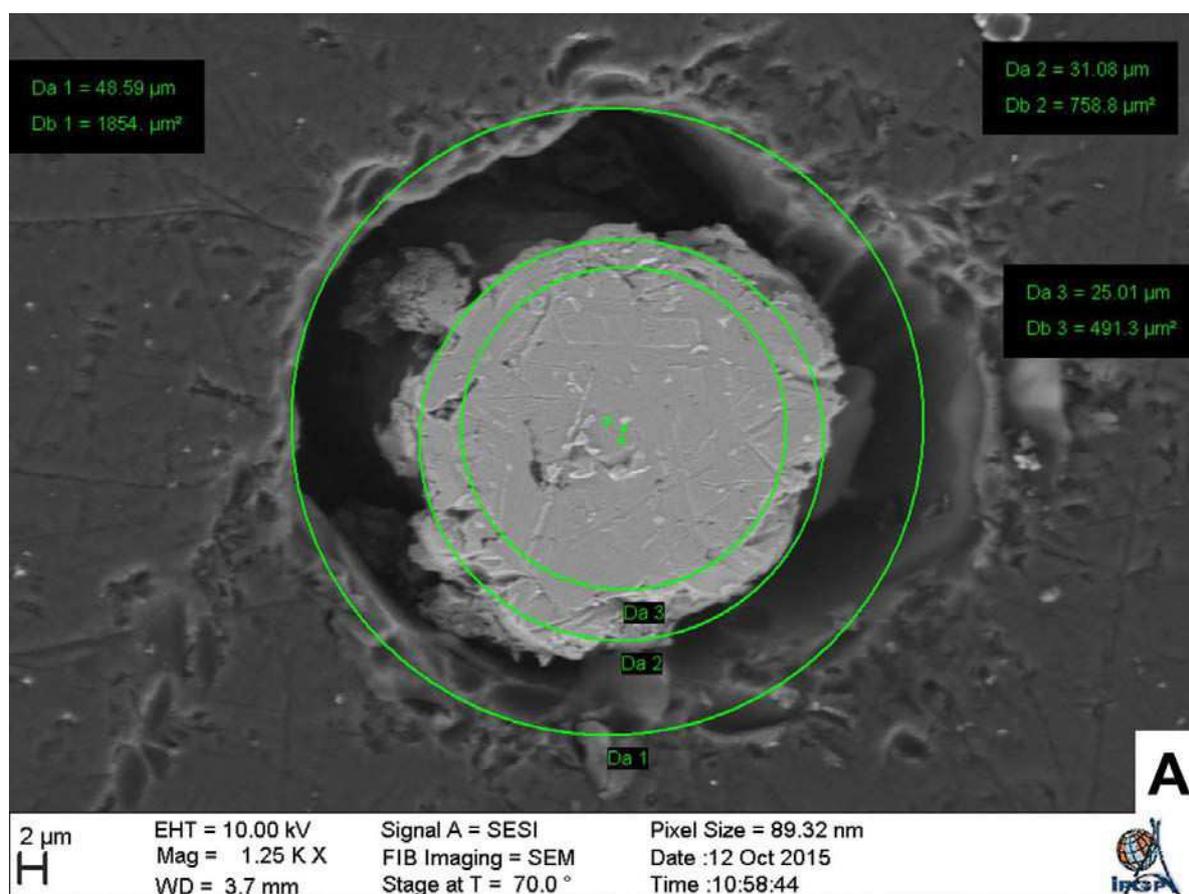


Figure III-41 : Image réalisée en microscopie électronique à balayage d'une électrode d'or commerciale de diamètre 25 μm après 12 cycles d'hybridation/polissage avec NaBF_4 comme sel support ; en vue globale X1750 (A) et en zoom sur le creux autour de l'électrode X19000 (B)

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.



