

Biocapteurs sur UMEs unitaires

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

A. Configuration UME de carbone graphite

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

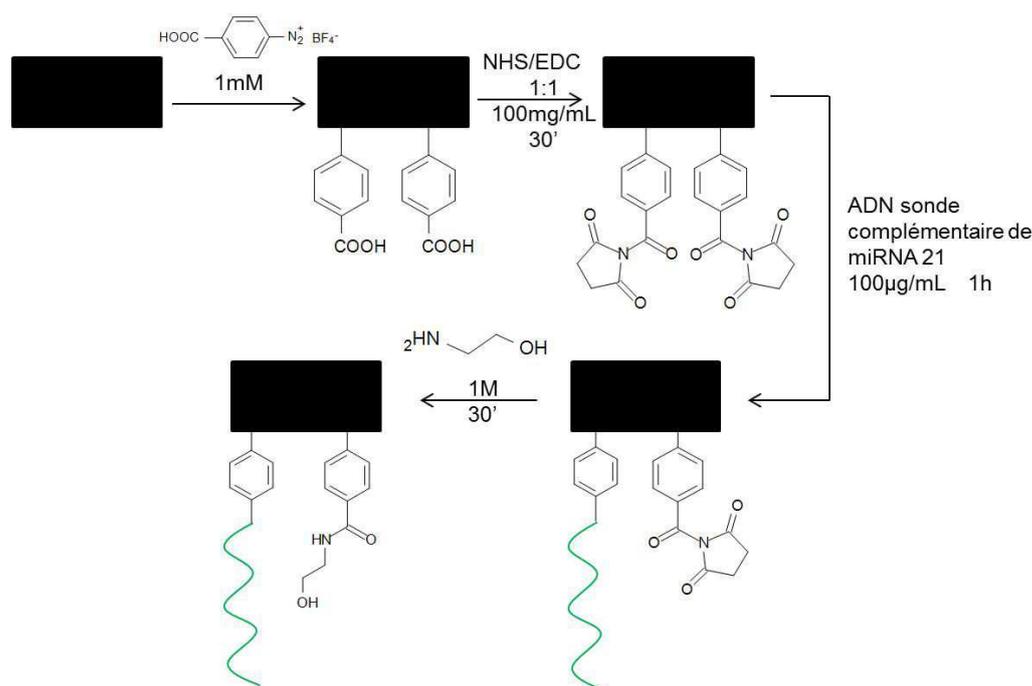


Figure III-1 : Schéma réactionnel de la modification des électrodes pour l'immobilisation des sondes ADN et la fabrication de biocapteurs sur électrodes de graphite

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

Biocapteurs sur UMEs unitaires

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

1) La caractérisation des électrodes

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

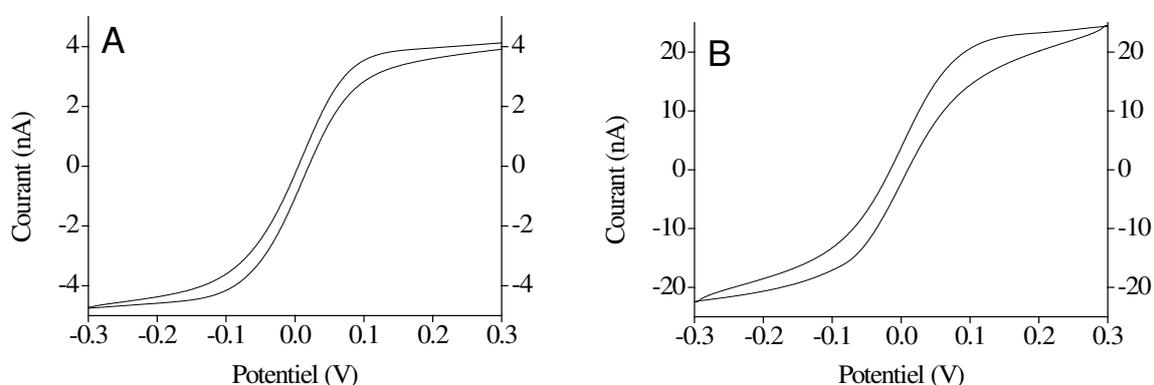


Figure III-2 : Voltampérogramme de deux électrodes de carbone graphite de diamètre 7 μm (A) et 33 μm (B) non modifiées dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM à une vitesse de balayage de 100 mV/s

