

II. Matériels et méthodes

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

A. Les électrodes utilisées

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

1) Electrodes disque unitaires en carbone graphite

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

Matériels et méthodes

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

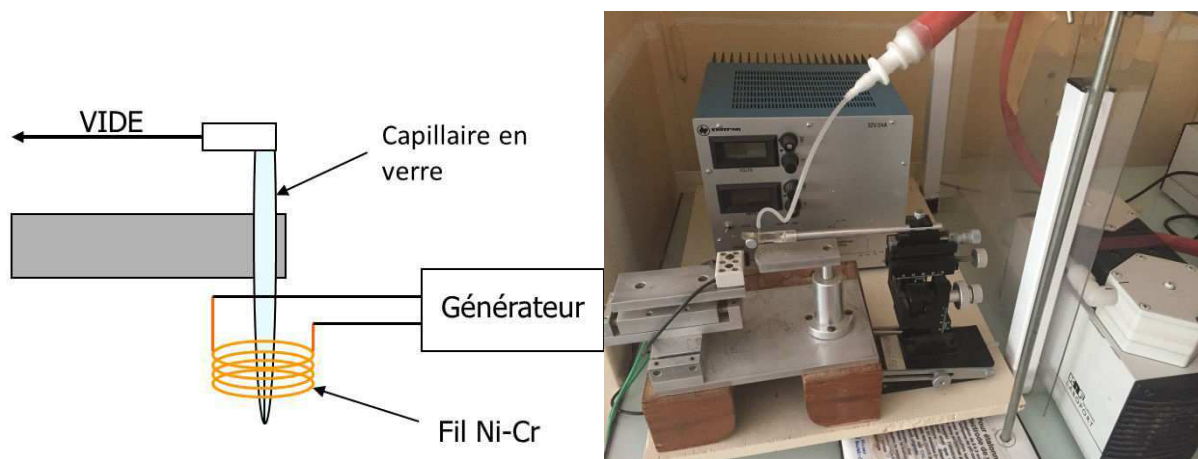


Figure II-1 : Schéma et photo du montage utilisé pour sceller les UMEs

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

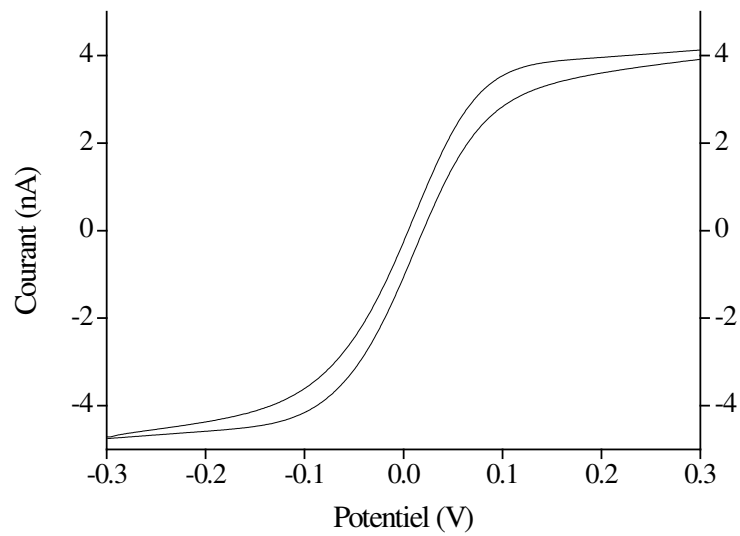


Figure II-2 : Exemple de voltampérogramme obtenu lors de la caractérisation d'une UME de carbone de 7 µm à une vitesse de balayage de 100 mV/s