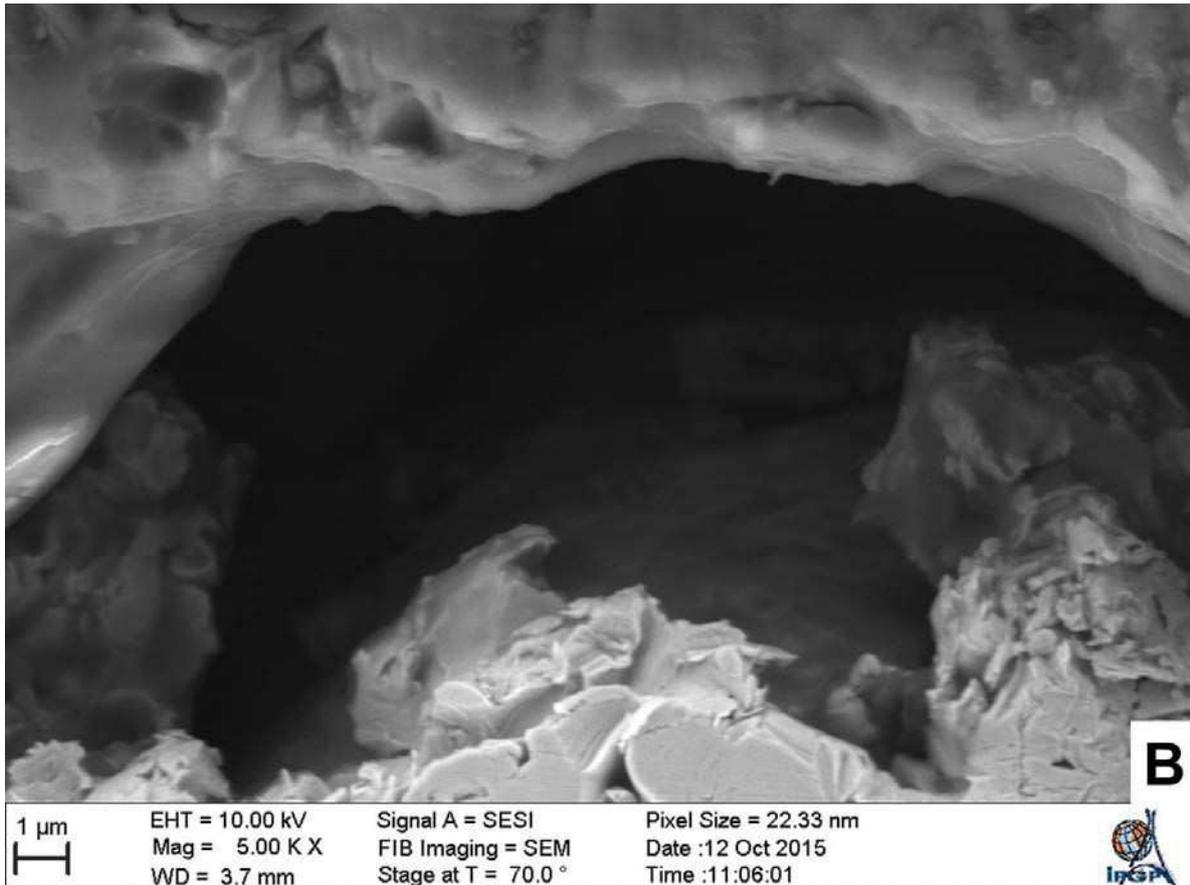


Figure III-42 : Image réalisée en microscopie électronique à balayage d'une électrode d'or commerciale de diamètre 25 μm après 12 cycles d'hybridation/polissage avec NaNO₃ comme sel support ; en vue globale X2000 (A) et en zoom sur le creux autour de l'électrode X7000 (B)

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

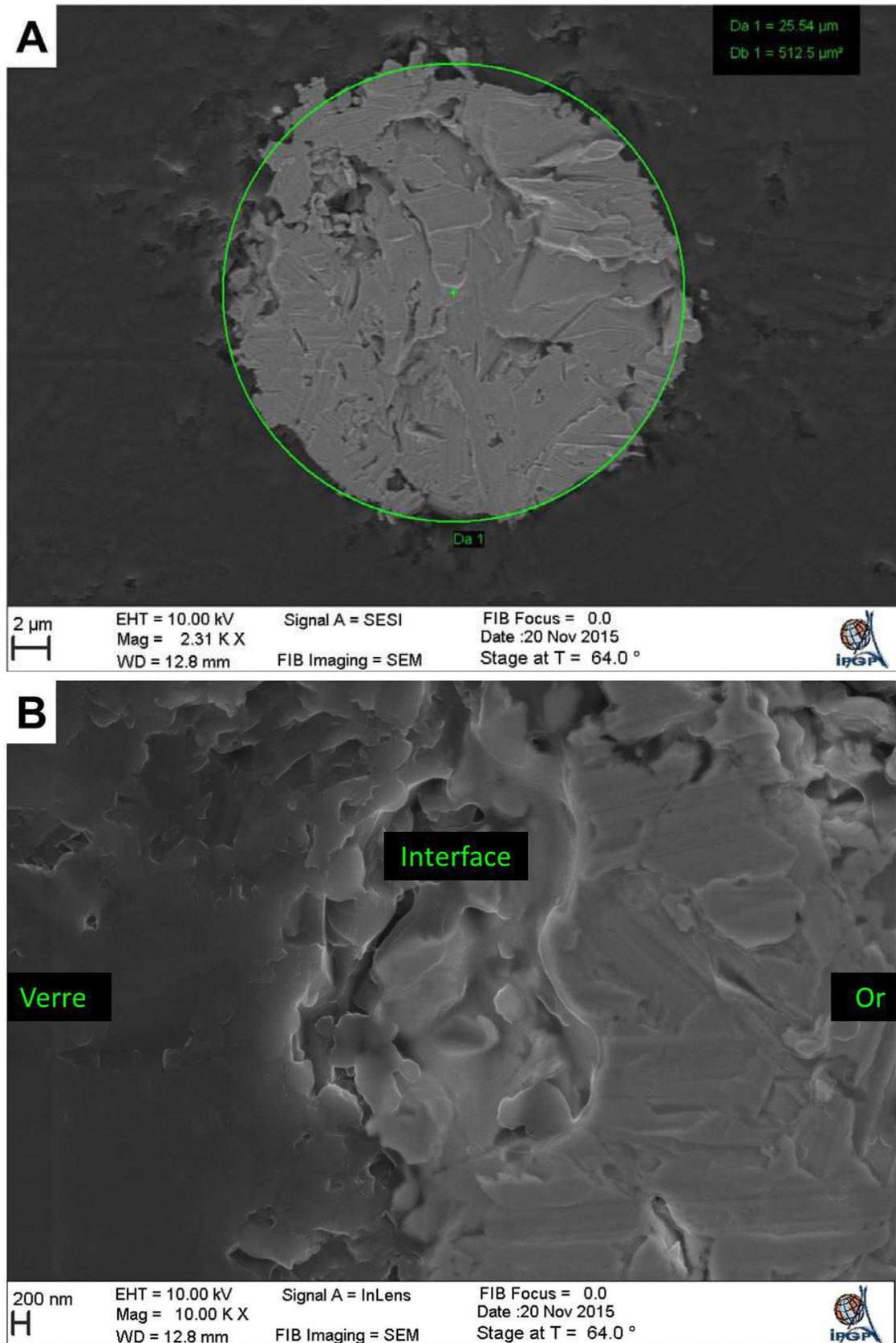


Figure III-43 : Image réalisée en microscopie électronique à balayage d'une électrode d'or commerciale de diamètre 25 µm après 12 cycles d'hybridation/polissage avec NaHCO₃ comme sel support ; en vue globale X3250 (A) et en zoom sur le sertissage autour de l'électrode X15000

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

Enfin, les images MEB réalisées après les tests de l'électrolyte contenant l'hydrogénocarbonate 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'hydrogénocarbonate 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'hydrogénocarbonate 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.

