



**HAL**  
open science

# Electrogreffage de biomolécules sur supports conducteurs pour le développement de biopuces à détection optique

Benjamin Corgier

► **To cite this version:**

Benjamin Corgier. Electrogreffage de biomolécules sur supports conducteurs pour le développement de biopuces à détection optique. Biochimie [q-bio.BM]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2007. Français. NNT: . tel-00164710

**HAL Id: tel-00164710**

**<https://theses.hal.science/tel-00164710>**

Submitted on 23 Jul 2007

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

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

# THÈSE

présentée devant

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON 1

pour l'obtention

du **DIPLÔME DE DOCTORAT**  
(arrêté du 7 août 2006)

Spécialité: Biochimie

par

**Benjamin P. CORGIER**

---

## **Electrogreffage de biomolécules sur supports conducteurs pour le développement de biopuces à détection optique**

---

### **JURY:**

Dr Nabil EL MURR

*Rapporteur,*

Dr Patrice N. MARCHE

*Rapporteur,*

Dr Gérard BIDAN

*Président,*

Prof. Marcus F. LAWRENCE

*Examineur,*

Prof. Loïc J. BLUM

*Directeur de Thèse,*

Dr Christophe A. MARQUETTE

*Co-directeur de Thèse*



Université Claude Bernard  Lyon 1

L'ensemble du travail constituant cette **THESE** a été réalisé au sein du

## Laboratoire de Génie Enzymatique et Biomoléculaire

(<http://lgeb.univ-lyon1.fr>)

Directeur de thèse: Prof. Loïc J. BLUM

Co-directeur de thèse: Dr Christophe A. MARQUETTE (DR)

Au sein de :

**ICBMS, Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires**

UMR 5246

Bât. CPE – Université Claude Bernard Lyon-1

43 Bd du 11 Novembre 1918

69622 Villeurbanne Cedex – France



Qui se nommait précédemment :

EMB2 : Enzymes, Membranes Biologiques et Biomimétiques

UMR CNRS 5013

---

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE  
SCIENCES - SANTE





# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

## **Président de l'Université**

**M. le Professeur L. COLLET**

Vice-Président du Conseil Scientifique

M. le Professeur J.F. MORNEX

Vice-Président du Conseil d'Administration

M. le Professeur J. LIETO

Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur D. SIMON

## **Secrétaire Général**

M. G. GAY

## ***SECTEUR SANTE***

### ***Composantes***

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

UFR de Médecine Lyon-Nord

Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE

UFR de Médecine Lyon-Sud

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

UFR d'Odontologie

Directeur : M. O. ROBIN

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Institut Techniques de Réadaptation

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

## ***SECTEUR SCIENCES***

### ***Composantes***

UFR de Physique

Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU

UFR de Biologie

Directeur : M. le Professeur H. PINON

UFR de Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

UFR de Génie Electrique et des Procédés

Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET

UFR Sciences de la Terre

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

UFR de Mathématiques

Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE

UFR d'Informatique

Directeur : M. le Professeur M. EGEA

UFR de Chimie Biochimie

Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT

UFR STAPS

Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI

Observatoire de Lyon

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

IUT A

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

IUT B

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS



# Remerciements

En premier lieu,

À Florence, pour son amour inconditionnel, son soutien de tous les instants, sa patience, ses conseils et tout le reste...

Également à ma famille, mes chers parents, et grands-parents ainsi que Cléo. Un grand merci à vous tous de m'avoir toujours accompagné, sans aucune condition et ainsi de m'avoir permis de devenir ce que je suis.

Sans oublier les éternels potes, toujours présents dans les grands moments ; Amandine, Alex, Amélie, Pymeric, Caroline, Carole, Dary, Elise, Flora, Gaëtan, Jujy, Marion, les Nicos, Thierry, tous les conscrits... et aussi pour tous ceux qui ne sont pas cités, merci.

Et bien sûr à mes amis-collègues, beaucoup plus amis que collègues ; Céline, Kevin, Marine, Bernard et Guillaume... qui m'ont aidé à passer avec douceur ces quelques années de recherche.

Et bien évidemment, à toutes les personnes formant le Laboratoire de Génie Enzymatique et Biomoléculaire, qui ont participé à ce travail et m'ont aidé dans la bonne humeur et le sérieux qui les caractérisent. Et plus particulièrement à Christophe à qui je dois beaucoup plus qu'il n'oserait l'admettre.

Mes remerciements vont également à La société Genoptics<sup>®</sup> et plus spécialement à Marielle Anger-Leroy, ainsi qu'à Alain Laurent de la société Biomérieux<sup>®</sup>.

Grâce à vous tous, cette Thèse n'est pas seulement un aboutissement, mais surtout le début d'une longue aventure.

Merci,



## ABBREVIATIONS

<b>ABTS</b>	2,2' azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acide)
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>AFM</b>	Microscopie à Force Atomique
<b>BrDz</b>	Bromo-Diazonium (4-bromophényl diazonium)
<b>BSA</b>	<i>Bovin Serum Albumin</i> (albumine de sérum bovin)
<b>CCD</b>	<i>Charge Coupled Device</i>
<b>CE</b>	Contre-Electrode
<b>Chod</b>	Choline oxydase
<b>CL</b>	Chimiluminescence
<b>CMA</b>	4-Carboxy-MéthylAniline
<b>DO</b>	Densité Optique
<b>DCC</b>	N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimide
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>ECL</b>	Electrochimiluminescence
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay</i>
<b>God</b>	Glucose oxydase
<b>HIV-1</b>	Virus de l'immunodéficience humaine, type 1
<b>HRP</b>	Peroxydase du raifort
<b>IgG</b>	Immunoglobuline de type G
<b>IgM</b>	Immunoglobuline de type M
<b>ITO</b>	( <i>indium thin oxide</i> ) film d'oxyde d'indium
<b>LASER</b>	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
<b>LDH</b>	Lactate Déshydrogénase
<b>Lod</b>	Lactate oxydase
<b>NADH</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
<b>PDMS</b>	Polydiméthylsiloxane
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-Buffer Saline</i> (tampon phosphate salin)
<b>PM</b>	<i>PhotoMutliplier</i> (photomultificateur)
<b>ppm</b>	partie par million
<b>Pyod</b>	Pyruvate oxydase
<b>Réf.</b>	Référence (électrode de)
<b>SAM</b>	<i>Self-Assembled Monolayer</i> (monocouche auto-assemblée)
<b>SCE</b>	<i>Satured Calomel Electrode</i> (électrode de calomel saturé)
<b>SPR</b>	<i>Surface Plasmon Resonance</i> (Résonance des Plasmons de Surface)
<b>SPRi</b>	Imagerie par Résonance des Plasmons de Surface
<b>Tris</b>	Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane
<b>u.a.</b>	unités arbitraires
<b>UV</b>	Ultra-Violets
<b>XPS</b>	<i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i> (spectroscopie des photoélectrons X)



---

# SOMMAIRE

---



<b>INTRODUCTION</b> .....	p1
---------------------------	----

<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	p3
----------------------------	----

## Chapitre I.

### Biopuces, généralités

1. Origine : les biocapteurs.....	p3
2. Les Biopuces, concept.....	p4

## Chapitre II.

### Support et immobilisation

1. Immobilisation par adsorption.....	p7
2. Encapsulation, rétention dans un gel ou un polymère / co-réticulation.....	p9
3. Immobilisation par affinité.....	p10
4. Immobilisation covalente.....	p11
a. Verre.....	p11
b. Métaux.....	p12
i) Le Platine.....	p12
i) L'or.....	p12
ii) Immobilisation sur supports d'or pour des mesures de SPR (résonance des plasmons de surface).....	p12
c. Carbone.....	p13
d. Quartz.....	p14
e. PDMS.....	p15
5. Immobilisation par méthodes électrochimiques.....	p15
a. Electropolymères conducteurs.....	p15
i) Immobilisation par piégeage durant l'électropolymérisation.....	p17
ii) Immobilisation par co-électropolymerisation.....	p18
b. Les sels de diazonium.....	p21
i) Propriétés chimiques.....	p21
ii) Electro-adressage de sels de diazonium.....	p22

**Chapitre III.****Méthodes de détection**

1. Méthodes optiques .....	p26
Les phénomènes luminescents .....	p26
a. Fluorescence .....	p28
b. Chimiluminescence .....	p29
i) Chimiluminescence du luminol .....	p30
ii) Les amplificateurs .....	p33
c. Electrochimiluminescence .....	p34
i) Electrochimiluminescence du "Ru(bpy) <sub>3</sub> <sup>2+</sup> " .....	p35
ii) Electrochimiluminescence du luminol .....	p35
d. Sensibilité et spécificité des détections de lumière .....	p39
e. Le signal luminescent .....	p39
f. Mesure de lumière .....	p40
2. Méthodes électrochimiques .....	p41
a. Ampérométrie .....	p41
b. Impédance .....	p42
3. Radiographie .....	p42
4. Méthodes sans marquage .....	p43
a. Mesures de variation de masse .....	p43
i) Microbalance piézo-électrique .....	p43
ii) Microlevier .....	p43
b. Microscopie à force atomique (AFM) .....	p43
c. Résonance des plasmons de surface (SPR) .....	p44

**Chapitre IV.****Les différents types de Biopuces à protéines**

1. Biopuces à biorécepteur non-catalytique .....	p46
2. Biopuces enzymatiques .....	p48

## MATERIELS & METHODES

<b>I. Matériels</b> .....	p50
1. Instrumentations.....	p50
2. Logiciels.....	p50
3. Réactifs.....	p50
i) Enzymes, protéines et acides nucléiques.....	p51
ii) Tampons et solution.....	p51
<b>II. Méthodes</b> .....	p53
1. Sérigraphie.....	p53
2. Immobilisation d'oxydases par piégeage.....	p55
a. Méthode manuelle.....	p55
b. Méthode automatisée.....	p56
3. Mesure d'activité des oxydases.....	p57
4. Mesures de Lumière grâce à la caméra CCD.....	p58
a. Electrochimiluminescence (ECL).....	p59
b. Chimiluminescence (CL).....	p59
5. ECL en fonction du potentiel.....	p60
6. Réaction de couplage CMA / Protéine.....	p61
7. Diazotation des dérivés anilines.....	p62
8. Electro-adressage des sels de diazonium et dérivés.....	p63
9. Essais sur biopuces.....	p64
a. Détection directe d'anticorps immobilisés.....	p64
b. Détection du facteur rhumatoïde (FR) dans des sérums humains grâce à un immuno-essai de type "capture".....	p64
c. Détection d'anticorps humains grâce à un immuno-essai de type "sandwich".....	p64
d. Détection de séquences oligonucléotidiques cibles.....	p65
10. Mesures d'activité de la Peroxydase immobilisée.....	p65
11. Microscopie à force atomique (AFM).....	p66
12. Spectroscopie des photoélectrons X (XPS).....	p66
13. Détection en imagerie SPR (SPRi).....	p67

## RESULTATS

1. Objectifs et plan de travail.....	p69
<b>Chapitre I.</b> .....	p71
<b>Electrochimiluminescence sur réseaux d'électrodes sérigraphiés</b>	
Article 1 : .....	p74
Screen-printed electrode microarray for electrochemiluminescent measurements Benjamin P. Corgier, Christophe A. Marquette, Loïc J. Blum <i>Analytica Chimica Acta</i> <b>538 (2005) 1–7</b>	
Travaux annexes.....	p81
<b>Chapitre II.</b> .....	p83
<b>Les sels de Diazonium, immobilisation de biomolécules</b>	
Article 2 : .....	p84
Diazonium-Protein Adducts for Graphite Electrode Microarrays Modification: Direct And Addressed Electrochemical Immobilization Benjamin P. Corgier, Christophe A. Marquette, Loïc J. Blum <i>Journal of the American Chemical Society</i> <b>127 (2005) 18328-18332</b>	
Travaux annexes.....	p92
Article 3 : .....	p94
Direct electrochemical addressing of immunoglobulins: Immuno-chip on screen-printed microarray Benjamin P. Corgier, Christophe A. Marquette, Loïc J. Blum <i>Biosensors and Bioelectronics</i> <b>22 (2007) 1522–1526</b>	
Article 4 : .....	p104
A Versatile Method for Direct and Covalent Immobilization of DNA and Proteins on Biochips Benjamin P. Corgier, Alain Laurent, Pascal Perriat, Loïc J. Blum, and Christophe A. Marquette <i>Angewandte Chemie International Edition</i> <b>46 (2007) 4108-4110</b>	
Travaux annexes	
Activité de reconnaissance des IgG immobilisés : immunoessai de type sandwich.....	p113
Influence de la concentration d'oligonucléotide lors de l'adressage .....	p114
Electro-adressage HRP-CMA ; effet du pH .....	p115

**Chapitre III.**..... p116**Electrodéposition d'or: amplification de chimiluminescence**

Article n°5: ..... p118

On-Chip Chemiluminescent Signal Enhancement using Nanostructured Gold Modified-Carbon Microarrays

Benjamin P. Corgier, Feng Li, Loïc J. Blum and Christophe A. Marquette

Accepté dans *Langmuir***Chapitre IV.**..... p124**Electro-adressage pour l'imagerie par SPR**

1. Propriété de greffage de diazonium seul, sur support SPRi ..... p125

2. Electro-adressage d'anticorps sur support SPRi ..... p125

3. Optimisation de l'électro-adressage ..... p127

a. Protocole électrochimique ..... p127

b. Influence de la concentration en IgG-CMA lors de l'électro-adressage ..... p128

4. Spécificité des interactions ..... p130

5. Conclusion partielle ..... p131

**CONCLUSION ET PERSPECTIVES**..... p133**REFERENCES**..... p137



---

**ETUDE**

**BIBLIOGRAPHIQUE**

---



# Chapitre I.

## Biopuces, généralités

Le marché des biopuces est actuellement porté par l'essor des puces à ADN. En effet, peu de biopuces à protéines sont disponibles sur le marché. Affymetrix<sup>®</sup> et Agilent<sup>®</sup>, les sociétés les plus impliquées dans le secteur des biopuces à ADN, détiennent à elles seules 60% du marché des biopuces (source : *market study "Biochips to 2008", #1854, Oct. 2004, The Freedonia Group<sup>®</sup>*).

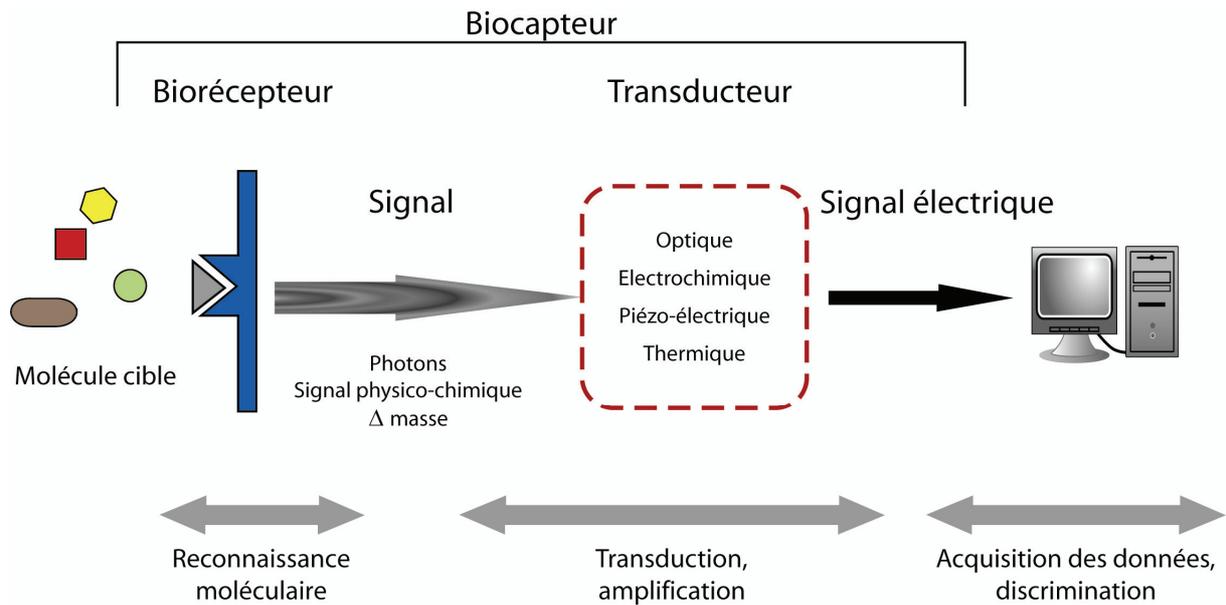
Le marché nord-américain des biopuces est estimé à 4 milliards de Dollars d'ici 2010, avec un CARG de 12,1% (Compound Annual Growth Rate : représente la croissance annuelle moyenne d'investissement ; source : *"Biochips" By: Global Industry Analysts, Marketresearch.com<sup>®</sup>*). Ces chiffres indiquent que la recherche actuelle est intensive et soutenue. La croissance de l'investissement montre également le besoin et le désir de développer ces nouveaux dispositifs.

### 1. Origine : les biocapteurs

Le terme de "biocapteur" (*biosensor*) est apparu au milieu du 20<sup>ème</sup> siècle avec le premier dispositif conçu à partir d'une électrode de Clark (spécifique de l'oxygène) couplée à un élément biologique (Clark *et al.*, 1962). La glucose oxydase était alors piégée entre une membrane de dialyse et une membrane perméable à l'oxygène, à proximité d'une électrode de platine. Ce système permettait ainsi de déterminer la concentration en glucose dans un échantillon, et tirait avantage de la sélectivité du bioélément immobilisé. Les auteurs décrivaient ici un système de mesure se présentant comme intégré, par rapport aux méthodes classiques de détection ou de dosage existantes à l'époque.

Depuis, une grande variété de systèmes analytiques, regroupés sous le terme de biocapteur, ont été mis au point. Ils peuvent utiliser des enzymes, des protéines, des anticorps, des acides nucléiques, des polysaccharides ou des cellules vivantes, en combinaison avec des transducteurs électrochimiques, optiques, piézoélectriques, magnétiques ou thermiques.

Par définition, les biocapteurs sont des instruments de mesure visant à accomplir la détection d'une molécule dans un échantillon, souvent complexe. Ils reposent tous sur le même principe de fonctionnement, présenté figure 1.