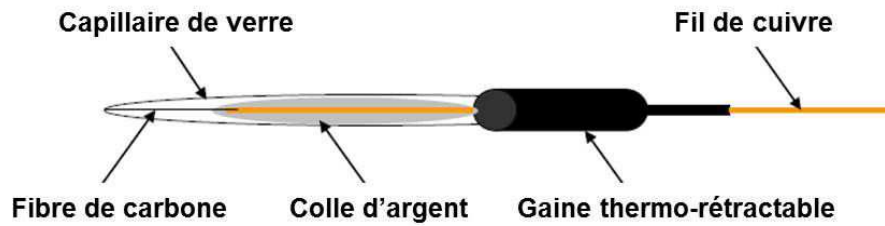


Figure II-3 : Schéma d'une UME réalisée au laboratoire avec une fibre de carbone

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

2) Electrodes disque unitaires en or

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

Matériels et méthodes

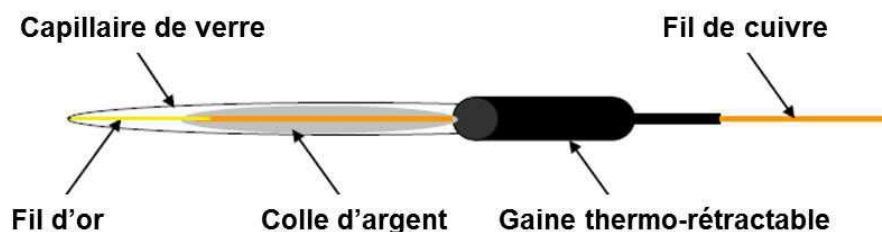


Figure II-4 : Schéma d'une UME en or fabriquée au laboratoire

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

3) Réseau d'électrodes bandes interdigitées

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

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

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

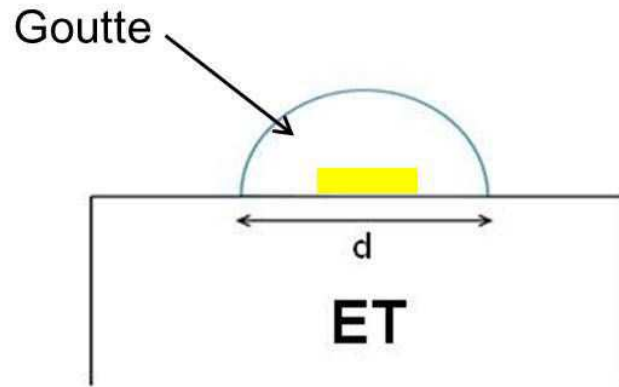


Figure II-5 : Schéma d'une électrode bande dans le cas d'une goutte déposée à sa surface