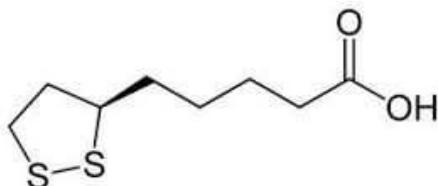


Figure III-44 : Structure de l'acide thioctique

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.

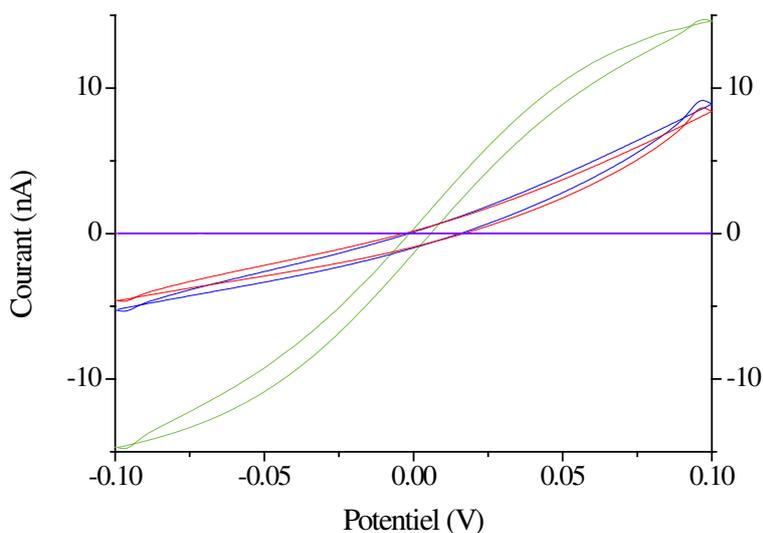


Figure III-45 : Vérification de la formation de la monocouche d'acide thioctique à 1 mM réalisée en deux heures à la surface de l'électrode d'or de 25 μm par évaluation du blocage du courant d'oxydo-réduction à la surface de l'électrode par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 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.

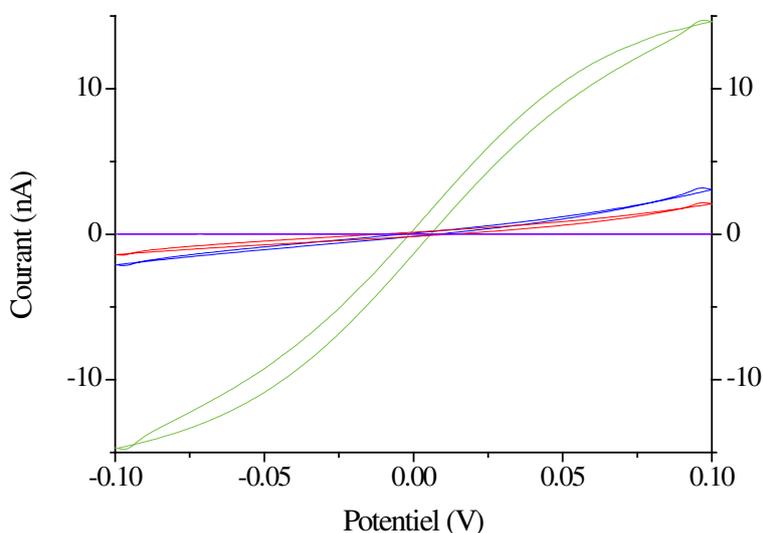


Figure III-46 : Vérification de la formation de la monocouche d'acide thioctique à 5 mM réalisée en deux heures à la surface de l'électrode d'or de 25 μm par évaluation du blocage du courant d'oxydo-réduction à la surface de l'électrode par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 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.

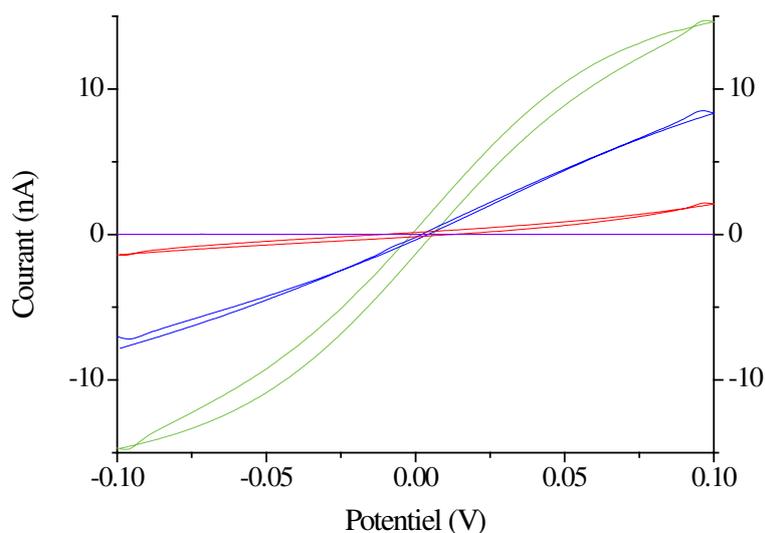


Figure III-47 : Comparaison des performances de monocouches formées à la surface de l'électrode d'or de 25 µm par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM à 50 mV/s ; blanc NaHCO_3 0,5 M (violet), électrode non greffée (vert), électrode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