**Figure 1.** Schéma de principe d'un biocapteur.

La phase cruciale de reconnaissance moléculaire est réalisée grâce au biorécepteur, le plus souvent un élément biologique immobilisé, formant la couche sensible. Lors de la reconnaissance moléculaire, la présence de la molécule cible se traduit directement ou indirectement par un signal. Celui-ci peut être une émission de photons, l'apparition de produit de réaction, ou une variation de masse, de pH ou de propriétés électriques. La seconde phase, dite de transduction/amplification a pour rôle de collecter et de traduire ce signal en un courant électrique mesurable. Dès lors, les données peuvent être acquises et traitées sous forme de valeurs numériques, il s'agit de la troisième phase d'acquisition et de traitement des données.

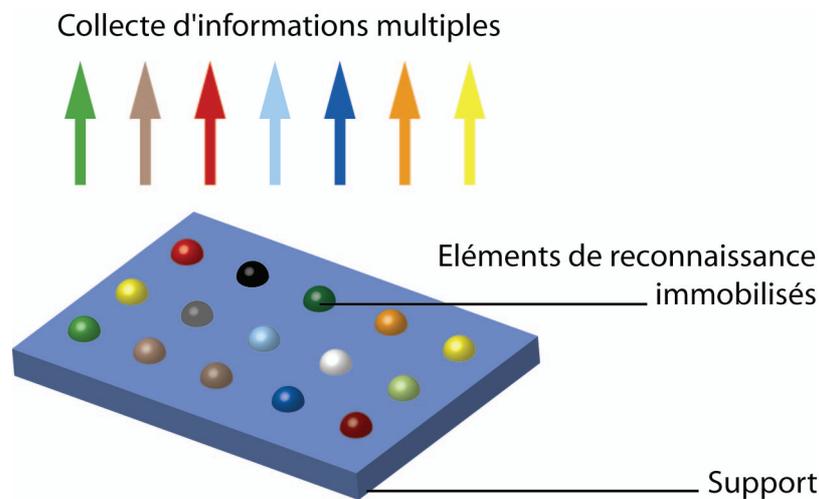
Le succès du fonctionnement d'un biocapteur est étroitement lié à la bonne synergie entre les différents éléments le composant : le support, la méthode d'immobilisation et le système de détection/transduction.

## 2. Les Biopuces, concept

Le terme générique de "biopuce" regroupe un ensemble de dispositifs analytiques, dont les technologies sont en partie issues des développements réalisés pour les biocapteurs.

Les biopuces comportent plusieurs éléments de reconnaissance, généralement disposés côte-à-côte sur un support donné, avec une densité plus ou moins élevée (figure 2). Ainsi, une faible

quantité de biomolécules est immobilisée sur une surface de petite taille (quelques millimètres à quelques centimètres), permettant de réaliser des mesures sur de faibles volumes d'échantillons (quelques nanolitres à quelques microlitres). En effet, le principe de fonctionnement des biopuces repose sur celui des biocapteurs, avec en plus de l'approche intégrée du système, des notions de miniaturisation et de parallélisation. Généralement, les éléments biologiques sont disposés sous forme de plots, agencés en parallèle à la surface d'un support.



**Figure 2.** Schéma de principe d'une biopuce : biocapteur miniaturisé multiparamétrique.

Il existe deux catégories majeures de biopuces : les biopuces à ADN et les biopuces à protéines, complétées par les biopuces à peptides et à sucres. Au sein de chaque catégorie, l'application recherchée peut être différente. En effet, il peut être envisagé de détecter de manière quantitative la présence d'une molécule cible (dosage) dans un échantillon complexe, ou d'étudier les interactions d'une biomolécule sur un ensemble de molécules immobilisées sous forme de plots (criblage).

Actuellement, les biopuces à ADN sont à un stade plus abouti que les biopuces à protéines. Ce fait s'explique par la plus grande facilité à manipuler, recueillir, synthétiser et amplifier l'ADN. En effet, les différents fragments d'ADN ont une haute homogénéité de structure et de stabilité alors que les protéines ont entre elles une plus grande hétérogénéité, ce qui rend la réalisation de biopuce à protéines plus délicate.



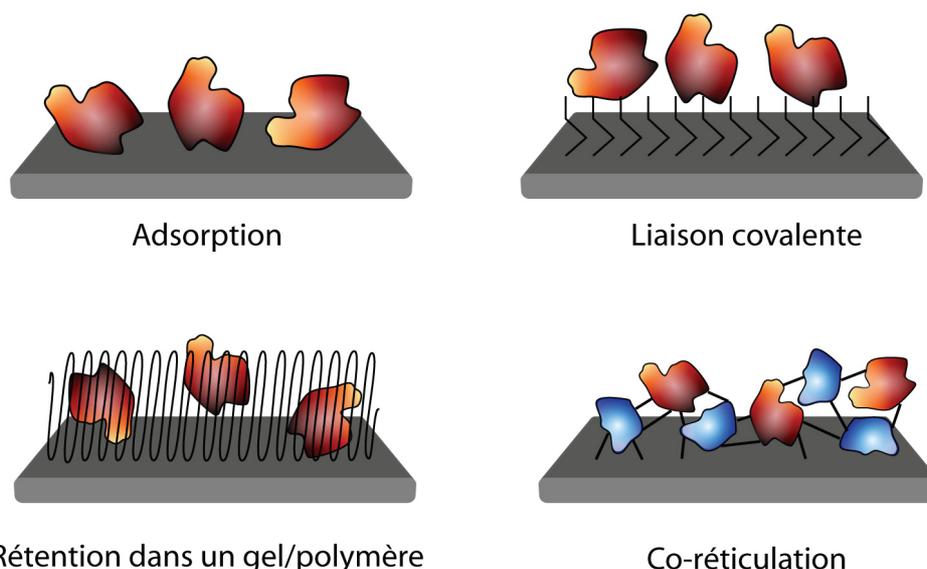
## Chapitre II.

### Support et immobilisation

Le support ainsi que la nature des biomolécules à fixer conditionnent la méthode d'immobilisation à employer. Généralement, le choix du support est lui-même conditionné par la méthode de détection qui sera utilisée. On peut ainsi distinguer les supports actifs et les supports passifs, vis-à-vis de la détection. Les supports dits actifs sont des matériaux conducteurs, utilisés pour des détections et/ou des immobilisations électrochimiques (ampérométrie, impédance, électrochimiluminescence), ou optiquement actifs (CCD, (Mallard *et al.*, 2005)).

Les méthodes d'immobilisation d'ores et déjà décrites et validées peuvent être classées selon la nature des interactions mises en jeu. On distingue les immobilisations sans greffage covalent : l'adsorption, le piégeage dans un gel ou un polymère, impliquant des liaisons de faible énergie (de type hydrophobe, électrostatique, ou de rétention mécanique dans un réseau), des immobilisations dites covalentes, où des réactions chimiques dites de couplage conduisent à la formation de liaisons covalentes entre biomolécules et support (figure 3).

Ainsi, seront présentés dans la suite de ces rappels bibliographiques, des méthodes d'immobilisation d'ores et déjà appliquées aux biopuces, et certaines méthodes développées pour les biocapteurs, apparaissant intéressantes ou aisément transposables aux biopuces. Les méthodes d'immobilisation dites d'électro-adressages seront présentées plus en détail, ainsi que celles permettant d'immobiliser des biomolécules sur des supports d'or afin de réaliser des mesures de résonance des plasmons de surface (SPR).



**Figure 3.** Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation de biomolécules.

## 1. Immobilisation par adsorption

Il s'agit de la méthode la plus simple pour immobiliser des éléments biologiques. Elle met en jeu des interactions de faible énergie entre le support et les biomolécules. (Sapsford *et al.*, 2004) ont comparé la capacité d'adsorption de nombreux supports modifiés en surface par des composés tels que le méthyl-silane, le polydiméthylsiloxane, le polystyrène, le polyimide, le thio-silane, l'époxy-silane, le polyéthylèneglycol-silane, l'amino-silane et l'agarose. Les auteurs comparent la quantité de protéines adsorbées grâce à un marquage fluorescent. En testant des protéines telles que la BSA, le fibrinogène, et le lysozyme, ils déterminent quels sont les supports les mieux adaptés en fonction du degré d'hydrophobicité des protéines à immobiliser.

Cette méthode par adsorption s'avère néanmoins délicate à utiliser du fait de l'implication uniquement d'interactions de faible énergie avec le support. En effet, les molécules immobilisées sont alors sujettes au phénomène de désorption. Cependant, une méthode d'adsorption intéressante a été décrite par (Hasunuma *et al.*, 2004). Une électrode en or est modifiée par un mélange d'alkanethiols (acide 4,4'-dithiodibutyrique, 11-ferrocenyl-1-undecanethiol) afin d'adsorber efficacement l'alcool oxydase et la peroxydase de raifort à sa surface. De plus, la présence de ferrocène sur l'électrode augmente la sensibilité de la détection ampérométrique en optimisant le transfert électronique vers l'électrode.

Un matériau très populaire dans le domaine de la microfluidique, le polydiméthylsiloxane (PDMS) est de plus en plus utilisé comme support pour biopuces. Il s'agit d'un polymère flexible de type silicone. Il présente des qualités physiques qui le rendent très intéressant pour la réalisation de biopuces en général, et de systèmes microfluidiques en particulier (Kartalov *et al.*, 2006). En effet, ce polymère est optiquement transparent, chimiquement inerte, de faible coût, non toxique et facile à manipuler et à modeler dans des conditions standards de laboratoire. Ce matériau présente un fort caractère hydrophobe, ce qui facilite l'utilisation de protocoles utilisant l'adsorption des protéines, soit à des fins d'immobilisation directe par adsorption, soit pour saturer la surface à l'aide d'une protéine bloquante, et ainsi mieux contrôler l'adsorption non-spécifique. Un autre avantage de ce matériau est qu'il permet la création de motifs avec un haut facteur de forme, le rendant intéressant pour la création de réseaux, pour des applications en microfluidique.

Le PDMS ne fut utiliser que récemment comme support d'immobilisation afin notamment de réaliser des tests ELISA (*Enzyme linked Immunosorbent assay*) en microfluidique (Eteshola *et al.*, 2001). Dans une première étude, les auteurs immobilisent par adsorption des anticorps dirigés contre des IgM de chèvre sur les parois de canaux d'un réseau microfluidique. Ils détectent ensuite grâce à une méthode "sandwich" les IgM présents dans l'échantillon.

L'adsorption dans des membranes synthétiques (6 x 8 cm) est aussi utilisée pour immobiliser des protéines. (Huang, 2001) a ainsi étudié des membranes de composition différentes afin d'immobiliser des anticorps ou des antigènes. Il compare la capacité d'adsorption de ces supports (des membranes commerciales de composition différentes : nylon, nylon chargé, nitrocellulose) en effectuant des tests ELISA. Les antigènes ou anticorps sont adsorbés sur les membranes, et les interactions spécifiques sont révélées grâce à un anticorps secondaire marqué par la peroxydase du raifort (HRP), permettant une détection chimiluminescente. L'étude a permis à l'auteur de sélectionner le meilleur modèle de membrane (membrane à base de nylon, Magnagraph), procurant le meilleur rapport signal/bruit. L'auteur utilise les propriétés d'adsorption de cette membrane afin de créer des plots de protéines, permettant de réaliser des détections spécifiques multiples.

D'autre part, il a été démontré que l'utilisation d'un support de silicium nano-poreux, obtenu par dissolution électrochimique de silicium monocristallin, permettait d'immobiliser des anticorps par adsorption. L'augmentation de la rugosité de la surface permet alors d'accroître la charge protéique par unité de surface, et ainsi les performances de détection du système (Ressine *et al.*, 2003).

Le principal inconvénient des immobilisations par adsorption est la désorption quasi-systématique et non contrôlée des biomolécules. En effet, les énergies d'interactions entre les molécules et le support sont sensibles aux variations de pH et de force ionique du milieu. Ce phénomène peut, par exemple, intervenir lors de dosages réalisés dans des milieux complexes tels que des échantillons naturels.

## 2. Encapsulation, rétention dans un gel ou un polymère / co-réticulation

Ces méthodes de piégeage, sont mises en œuvre de diverses manières. Les polymères utilisés peuvent être des dérivés polyvinylyls, des polyéthylèneglycols, du dextran ou de l'aminodextran. Ils peuvent être photopolymérisables, ou encore électropolymérisables comme le polypyrrole, le polythiophène ou la polyaniline (Sangodkar *et al.*, 1996).

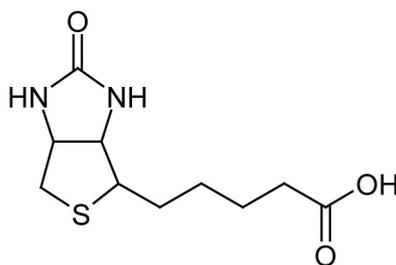
La co-réticulation est en générale réalisée entre une protéine d'intérêt et une protéine neutre, le plus souvent la BSA (albumine de sérum bovin), et en présence d'un agent pontant, généralement le glutaraldéhyde (Suzuki *et al.*, 2001). Les auteurs montrent ici que la co-réticulation est adaptée à la fixation d'enzyme au sein de membranes perméables aux gaz, et réalisent ainsi un système microfluidique pour le dosage ampérométrique simultané de glucose, d'urée, d'acide urique, de créatine et de créatinine.

Les méthodes de piégeage permettent d'une manière générale d'augmenter la charge en protéine par unité de surface. De plus, (Gill *et al.*, 2000) suggèrent que les enzymes immobilisées par piégeage aient une certaine liberté de mouvement, ce qui leur permet d'avoir une activité plus proche de celle observée en solution.

Une autre méthode de piégeage intéressante a été présentée en immobilisant directement des enzymes dans un mélange contenant de la poudre de graphite et un liant (méthyltriméthoxysilane), afin d'obtenir une pâte conductrice dans laquelle sont directement incorporées les enzymes (Lev *et al.*, 1997; Walcarius, 2001). (Sampath *et al.*, 1996) produisent ainsi des électrodes contenant des oxydoréductases (lactate oxydase, glucose oxydase et L-amino acide oxydase), et réalisent des détections ampérométriques de l' $H_2O_2$  produit par chaque enzyme.

### 3. Immobilisation par affinité

Cette méthode utilise les propriétés naturelles de reconnaissance et d'interaction de certaines molécules. Le couple streptavidine/biotine est majoritairement employé dans ce dernier type d'immobilisation non-covalente compte tenu de la très forte affinité entre ces deux entités ( $K_d = 10^{-15}$  M). Cette méthode consiste soit en l'immobilisation de streptavidine (protéine homotétramérique) soit de biotine (figure 4) à la surface d'un support. L'immobilisation a ensuite lieu indirectement grâce à la mise en présence de protéine ou une autre molécule préalablement marquée soit par la biotine soit par la streptavidine (Wilchek *et al.*, 1988). Il est également possible d'utiliser la forte affinité de ce couple streptavidine/biotine afin d'immobiliser des particules de grande taille (billes de polystyrène de diamètre : 1  $\mu\text{m}$ ) (Andersson *et al.*, 2002). Cette dernière technique permet, grâce aux billes-streptavidine fixées sur un support activé par de la biotine, d'augmenter la quantité de matériel biologique immobilisé par unité de surface. De plus, en déposant ces solutions de billes modifiées par une technique d'impression par microcontact, les auteurs créent un réseau de billes avec une largeur de trame de l'ordre de 5  $\mu\text{m}$ .



**Figure 4.** Structure chimique de la biotine, également appelée vitamine H ou B8.

D'autre part, les protéine-A et protéine-G sont utilisées pour leur propriété d'interaction spécifique avec les anticorps. En effet, ces protéines ont une forte affinité pour les régions Fc des immunoglobulines. (Yakovleva *et al.*, 2003) fixent ainsi les protéines A ou G par couplage avec du glutaraldéhyde dans différents polymères hydrophiles (polyéthylèneimine, dextran, polyvinyl alcool, aminodextran et 3-aminopropyltriéthoxysilane), et immobilisent par affinité des IgG anti-atrazine. L'efficacité d'immobilisation de ces systèmes est tout d'abord comparée, et il en ressort que le meilleur modèle est celui du polyéthylèneimine supportant la protéine G. Les auteurs réalisent des dosages d'atrazine par compétition avec de l'atrazine marquée par la peroxydase pour une détection chimiluminescente, atteignant une limite de détection de 0,006  $\mu\text{g/L}$ .

Un autre exemple nous est donné par (Eteshola *et al.*, 2001) qui dans la suite de leur étude sur l'immobilisation par adsorption sur le PDMS adsorbent la protéine-A sur des canaux de PDMS, puis l'utilisent pour augmenter la charge d'IgG fixés par rapport à une adsorption directe des anticorps sur ce matériau. Ils augmentent le rapport signal/bruit d'un facteur trois et obtiennent ainsi une limite de détection de 17 nM pour des anticorps de type M (2,5 µg/mL).

## 4. Immobilisation covalente

Des méthodes chimiques de modification de surfaces sont utilisées pour fixer de manière covalente des protéines. Dans ce cas le support doit présenter en surface des groupements chimiques réactifs tels que des hydroxyles, des amines, des carboxyles, ou des thiols afin de réaliser des réactions de couplage.

Les méthodes conduisant à un couplage covalent entre le support et les biomolécules dépendent essentiellement de la nature du substrat employé. Ainsi ces méthodes sont présentées en fonction du matériau sur lequel elles sont utilisées.

### a. Verre

Le verre est couramment modifié en utilisant la chimie des silanes. Ainsi, (MacBeath *et al.*, 1999) activent une lame de verre par des fonctions maléimide, ce qui leur permet ensuite de fixer covalamment des billes liées à des biomolécules. Ils montrent ici la possibilité de déposer et de détecter par fluorescence 10800 plots distincts sur une lame de verre de taille standard. Ils montrent également l'efficacité de ce type d'immobilisation avec un couplage aldéhyde-silane afin de fixer directement des protéines via leurs fonctions amines libres (MacBeath *et al.*, 2000).

Des anticorps, notamment des anti-HGF (*hepatocyte growth factor*, indicateur fréquent de cancer), ont également été fixés covalamment par couplage sur des plaques de verre aminosilanisées par l'intermédiaire d'un agent pontant homobifonctionnel : bi-maléimide (Woodbury *et al.*, 2002). Cette immobilisation a permis de réaliser le dosage d'HGF et de marqueurs protéiques dans des échantillons de sérums humains, grâce à une détection fluorescente.

## **b. Métaux**

### **i) Le platine**

Le platine peut être préalablement oxydé, avant d'être modifié chimiquement par des aminosilanes (Zhu *et al.*, 1994). Ces auteurs ont immobilisé la glucose oxydase par couplage covalent sur une électrode de platine activée (électro-oxydée puis fonctionnalisée) faisant partie d'un micro-réseau. Ils mettent ainsi en œuvre un capteur à glucose obtenant une limite de détection de 0,5 mM.