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

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

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

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

Matériels et méthodes

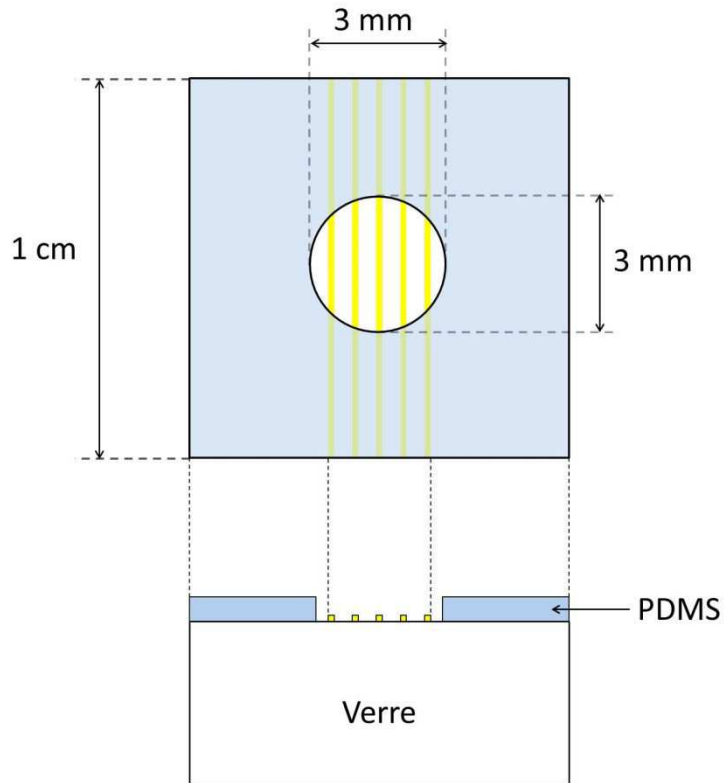


Figure II-6 : Schéma du prototype d'électrodes bandes disposées en réseau

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

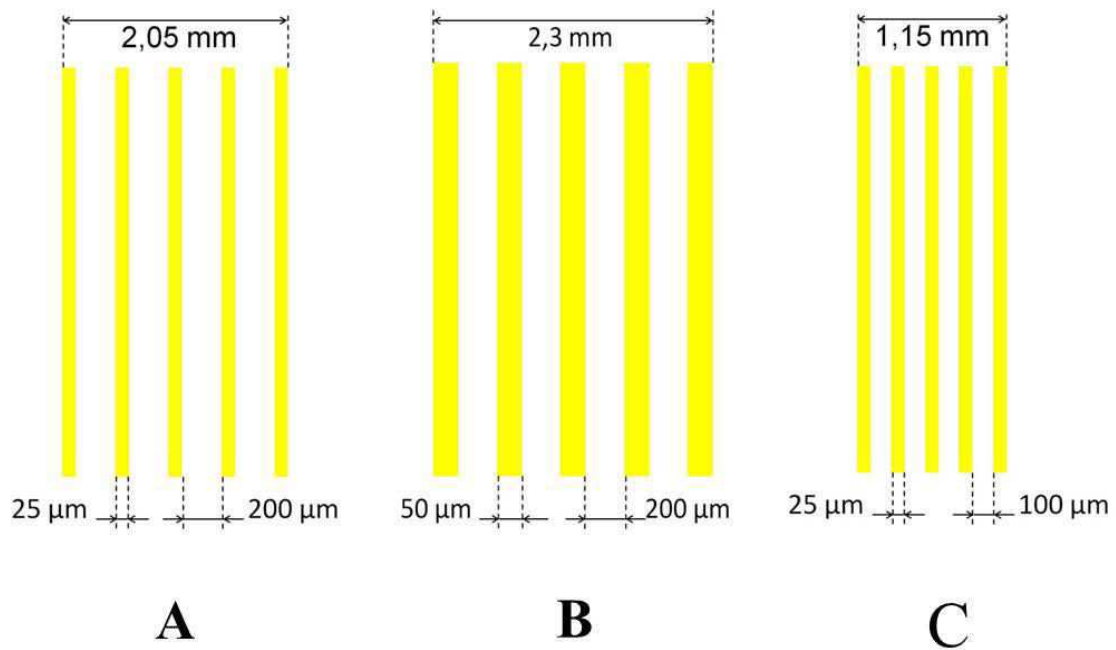


Figure II-7 : Schéma des différentes configurations de réseaux d'électrodes fabriquées

