

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

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

A. Considérations préliminaires sur l'hybridation et sa cinétique

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



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

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

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

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

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

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

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

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

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

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

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

t le temps d'hybridation en s

w la largeur d'une électrode bande en cm

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

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

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

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

N le nombre d'électrodes bandes dans un puits

t le temps d'hybridation en s

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

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

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

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

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

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

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

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

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

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

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

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

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

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

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

B. Caractérisation des réseaux d'électrodes

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

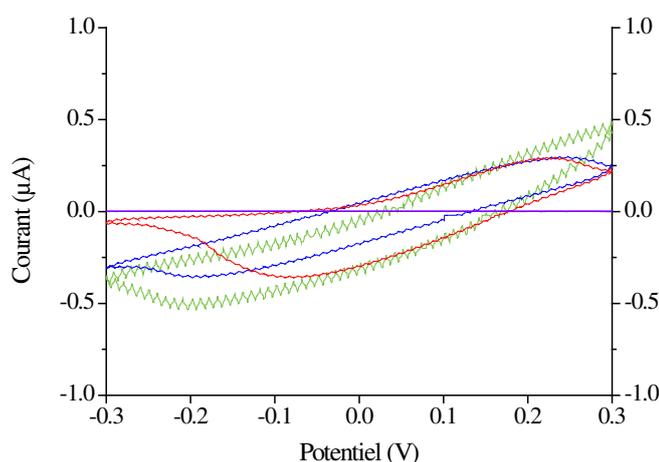


Figure IV-1 : Caractérisation du réseau d'électrodes d'or en bandes de largeur $25\ \mu\text{m}$ espacées de $200\ \mu\text{m}$ pour trois bandes différentes sans traitement préalable par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ $5\ \text{mM}$ et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$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

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

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

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

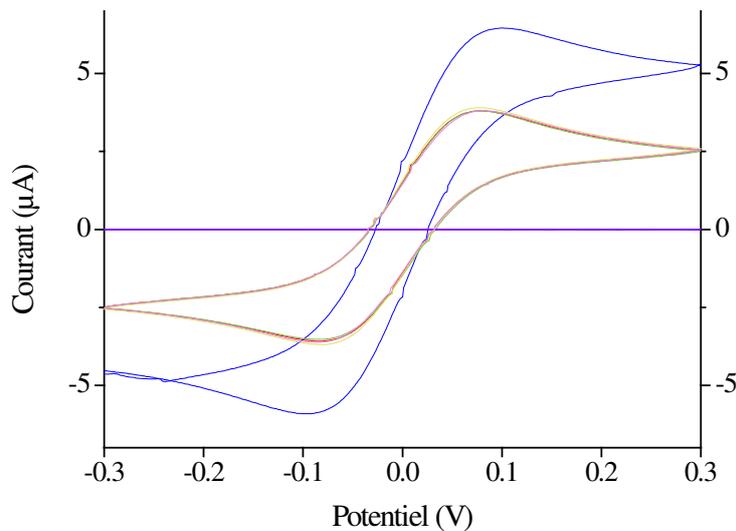


Figure IV-2 : Caractérisation du réseau d'électrodes d'or en bandes de largeur 25 μm espacées de 200 μm pour les 5 bandes après recuit par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM à 100 mV/s ; blanc NaCl 0,5 M (violet), bande 1 (rouge),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