### **ii) L'or**

Afin d'utiliser des surfaces d'or, les méthodes conduisant à la formation de monocouches auto-assemblées (SAM, *Self Assembled Monolayers*) sont privilégiées (Chaki *et al.*, 2002). Ces techniques consistent à générer une monocouche de composés thiolés, généralement lipidiques, fonctionnalisant les surfaces d'or (Wink *et al.*, 1997). La surface d'or fonctionnalisée présente alors des propriétés qui dépendent de la longueur de la chaîne et des fonctions accessibles à leur extrémité. Ainsi, les lipides déposés sont choisis en fonction des propriétés recherchées : immobilisation par adsorption, par couplage covalent ou pour une transduction électrochimique.

(Zhao *et al.*, 1999) ont comparés l'efficacité du greffage covalent de brins d'ADN sur des monocouches auto-assemblées fonctionnalisées en leur extrémité par des fonctions hydroxyl, amine, et acide carboxylique. Ils déterminent par XPS la densité de surface d'ADN immobilisé, ce qui leur permet de sélectionner les hydroxyl-SAM.

### **iii) Immobilisation sur supports d'or pour des mesures de SPR (résonance des plasmons de surface)**

Pour le développement de supports destinés à des mesures de SPR, deux technologies sont majoritairement utilisées : la chimie des thiols seule, et la chimie des thiols supportant des polymères de type dextran (Lofas *et al.*, 1995).

Dans le cas de la chimie des thiols, la surface d'or est traitée chimiquement afin d'être fonctionnalisée par une monocouche d'amine-alkenethiol (Brockman *et al.*, 1999), utilisée ensuite afin de fixer covalamment les biomolécules sur le support. Cette technologie, a permis

de développer des biopuces pour la détection en imagerie par SPR (SPRi) utilisant des oligonucléotides immobilisés (Jordan *et al.*, 1997; Nelson *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006), des protéines de faible poids moléculaire immobilisées (Lee *et al.*, 2006), et des carbohydrates immobilisés (Smith *et al.*, 2003).

D'autre part, l'immobilisation impliquant des polymères de type dextran est également très utilisée pour l'immobilisation de biomolécules sur des supports d'or pour la SPR. Cette technologie est celle utilisée par la société Biacore<sup>®</sup> (Brighamburke *et al.*, 1993). Cette technique consiste à utiliser des polymères dextran aminés, ou oxydés (acide carboxylique) afin de fixer les biomolécules par couplage covalent sur ceux-ci.

Il a été montré que cette technologie permettait de conserver les protéines immobilisées sous leur forme native, et d'amplifier le signal SPR, diminuant ainsi les limites de détection (Lofas *et al.*, 1990). Cependant, des études comparatives récentes ont montré que l'immobilisation d'oligonucléotides à l'aide de la technologie des dextrans procurait moins de reproductibilité que celle des alkenethiols (Mannelli *et al.*, 2006).

Une troisième technologie a été développée, tirant avantage de l'électro-polymérisation des dérivés pyrroles et du caractère conducteur de ces supports en or (cf. Chap. II § 5.a, page 15).

### c. Carbone

Les surfaces à base de carbone, et plus particulièrement le carbone vitreux, peuvent être oxydées électrochimiquement, afin de faire apparaître en surface des fonctions oxygénées réactives (Hoogvliet *et al.*, 1991). Les conditions requises sont un milieu acide, et un potentiel oxydant (+1,6 V *vs*-SCE). Les fonctions carboxyliques qui apparaissent en surface peuvent alors être impliquées dans des réactions de couplage de type carbonyl/amine primaire, avec notamment des agents pontants : éthylènediamine seul ou éthylènediamine puis glutaraldéhyde.

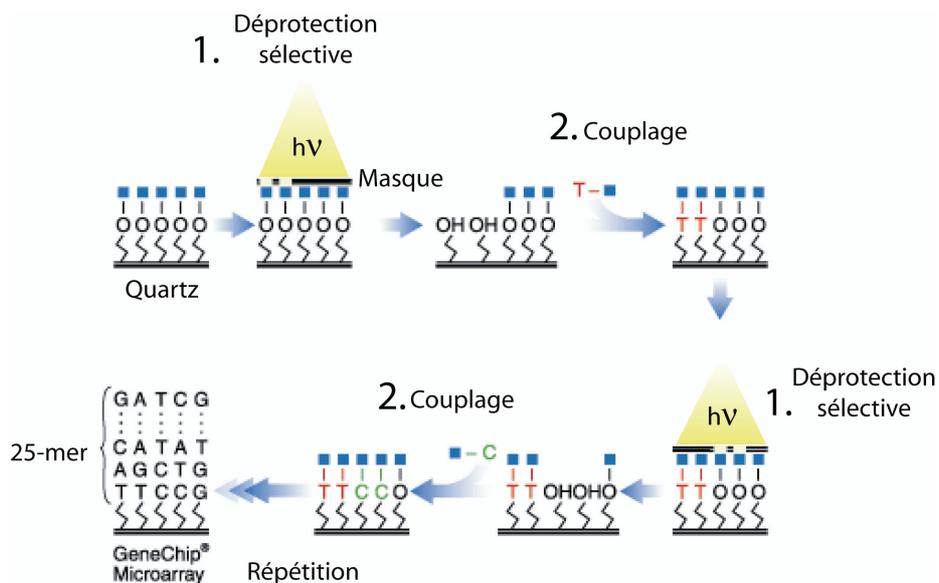
Ces procédés ont été utilisés pour l'immobilisation de brins d'ADN. Par exemple, (Millan *et al.*, 1992), après oxydation du carbone vitreux, greffent des sondes nucléiques en utilisant un carbodiimide : l'EDC (1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide). L'hybridation des sondes fixées est ensuite détectée par voltammétrie cyclique, en présence d'un médiateur électrochimique se fixant dans le petit sillon des hélices double brin. Récemment, (Marquette *et al.*, 2006b) ont utilisés cette méthode d'immobilisation afin de greffer des sondes oligonucléotidiques sur des électrodes de carbone sérigraphiées. Ils utilisent pour cela l'EDC,

et des oligonucléotides portant un espaceur C6-NH<sub>2</sub> à leur extrémité 5'. Ils obtiennent ainsi des couches sensibles permettant de réaliser des détections de brins complémentaires sans marquage (par mesure d'impédance).

D'autre part, il a été montré que cette méthode pouvait être employée pour immobiliser des enzymes (Bianco *et al.*, 1990). La glucose oxydase a ainsi été fixée à la surface d'une électrode de carbone vitreux permettant de doser le glucose par ampérométrie. (Wu *et al.*, 1994) ont montrés que l'enzyme reste active, et que la couche sensible est stable durant deux mois.

### d. Quartz

La société Affymetrix<sup>®</sup> utilise une technique de photolithographie permettant la synthèse *in situ* de sondes nucléotidiques fixées covalamment sur la surface d'une puce en quartz (1 x 1 cm). Pour cela, des étapes de réaction chimique de couplage s'enchaînent, avec des étapes de déprotection (figure 5). Ces étapes de déprotection ciblent des zones de la puce grâce à une technique de photolithographie : un masque portant les ouvertures appropriées permet de déprotéger les oligonucléotides choisis en vue du couplage. Cette méthode permet de créer des puces supportant jusqu'à 1,3 million de brins (au total), pouvant représenter jusqu'à 10 000 plots de séquences différentes.



**Figure 5.** Principe de déposition de plots sur des puces à ADN Affymetrix<sup>®</sup>. Synthèse combinatoire *in situ* de séquences nucléotidiques jusqu'à 25-mer. 1) Étapes de déprotection par photolithographie. 2) Étapes de couplage. (D'après [www.affymetrix.com/technology/](http://www.affymetrix.com/technology/))

## e. PDMS

Les supports de type PDMS peuvent également être utilisés pour des immobilisations covalentes. La chimie utilisée met en œuvre les mêmes procédés que ceux employés sur le verre. Il s'agit de la chimie des silanes appliquée au PDMS, après des étapes d'oxydation, soit par la méthode des plasmas d'oxygène (Jang *et al.*, 2006), soit par méthode utilisant du peroxyde d'hydrogène en milieu acide (Sui *et al.*, 2006). En effet, il a été démontré que le PDMS oxydé ainsi, présentait une réactivité similaire à celle des surfaces de verre, et pouvait être fonctionnalisé afin de greffer en plusieurs étapes une couche de biotine (Jang *et al.*, 2006). Les auteurs ont ainsi immobilisé un anticorps afin de réaliser un immuno-essai dans un système microfluidique. Il a également été démontré que le PDMS pouvait être oxydé en milieu acide, puis silanisé, et enfin permettre le greffage covalent de molécules telles que des protéines, des peptides ou des oligonucléotides (Sui *et al.*, 2006).

## 5. Immobilisation par méthodes électrochimiques

Les techniques dites "d'électro-adressage" de biomolécules sont des méthodes d'immobilisation récentes. Il s'agit ici, grâce à l'application d'un potentiel électrochimique aux bornes d'un système, d'immobiliser spécifiquement des biomolécules à la surface d'un matériau conducteur.

Ces méthodes visent à créer des couches sensibles utilisables pour biopuces de manière directe et spécifique, comparées aux autres méthodes dites classiques qui nécessitent plusieurs réactions chimiques et/ou l'intervention d'un système robotisé de type "spotter".

L'avantage technique recherché est d'éviter l'emploi de matériel lourd tel que les "spotter". En effet, ces appareils reposant sur le micro-pipetage robotisé de solutions pour le dépôt localisé de plots, sont contraignants à mettre en œuvre.

Toutefois, afin de réaliser un électro-adressage, les supports conducteurs utilisables pour l'électro-adressage doivent être composés soit d'un réseau d'électrodes, soit d'une surface totalement conductrice.

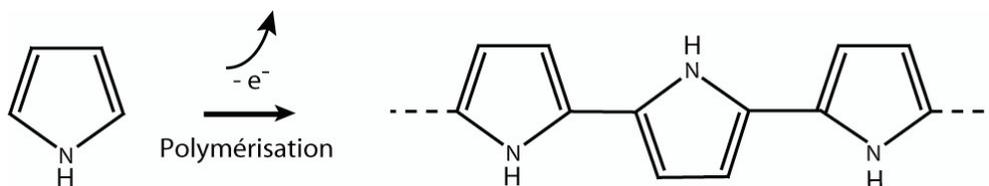
### a. Electropolymères conducteurs

Historiquement, l'immobilisation par électro-adressage est une technologie récente qui est apparue avec les recherches réalisées sur les électropolymères conducteurs. Par définition,

ceux-ci sont des structures polymériques réalisés par électroréduction ou électro-oxydation à partir de monomères en solution.

Des travaux dans ce domaine ont été menés dès 1979, avec la démonstration et l'étude de l'électropolymérisation du pyrrole à la surface d'une électrode de platine (Diaz *et al.*, 1979). Ainsi, les films de polypyrrole réalisés dans des conditions électrochimiques maîtrisées ont montrés des propriétés intéressantes : conductivité augmentée et adhésion forte du film à la surface du métal. Il a été montré que le mécanisme de croissance des films de polypyrrole se produit de manière radicalaire, de façon directement proportionnelle au temps d'application du potentiel (Genies *et al.*, 1983).

Les films polymérisés ont des propriétés conductrices qui proviennent d'une forte mobilité des électrons, due à la conjugaison des liaisons C=C, le long de toute la chaîne polymérisée (figure 6).

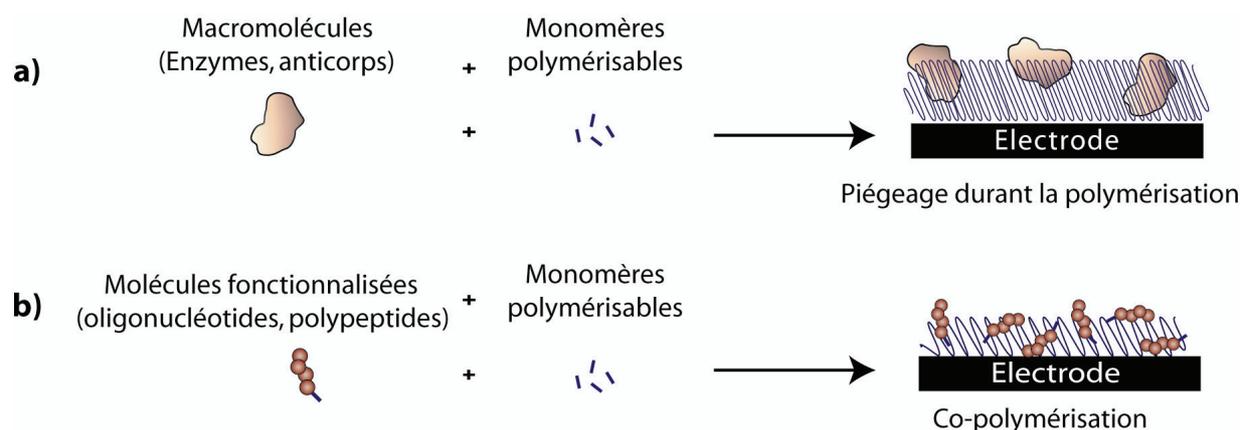


**Figure 6.** Polymérisation du pyrrole sous l'effet d'une électro-oxydation.

Dès 1984, des techniques électrochimiques telles que la voltammétrie cyclique, la coulométrie ou la "*potential step experiment*" sont utilisées afin d'étudier l'électropolymérisation de films de polypyrrole à partir de solutions aqueuses acides, neutres ou basiques ou de solutions organiques (Asavapiriyant *et al.*, 1984).

Le premier biocapteur utilisant des films de polypyrrole reposait sur le piégeage d'une enzyme, durant le processus d'électropolymérisation du pyrrole en solution. Cette technique exploite la capacité du pyrrole et/ou de ses dérivés à former des films insolubles, adsorbés à la surface de l'électrode. Ainsi, (Umana *et al.*, 1986) ont pu réaliser un biocapteur utilisant une électrode de carbone vitreux sur laquelle la glucose oxydase a été piégée dans le film de polymère, permettant de doser du glucose par détection électrochimique. Dans ce genre de système à détection ampérométrique, le polymère joue non-seulement le rôle de matrice d'immobilisation de l'enzyme, mais permet également un transfert électronique rapide depuis l'enzyme jusqu'à l'électrode.

Actuellement, les systèmes d'immobilisation utilisant ces électropolymères sont essentiellement associés à des détections ampérométriques (Mulchandani *et al.*, 1995; Cai *et al.*, 2003; Tsujimoto *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005b; Han *et al.*, 2006; Ionescu *et al.*, 2006). Les polymères utilisées sont de différentes natures : polyaniline, polypyrrole, polyacétylène, polyphénylène ou polythiophène (Gerard *et al.*, 2002). Parmi ces systèmes, nous pouvons distinguer deux classes majeures d'immobilisation impliquant des électropolymères. D'une part le piégeage "mécanique" de biomolécules durant le processus d'électropolymérisation, qui est efficace pour les molécules de haut poids moléculaire telles que les protéines (figure 7.a), et d'autre part la co-polymérisation de monomères de type pyrrole avec des biomolécules fonctionnalisées par des unités pyrroles. Cette dernière est plus efficace pour immobiliser des biomolécules de "petite taille" telles que des oligonucléotides ou des polypeptides (figure 7.b), mais peut également être utilisée pour des molécules de haut poids moléculaire.



**Figure 7.** **a)** Immobilisation de biomolécules par piégeage durant le processus d'électropolymérisation à la surface d'une électrode. **b)** Immobilisation par co-électropolymérisation de monomères avec des biomolécules fonctionnalisées par ce monomère à la surface d'une électrode.

### **i) Immobilisation par piégeage durant l'électropolymérisation**

Des enzymes de type oxydase ont été immobilisées par cette technique dans des films d'électropolymère conducteurs : polyaniline, polyindole, polypyrrole et poly(o-phenyldiamine) (Dumont *et al.*, 1996). La cinétique et le comportement des enzymes piégées (God : glucose oxydase) ont été étudiés en fonction de différentes conditions de pH, de température et dans plusieurs solvants. Les auteurs montrent ainsi que les films enzymatiques formés permettent de diminuer les interférences générées par la présence d'espèces

électroactives dans le milieu, telles que l'ascorbate, la cystéine, ou l'acide urique. Cet effet est dû aux propriétés dites "perm-sélectives" des électropolymères.

D'autres enzymes ont également été immobilisées par électro-adressage, notamment une invertase dans un film mixte de polypyrrole/PMMA-co-PMMT (polyméthyl-méthacrylate-co-polyméthyl-thienyl-méthacrylate) (Bekir Yildiz *et al.*, 2005). L'enzyme active est alors stabilisée, et forme une couche sensible permettant de réaliser des mesures pendant une journée.

De manière comparable, une tyrosinase a été immobilisée par piégeage dans un film électrogénéré de polythiophène à la surface d'une électrode de carbone vitreux (Vedrine *et al.*, 2003). Les auteurs montrent que ce type de film procure une réponse optimale du biocapteur pour la détection ampérométrique de phénols, di-phénols et herbicides par inhibition de l'activité de la tyrosinase.

D'autre part, cette méthode de piégeage de biomolécules lors de l'électropolymérisation a été décrite pour la réalisation d'immunocapteurs (Li *et al.*, 2005a). Les auteurs immobilisent des immunoglobulines de type G lors de la polymérisation du pyrrole à la surface d'une électrode en carbone vitreux. Le biocapteur ainsi généré permet de détecter des interactions antigène/anticorps sans marquage, grâce à des mesures d'impédance.

Plus récemment, ce type d'immobilisation fut employé pour réaliser des plots de plusieurs anticorps électro-adressés dans du polypyrrole sur une surface de microélectrodes interdigitées (Shi *et al.*, 2006). La présence d'antigènes contenus dans des échantillons de sérum humain est détectée avec une grande sensibilité et une bonne spécificité par voltammétrie cyclique en présence d'un médiateur, le  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ .

## ii) Immobilisation par co-électropolymérisation

Cette seconde méthode d'immobilisation impliquant également ces électropolymères repose sur la co-électropolymérisation de monomères et de biomolécules fonctionnalisées par un dérivé de ce monomère. Ce procédé est plus couramment utilisé pour les molécules de petite taille, et conduit à une fixation covalente des biomolécules au sein du polymère, ce qui évite les problèmes de relargage (figure 7.b).