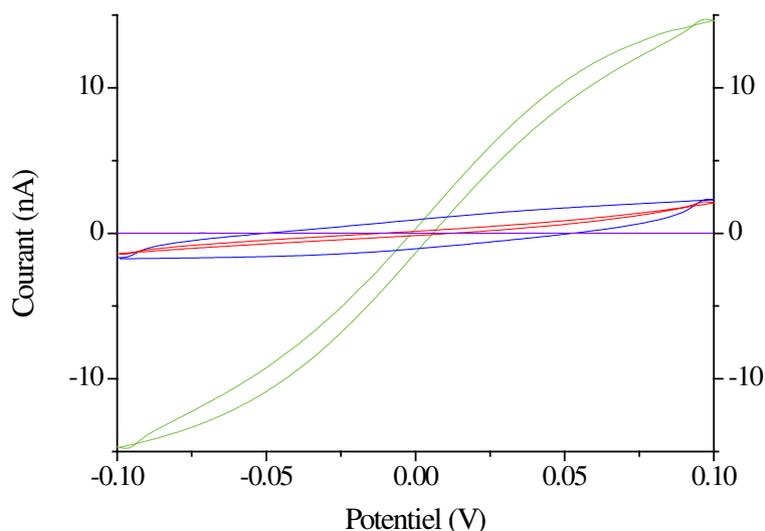


Figure III-48 : Comparaison des performances de monocouches formées à la surface de l'électrode d'or de 25 µm par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM à 50 mV/s ; blanc NaHCO_3 0,5 M (violet), électrode non greffée (vert), électrode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

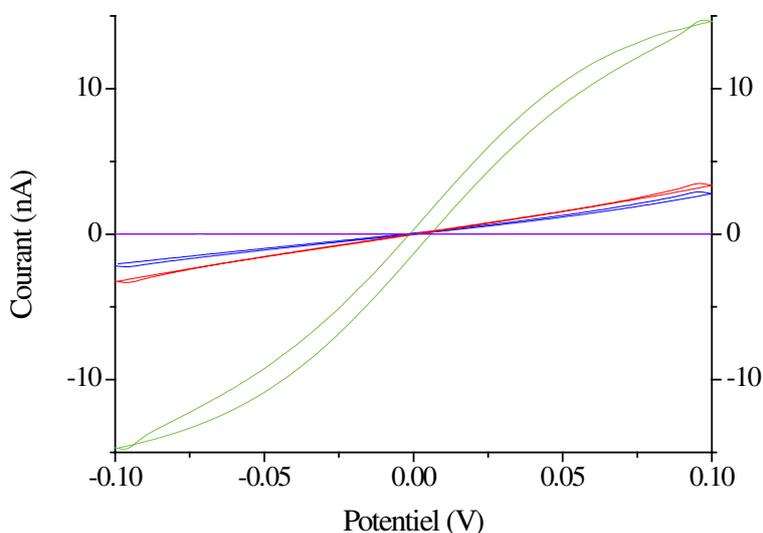


Figure III-49 : Comparaison des performances de monocouches formées à la surface de l'électrode d'or de 25 µm par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM à 50 mV/s ; blanc NaHCO_3 0,5 M (violet), électrode non greffée (vert), électrode 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 solvation de l'acide thioctique dans les deux solvants. En effet, dans l'eau, la solvation 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

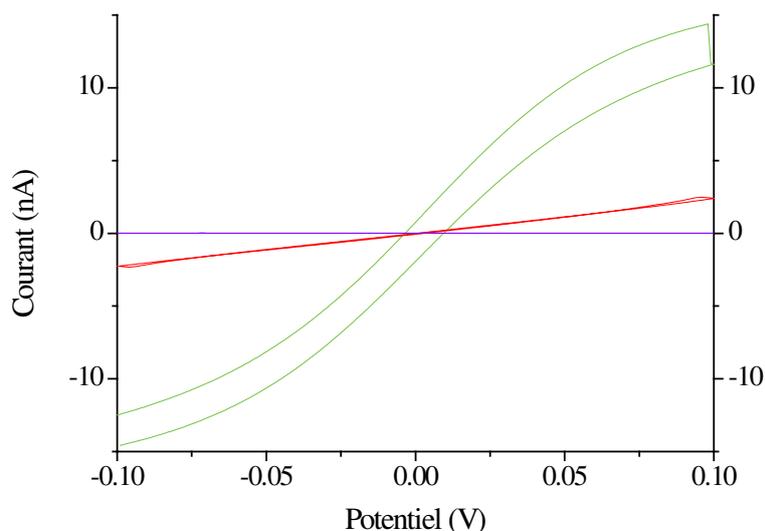


Figure III-50 : Vérification de la formation de la monocouche de sondes ADN marquées par l'acide thioctique à 10^{-5} M réalisée en deux heures à la surface d'une électrode d'or commerciale de $25 \mu\text{m}$ par évaluation du blocage du courant d'oxydo-réduction à la surface de l'électrode par voltampérométrie 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

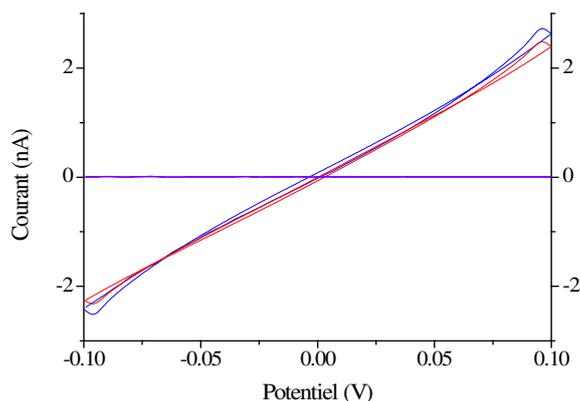


Figure III-51 : Exemple de biocapteur réalisé sur une électrode d'or commerciale de 25 µm avec une concentration en cible complémentaire de 10^{-6} M ; blanc NaHCO₃ 0,5 M (violet), électrode modifiée par la sonde ADN marquée par l'acide thioctique seule (rouge), électrode modifiée par la sonde ADN marquée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