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

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

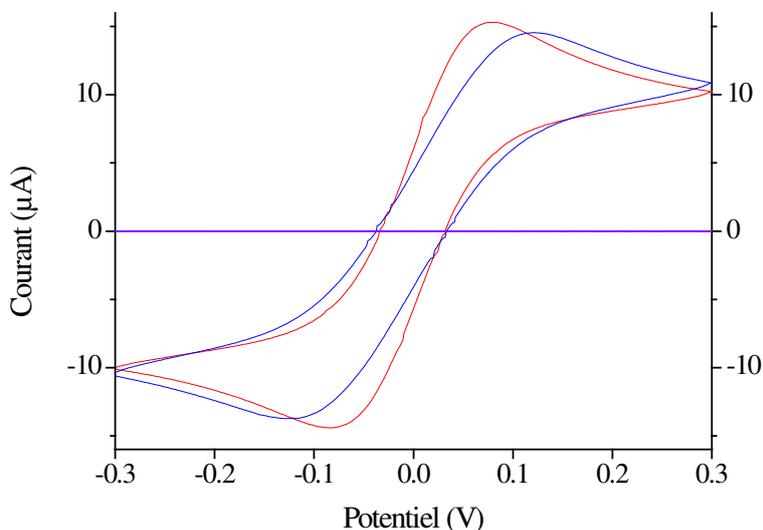


Figure IV-3 : Comparaison des voltampérogrammes obtenus sur le réseau d'électrodes 25_200 par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM à 100 mV/s pour la somme des courants des bandes 1, 3, 4, 5 (rouge) et pour la mesure sur les bandes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

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

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

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

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

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

1) Monocouches d'acide thioctique

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

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

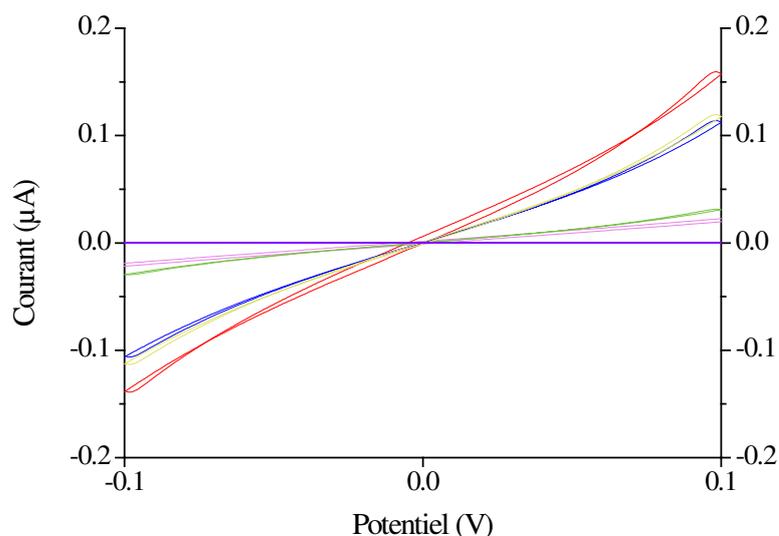


Figure IV-4 : Vérification de la formation de la monocouche d'acide thioctique à 5 mM réalisée en deux heures à la surface du réseau d'électrodes d'or 25_200 par évaluation du blocage du courant d'oxydo-réduction à la surface des électrodes par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$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

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

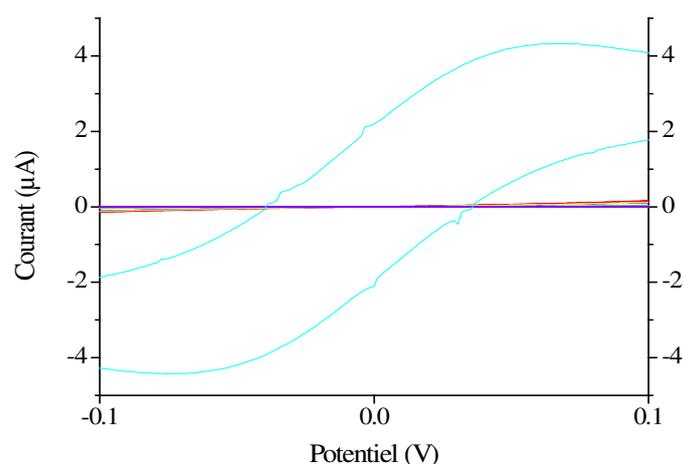


Figure IV-5 : Vérification du blocage du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure à la surface du réseau d'électrodes d'or 25_200 modifiées par la monocouche d'acide thioctique à 5 mM réalisée en deux heures par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$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