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

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

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

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

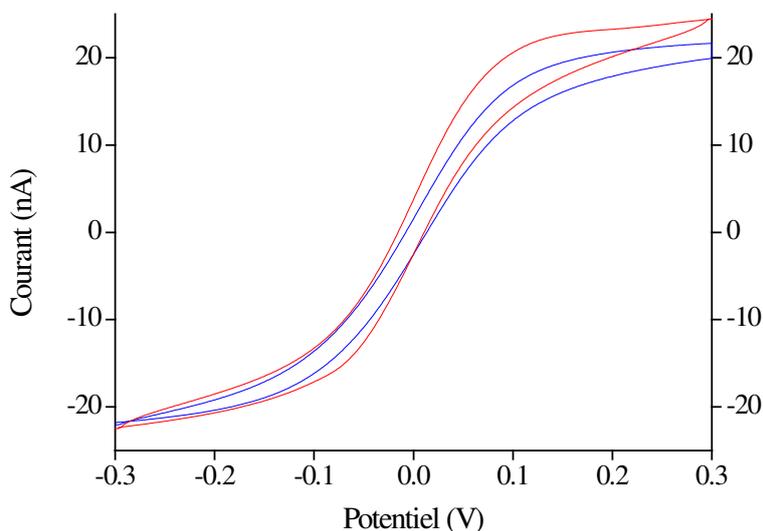


Figure III-3 : Voltampéromètre de caractérisation d'une électrode de carbone graphite non modifiée de diamètre 33 μm dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM à une vitesse de balayage de 100 mV/s immédiatement après fabrication (bleu) et après la fabrication de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

2) Le greffage du diazonium

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

a) Greffage par chronoampérométrie

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

Biocapteurs sur UMEs unitaires

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

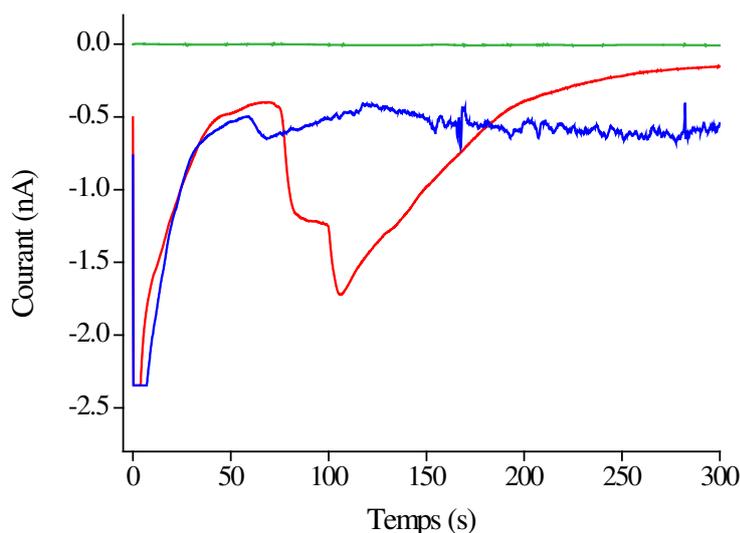


Figure III-4 : Essai de greffage du diazonium à 1 mM dans l'acétonitrile par chronoampérométrie à -0,6V pendant 5 min sur UME de carbone de diamètre 33 μm ; Essai n°1 (rouge), Essai n°2 (bleu), Blanc acétonitrile + sel support (vert)

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

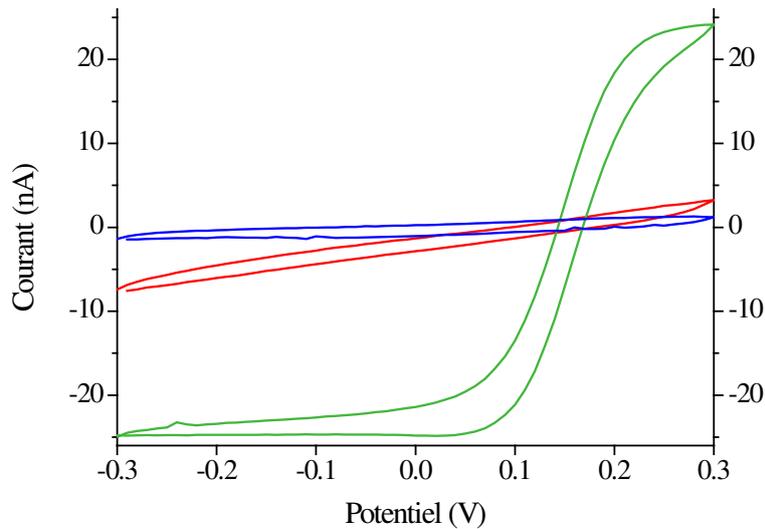


Figure III-5 : Vérification du dépôt du diazonium effectué en chronoampérométrie 5 min par évaluation du blocage du courant d'oxydo-réduction à la surface de l'électrode de carbone graphite de 33 μm par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$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