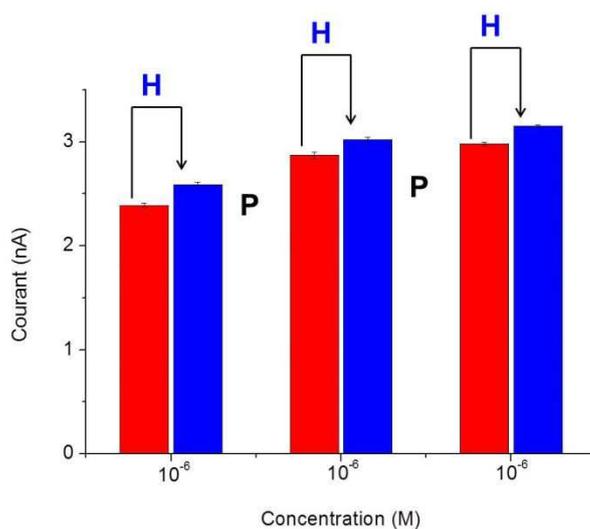


Figure III-52 : Histogramme montrant le courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure mesuré à l'électrode au cours des cycles d'hybridation et polissage de l'électrode pour une concentration en cible de 10^{-6} M ; électrode modifiée par la sonde marquée par l'acide thioctique seule (rouge),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

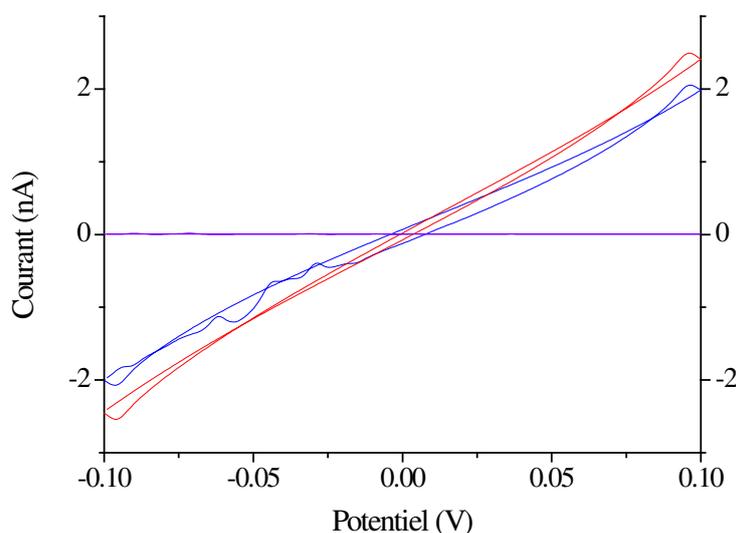


Figure III-53 : Comparaison des voltampérogrammes obtenus pour une électrode modifiée par la sonde ADN marquée AT seule (rouge) et pour une électrode modifiée par le duplex ADN marqué AT préalablement formé (bleu)

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

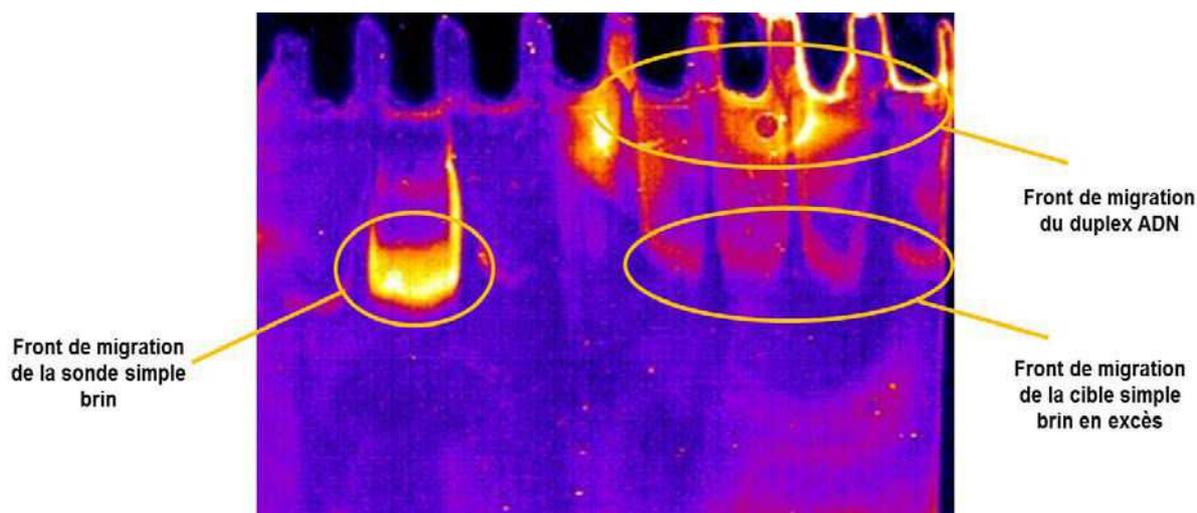


Figure III-54 : Photo du gel de polyacrylamide utilisé pour réaliser l'électrophorèse de la sonde ADN marquée par l'acide thioctique seule et de la sonde marquée par l'acide thioctique en présence de sonde complémentaire en excès

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.