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

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

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

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

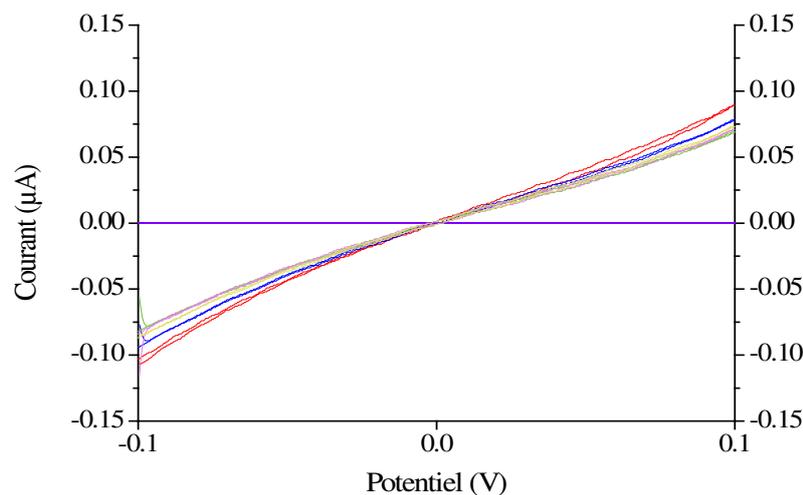


Figure IV-6 : Vérification de la formation de la monocouche de sonde ADN marquée par le 1-DTAP à 10^{-5} M réalisée en 15 heures à la surface du réseau d'électrodes d'or 25_200 par évaluation du blocage du courant d'oxydo-réduction à la surface des électrodes par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

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

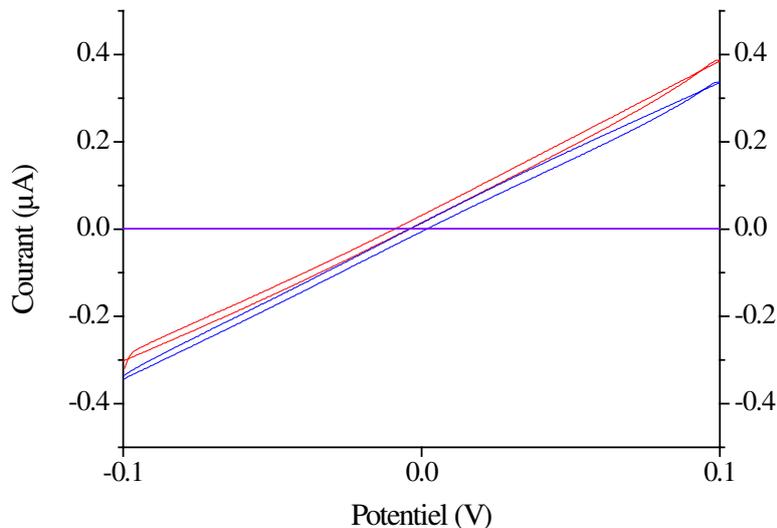


Figure IV-7 : Comparaison des voltampérogrammes moyens obtenus à la surface du réseau d'électrodes d'or 25_200 modifiées par la sonde ADN marquée 1-DTAP juste après adsorption (rouge) et après immersion 30 minutes dans NaCl 0,5 M (bleu), blanc NaCl 0,5 M (violet)