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

Biocapteurs sur UMEs unitaires

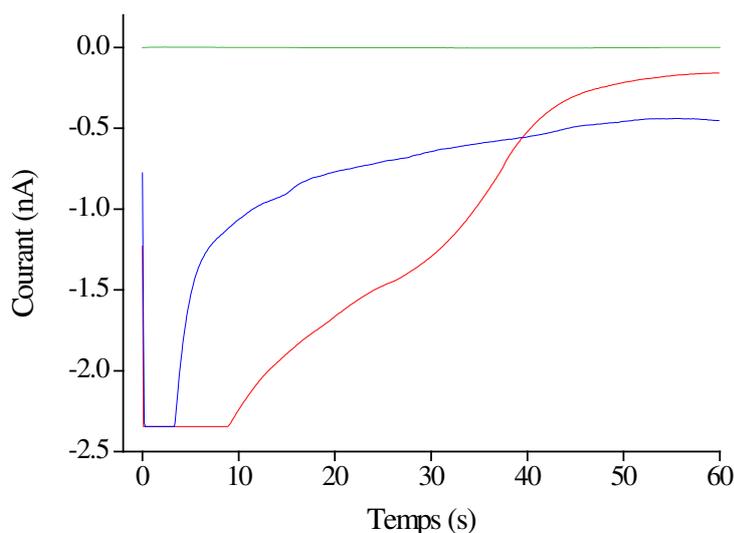


Figure III-6 : Essai de greffage du diazonium à 1 mM dans l'acétonitrile par chronoampérométrie à -0,6V pendant une minute sur UME de carbone de diamètre 33 µm ; Essai n°1 (rouge), Essai n°2 (bleu), Blanc acétonitrile + sel support (vert)

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

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

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

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

b) Greffage par voltampérométrie cyclique

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

Biocapteurs sur UMEs unitaires

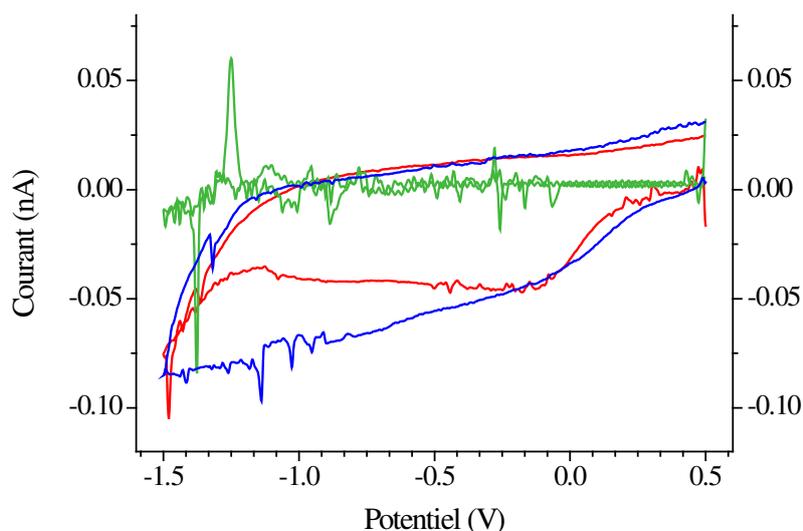


Figure III-7 : Greffage du diazonium à 1 mM dans l'acétonitrile sur électrode de carbone graphite de diamètre 7 μm par voltampérométrie cyclique 1 cycle à 100mV/s ; Essai n°1 (rouge), Essai n°2 (bleu), Blanc acétonitrile + sel support (vert)

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

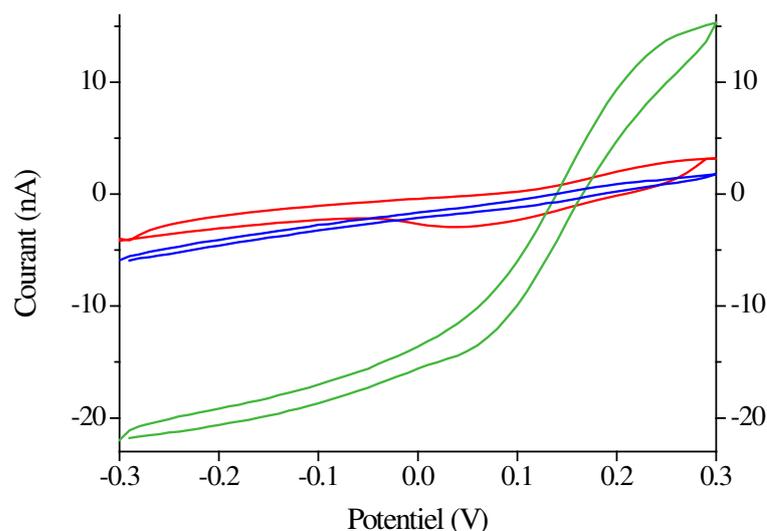


Figure III-8 : Vérification du dépôt du diazonium effectué en voltampérométrie cyclique 1 cycle par évaluation du blocage du courant d'oxydo-réduction à la surface de l'électrode de carbone graphite de 7 µm par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$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

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

c) Greffage par adsorption puis voltampérométrie cyclique.