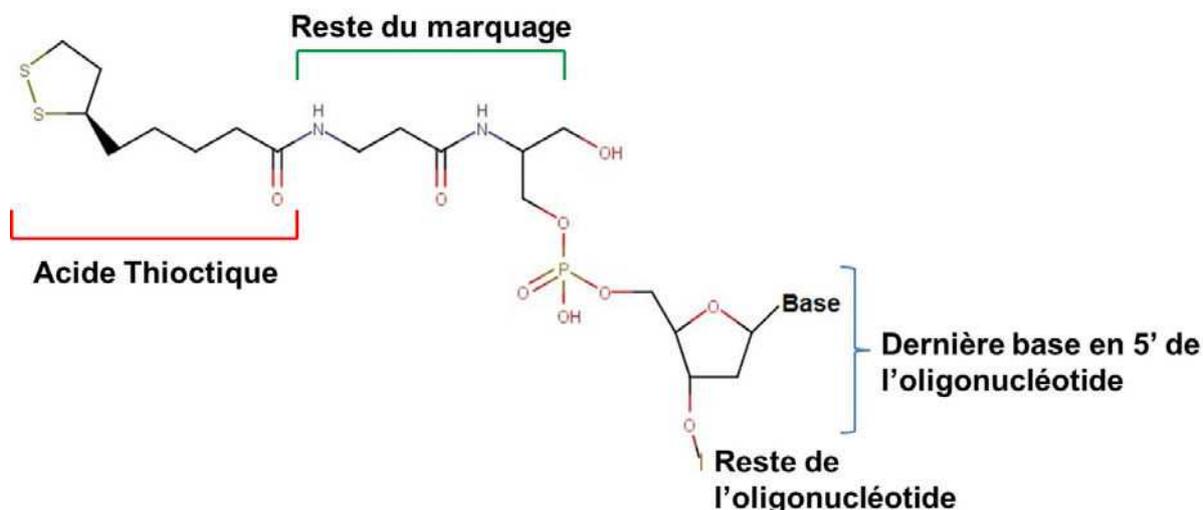


Figure III-55 : Détail de la modification (AcTh) de la sonde complémentaire du miRNA 215 par l'acide thiooctique

Cette Figure III-55 détaillant la modification effectuée sur la sonde ADN pour obtenir un ancrage acide thiooctique 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 thiooctique 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 thiooctique et couplage peptidique de la sonde ADN

La stratégie employée ici consiste à utiliser le greffage de l'acide thiooctique 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.

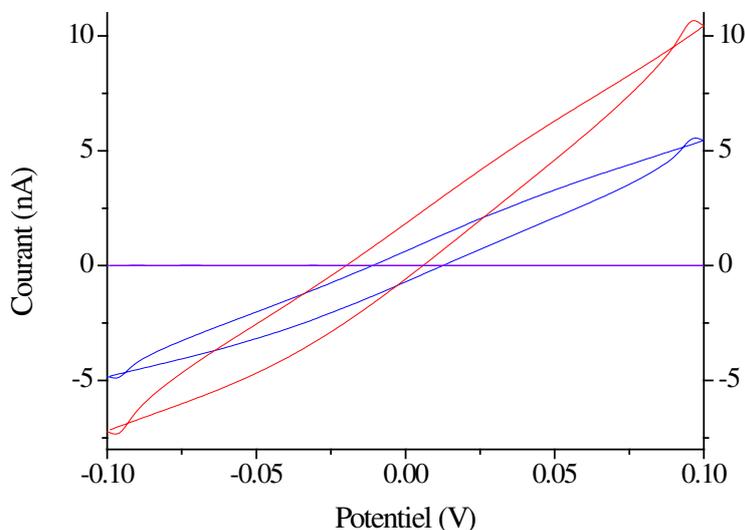


Figure III-56 : Exemple de biocapteur réalisé sur une électrode d'or commerciale de 25 μm avec une concentration en cible complémentaire de 10^{-6} M ; blanc NaHCO_3 0,5 M (violet), électrode modifiée par l'acide thioctique et couplage peptidique de la sonde marquée par une amine seule (rouge), électrode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

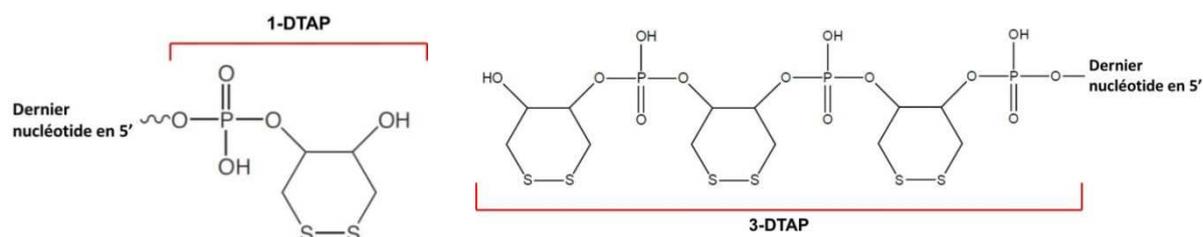
Le courant mesuré après hybridation est plus faible que celui mesuré sur l'électrode modifiée par la sonde seule. En effet, à 0,1 V, le courant mesuré après hybridation est de 10,7 nA avant hybridation contre 5,50 nA après hybridation. De la même façon en réduction, le courant avant hybridation vaut -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.



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.

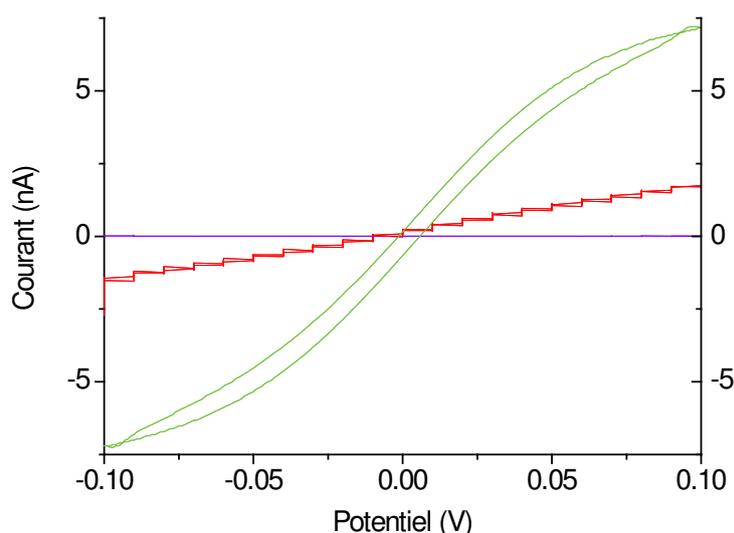


Figure III-58 : Vérification de la formation de la monocouche de sondes ADN marquées par le 1-DTAP à 10^{-5} M réalisée en 15 heures à la surface d'une électrode d'or commerciale de $25 \mu\text{m}$ par évaluation du blocage du courant d'oxydo-réduction à la surface de l'électrode par voltampérométrie 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.