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

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

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

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

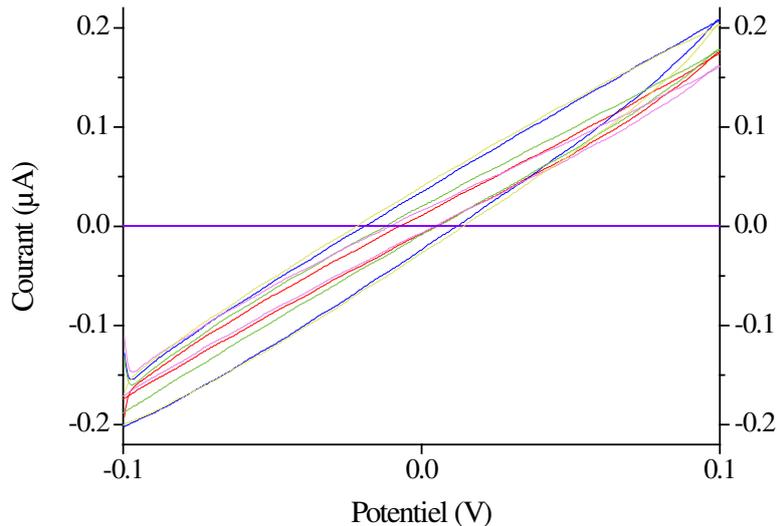


Figure IV-8 : Vérification de la formation de la monocouche de sonde ADN marquée par le 3-DTAP à 10^{-5} M réalisée en 15 heures à la surface du réseau d'électrodes d'or 25_200 par évaluation du blocage du courant d'oxydo-réduction à la surface des électrodes par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$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

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

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

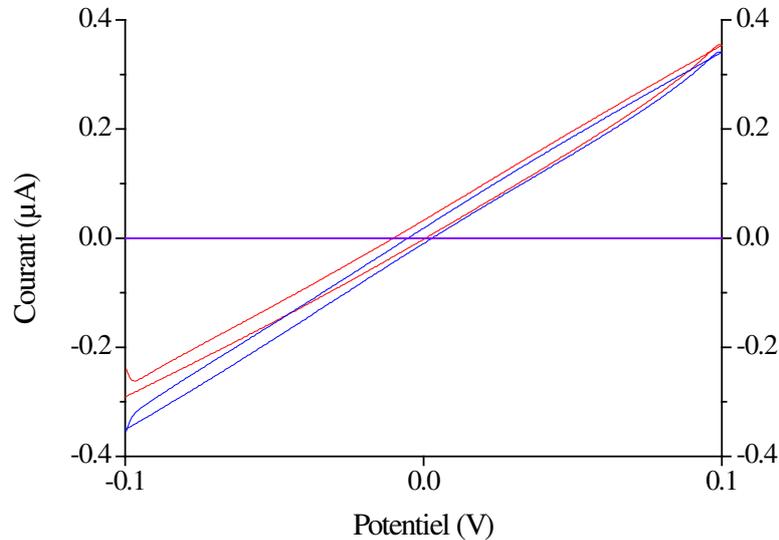


Figure IV-9 : Comparaison des voltampérogrammes moyens obtenus à la surface du réseau d'électrodes d'or 25_200 modifiées par la sonde ADN marquée 3-DTAP juste après adsorption (rouge) et après immersion 30 minutes dans NaCl 0,5 M (bleu), blanc NaCl 0,5 M (violet)

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

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

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

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

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

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

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

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

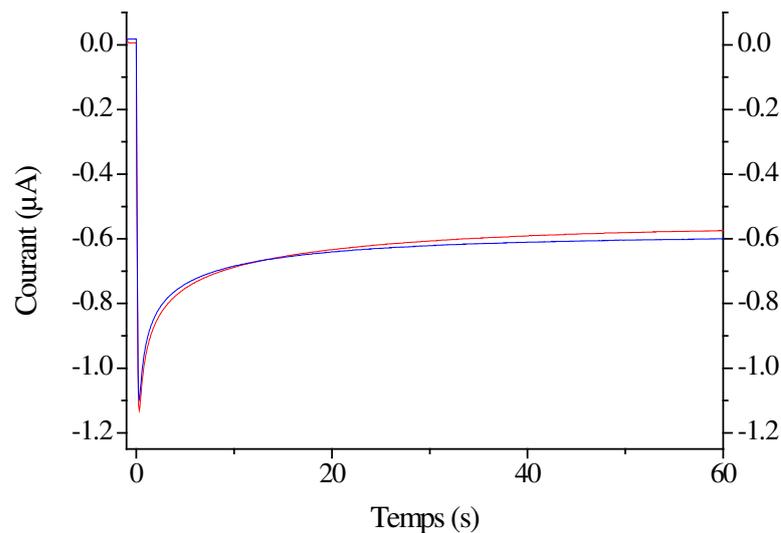


Figure IV-10 : Chronoampérogrammes moyens obtenus par mesure du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure à la surface des réseaux d'électrodes d'or 25_200 modifiés par les sondes ADN marquées par le 1-DTAP dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