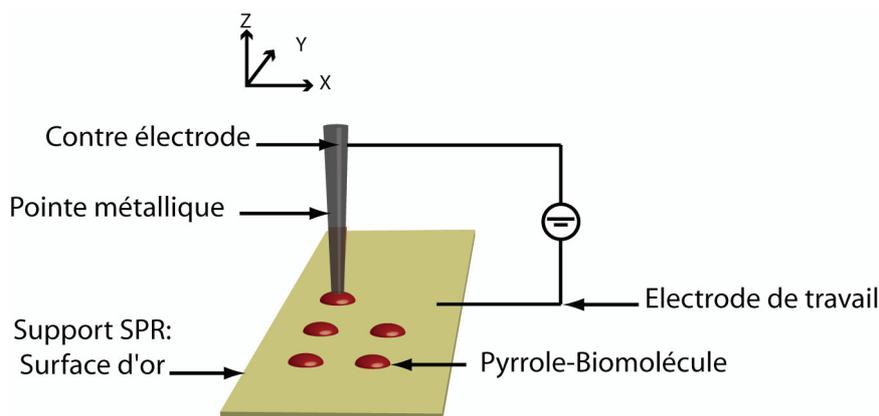
Ainsi, des acides-aminés et des di-peptides fonctionnalisés par du pyrrole ont été co-électropolymérisés dans des films de pyrrole (Garnier *et al.*, 1994). L'accessibilité des molécules piégées dans les couches sensibles est alors mise en évidence grâce à la reconnaissance réalisée par la carboxypeptidase A, enzyme spécifique des différents peptides.

Utilisant la même approche de co-électropolymérisation, un dérivé de biotine a été électro-adressé dans un film de polydicarbazole à la surface d'une électrode de carbone vitreux (Cosnier *et al.*, 2003). Ce support permet ensuite d'immobiliser un complexe avidine-polyphénol oxydase, et ainsi de détecter par ampérométrie la L- et la D-noradrénaline.

D'autre part, un réseau de 48 électrodes d'or de  $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$  chacune a été utilisé comme base pour l'électro-adressage d'oligonucléotides et de pyrrole co-polymérisés, utilisant des brins modifiés en 5' par du pyrrole (Livache *et al.*, 1998b). Cette biopuce a été utilisée pour le criblage génotypique du virus de l'hépatite C dans des échantillons de sang. Cette méthode directe d'immobilisation fut aussi mise en œuvre pour la réalisation d'une biopuce à ADN visant à détecter et cribler des mutations génétiques du gène humain *K-ras* (Lopez-Crapez *et al.*, 2001).

Basées sur ce modèle d'immobilisation par co-électropolymérisation de dérivés pyrrolés, des microélectrodes modifiées par des polypeptides ont également été obtenus (Livache *et al.*, 1998a). Des anticorps spécifiques des polypeptides ainsi greffés ont permis de réaliser des immunodétections révélées par fluorescence. Cette étude démontre qu'il est possible d'immobiliser plusieurs couches sensibles sur des micro-électrodes ( $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ ) d'une même puce, sans interférence les unes avec les autres.

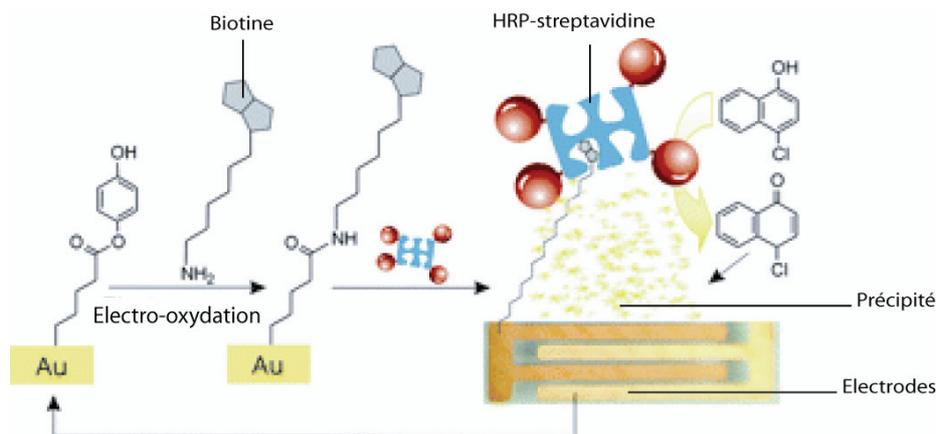
Cette méthode d'immobilisation par électro-adressage a également été employée pour créer des plots sur des supports en or, pour des mesures en imagerie de résonance des plasmons de surface (SPRi) (Guedon *et al.*, 2000; Livache *et al.*, 2001). Ainsi, des dérivés pyrrolés d'oligonucléotides ont été co-électropolymérisés à la surface d'une puce d'or pour SPRi de  $1\ \text{cm}^2$ . L'étape de déposition des différentes couches sensibles s'effectue alors grâce à un système de "*pin-electro-spotting*" (figure 8). Les auteurs montrent alors que cette méthode permet la détection directe et sans marquage des hybridations grâce aux mesures de SPRi.



**Figure 8.** Immobilisation par électropolymérisation et "*pin-spotting*". La déposition est réalisée grâce à une pointe conductrice contenant la solution de biomolécules à électro-adresser. La différence de potentiel est appliquée entre la pointe et la surface du support.

La même approche a également été développée pour l'immobilisation de protéines. Des anticorps modifiés ont alors été électro-adressés sur ce support, et des mesures de SPRi ont permis de mettre en évidence des interactions spécifiques antigènes/anticorps, au travers d'une détection sans marquage et en temps réel des antigènes en solution (Grosjean *et al.*, 2005). Ces systèmes d'électro-adressage par "*pin-electrospotting*" sur or ont permis de former des plots de films insolubles de pyrrole-protéines (Wolowacz *et al.*, 1992), pyrrole-oligonucléotides (Livache *et al.*, 1994) et pyrrole-peptides (Cherif *et al.*, 2006), permettant d'effectuer des mesures en SPRi avec des performances équivalentes aux systèmes classiques d'immobilisation.

Une méthode originale d'électro-adressage indirect sur or est présentée par (Kim *et al.*, 2004). Ils utilisent un réseau d'électrodes en or fonctionnalisées par une monocouche exposant des fonctions mono-ester d'hydroquinone. Le greffage d'amino-biotine en solution sur ces fonctions est déclenché grâce à une électro-oxydation (figure 9). Les auteurs génèrent ainsi une couche de biotine uniquement sur les électrodes de travail, celle-ci sert d'encrage à des complexes streptavidine-péroxydase. La HRP catalyse l'oxydation du 4-chloro-1-naphtol en 4-chloro-1-naphtone, qui précipite alors sur les électrodes fonctionnalisées, permettant de mettre en évidence l'emplacement du greffage.



**Figure 9.** Electro-adressage de biotine-amine sur électrodes d'or. Puis incubation du complexe streptavidine-peroxydase. D'après (Kim *et al.*, 2004).

Un réseau d'électrodes sérigraphié a également été utilisé afin de mettre au point une méthode d'immobilisation de protéines adressées électrochimiquement. Ce type de procédé a été appliqué à la détection sérologique d'anticorps dirigés contre la protéine p24 de capsid d'HIV. Les résultats les plus intéressants ont été obtenus en piégeant directement la p24 génétiquement modifiée, dans l'électro-polymère, sous une forme pré-immobilisée sur un polymère de poly-maléique anhydride-alt-méthylvinyle éther (Marquette *et al.*, 2005). Cette forme pré-immobilisée semble permettre l'orientation de la protéine à la surface du support, rendant sa réactivité par rapport aux anticorps proche de celle observée en solution. Ce type de biopuce a permis de détecter au sein d'échantillons de sérums humains la présence d'anticorps spécifiques anti-p24 (protéine de capsid d'HIV-1), et de discriminer des sérums de patients infectés ou non.

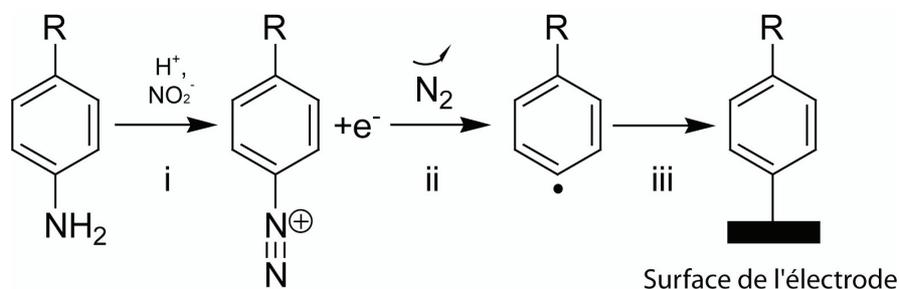
Ainsi la palette de couches sensibles pouvant être obtenues grâce à des films électropolymérisés est assez large, et peut s'appliquer à l'immobilisation de protéines, d'anticorps ou d'oligonucléotides. Les biocapteurs/biopuces ainsi réalisés permettent aussi bien des détections optiques qu'électrochimiques.

## **b. Les sels de diazonium**

### **i) Propriétés chimiques**

L'immobilisation par électro-adressage de biomolécules reposant sur l'électro-réduction des sels de diazonium n'est à l'heure actuelle que très peu développée. Ce procédé repose sur les propriétés particulières de greffage des sels d'aryl-diazonium (figure 10) introduit par

(Delamar *et al.*, 1992) : (i) Les sels de diazonium peuvent être formés à partir de dérivés aniline, dans une solution acide de  $\text{NaNO}_2$  ; (ii) ce sel de diazonium peut alors être électro-réduit pour conduire à la libération d'azote, et à la formation d'un aryl-radical de forte réactivité ; (iii) ce dernier se greffe, sur la surface de l'électrode qui a fourni l'électron nécessaire à son électro-réduction. Il se forme une liaison covalente de type C-X, où X peut être de l'or, du cobalt, du nickel, du zinc, de l'ITO (film d'oxyde d'indium), du platine, du cuivre, du graphite, du diamant, ou du silicium (DeVilleneuve *et al.*, 1997; Allongue *et al.*, 1998; Downard, 2000; Adenier *et al.*, 2001; Chaussé *et al.*, 2002; Allongue *et al.*, 2003; Bernard *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Laforgue *et al.*, 2005; Pinson *et al.*, 2005; Lyskawa *et al.*, 2006a; Maldonado *et al.*, 2006).

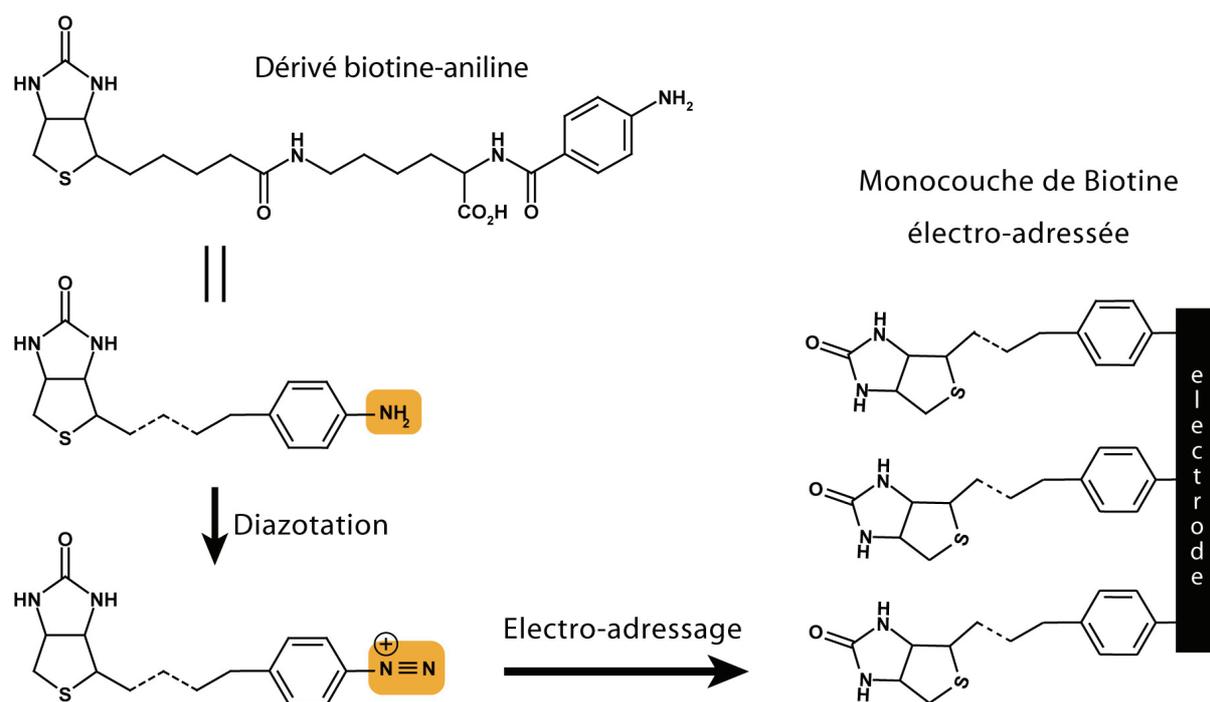


**Figure 10.** Séquence réactionnelle de génération et d'électro-greffage des sels de diazonium à la surface d'une électrode. i) diazotation, ii) électro-réduction, iii) greffage.

## ii) Electro-adressage de sels de diazonium

Cette réaction fût mise en œuvre pour la première fois sur des électrodes de carbone vitreux, afin d'immobiliser de manière indirecte une enzyme (Bourdillon *et al.*, 1992). La réaction d'électro-greffage était alors utilisée afin de fonctionnaliser l'ensemble de la surface de carbone vitreux et ainsi d'obtenir une couche d'acétate de phényle. Cette méthode a été utilisée pour dérivatiser la surface afin de réaliser un greffage covalent par couplage chimique de la glucose oxydase. Il s'agit donc ici d'une méthode indirecte d'électro-adressage.

La réaction de diazotation sur un dérivé aniline a été également utilisée afin de greffer une monocouche de biotine. Un conjugué biotine-aniline a alors été diazoté pour former un dérivé biotine-aryldiazonium, puis greffé par électro-réduction à la surface d'une électrode de carbone sérigraphiée (figure 11) (Dequaire *et al.*, 1999).



**Figure 11.** Formation d'une monocouche de biotine fixée covalentement par électro-adressage sur une électrode de carbone.

Ainsi, la surface de l'électrode devient un point d'encrage covalent pour la streptavidine. Les auteurs utilisent alors cette surface afin de fixer la phosphatase alcaline biotinylée. Les auteurs mettent en évidence la stabilité de la couche sensible ainsi formée, sans cependant, décrire d'application concrète.

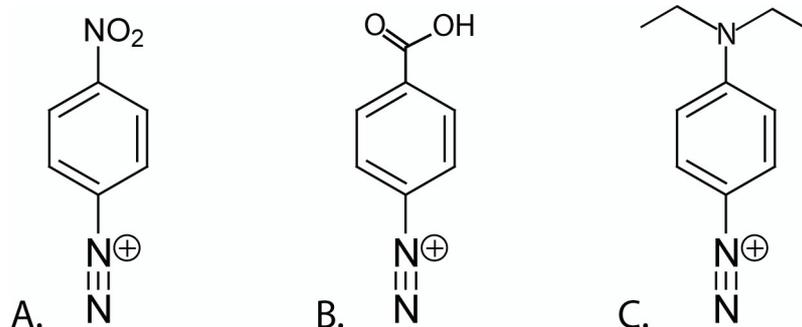
Très récemment, et en s'appuyant sur nos travaux (Corgier *et al.*, 2005), une méthode d'électro-adressage direct pour la peroxydase du raifort (HRP) a été développée (Polsky *et al.*, 2006). Un couplage entre le 4-carboxyphényldiazonium et la HRP, via un carbodiimide est réalisé, puis l'adduit HRP-aryldiazonium est électro-adressé sur une électrode de carbone vitreux. Il en résulte la formation d'une couche sensible d'HRP fixée covalentement, permettant de détecter le peroxyde d'hydrogène par voltammétrie cyclique.

Jusqu'à présent, les propriétés des sels de diazonium pour l'adressage de biomolécules ont été essentiellement exploitées avec des supports en carbone. Cependant, il est envisageable d'étendre cette méthode à une plus large variété de supports, sur lesquels il a été montré que les aryl-diazoniums pouvaient se greffer : le fer (Adenier *et al.*, 2002; Chaussé *et al.*, 2002), le platine, le cobalt, le nickel, le zinc, le cuivre (Bernard *et al.*, 2003), l'or (Laforgue *et al.*,

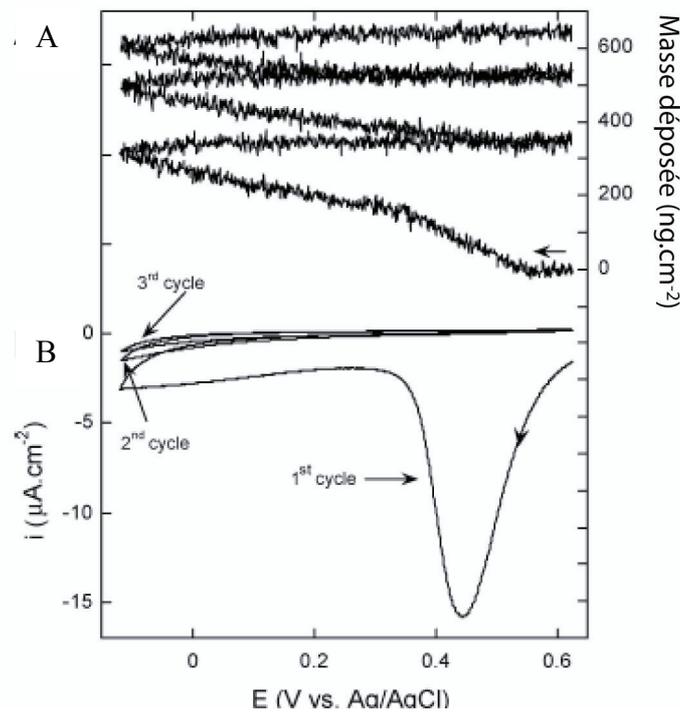
2005; Lyskawa *et al.*, 2006b), l'ITO (Maldonado *et al.*, 2006) et le silicium (Allongue *et al.*, 2003).