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

Biocapteurs sur UMEs unitaires

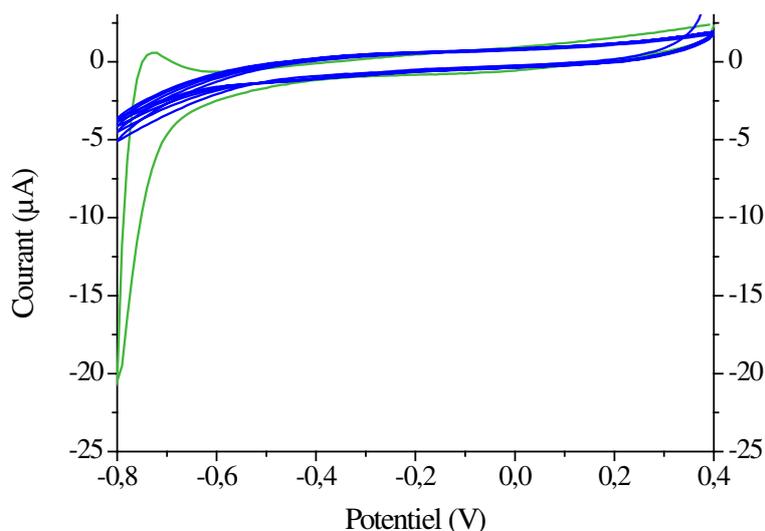


Figure III-9 : Greffage du diazonium sur électrode millimétrique de carbone vitreux à 1 mM dans l'acétonitrile par adsorption préalable pendant 15 heures puis voltampérométrie cyclique 4 cycles à 100mV/s dans une solution d'acétonitrile et sel support ; greffage (bleu), Blanc acétonitrile + sel support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

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

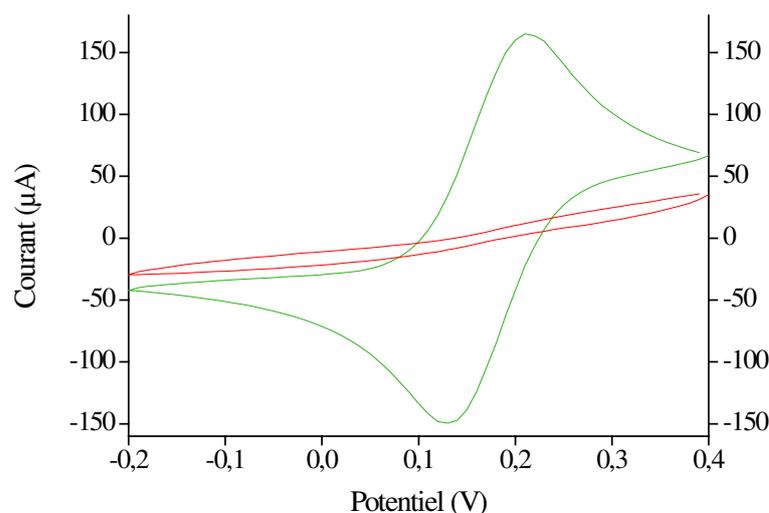


Figure III-10 : Vérification du dépôt du diazonium effectué par adsorption préalable pendant 15 heures puis voltampérométrie cyclique 4 cycles par évaluation du blocage du courant d'oxydo-réduction à la surface de l'électrode millimétrique de carbone vitreux par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$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

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

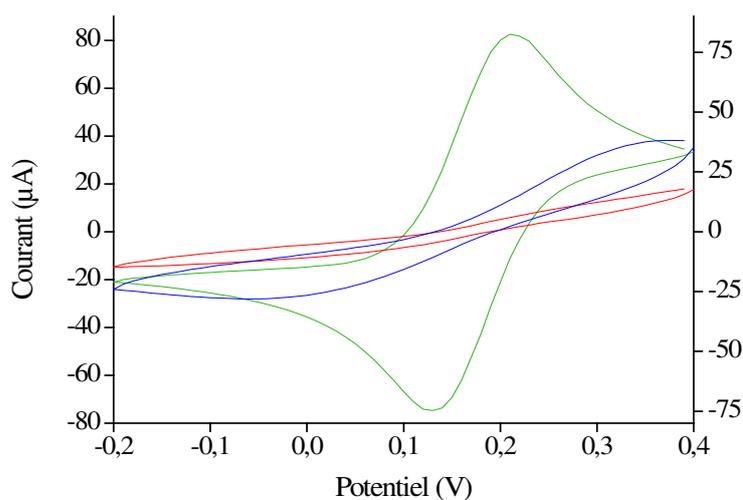


Figure III-11 : Comparaison du blocage du courant faradique d'oxydo-réduction du ferri/ferrocyanure après greffage du diazonium sur électrode millimétrique de carbone vitreux par différentes méthodes ; greffage par adsorption préalable 15 heures puis voltampérométrie cyclique 4 cycles (rouge), greffage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