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

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

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

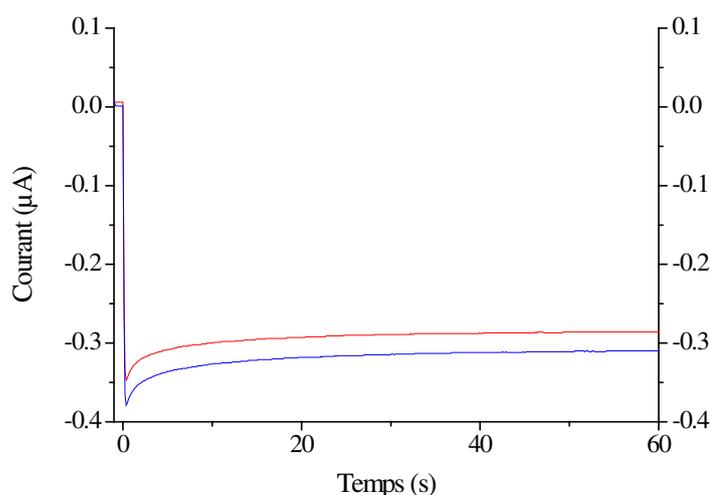


Figure IV-11 : Chronoampérogrammes moyens obtenus par mesure du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure à la surface des réseaux d'électrodes d'or 25_200 modifiés par les sondes ADN marquées par le 1-DTAP dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5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

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

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

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

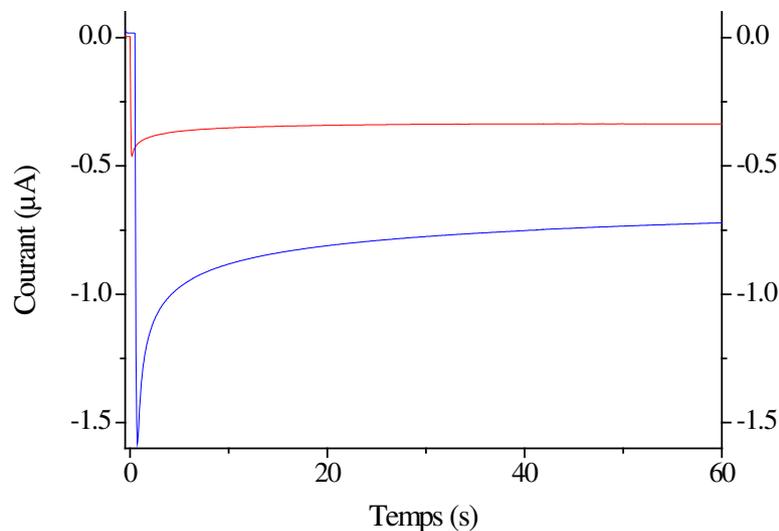


Figure IV-12 : Chronoampérogrammes moyens obtenus par mesure du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure à la surface des réseaux d'électrodes d'or 25_200 modifiés par les sondes ADN marquées par le 1-DTAP dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5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

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

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

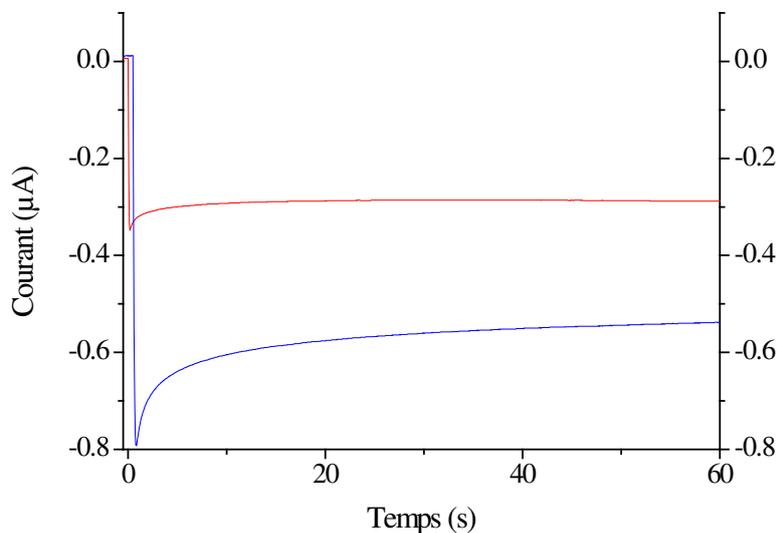


Figure IV-13 : Chronoampérogrammes moyens obtenus par mesure du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure à la surface des réseaux d'électrodes d'or 25_200 modifiés par les sondes ADN marquées par le 1-DTAP dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5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