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

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

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

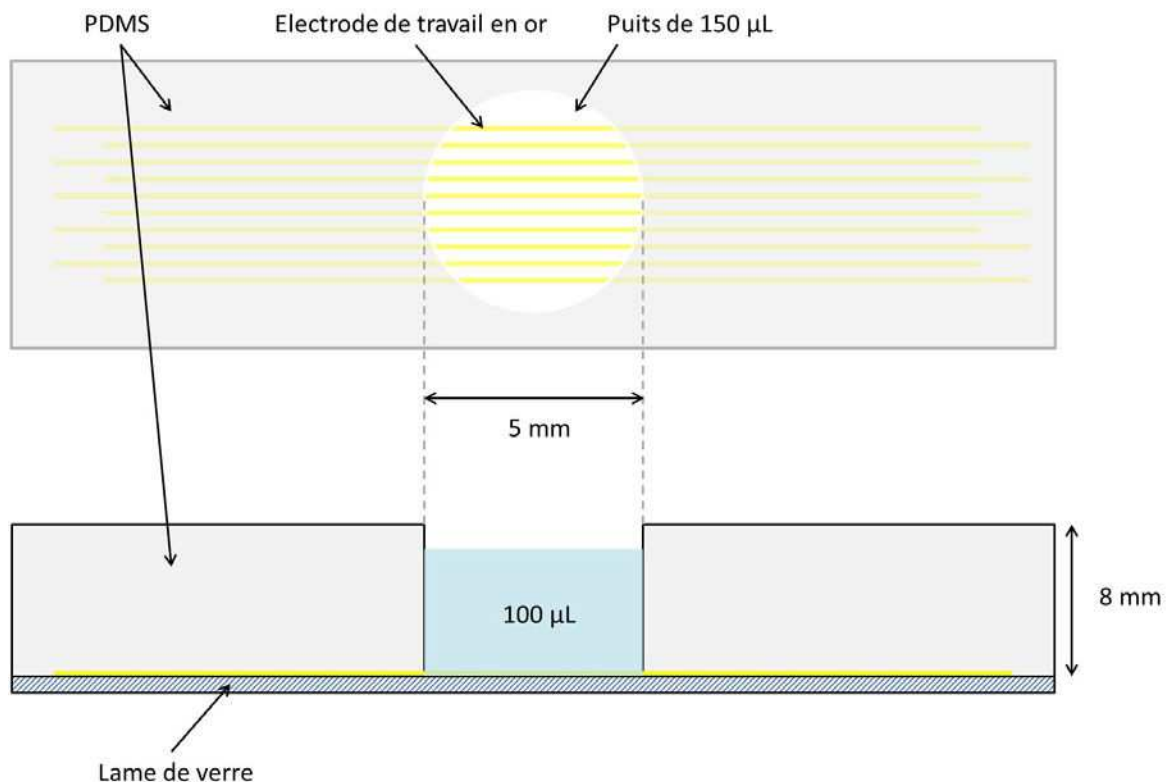


Figure II-8 : Schéma du réseau conçu vu de dessus et vu de profil en coupe

Matériels et méthodes

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

4) Les contre-électrodes

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

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

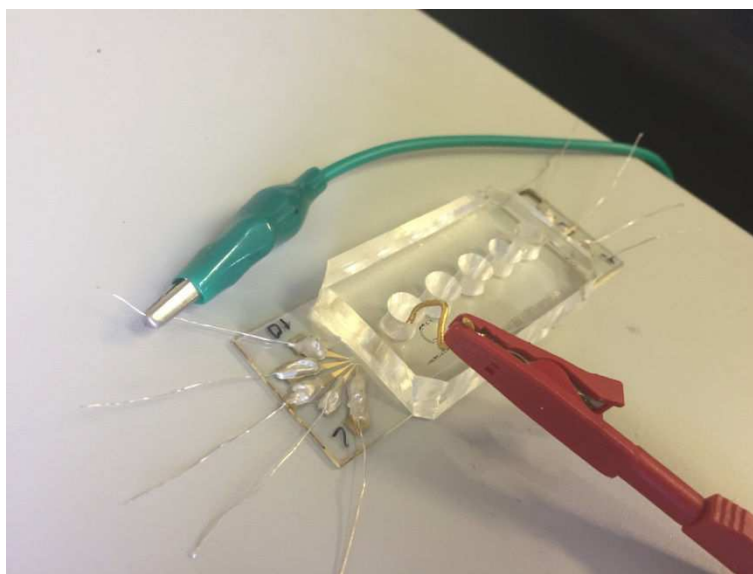


Figure II-9 : Photo du montage à deux électrodes dans le cas de l'utilisation des réseaux d'électrodes bandes comme électrode de travail

B. Les mesures électrochimiques

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

1) Les dispositifs expérimentaux

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

a) *Le picostat*

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

b) *Le potentiostat PAR 263A*

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

c) *Le potentiostat PG 580R*

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

2) Les méthodes de mesures électrochimiques

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

a) *La voltampérométrie cyclique*

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

Matériels et méthodes

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

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

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

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

b) La chronoampérométrie

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

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

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

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

C. L'électrolyte de mesure

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

1) Le sel de fond

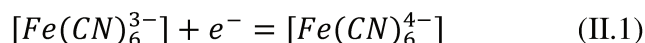
La présence du sel de fond dans l'électrolyte est indispensable pour s'affranchir du phénomène de migration des espèces. Il convient donc de maintenir la force ionique de ce sel de fond à 0,5 M pour travailler dans de telles conditions. Les différents sels de fond utilisés dans cette étude sont le chlorure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