Biocapteurs sur UMEs unitaires

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

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

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

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

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

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

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

a) Le couplage avec le ferrocène amine

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

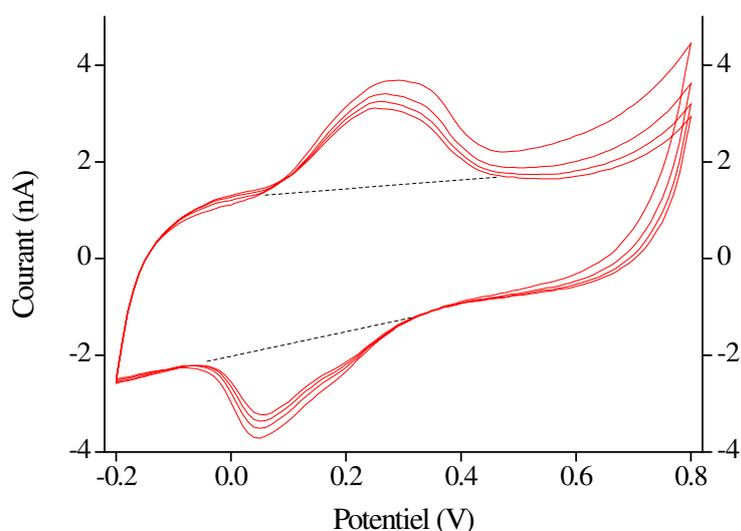


Figure III-12 : Mesure de l'électroactivité de la sonde ferrocenylméthylamine greffée par couplage peptidique sur une électrode commerciale de 33 μm en carbone graphite au préalable fonctionnalisée par le 4-carboxybenzenediazonium par chronoampérométrie à -0,6V pendant 1 minute par voltampérométrie cyclique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

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

Biocapteurs sur UMEs unitaires

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

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

$$Q = zFS\Gamma$$

Q la charge en C

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

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

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

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

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

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

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

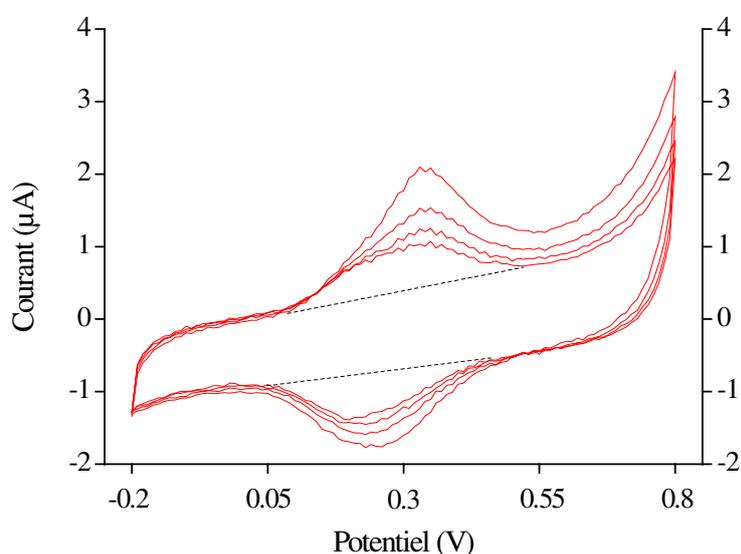


Figure III-13 : Mesure de l'électroactivité de la sonde ferrocenilméthylamine greffée par couplage peptidique sur une électrode millimétrique de carbone vitreux fonctionnalisée par le 4-carboxybenzenediazonium par voltampérométrie cyclique 1 cycle 100 mV/s par voltampérométrie cyclique dans NaCl 0,5M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