D'autre part, sans aboutir au développement de biopuces ou à la réalisation de couche sensible, des études se sont portées sur le phénomène de déposition des sels de diazonium. Ainsi, les propriétés de greffage des sels d'aryl-diazonium substitués en *para* (4-nitrophényldiazonium, 4-carboxyphényldiazonium, et 4-diéthylanilinediazonium, figure 12), dans l'acétonitrile ont été caractérisées sur des surfaces d'or (Laforgue *et al.*, 2005). Les auteurs mettent en évidence deux phénomènes par voltammétrie cyclique, XPS et impédance. Le premier phénomène, rapide (20 secondes), est le greffage d'une monocouche. Le second, avec une cinétique beaucoup plus lente (20 minutes) est la formation de multicouches à la suite de la première. Ils montrent que la possibilité de formation de multicouches par électroréduction dépend de la nature du groupement situé en *para* du diazonium. Ainsi le 4-carboxyphényldiazonium ne permet pas de les former efficacement, contrairement aux 4-nitrophényldiazonium et 4-diéthylanilinediazonium. Les auteurs démontrent également que la disparition de la vague de réduction après le premier cycle n'est pas suivie de l'arrêt du greffage de matière sur l'électrode. Ceci est montré par des mesures simultanées de courant par voltammétrie cyclique et de variation de masse par microbalance piézoélectrique (figure 13).

Cette disparition semble donc plutôt attribuée à l'effet de passivation de la surface de l'électrode, consécutivement à l'électro-greffage de sels de diazonium sur du carbone vitreux (Saby *et al.*, 1997). Des mesures XPS ont permis de caractériser les dépôts, et des expériences de voltammétrie cyclique en présence de médiateurs électrochimiques ont montré les effets bloquant des couches formées.

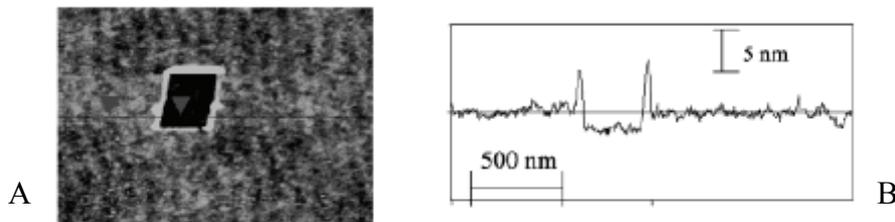


**Figure 12.** A) 4-nitrophényldiazonium B) 4-carboxyphényldiazonium. C) 4-diéthylanilinediazonium



**Figure 13.** A) Etude de la masse déposée en fonction du potentiel lors de l'électrogreffage de 4-nitrophényldiazonium. B) Voltamogramme cyclique de l'électroréduction de 5 mM de 4-nitrophényldiazonium dans l'acétonitrile sur une électrode d'or. vitesse: 5 mV/sec.

La formation de mono- ou multi-couches électro-adressées dans de l'acétonitrile sur des films de carbone a également été étudiée par AFM, grâce à un grattage (*AFM scratching*) volontaire de la surface (figure 14) (Anariba *et al.*, 2003).



**Figure 14.** A) Image AFM, en mode "tapping" d'une monocouche de terphényl diazonium électro-greffée, mise en évidence par "grattage" préalable en mode contact. B) Profil permettant de déterminer l'épaisseur de la couche déposée (1 nm).

D'autre part, il a été démontré que des diazoniums pouvaient être générés *in situ* par réaction de nitrite d'isoamyle sur des anilines et ainsi se greffer sur des nanotubes de carbone, sans impliquer une électroréduction (Bahr *et al.*, 2001). Les auteurs utilisent pour cela une catalyse thermique : 60°C pendant 12 heures.





## Chapitre III.

# Méthodes de détection

Les méthodes de détection utilisées pour les biopuces sont variées mais peuvent être regroupées selon deux catégories ; d'une part les techniques utilisant un marqueur, telles que certaines méthodes optiques (fluorescence, chimiluminescence et électrochimiluminescence), radioactives, et certaines méthodes électrochimiques ; et d'autre part les techniques ne nécessitant pas de marquage : impédance, résonance des plasmons de surface (SPR), microbalance piézo-électrique, ou encore microscopie à force atomique (AFM).

## 1. Méthodes optiques

Pour la détection de signaux lumineux, les transducteurs utilisés sont soit des tubes photomultiplicateurs couplés ou non à des fibres optiques et/ou à un système de balayage (scanner), soit des photodiodes, soit des capteurs CCD (Charged Coupled Device). Ces méthodes optiques sont très prisées puisque le détecteur n'est en général pas en contact avec le capteur et évite ainsi de perturber le système. Néanmoins, elles nécessitent l'emploi d'appareillages parfois complexes et onéreux (source et détecteur de fluorescence, scanner de fluorescence, ou caméra CCD).

### Les phénomènes luminescents

La luminescence désigne l'ensemble des phénomènes d'émission de rayonnements électromagnétiques ultraviolets, visibles ou infrarouges qui ne sont pas dus à un effet thermique. Certaines molécules, les luminophores, ont la propriété, lorsqu'elles sont portées à un état excité, d'émettre cette lumière dite froide en retournant à leur état fondamental. Ce passage à un état excité peut-être déclenché selon différents mécanismes, on distingue alors les différents types de luminescence selon la nature de la source d'énergie mise en œuvre. Les principaux phénomènes luminescents sont listés ci-dessous, et leur diagramme énergétique est présenté (figure 15).

La *photoluminescence* est produite par absorption de rayonnements électromagnétiques, ultraviolets ou visibles. On distingue deux types de photoluminescence selon le temps entre excitation et émission : la *fluorescence* lorsque le phénomène est quasi instantané, le temps

séparant les deux phases est de l'ordre de  $10^{-12}$  sec, et la *phosphorescence*, où l'émission persiste durant un temps plus long pouvant aller de la fraction de seconde à plusieurs jours.

La *chimiluminescence* est l'émission de lumière produite directement ou indirectement par une réaction chimique. En général, les réactions de chimiluminescence sont des processus d'oxydations et se déroulent en trois phases : réaction chimique, transfert d'énergie (excitation) puis émission.

L'*électrochimiluminescence* est l'émission de lumière produite suite à la réaction électrochimique de certains composés luminescents. Ce type de luminescence est également appelé *chimiluminescence électro-générée*. Couramment, le luminophore est oxydé électrochimiquement, il est porté à un état électronique excité et, de la même manière que les composés chimiluminescents, il émet un photon en retournant à son état fondamental. Ces méthodes sont donc indépendantes de la présence de biocatalyseurs.

La *bioluminescence* est une forme particulière de la chimiluminescence qui se produit chez certains organismes vivants. Le phénomène provient le plus souvent de réactions enzymatiques et les exemples les plus connus sont rencontrés chez les lucioles, les lampyres (vers luisants), certains poissons des profondeurs et quelques plantes et bactéries marines.

Bien que les différents phénomènes de luminescence soient encore l'objet de travaux de recherche afin d'élucider un certain nombre de mécanismes, de nombreuses applications scientifiques et techniques ont été développées dans le domaine analytique avec les réactions de bio- et chimi-luminescence (Blum, 1997).

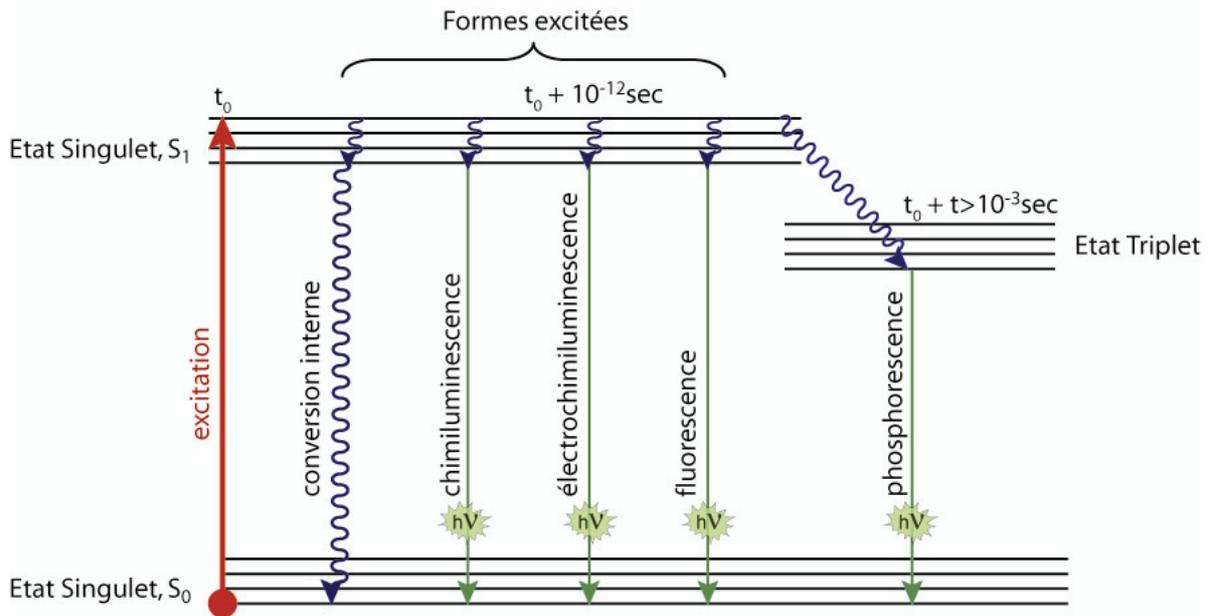
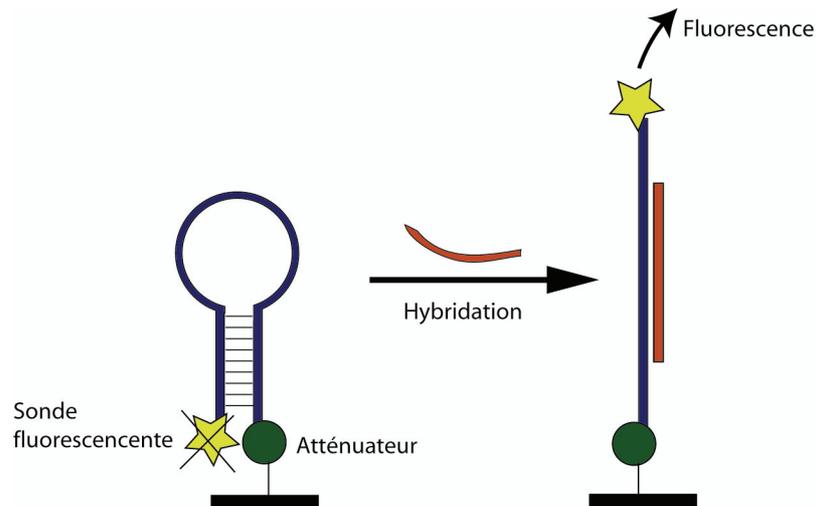


Figure 15. Diagramme de Jablonski : diagramme énergétique des différents phénomènes luminescents.

### a. Fluorescence

Pour les biocapteurs et les biopuces d'une façon générale, la fluorescence est la méthode de détection la plus employée. En effet, elle est largement utilisée pour les biopuces à ADN, soit pour réaliser des détections directes par hybridation avec les brins complémentaires marqués, soit avec des méthodes impliquant des balises moléculaires (*molecular beacons* ; figure 16) (Epstein *et al.*, 2002). Dans ce cas, la détection repose sur l'effet de l'augmentation de la distance entre un fluorophore et un atténuateur, suite à l'hybridation. Cet éloignement entre les deux molécules lève l'inhibition due à l'atténuateur, et permet la fluorescence du fluorophore.

Ce système de balise moléculaire peut également utiliser l'effet de FRET (Förster *fluorescence resonance energy transfer*) lorsqu'une molécule "donneuse" est employée à la place de l'atténuateur. Ainsi (Kim *et al.*, 2007) observent une variation de longueur d'onde du signal émis, lors de l'hybridation.



**Figure 16.** Principe de détection des balises moléculaires (*molecular beacons*), impliquant un oligonucléotide en épingle comportant un fluorophore et un atténuateur à ses extrémités.

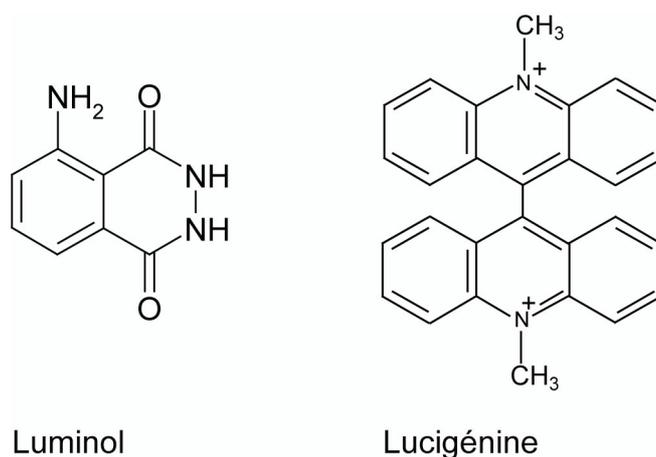
La fluorescence est également la méthode de marquage majoritairement utilisée pour les biopuces à protéines (Templin *et al.*, 2002; Espina *et al.*, 2004). En effet, cette méthode est sensible, et permet d'effectuer plusieurs détections simultanément en utilisant différentes sondes, comme celles de la famille des Cy<sup>TM</sup> (dérivés cyanine), reconnues pour leur grande sensibilité. De plus, le spectre d'émission de ces sondes présente un pic d'émission fin, ce qui facilite les détections simultanées sur une même biopuce.

Bien que cette méthode soit largement utilisée, un inconvénient majeur de la détection par fluorescence est qu'elle nécessite d'employer à la fois une source lumineuse et un détecteur. De plus, elle est sujette à des problèmes de bruit de fond dû aux supports pouvant avoir une fluorescence intrinsèque. D'autre part, des concentrations élevées en protéines perturbent ces systèmes. En effet, celles-ci absorbent une partie des radiations et certains acides aminés possèdent des propriétés fluorescentes (Tyr, Trp et Phe).

## b. Chimiluminescence

Le terme de chimiluminescence regroupe l'ensemble des réactions chimiques ou enzymatiques ayant entre autre comme produit de réaction une molécule dans un état excité, dont le retour à un état fondamental s'accompagne de l'émission de photons. Plusieurs centaines de composés organiques et inorganiques sont à l'origine de réactions de chimiluminescence qui peuvent se produire en phase liquide, gazeuse, ou aux interfaces

solide-liquide et solide-gaz (Campbell, 1988). Parmi ces nombreux luminophores, seul quelques composés organiques ont fait l'objet d'applications dans le domaine de l'analyse biochimique. Parmi les luminophores les plus utilisés on peut citer le luminol, les peroxyoxalates, les dioxétanes, et les dérivés d'acridinium (lucigénine) (Blum, 1997). Les deux composés les plus utilisés sont le luminol et la lucigénine (figure 17).

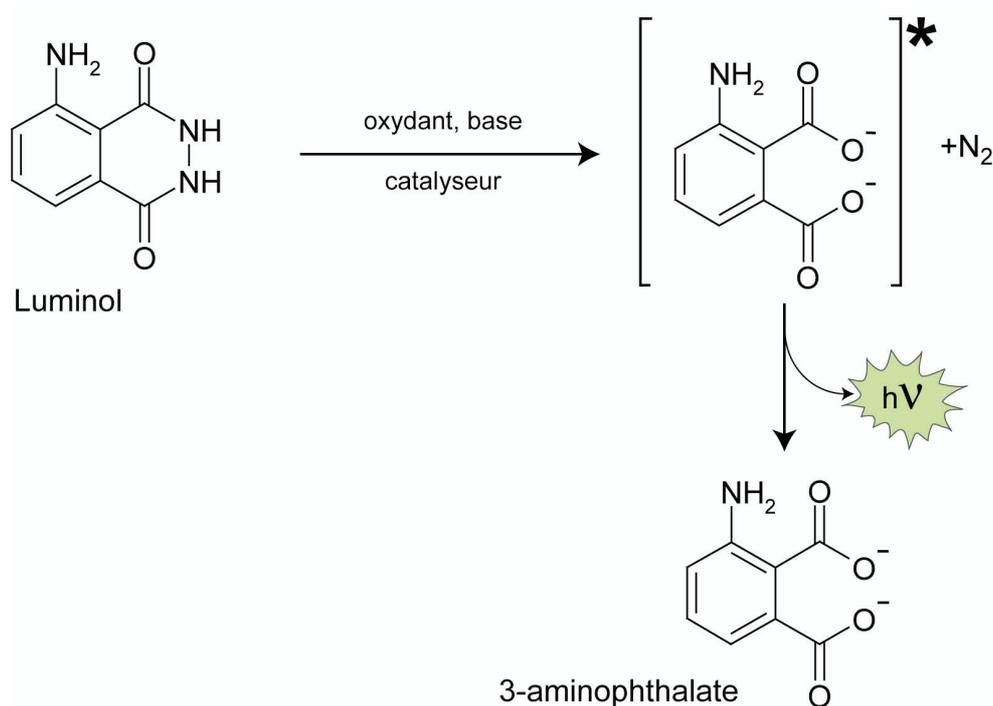


**Figure 17.** Exemples de composés chimiluminescents les plus employés.

La chimiluminescence de la lucigénine se produit en milieu alcalin en présence de peroxyde d'hydrogène, elle a été décrite en 1979 (Maskiewicz *et al.*, 1979), mais son utilisation dans le domaine analytique reste assez limitée.

### i) Chimiluminescence du luminol

Dans le domaine analytique, le luminol (5-amino-2,3-dihydrophthalazine 1,4-dione) est le composé chimiluminescent le plus couramment employé. Sa luminescence fut décrite pour la première fois en 1928 par Albrecht (Albrecht, 1928). D'une manière générale, en milieu non protoné, le luminol réagit préférentiellement avec l'oxygène en présence d'une base forte pour produire de la lumière (425 nm) (figure 18) (White *et al.*, 1964). En milieu protoné, il réagit préférentiellement avec un peroxyde.