2) La sonde rédox

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

Matériels et méthodes

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



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

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

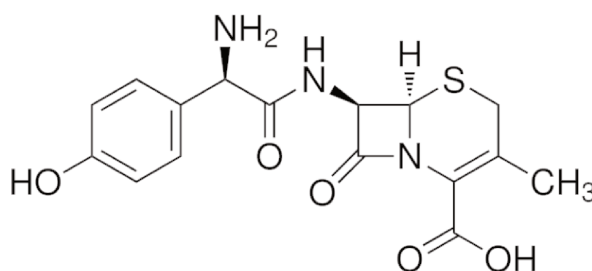
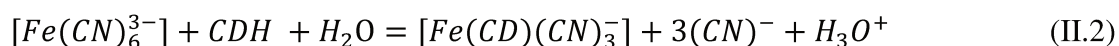
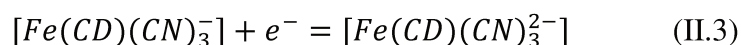


Figure II-10 : Structure du céfadroxil

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



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



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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

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

3) L'intercalant rédox

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

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

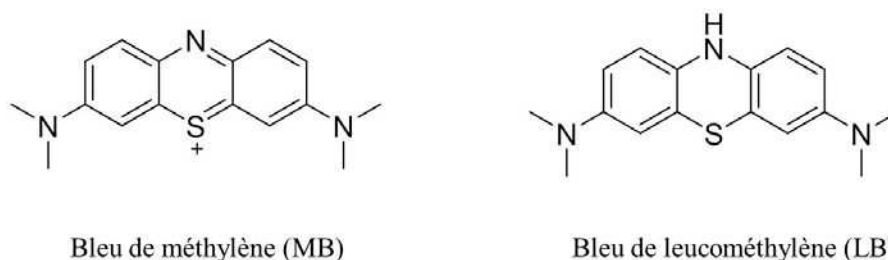
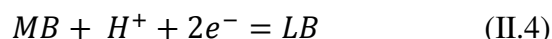


Figure II-11 : Structure du bleu de méthylène et de sa forme réduite bleu de leucométhylène

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



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

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

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

Matériels et méthodes

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

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

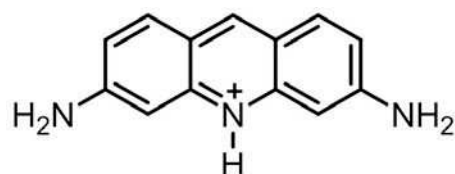


Figure II-13 : Structure de la proflavine (Pfl) à pH physiologique

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

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

D. Les sondes et cibles ADN et ARN

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

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

1) Les cibles ADN et ARN

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

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

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

5' ATG ACC TAT GAA TTG ACA GAC 3'

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

Matériels et méthodes

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

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

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

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

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

2) Les cibles non-complémentaires

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

5' ACA CAA GCA CAG TAG ATC CTG 3'

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

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

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

5' ATG ACC TAT GTA TTG ACA GAC 3'