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

Biocapteurs sur UMEs unitaires

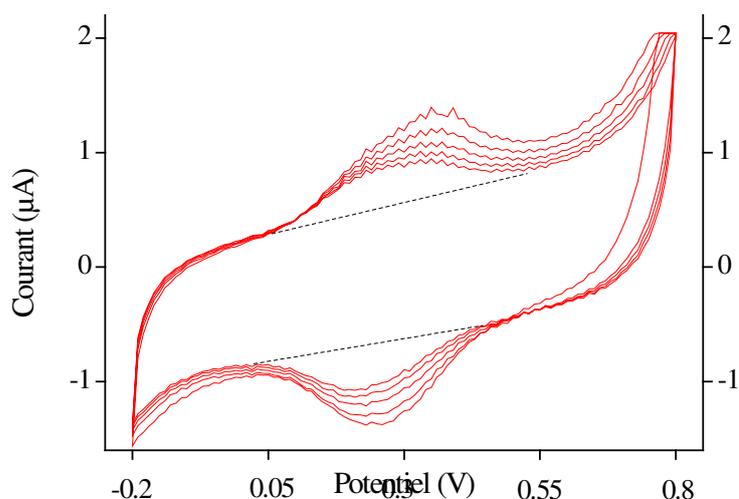


Figure III-14 : Mesure de l'électroactivité de la sonde ferrocenilméthylamine greffée par couplage peptidique sur une électrode millimétrique de carbone vitreux fonctionnalisée par le 4-carboxybenzenediazonium par adsorption préalable 15 heures puis voltampérométrie cyclique 4 cycles à 100 mV/s par voltampérométrie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

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

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

b) Le couplage avec la sonde ADN modèle

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

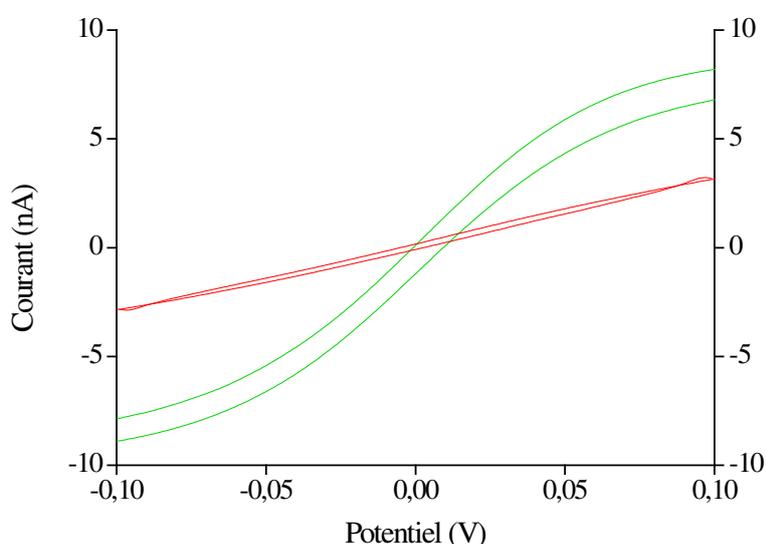


Figure III-15 : Électroactivité de $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM en présence de céfadroxil en excès (25 mM) sur électrode de graphite diamètre 7 μm en présence de proflavine (Pfl) à 10^{-6} M dans NaCl 0,5 M ; fonctionnalisée par la sonde ADN (rouge) et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

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

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

Biocapteurs sur UMEs unitaires

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

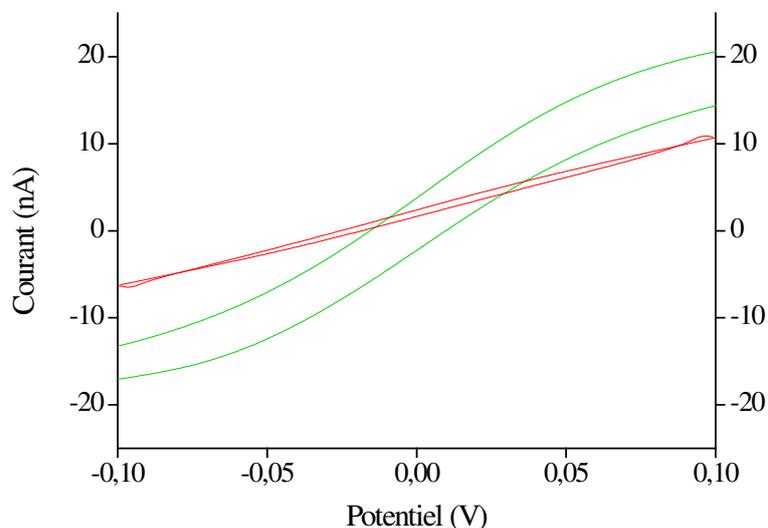


Figure III-16 : Électroactivité de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM en présence de céfadroxil en excès (25 mM) sur électrode de 33 μm en présence de proflavine (Pfl) à 10^{-6} M dans NaCl 0,5 M ; fonctionnalisée par la sonde ADN (rouge) et sur électrode non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