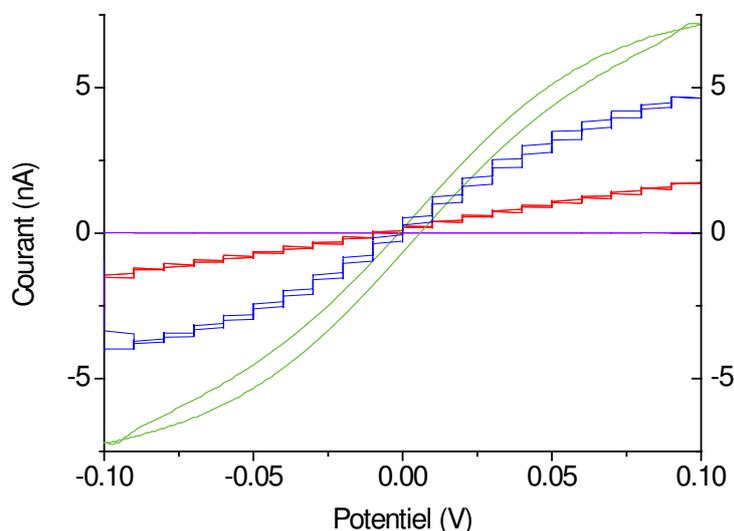


Figure III-59 : Exemple de biocapteur réalisé sur une électrode d'or commerciale de $25 \mu\text{m}$ avec une concentration en cible complémentaire de 10^{-6} M ; blanc NaCl 0,5 M (violet), UME non greffée (vert), électrode modifiée par la sonde ADN marquée par le 1-DTAP seule (rouge), électrode modifiée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

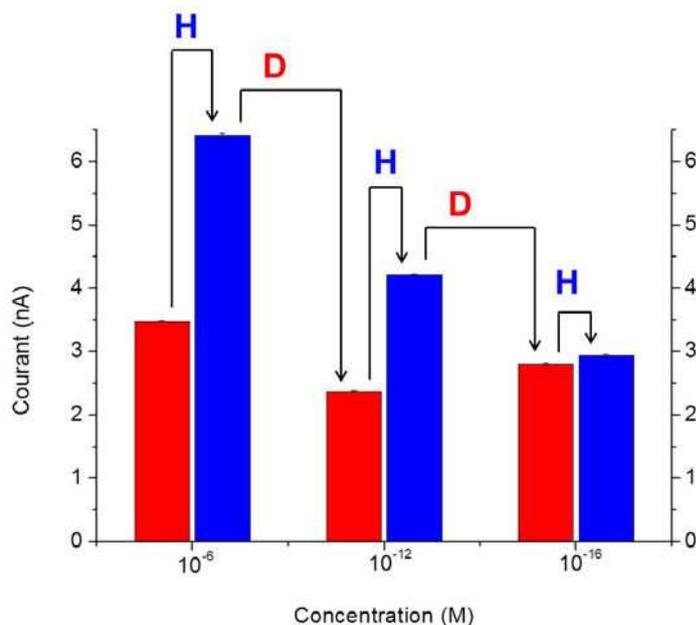


Figure III-60 : Histogramme montrant le courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure mesuré à l'électrode au cours des cycles d'hybridation et dénaturation de l'électrode pour les différentes concentrations en cible; électrode modifiée par la sonde seule (rouge), électrode modifiée par la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

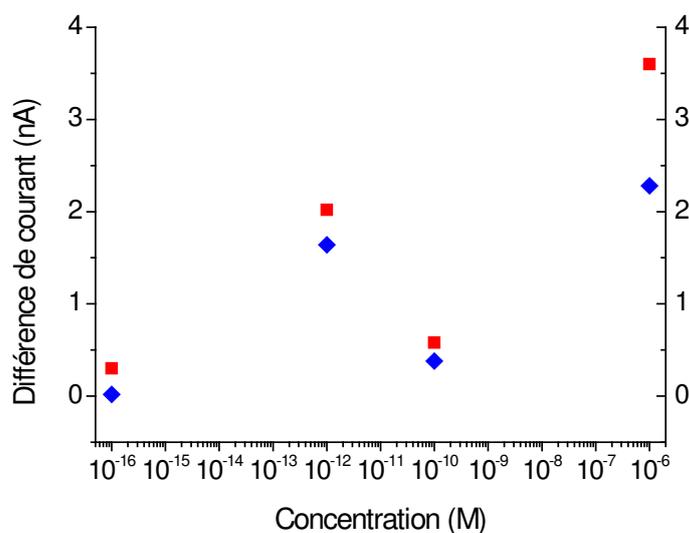


Figure III-61 : Représentation de tous les résultats obtenus avec les sondes marquées 1-DTAP permettant d'observer la dispersion des mesures

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).

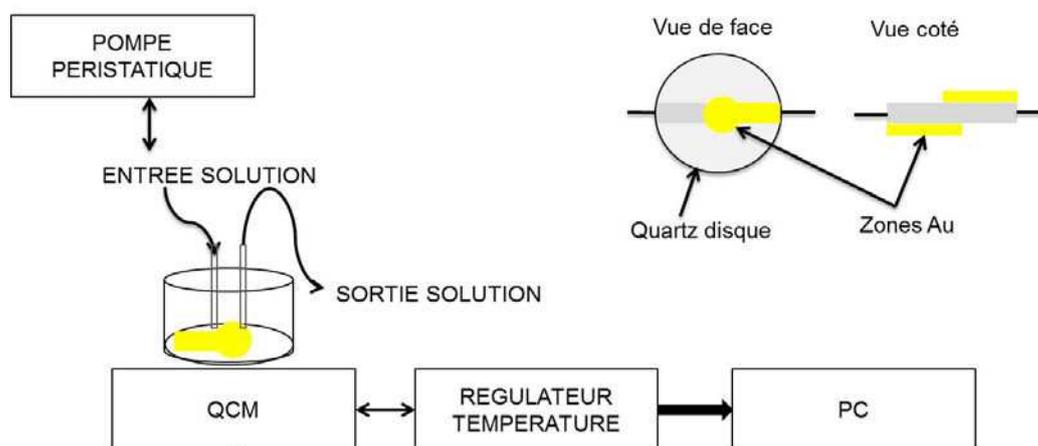


Figure III-62 : Schéma du montage utilisé pour réaliser les expériences de QCM

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.