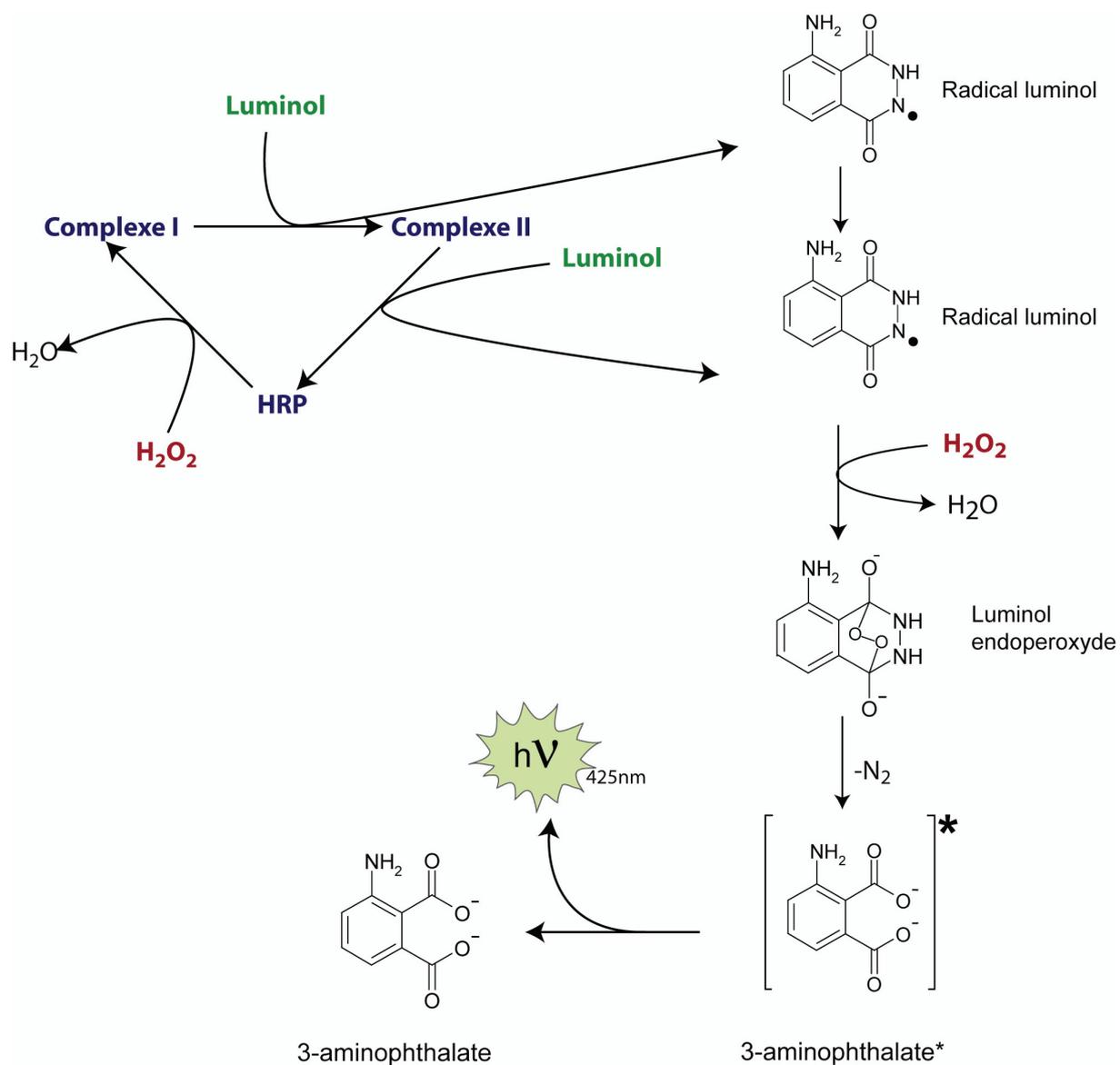
**Figure 18.** Représentation schématique de la réaction générale de chimiluminescence du luminol.

Parmi les nombreux systèmes chimiques conduisant à la production d'aminophthalate dans un état excité, on peut distinguer le cas particulier de la chimiluminescence du couple luminol/ $H_2O_2$  catalysée par une enzyme. En effet, cette méthode utilisant la peroxydase de raifort (*horseradish peroxidase*, ou HRP) est largement privilégiée car elle permet de travailler à des pH proches de la neutralité. Détournée de son activité naturelle, cette enzyme catalyse l'oxydation du luminol par le peroxyde d'hydrogène (figure 19). Il ne s'agit pas ici de bioluminescence, mais bien de chimiluminescence catalysée par une enzyme puisque celle-ci est détournée de son activité naturelle.

La peroxydase réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour former un complexe intermédiaire inactif appelé complexe I (figure 19). Le fer (+III), présent dans le groupement prosthétique de l'enzyme, passe à l'état d'oxydation (+V). La réduction du complexe I par le luminol produit un radical luminol et un complexe II de degré d'oxydation (+IV). La réaction du complexe II avec une seconde molécule de luminol conduit à la formation d'un deuxième radical luminol avec régénération de la peroxydase (Dawson, 1988).

Deux voies de production de l'ion aminophthalate peuvent être envisagées selon la nature de l'oxydant réagissant avec les radicaux luminol. La voie superoxyde se déroule lorsque

l'oxydant est l'oxygène, alors que la voie diazaquinone a lieu par réaction avec le peroxyde d'hydrogène. La voie superoxyde n'a lieu que lorsque la concentration en peroxydase est très faible, inférieur à  $10^{-12}$  M (Li *et al.*, 1993).



**Figure 19.** Représentation schématique de la réaction de chimiluminescence du couple luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, catalysée par la peroxydase du raifort (HRP). D'après (Thorpe *et al.*, 1987).

D'autre part, plusieurs auteurs ont étudié ces mécanismes en isolant les composés intermédiaires de cette réaction et en déterminant les constantes cinétiques des différentes étapes (Thorpe *et al.*, 1987; Merenyi *et al.*, 1990).

Il existe d'autres catalyseurs de la chimiluminescence du couple luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tels que le ferricyanure, les ions cobalts, les ions cuivriques, et l'hématine. Ils peuvent être utilisés pour la catalyse de cette réaction de chimiluminescence mais ils nécessitent des valeurs de pH élevées, générant des luminescences de fond importantes.

Avec le système catalysé par la HRP, l'intensité de la lumière émise dépend de plusieurs facteurs : la concentration en substrats et en enzyme, la température, le pH et la concentration en sel (Blum *et al.*, 1997). Cette méthode de détection est très largement employée lors des tests dits ELISA (Clark *et al.*, 1986), ou un second anticorps marqué par la peroxydase est alors utilisé.

La peroxydase de raifort est une enzyme de la classe des oxydoréductases. Cette glycoprotéine d'un poids moléculaire de 44 KDa est de forme globulaire et comporte un groupement hémunique (porphyrine contenant un atome de fer) au sein de son site actif (Welinder, 1979). Le mécanisme d'oxydation par l'oxygène a été récemment décrit (Berglund *et al.*, 2002). Les auteurs ont décrit les cinq étapes d'oxydation de la peroxydase au sein du groupement hémunique.

La peroxydase de raifort présente une spécificité relativement large, et peut catalyser l'oxydation de nombreux composés donneurs d'hydrogène : chromophores et luminophores, en présence de peroxyde d'hydrogène. La peroxydase de raifort comme la plupart des peroxydases peut catalyser, en absence de peroxyde d'hydrogène, des réactions d'oxydation de composés tels que des aminothiols (Svensson, 1988), ou le NADH (Cook *et al.*, 1993). On parle alors de peroxydase/oxydase.

## ii) Les amplificateurs

Un composé est considéré comme amplificateur de la réaction de chimiluminescence si son addition dans le milieu réactionnel entraîne une augmentation de l'intensité du signal lumineux comparée à l'intensité du signal obtenu en son absence, sans augmenter la luminescence de fond. Le rapport de ces deux signaux représente le facteur d'amplification.

Le premier agent amplificateur de la réaction de chimiluminescence du luminol mis en évidence est un dérivé benzothiazole : la luciférine de luciole, dont l'utilisation a permis d'obtenir un facteur d'amplification de 80 (Whitehead *et al.*, 1983). Plusieurs familles de molécules ont ces propriétés d'amplificateur de la réaction de chimiluminescence du luminol catalysée par la peroxydase (Thorpe *et al.*, 1986). Ce sont des benzothiazoles, des phénols (Kuroda *et al.*, 2000), des naphthols ou des amines aromatiques.

Récemment, des amplificateurs de la famille des phénols substitués en *para* ont été comparés à l'aide d'un test ELISA (Dotsikas *et al.*, 2007). Les auteurs ont montrés que le 4-imidazol-phénol permettait d'obtenir une amplification plus forte (2,5 fois celle du *p*-iodophénol, cité plus bas), et donc une meilleure sensibilité du test.

Le mécanisme chimique exact qui conduit à ce phénomène n'est pas encore clairement élucidé. Néanmoins il est suggéré que les amplificateurs agissent en facilitant les transferts électroniques, ou en accélérant la conversion du complexe II en enzyme native.

Actuellement, le composé le plus employé est le *para*-iodophénol introduit comme amplificateur par (Thorpe *et al.*, 1985). Il permet d'accroître le rapport signal/bruit en amplifiant le signal lumineux d'un facteur 180 (Thorpe *et al.*, 1986). Les auteurs ont également montré que le pH ainsi que la concentration en amplificateur influence le degré d'amplification.

De plus, outre l'augmentation de l'intensité du signal lumineux, la réaction de chimiluminescence amplifiée présente l'avantage d'être plus stable au cours du temps ; le signal lumineux est alors persistant, ce qui est un avantage lors d'utilisations analytiques de la réaction.

### c. Electrochimiluminescence

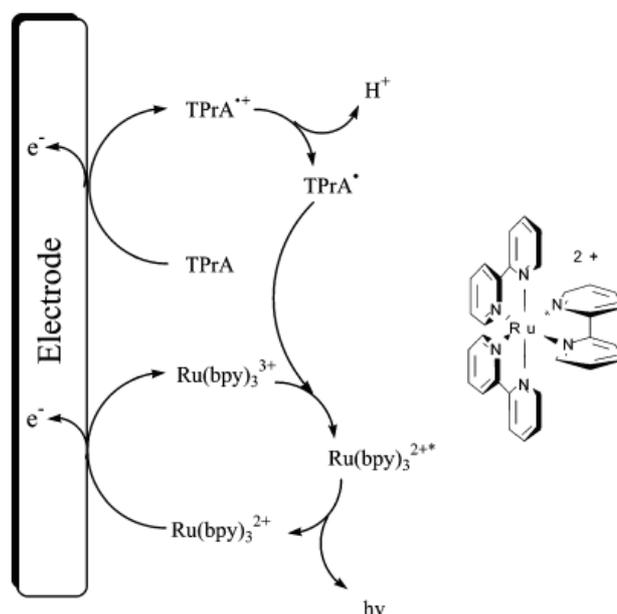
D'une manière générale, cette méthode est plus rarement employée que la chimiluminescence dans le domaine analytique. Dans le cas de l'électrochimiluminescence (ECL), le luminophore est oxydé électrochimiquement avant de réagir avec un co-réactif afin d'aboutir à l'émission d'un photon.

Ces techniques, hybrides entre électrochimie et chimiluminescence, présentent l'avantage d'éviter les interférences dues à la présence d'autres espèces électroactives dans le milieu dont souffrent les détections ampérométriques (cf. Chap. III § 2.a, page 41). En effet, ce sont ces espèces, présentes dans les milieux complexes tels que le sang, qui sont un frein au développement des capteurs électrochimiques.

Concernant les matériaux conducteurs, les électrodes à base de graphite sont très prisées, mais un autre matériau offre des propriétés intéressantes pour la détection électrochimiluminescente, il s'agit d'oxyde d'indium (*indium tin oxyde*, ou ITO) déposé sur une surface en verre (Dobrowolski *et al.*, 1987). Ce matériau a la propriété d'être conducteur et l'avantage d'être transparent aux longueurs d'onde d'émission de l'ECL.

### i) Electrochimiluminescence du " $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ "

Outre ses propriétés de fluorescence, le complexe tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) ( $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ) est aussi employé dans des réactions d'ECL. Cette propriété du  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  a été montrée en 1972 (Tokel *et al.*, 1972). Le principe le plus utilisé de l'ECL du  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ , utilisant un co-réactif (un dérivé d'amine) est présenté figure 20.



**Figure 20.** Principe d'ECL par électro-oxydation du complexe tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II):  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  et de la TPrA : tripropylamine. D'après (Richter, 2004).

La réaction entre les deux espèces oxydées aboutie à l'émission de photons ( $\lambda = 620 \text{ nm}$ ). L'intérêt de ce composé, utilisé comme marqueur, est qu'il peut théoriquement être régénéré électrochimiquement après émission de photon et retour à son état fondamental. Cela permet ainsi d'obtenir un signal stable dans le temps.

### ii) Electrochimiluminescence du luminol

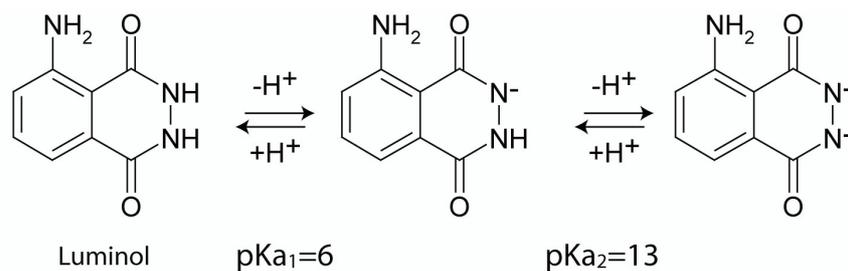
Connu depuis 1929 (Harvey, 1929), l'électrochimiluminescence du luminol n'a été pratiquement pas étudiée jusqu'aux années 60, lorsque quelques auteurs (Kuwana, 1963; Epstein *et al.*, 1967) se sont penchés sur le mécanisme impliqué dans l'oxydation électrochimique du luminol conduisant à l'émission de lumière.

En 1992, Sakura (Sakura, 1992) propose un mécanisme détaillant la réaction d'électrochimiluminescence du luminol en présence de peroxyde d'hydrogène et conduisant à l'émission de lumière. Le mécanisme proposé diffère selon le pH du milieu, mais aussi selon le potentiel appliqué (figure 21). Le mécanisme dans son ensemble est comparable à celui de la chimiluminescence catalysée par la peroxydase. Au niveau de l'électrode, le luminol est oxydé (perte d'un seul électron) en diazaquinone, qui réagit ensuite avec un oxydant pour aboutir au 3-aminophthalate dans un état excité. Lorsque le potentiel utilisé est supérieur à + 500 mV, la diazaquinone va être oxydée une seconde fois (de nouveau perte d'un électron) au niveau de sa fonction amine. Le dérivé oxydé ainsi produit réagira alors avec un oxydant pour donner un dérivé oxydé de l'aminophthalate dans un état excité. Suivant le potentiel utilisé, la nature de l'oxydant sera différente, ce sera le peroxyde d'hydrogène pour des potentiels inférieurs à + 1 V et, pour des valeurs de potentiel proches de + 1 V, ce sera le peroxyde d'hydrogène sous une forme oxydée (superoxyde).

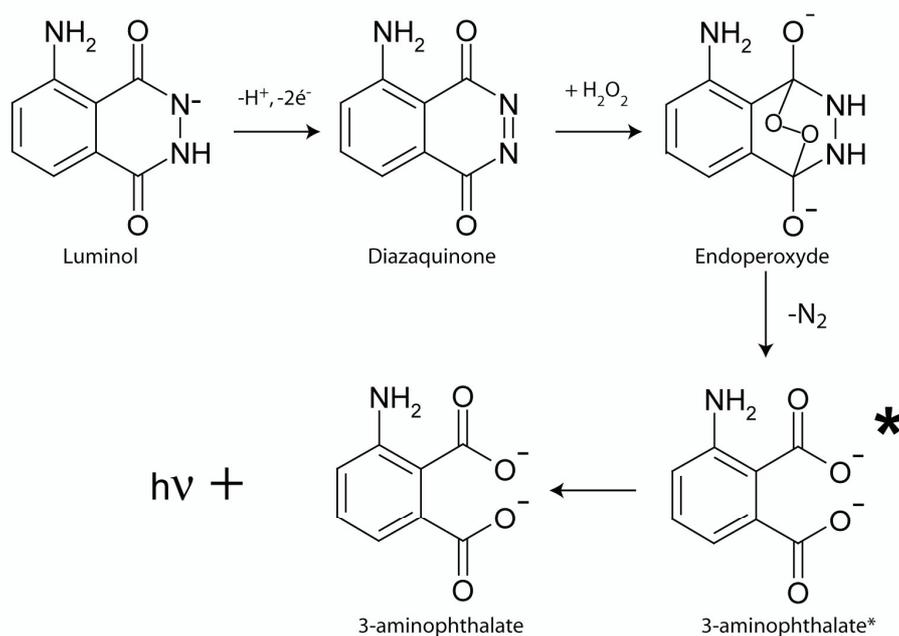
En effet, le peroxyde d'hydrogène est oxydé au niveau des électrodes de carbone pour des potentiels élevés. Au-delà de + 1 V, celui-ci réagit donc sous une forme superoxyde ( $O_2^-$ ). Ces variations de degré d'oxydation des espèces réactives avec le potentiel ne sont possibles qu'en utilisant une électrode de carbone. En effet, les potentiels d'oxydation du luminol et de l' $H_2O_2$  sont très différents au niveau de ces électrodes alors qu'ils sont proches lorsque l'électrode utilisée est une électrode de platine.

Le peroxyde d'hydrogène étant un co-réactif de la réaction d'ECL du luminol, ce système permet de détecter sensiblement l' $H_2O_2$  à des concentrations aussi faibles que 66 pM (Sakura, 1992). Pour cela le luminol est oxydé à un potentiel de + 700 mV vs SCE à la surface d'une électrode de carbone vitreux.