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

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

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

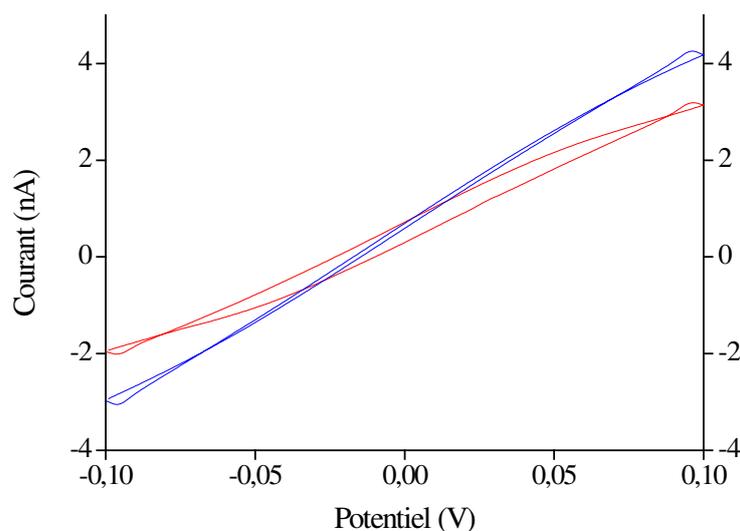


Figure III-17 : Électroactivité de $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM en présence de céfadroxil en excès (25 mM) en présence de proflavine (Pfl) à 10^{-6} M dans NaCl 0,5 M sur électrode de 7 μm ; fonctionnalisée par la sonde ADN (rouge) et fonctionnalisée par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

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

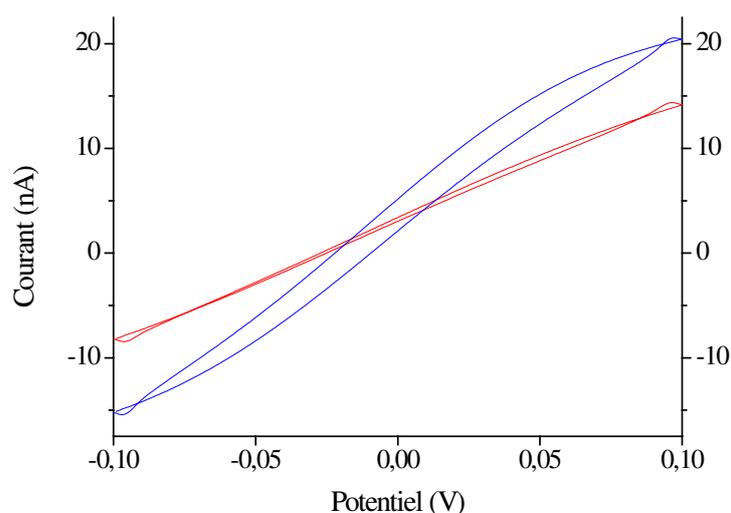


Figure III-18 : Électroactivité de $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$ 5 mM en présence de céfadroxil en excès (25 mM) en présence de proflavine (Pfl) à 10^{-6} M dans NaCl 0,5 M sur électrode de 33 μm ; fonctionnalisée par la sonde ADN (rouge) et fonctionnalisée par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

Biocapteurs sur UMEs unitaires

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

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

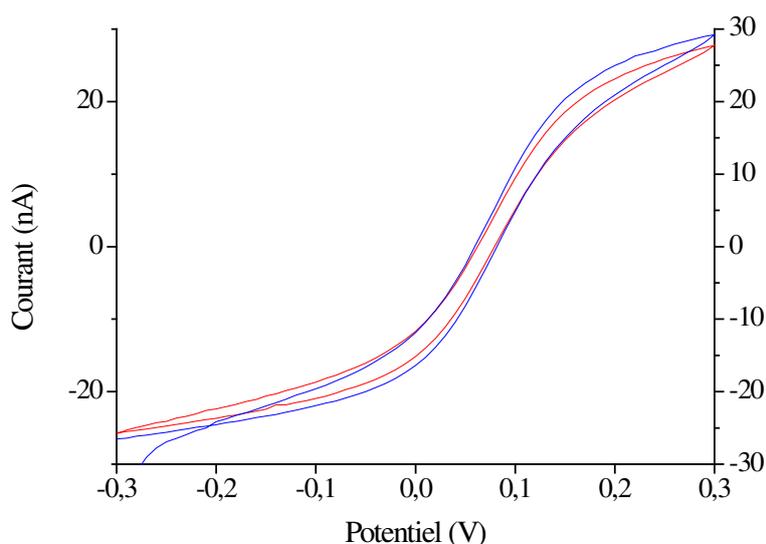


Figure III-19 : Caractérisation de l'électrode de carbone commerciale de 33 μm neuve (rouge) et après fabrication d'un biocapteur fonctionnel puis polissage (bleu) par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 5 mM et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 5 mM à 100 mV/s