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

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

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

3) Les sondes ADN et ARN

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

a) Sonde modifiée par une amine

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

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

Matériels et méthodes

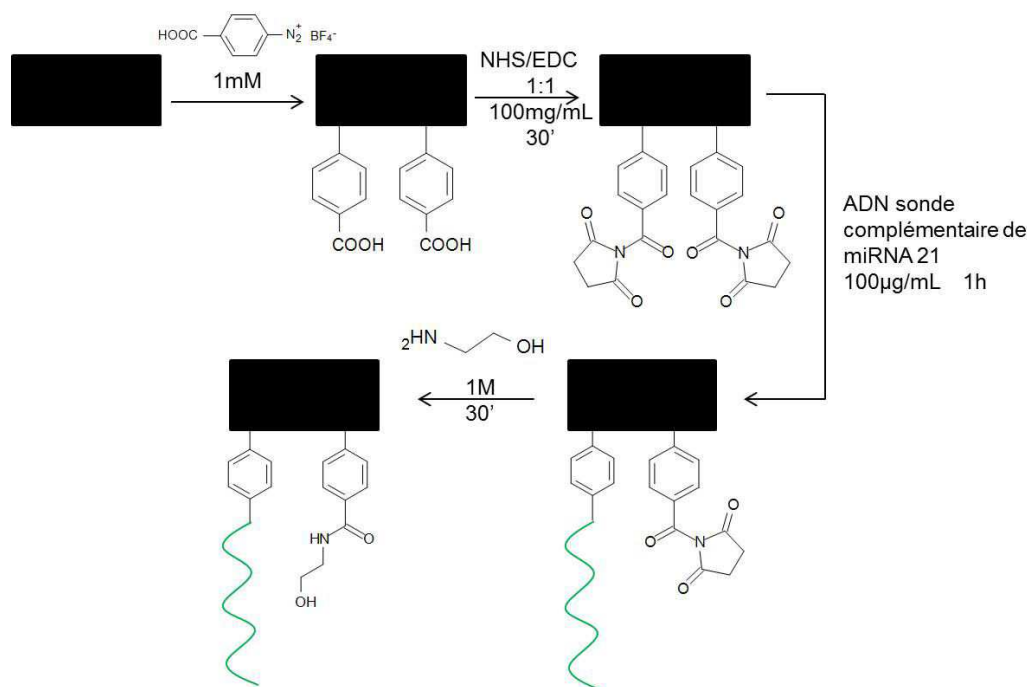


Figure II-14 : Schéma réactionnel de l'immobilisation des sondes marquées amine à la surface d'une électrode de carbone graphite par couplage peptidique avec un diazonium

b) Sondes modifiées par un thiol

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



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



Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

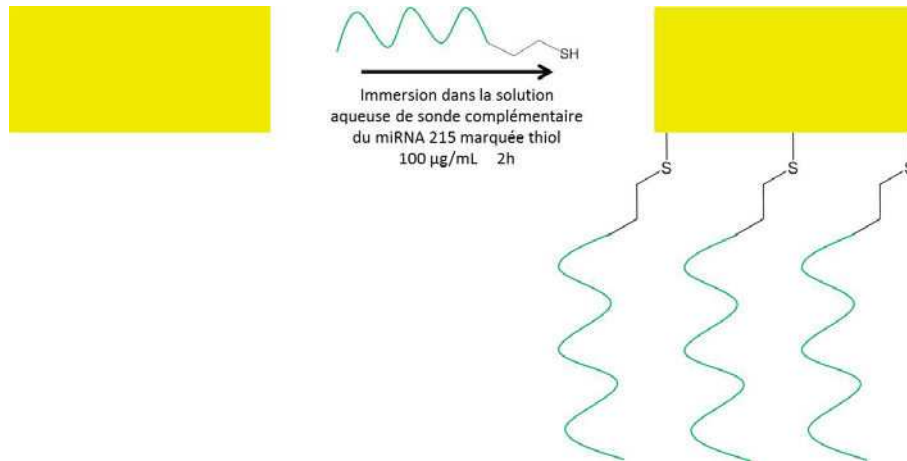


Figure II-15 : Schéma réactionnel de l'immobilisation des sondes marquées par un thiol à la surface d'une électrode d'or par chimisorption