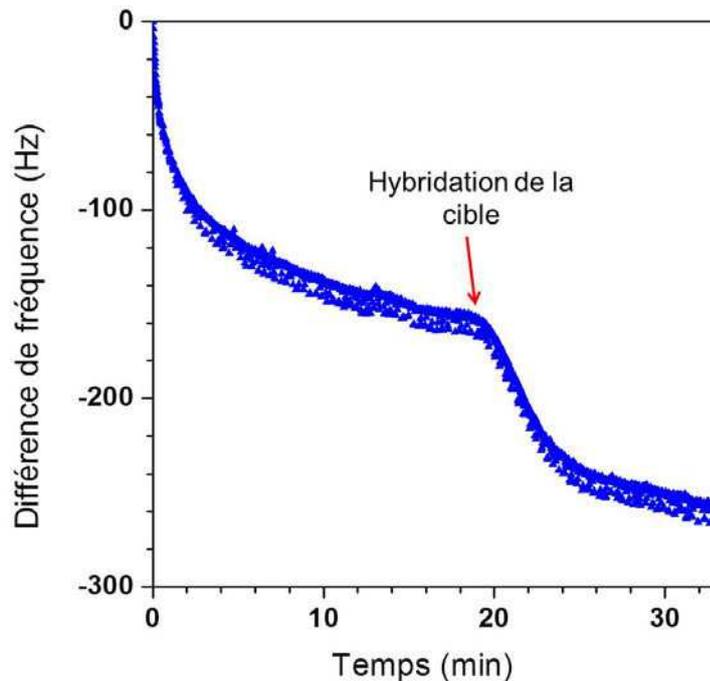


Figure III-63 : Représentation graphique de la différence de fréquence mesurée sur le quartz en fonction du temps durant l'hybridation d'une cible complémentaire sur l'électrode modifiée par la sonde 1-DTAP

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		
$\Delta f(\text{sonde})$ (Hz)	-177	-161	-250	-171	-177	-189	-166	-177	-187
$\Delta f(\text{cible})$ (Hz)	-287	-252	-395	-277	-285	-288	-210	-220	-226
$\Delta f(\text{cible})-$ $\Delta f(\text{sonde})$ (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.

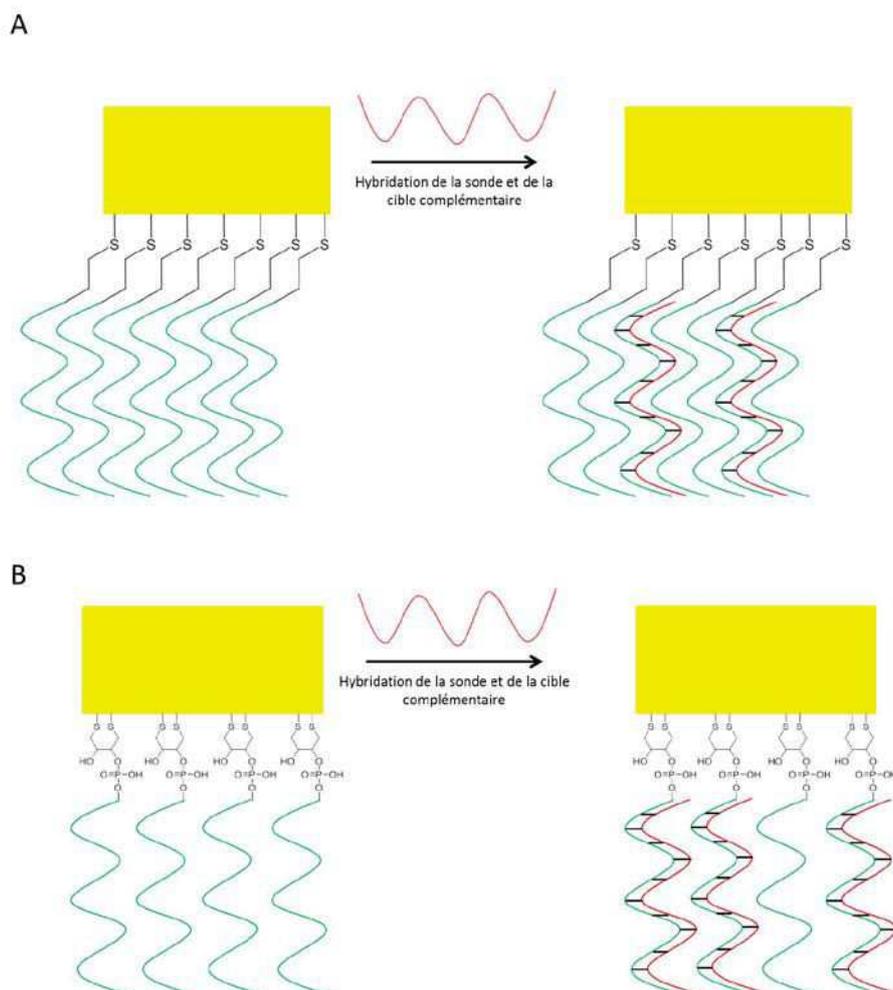


Figure III-64 : Schéma de l'hybridation sur une électrode modifiée par la sonde marquée thiol (A) et 1-DTAP (B)

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