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

Biocapteurs Electrochimiques de microARNs pour le Diagnostic Médical

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

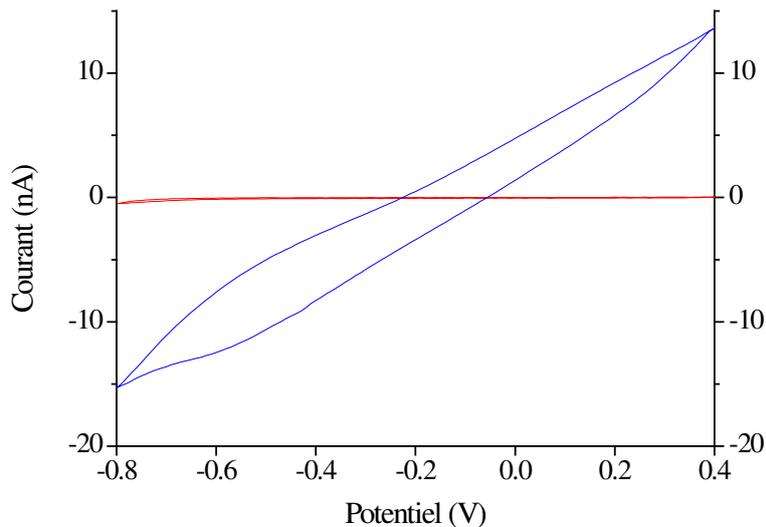


Figure III-20 : Comparaison de greffages du diazonium réalisés par adsorption préalable 15 heures puis voltampérométrie cyclique 4 cycles sur l'électrode commerciale de 33 μm neuve (rouge) et après fabrication d'un biocapteur fonctionnel puis polissage de la surface (bleu)

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

Biocapteurs sur UMEs unitaires

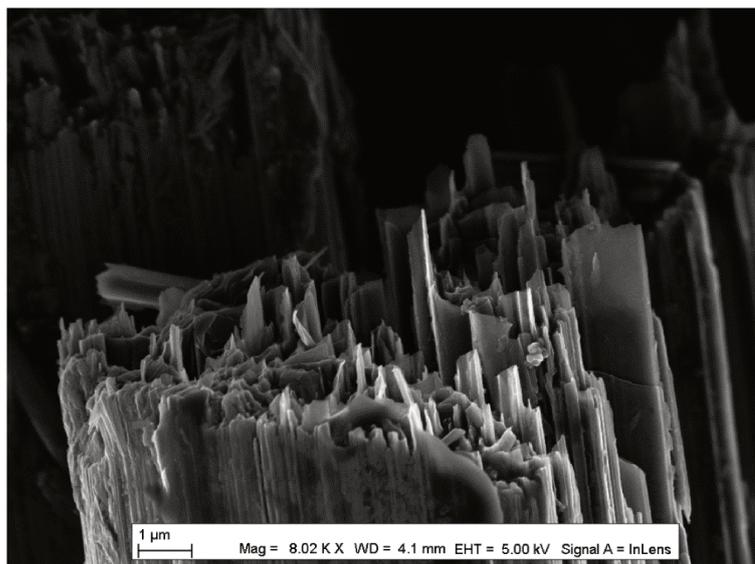


Figure III-21 : Image réalisée en microscopie électronique à balayage de l'extrémité d'une fibre de carbone de diamètre 10 μm

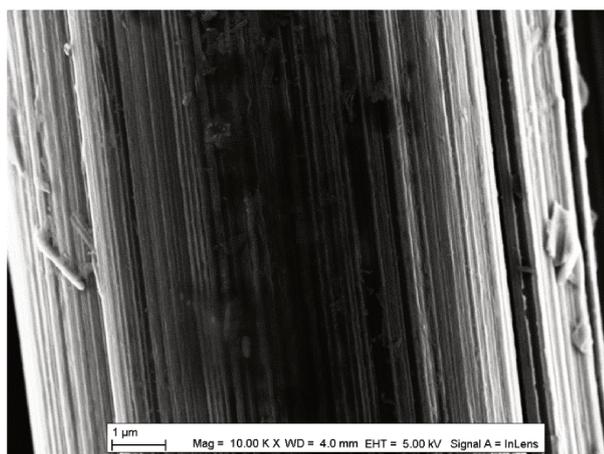


Figure III-22 : Image réalisée en microscopie électronique à balayage d'une fibre de carbone vue de côté.

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

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