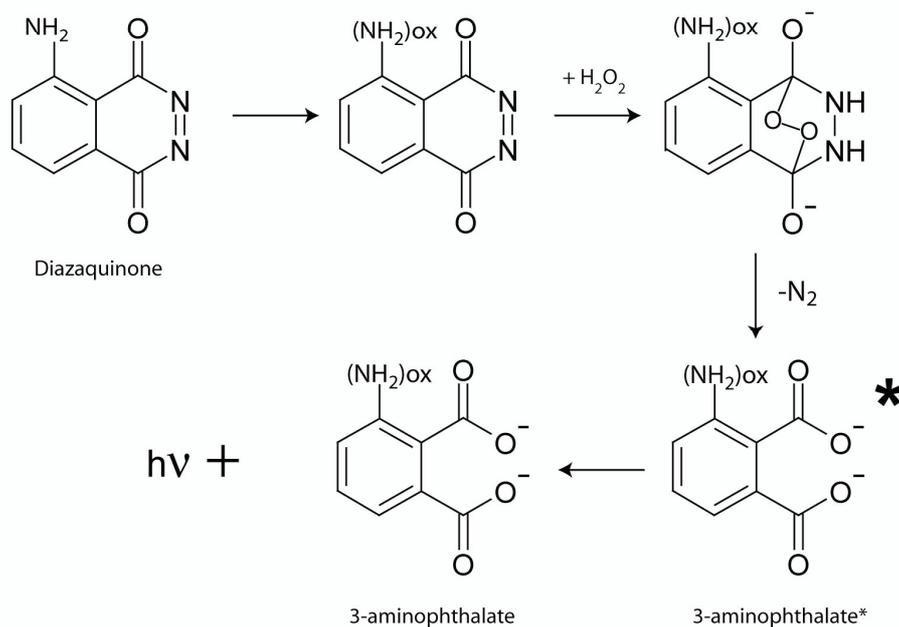
Les utilisations analytiques de l'électrochimiluminescence du luminol sont assez peu nombreuses. On trouve néanmoins quelques systèmes intéressants mettant en jeu l'ECL du couple luminol/ $H_2O_2$ . Un des systèmes de biopuces électrochimiluminescentes le mieux représenté, est un système utilisé afin de détecter l' $H_2O_2$  produit enzymatiquement à la surface d'une plaque de carbone vitreux. Ainsi, six oxydases spécifiques de six métabolites (dont cinq sanguins) ont été immobilisées par adsorption sur des billes elle-même piégées dans des dépôts de photopolymère (Marquette *et al.*, 2003b). Il en résulte une biopuce à détection électrochimiluminescente permettant de détecter spécifiquement les substrats de ces oxydases, de manière concomitante grâce à une caméra CCD.



Potentiel inférieur à + 500 mV :

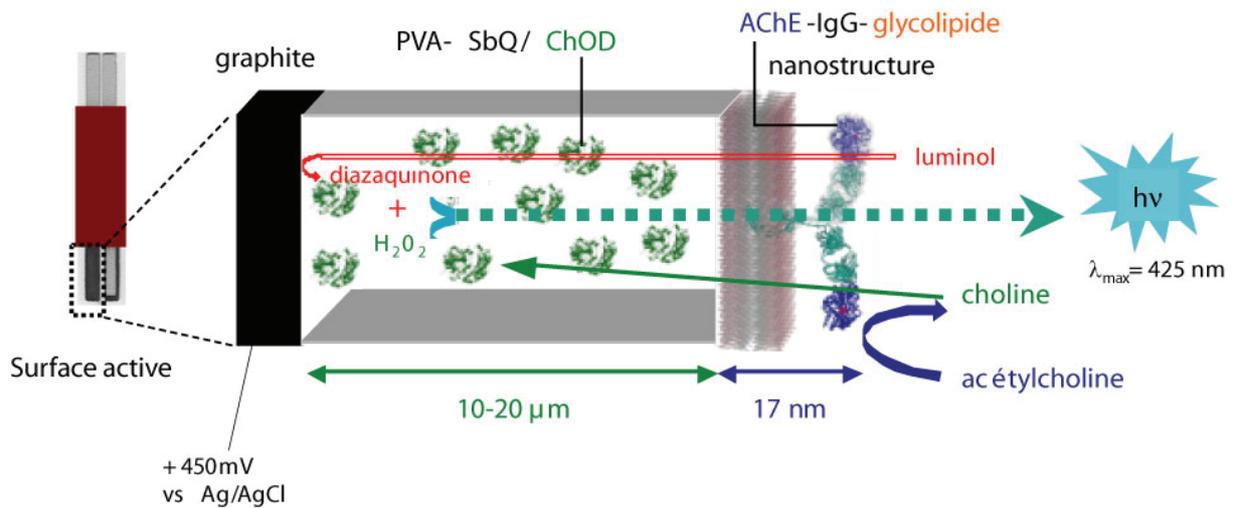


Potentiel supérieur à + 500 mV :



**Figure 21.** Schéma réactionnel général de l'électrochimiluminescence du luminol. D'après (Sakura, 1992).

(Godoy *et al.*, 2005) ont également démontré la possibilité d'utiliser l'ECL au sein d'une architecture élaborée de biocapteur pour la détection d'acétylcholine. Ce système se compose d'une membrane de taille nanométrique composée de glycolipides et d'un anticorps monoclonal, utilisés pour l'immobilisation de l'acétylcholinestérase, et d'un polymère synthétique pour l'immobilisation de la choline oxydase (figure 22).



**Figure 22.** Représentation schématique du principe de fonctionnement du biocapteur à acétylcholine utilisant une membrane lipidique, à la surface d'une électrode sérigraphiée. AChE : acétylcholinestérase ; ChOD : choline oxydase. D'après (Godoy *et al.*, 2005)

L'ECL du luminol a également été utilisée sur un support conducteur composé d'un mélange graphite/PDMS (Marquette *et al.*, 2004). Des anticorps humains (IgG) et des oligonucléotides ont été immobilisés sur des billes de Sepharose, et celles-ci ont été agencées sous forme de plots sur ce matériau élastomérique. Les révélations ont été effectuées avec des molécules marquées par la glucose oxydase, permettant de produire de l' $H_2O_2$  en présence de glucose, et ainsi d'initier l'ECL du luminol.

La chimiluminescence et l'électrochimiluminescence du luminol sont des méthodes de détections intéressantes comme alternatives aux méthodes fluorescentes qui sont très majoritairement employées dans le domaine des biopuces, mais qui ne permettent pas toujours une quantification aisée des molécules détectées (Marquette *et al.*, 2006a).

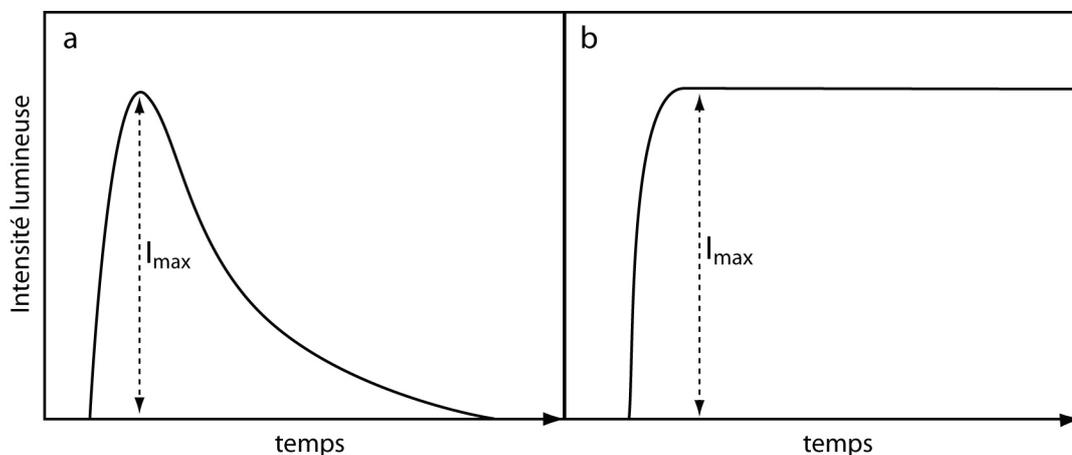
### d. Sensibilité et spécificité des détections de lumière

La sensibilité dépend essentiellement de quatre facteurs : le rendement quantique de la réaction d'émission de lumière, la vitesse de la réaction, la sensibilité du détecteur et le bruit de fond de la méthode.

Le rendement quantique ( $\Phi$  ; compris entre 0-1) des luminophores est le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de molécules de luminophore ayant réagi. Chaque luminophore a son propre rendement quantique et celui-ci varie en fonction de l'environnement (pH, concentration, force ionique, polarité du solvant). Pour les fluorophores,  $\Phi$  est le rapport entre le nombre de photons absorbés et le nombre de photons émis. Ce rendement est fort pour la fluorescence, mais le bruit de fond de cette méthode est élevé.

Ainsi, la sensibilité des mesures de bio- et chimiluminescence est en générale plus élevée que celle des techniques fluorimétriques, à cause notamment de leur bruit de fond plus élevé.

### e. Le signal lumineux



**Figure 23.** Différents types de signaux lumineux : a) signal "flash", b) signal persistant.

Chaque réaction de bio- ou chimi-luminescence présente *in vitro* une cinétique caractéristique d'émission de lumière qui dépend d'une part de la nature des molécules réactives et d'autre part du milieu réactionnel. Quel que soit la réaction considérée, le signal augmente rapidement pour atteindre sa valeur maximale ( $I_{\max}$ ), puis soit se stabilise, soit décroît rapidement de manière exponentiel, c'est le type "flash lumineux" (figure 23). Il est plus

approprié de mesurer des signaux luminescents dits persistants afin de réaliser des détections sur biopuces. En effet, cela permet de fixer le temps de mesure de façon à collecter un maximum de signal.

## f. Mesure de lumière

Quel que soit le mode de détection optique employé, le détecteur doit satisfaire des critères essentiels :

- être capable de détecter aussi bien une intensité de quelques photons par seconde qu'une intensité de plusieurs millions de photons par seconde.

- produire dans toute sa gamme de sensibilité un signal électrique directement proportionnel à l'intensité du flux ou à la quantité de photon arrivant sur celui-ci.

- être sensible dans une gamme de longueur d'onde la plus large possible.

- dans le cas d'un capteur CCD (Charged Couple Device), il doit également procurer une résolution spatiale du signal suffisante pour distinguer clairement les différents plots arrangés sur un support.

Dans le cas des caméras CCD, afin de détecter des phénomènes luminescents de faible intensité, il est nécessaire d'utiliser un temps d'intégration relativement "long", de l'ordre de 1 à 10 minutes. Or, l'effet de l'augmentation de température générée par les capteurs CCD lors de cette mesure produit un fort signal parasite, correspondant à du bruit de fond (De Ruijter, 1995). Ainsi lors de mesure de phénomènes luminescents dits "lents", il est nécessaire de refroidir efficacement l'ensemble des capteurs afin de diminuer au maximum le signal parasite généré par la chaleur. Ceci est couramment obtenu en mettant en contact direct le capteur CCD avec un élément Peltier qui draine la chaleur hors du capteur et permet dans certains cas d'abaisser sa température à  $-40^{\circ}\text{C}$ . Ce système peut également être couplé à un circuit de refroidissement liquide afin d'augmenter son efficacité, jusqu'à abaisser le capteur CCD à des températures de l'ordre de  $-100^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Méthodes électrochimiques

### a. Ampérométrie

Cette méthode, largement utilisée pour développer des biocapteurs lors des trente dernières années, est moins utilisée pour la réalisation de biopuces. En effet, La détection ampérométrique de multiples composés grâce à une biopuce nécessite l'utilisation d'un réseau d'électrodes ou de microélectrodes, et doit éviter les éventuelles problèmes d'interférences entre celles-ci.

Néanmoins, (Madaras *et al.*, 1996) ont mis au point un biocapteur miniaturisé ( $\varnothing = 1$  mm) afin de détecter la créatine et la créatinine. Pour cela ils immobilisent les enzymes (créatine amidinohydrolase et sarcosine oxydase, créatinine amidohydrolase) par couplage covalent à la surface d'électrode de platine. Mais afin de rendre possible ces mesures dans le sérum, des membranes d'acétate de cellulose et de polyuréthane ont été utilisées dans le but de réduire le signal électrochimique généré par les constituants du sérum.

(Sapelnikova *et al.*, 2003) ont mis en œuvre des enzymes piégées dans un gel, sur un réseau d'électrodes de platine ou d'or sérigraphiées ( $\varnothing = 1$  mm) afin de réaliser des détections ampérométriques des dérivés phénoliques. Le gel est notamment composé de poly-imidazol-vinyl-osmium, améliorant les transferts électroniques vers l'électrode, et permettant ainsi de détecter et de doser des composés comme le catéchol ou le phénol, avec des limites de détection de  $3 \mu\text{M}$ .

Techniquement, ces méthodes sont assez simples à mettre en œuvre puisqu'elles ne nécessitent pas de lourd appareillage de détection. Néanmoins, leur inconvénient majeur est que ces mesures d'ampérométrie sont sujettes aux interférences engendrées par la présence de nombreuses molécules électroactives (acide urique, urée, sels...). Celles-ci peuvent être présentes dans les milieux complexes tels que le sérum ou les fluides biologiques, et plus généralement les échantillons naturels. Ces problèmes d'interférence peuvent être partiellement résolus par l'utilisation de médiateurs d'oxydoréduction tels que le ferrocène, le ferricyanure ou certaines quinones (Blum *et al.*, 1991) qui permettent d'abaisser le potentiel de travail.

Néanmoins, ces méthodes ne sont pour l'instant pas transposées à la mise au point de biopuces.

## b. Impédance

Par définition, l'impédance électrique mesure l'opposition d'un circuit électrique au passage d'un courant alternatif sinusoïdal. Le concept d'impédance est une généralisation de la loi d'ohm dans l'étude des circuits en courant alternatif. Cette méthode de détection repose sur les mesures des propriétés diélectriques à l'interface électrode/solution. Les modifications de la surface et/ou la présence de molécules sur celle-ci influencent les mesures d'impédance.

Ainsi, il a été montré que les interactions antigènes/anticorps à la surface d'une électrode recouverte d'un électropolymère (polypyrrole) pouvaient modifier cette propriété électrochimique, et ainsi être détectées (Sargent *et al.*, 1999). Cette méthode présente l'avantage de pouvoir fonctionner sans marquage préalable des molécules détectées.

L'impédance est présentée comme une alternative plus simple et moins onéreuse à mettre en œuvre par rapport aux détections ELISA ou radio-immunologiques. Néanmoins elle s'avère moins efficace pour des dosages quantitatifs (Darain *et al.*, 2004). Le premier système de détection reposant sur des mesures d'impédance a été élaboré afin de détecter l'hybridation entre des sondes oligonucléotidiques immobilisées et des oligonucléotides dans l'échantillon (Souteyrand *et al.*, 1997). Cette technique a également permis de mesurer en temps réel des phénomènes d'hybridation/dénaturation (Marquette *et al.*, 2002). Plus tard, (Marquette *et al.*, 2006b) ont pu détecter et quantifier des oligonucléotides (de 1 à 200 nM), toujours sans marquage préalable des séquences complémentaires. Pour cela, les brins sondes étaient alors greffés covalamment par couplage chimique impliquant un carbodiimide sur un réseau d'électrodes sérigraphié. Une étude récente montre qu'il est possible d'amplifier les variations d'impédance (160 %) en utilisant des sondes nucléiques marquées par rapport aux sondes seules. La phosphatase alcaline, utilisée comme marqueur, permet de produire un composé insoluble se déposant à la surface de l'électrode, et augmentant les variations de signal lors des mesures d'impédance (Ma *et al.*, 2006).

## 3. Radiographie

Dans le cas de la détection par radiographie, la radioactivité émise est mesurée et quantifiée. Cette méthode, assez sensible, est rarement transposée sur les biopuces compte tenu des contraintes liées à l'utilisation de matériel radioactif. Cependant, (Zhu *et al.*, 2000) l'ont utilisé pour cribler l'activité de 119 kinases de *Saccharomyces cerevisiae*, en utilisant pour cela de l'ATP- $\gamma$ -P<sup>33</sup>. Les auteurs ont notamment immobilisé 17 peptides, potentiellement substrats de ces kinases, sur un support en PDMS par couplage covalent. Ils ont ainsi pu

détecter par autoradiographie les groupements phosphates transférés et déterminer quels sont les substrats respectifs des différentes kinases testées.

## 4. Méthodes sans marquage

### a. Mesures de variation de masse

#### i) Microbalance piézo-électrique

Ce mode de détection est basé sur les variations de fréquence de résonance d'un cristal piézo-électrique en fonction de la masse présente à sa surface. En théorie, il est possible de détecter des variations de masse de l'ordre du picogramme. Il a été montré que cela permettait de détecter et de quantifier des interactions antigène/anticorps, au sein de solution protéiques complexes (Tajima *et al.*, 1998; Liss *et al.*, 2002; Murata *et al.*, 2003).

#### ii) Microlevier

D'autre part, des techniques utilisant des microleviers, similaires à ceux utilisés pour l'AFM, peuvent être employées pour détecter des interactions. C'est par une méthode de mesure de la déflexion d'un microlevier sur lequel est immobilisée de la glucose oxydase que (Pei *et al.*, 2004) ont pu quantifier du  $\beta$ -D-glucose en solution. Ils mesurent la variation de courbure du microlevier due à la présence de glucose en solution à l'aide d'un faisceau laser couplé à un détecteur optique sensible aux variations de distance.

### b. Microscopie à force atomique (AFM)

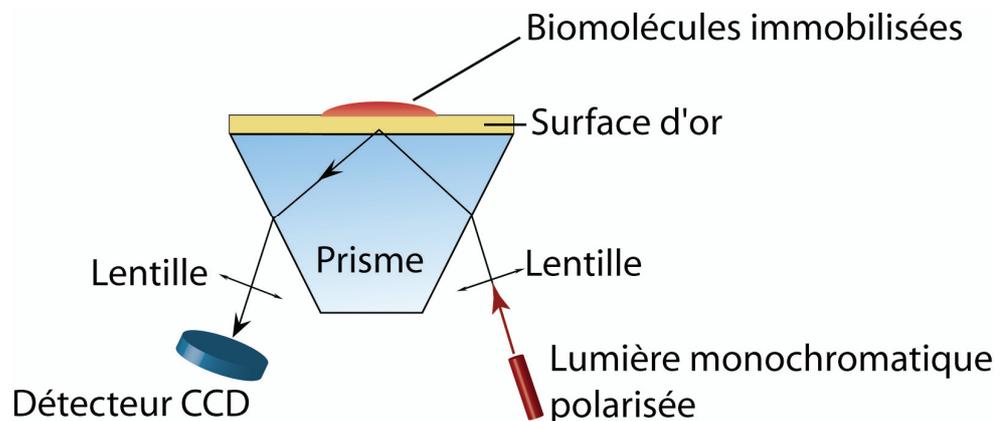
L'AFM, à l'origine utilisée afin de visualiser avec précision la topographie d'une surface, n'est que très peu employée dans le domaine des biopuces. Cette méthode procure une résolution de l'ordre de 0,4 nm pour les molécules organiques présentes sur des surfaces d'or (Green *et al.*, 1995). Cette technique est très largement utilisée pour topographier des surfaces, dans un but expérimental, mais il est également possible d'utiliser l'AFM pour réaliser des détections d'interactions spécifiques sur un support. Ainsi, des interactions antigènes/anticorps ont été mises en évidence par AFM, après avoir immobilisé des IgG de lapin covalamment sur une surface d'or (Jones *et al.*, 1998). Les auteurs ont détecté les variations de hauteur générées suite aux interactions. Cette méthode est d'un point de vue spatiale très résolutive (de

quelques nanomètres), et est présentée comme compatible pour l'analyse de surfaces comportant des plots de biomolécules agencées. Ainsi, l'AFM permettrait d'analyser environ 200 dépôts individuels différents disposés sur  $100 \mu\text{m}^2$  en moins de 5 minutes, cela laisse envisager, selon (Jones *et al.*, 1998), la réalisation de diagnostics immunologiques complets en un minimum de temps.