c) Sonde modifiée par l'acide thioctique

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

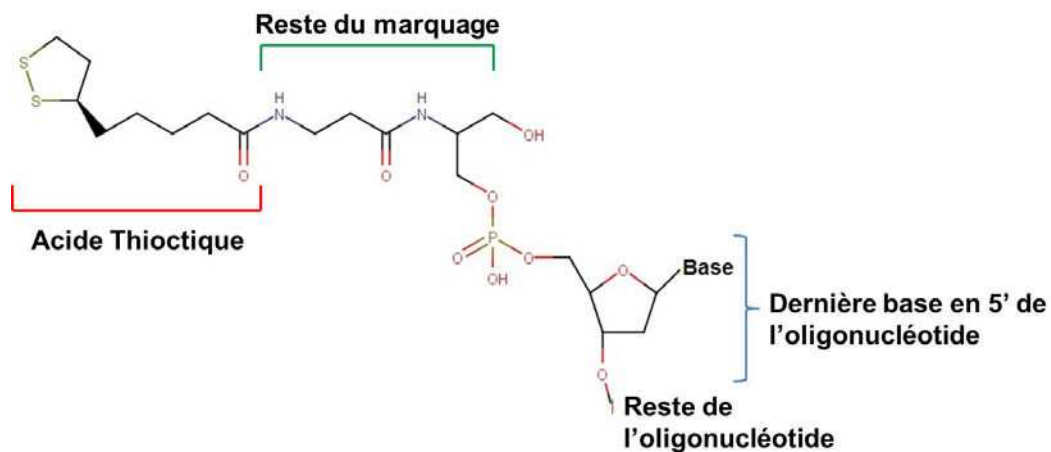


Figure II-16 : Détail de la modification (AcTh) de la sonde complémentaire du miRNA 215 par l'acide thioctique

Matériels et méthodes

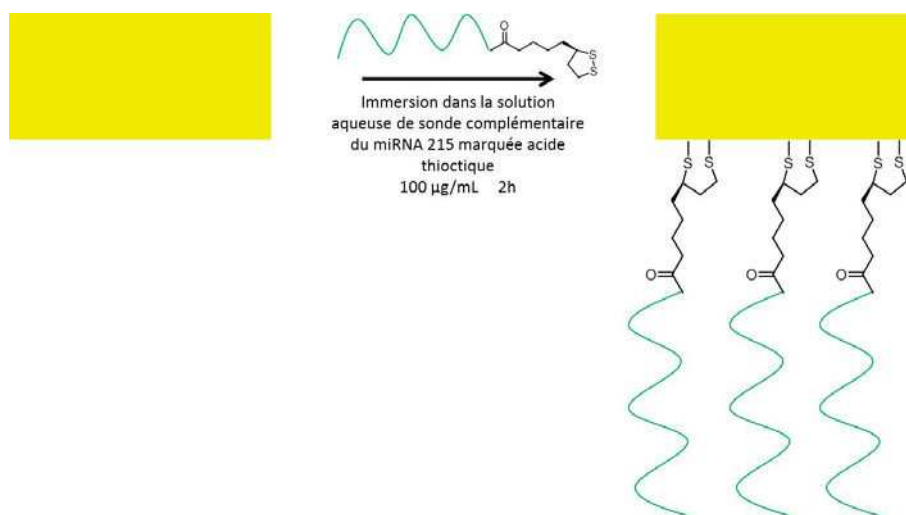


Figure II-17 : Schéma réactionnel de l'immobilisation des sondes marquées par un disulfure (exemple de l'acide thioctique) à la surface d'une électrode d'or par chimisorption

La séquence est donc la suivante :



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

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

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

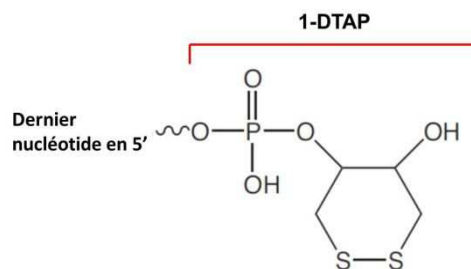


Figure II-18 : Détail de la modification 1-DTAP d'une sonde ADN

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

La séquence utilisée dans ce cas est la suivante :



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

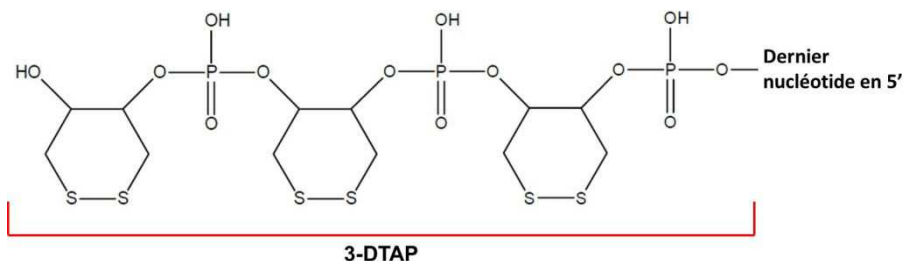


Figure II-19 : Détail de la modification 3-DTAP d'une sonde ADN

La séquence utilisée est la suivante :



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



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

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

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

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