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

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

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

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

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

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

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

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

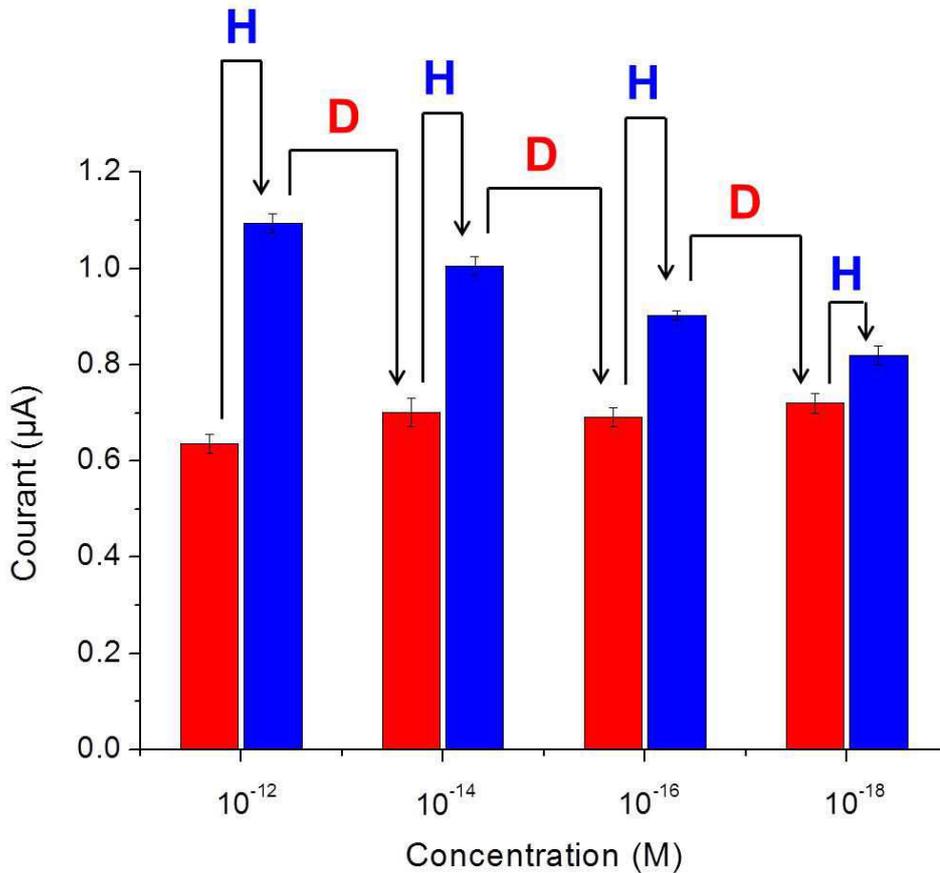


Figure IV-14 : Histogramme montrant le courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure moyen mesuré à la surface du réseau d'électrodes d'or 25_200 au cours des cycles d'hybridation et dénaturation de l'électrode pour les différentes concentrations en cible; électrode modifiée par la sonde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

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

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

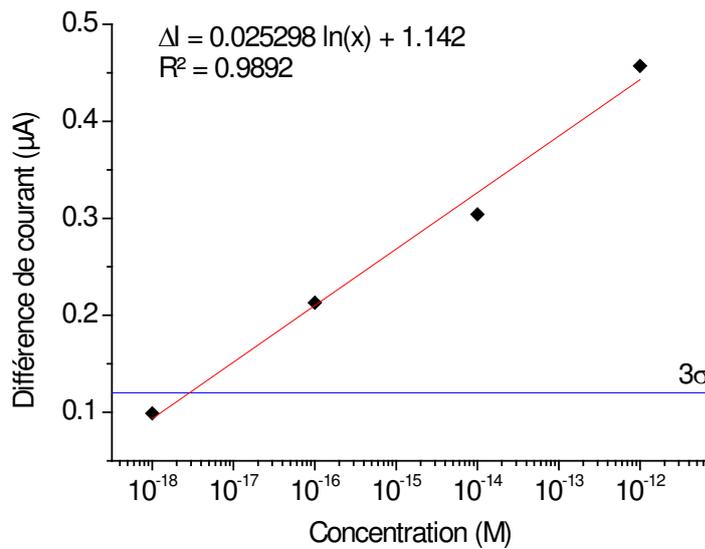


Figure IV-15 : Courbe de calibration du biocapteur fabriqué sur le réseau d'électrodes d'or 25_200 modifié par les sondes ADN marquées par le 1-DTAP ; Différence de courant pour chaque concentration (losanges noirs), courbe de tendance des points (rouge), triple de la déviation standard (bleu)

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

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

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

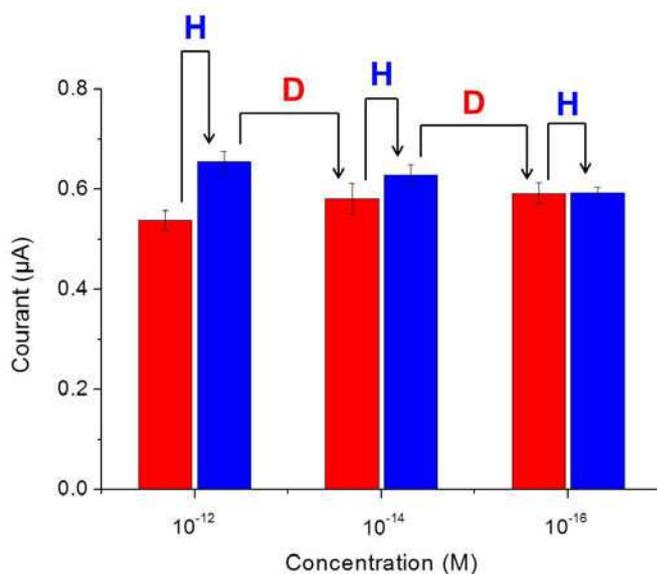


Figure IV-16 : Histogramme montrant le courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure moyen mesuré à la surface du réseau d'électrodes d'or 25_200 au cours des cycles d'hybridation et dénaturation de l'électrode pour les différentes concentrations en cible; électrode modifiée par la sonde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

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

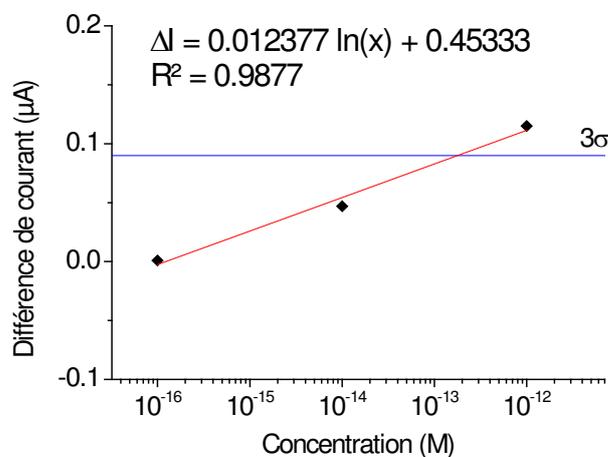


Figure IV-17 : Courbe de calibration du biocapteur fabriqué sur le réseau d'électrodes d'or 25_200 modifié par les sondes ADN marquées par le 3-DTAP ; Différence de courant pour chaque concentration (losanges noirs), courbe de tendance des points (rouge), triple de la déviation standard (bleu)

Biocapteurs sur réseaux d'électrodes d'or

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