### c. Résonance des plasmons de surface (SPR)

Le principe physique de la résonance des plasmons de surface fut décrit pour la première fois il y a 40 ans par (Kretschmann *et al.*, 1968). De nos jours, cette technique de détection se présente comme très intéressante puisqu'elle autorise la mesure et le suivi en temps réel d'évènements de reconnaissance moléculaire sans utiliser de méthode de marquage (Boozer *et al.*, 2006).

Cette technique repose sur la génération d'un champ électromagnétique à la surface d'un conducteur métallique grâce à un faisceau lumineux incident. Un faisceau de lumière polarisée de longueur d'onde fixe irradie le support, générant ainsi des ondes électromagnétiques à l'intérieur ou en surface du métal. L'intensité lumineuse réfléchie dépend alors des propriétés diélectriques du milieu adjacent à cette surface (figure 24).



**Figure 24.** Schéma de principe de mesure par SPR.

Les interactions avec des molécules immobilisées à la surface de l'or modifient ces propriétés et peuvent ainsi être étudiées (<http://www.biocore.com/technology>). La SPR permet non seulement de détecter d'éventuelles interactions, mais aussi et surtout d'en étudier la cinétique et donc de déterminer les constantes d'affinité des espèces mises en jeu. Il est également

possible d'étudier la stœchiométrie des interactions entre, par exemple, un récepteur et son ligand : la leptine et son récepteur membranaire (Mistrik *et al.*, 2004).

D'autre part, l'émergence de techniques d'imagerie par SPR (SPRi) (Rothenhausler *et al.*, 1988), ouvre les champs d'investigation de détections multiples sur des supports au format biopuce. En effet, des systèmes de mesure par SPRi ont été récemment développés (<http://www.genoptics-spr.com>; ou FlexChip [www.biocore.com](http://www.biocore.com)), et se montrent très prometteurs au regard de leurs performances et de leur rapidité de mesure. Dans ce cas, le détecteur employé est un capteur CCD et les signaux sont recueillis et traités pour chaque zone/plot du support. Les résultats peuvent alors être représentés sous forme d'image, dont les variations du contraste représentent les variations de la quantité de matière interagissant à la surface du support.





# Chapitre IV.

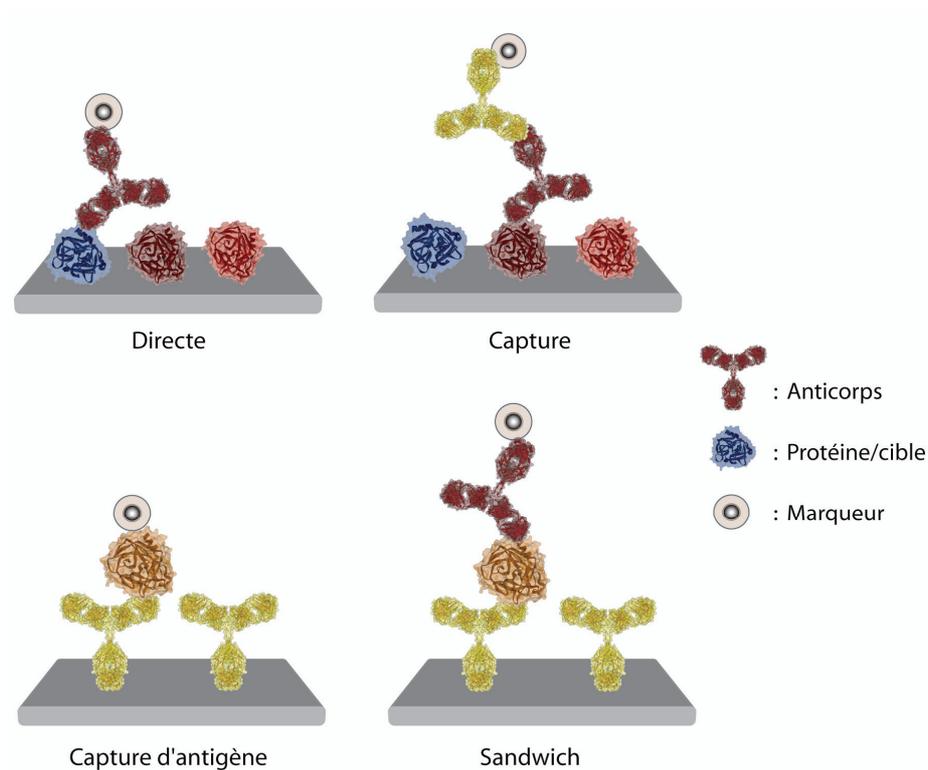
## Les différents types de biopuces à protéines

### 1. Biopuces à biorécepteur non-catalytique

Ces biopuces représentent la majorité des biopuces à protéines existantes. Elles visent à détecter et/ou quantifier des protéines présentes dans des échantillons complexes en utilisant les propriétés spécifiques d'affinité des interactions biomoléculaires.

Parmi les biopuces impliquant des interactions non-catalytiques, on distingue notamment la famille des immunopuces, qui regroupe toutes les biopuces dont le principe fait appel aux interactions anticorps/antigènes. Les différents types d'architecture biomoléculaire impliquant les propriétés de reconnaissance des anticorps sont présentés en figure 25. A noter que le principe de capture d'antigène est fréquemment utilisé par compétition avec les molécules en solution à détecter.

La détection de protéines dans un milieu complexe grâce à un anticorps est une méthode de choix, mais la difficulté principale de cette technique est d'obtenir des anticorps en quantité suffisante et avec une spécificité satisfaisante vis-à-vis d'un antigène. En effet, ce problème est soulevé par (Haab *et al.*, 2001) qui ont étudiés 115 interactions antigènes/anticorps connues sur une seule biopuce. Les auteurs ont observés que seulement dans 30% des cas, une relation de linéarité entre la concentration d'anticorps ou d'antigène présent et le signal mesuré était obtenue. Cela met également en évidence le problème des interactions croisées qui ont lieu sur les immunopuces. Néanmoins, (Sreekumar *et al.*, 2001) ont pu utiliser une biopuce comportant 146 anticorps différents immobilisés, dirigés contre des protéines jouant un rôle important dans la régulation cellulaire. Ils comparent la fluorescence émise par les protéines de l'échantillon (marquées Cy-3) par rapport à celle d'un échantillon de référence (marquées Cy-5). Ce système leur permet ainsi de contrôler simultanément le niveau d'expression des différents éléments régulateurs de cellules cancéreuses.



**Figure 25.** Stratégies de détection pour les immunopuces, pouvant impliquer des molécules marquées. Détection directe, de type capture ou sandwich. D'après (MacBeath, 2002).

Le problème de la spécificité d'un anticorps, qui n'est jamais totalement exclusive vis-à-vis d'un antigène, peut être contourné en utilisant la méthode "sandwich" (figure 25), qui consiste à immobiliser un anticorps, puis à utiliser un second anticorps spécifique pour la détection de l'interaction (Mendoza *et al.*, 1999). Un autre avantage de cette méthode est qu'elle permet de détecter un antigène sans l'immobiliser ou le modifier chimiquement pour le marquer. Afin d'exploiter au mieux ce procédé, il est nécessaire d'obtenir deux anticorps monoclonaux spécifiques de deux régions bien distinctes de l'antigène recherché.

Ce type de biopuces offre un fort potentiel dans le cadre de recherche en protéomique. Ainsi, (Zhu *et al.*, 2001) ont démontré la possibilité d'étudier un protéome entier sur une biopuce. Pour cela, ils ont cloné 94% des protéines de *Saccharomyces cerevisiae*, les ont purifiées et marquées avec une queue composée de 6 histidines. Ils ont ainsi pu les immobiliser par affinité sur un support en verre comportant des fonctions chélatantes (Ni-NTA). Dès lors, il leur a été possible d'étudier les interactions de ces protéines avec des éléments liés à la signalisation cellulaire comme la calmoduline, des phosphatidylinositols, ou des lipides.

## 2. Biopuces enzymatiques

Par opposition aux biopuces s'appuyant sur des biorécepteurs non-catalytiques, nous distinguons les biopuces enzymatiques, dont les réactions catalysées par les enzymes immobilisées sont les éléments clés de leur système de détection.

Ces biopuces sont utilisées dans le domaine de la recherche, notamment pour étudier les caractéristiques cinétiques ou de spécificité des enzymes. Par exemple, c'est dans ce but que différents substrats d'une kinase ont été immobilisés sur une surface en or, et l'activité catalytique de ces enzymes caractérisée de manière quantitative en fonction des différents substrats. L'effet de plusieurs inhibiteurs a également été testé. Trois méthodes de détection ont permis de corréliser ces résultats : fluorescence, SPR, et radiographie du P<sup>32</sup> (Houseman *et al.*, 2002). De la même manière, les activités de 119 kinases de *Saccharomyces cerevisiae* ont été étudiées en immobilisant les substrats potentiels de celles-ci sur une biopuce (Zhu *et al.*, 2000). (cf. radiographie, Chap. III § 3, p42).

Néanmoins, une large majorité des biopuces à enzymes a une fonction de diagnostic. Ces biopuces sont utilisées en tant qu'instruments de mesure simultanée de certains métabolites importants, comme le glucose, le lactate, le cholestérol, l'acide urique, présents dans les liquides physiologiques. Pour cette catégorie de biopuces il est primordial de conserver un maximum d'activité catalytique des enzymes immobilisées. Ces biopuces sont, dans la plupart des cas, l'objet de détections ampérométriques (de Prada *et al.*, 2004; Schoning *et al.*, 2005; Solná *et al.*, 2005) ou électrochimiluminescentes (Marquette *et al.*, 1999; Marquette *et al.*, 2003a; Marquette *et al.*, 2003b). A titre de comparaison, le tableau 1 présente les principales caractéristiques de quelques systèmes (biocapteurs et biopuces) décrit pour le dosage de glucose ou de lactate.

**Tableau 1.** Exemples de biocapteurs/biopuces enzymatiques pour le dosage de glucose et/ou lactate.

Support/ immobilisation	Méthode de détection/transduction	Gamme Dynamique (mM)	Références
Pontage covalent dans glutaraldéhyde	God + médiateur, ampérométrie	Glc: 0,1 à 5	Lupu <i>et al.</i> , 2004
Enzyme piégée dans résine + graphite	God, ampérométrie	Glc: 0,5 à 10	Alvarez-Romero <i>et al.</i> , 2004
Carbone vitreux Nanotubes + crosslinker	God + médiateur, ampérométrie	Glc: 2 à 20	Joshi <i>et al.</i> , 2005
Piégeage dans un électropolymère	God, ΔpH induit Δconductivité	Glc: 10 à 50	Sangodkar <i>et al.</i> , 1996
Pontage sur platine activé (oxydation)	God, ampérométrie	Glc: 1 à 40	Zhu <i>et al.</i> , 1994
Enzyme dans CMC, sur électrodes sérigraphiées	God + médiateur, ampérométrie	Glc: 1 à 20	Ohfuji <i>et al.</i> , 2004
Fixation sur verre silanisé + glutaraldéhyde	God+HRP, Chimiluminescence	Glc: $5 \cdot 10^{-3}$ à 1	Kasai <i>et al.</i> , 2002
Séparation électrophorétique	God et Lod, ampérométrie,	Glc et Lac : 0,1 à 0,5	Wang <i>et al.</i> , 2007
Liaison covalente orienté (avec les thiols)	Bacterial Glc/Gal binding protein SPR	Glc: 1 à 30	Hsieh <i>et al.</i> , 2004
Piégeage entre membrane et électrode sérigraphiée	God + médiateur, ampérométrie	Glc: 1 à 100	Sato <i>et al.</i> , 2006
Co-réticulation BSA + glutaraldéhyde	God, microbalance piezzo- électrique	Glc: 3 à 15	Pei <i>et al.</i> , 2004
Piégeage dans un hydrogel: Poly(carbamoyl) sulphonate	LDH + Pyod, ampérométrie	Lac: 0,01 à 0,4	Kwan <i>et al.</i> , 2004
Rétention dans films de poly(aniline)	LDH, ampérométrie	Lac: 0,05 à 0,6	Halliwell <i>et al.</i> , 2002
Co-réticulation: BSA, glutaraldéhyde, polypyrrole	God et Lod, ampérométrie	Glc: 0,5 à 10 Lac: 0,5 à 10	Palmisano <i>et al.</i> , 2000
Hydrogel photo-adressable	God et Lod, ampérométrie	Glc: 0,1 à 35 Lac: 0,05 à 15	Moser <i>et al.</i> , 2004
Rétention dans photopolymère: PVA-SbQ	God et Lod, ampérométrie	Glc: 0,5 à 20 Lac: 0,5 à 10	Pedromo <i>et al.</i> , 2000
Rétention dans un électropolymère	God+médiateur, ampérométrie	Glc: 0,05 à 4 Lac: 0,01 à 0,3	Badea <i>et al.</i> , 2003
Sur membranes de polyamide et collagène	God et Lod ECL du couple H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Luminol	Glc: $2,3 \cdot 10^{-3}$ à 10 Lac: $0,6 \cdot 10^{-3}$ à 1,1	Marquette and Blum, 1999
Enzymes + micro-billes, dans photopolymère	God et Lod ECL du couple H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Luminol	Glc: 0,02 à 2 Lac: 0,002 à 0,2	Marquette <i>et al.</i> , 2003a





---

**MATERIELS**

**ET**

**METHODES**

---



# I. MATÉRIELS

## 1. Instrumentations

Appareillage à sérigraphie, DEK 248.....	DEK
Caméra CCD refroidie à -30°C, LAS-1000 plus.....	FUJIFILM
Colonne Sephadex™ G-25 M.....	AMERSHAM BIOSCIENCES
ITO, film d'oxyde d'indium sur plaque de verre (8-12 Ohms).....	SIGMA
Lampe UV.....	CAMAG
Luminomètre lecteur de plaque 96, Luminoskan.....	LABSYSTEMS
Microfiltres, Microcon YM-30.....	MILLIPORE
Multi-Potentiostat équipé de 3 voix bas-courant, VMP3.....	BIOLOGIC
Microscope optique.....	ZEISS
Microscope à force atomique, Solver-Pro.....	NT-MDT
Potentiostat, Voltalab PGZ 301.....	RADIOMETER ANALYTICAL
Prismes SPRi, recouverts d'or (50 nm).....	GENOPTICS
Appareillage à SPR: SPRi-Plex.....	GENOPTICS
Silicium monocristallin (111), 1 cm <sup>2</sup> (dopés : N-Phos) R=5-10 Ohm.cm.....	GOODFELLOW
Sonde électrochimique combiné (Pt vs-Pt).....	INCELTECH-SGI
Spectroscopie des rayons X, ESCALAB.....	VG SCIENTIFIC
Spectroscopie des rayons X, AXIS Ultra DLD.....	KRATOS
Spectrophotomètre, UVIKON 942.....	UVIKON
"Spotter", Biochip Arrayer BCA1.....	PERKIN ELMER

## 2. Logiciels

Apimager EL 3.....	APIBIO
DEK Align 4.....	DEK
Ec-Lab 9.24.....	BIOLOGIC
Image Gauge 4.0.....	FUJIFILM
Luminoskan Acent 2.4.....	LABSYSTEMS
Voltmaster 4.....	RADIOMETER ANALYTICAL
SPRi 1000.....	GENOPTICS

## 3. Réactifs

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique acide) (ABTS).....	BOEHRINGER
HAuClO <sub>4</sub> (3H <sub>2</sub> O).....	SIGMA
4-aminobenzylamine.....	SIGMA
4-bromophenyldiazonium tetrafluoroborate.....	SIGMA
4-carboxymethylaniline.....	SIGMA
Choline, sel de chlorure.....	SIGMA
D-(+)-glucose, anhydre.....	SIGMA

Diméthylsulfoxyde.....	ROTH
Diéthylmalonylurée sodée (Véronal).....	PROLABO
Encre de carbone, Electrodag 423 SS.....	ACHESON
Encre isolante, Minico M 7000.....	ACHESON
Film transparent pour imprimante laser, CG 3360.....	3M
Film transparent pour imprimante laser, TC1.....	KORES
Hexaferrocyanate $K_3Fe(CN)_6^{(III)}$ de potassium.....	SIGMA
Hexaferrocyanate $K_3Fe(CN)_6^{(II)}$ , $3H_2O$ de potassium.....	PROLABO
$H_2O_2$ 30%.....	PROLABO
L-(+)-acide lactique, sel de lithium.....	SIGMA
Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione).....	SIGMA
NaCl.....	PROLABO
N-hydroxysuccinimide.....	SIGMA
N-N'-dicyclohexylcarbodiimide.....	SIGMA
Nitrite de sodium.....	PROLABO
4-nitrobenzène diazonium tétrafluoroborate.....	ACROS ORGANICS
Para-iodophénol.....	SIGMA
Polyoxyéthylènesorbitan monolaureate (tween 20).....	SIGMA
PVA-SbQ: Poly(vinyl alcool)-styrylpyridinium degré de polymérisation 2300, degré de saponification 88, SbQ :1.06%, contenu solide 11%, pH 6.2.....	TOYO GOSEI KOGYO
Sérum de calibration humain reconstitué "normal" (Lyotrol N).....	BIOMERIEUX
Sérum de calibration humain reconstitué "pathologique" (Lyotrol P).....	BIOMERIEUX
Sérum humains contenant diverses fractions de facteur rhumatoïde.....	LIFE LINE LAB

### i) Enzymes, protéines et acides nucléiques

Albumine de sérum bovin (BSA).....	SIGMA
Choline oxydase extraite d' <i>Alcaligenes Species</i> . E.C.1.1.3.17.....	SIGMA
Glucose oxydase extraite d' <i>Aspergillus Niger</i> . E.C.1.1.3.4.....	BOEHRINGER
Immunoglobulines de type G (extraite de serum de lapin).....	LIFE LINE LAB
Immunoglobulines de type G (extraite de serum humain).....	SIGMA
Anticorps polyclonaux dirigés contre les IgG de lapin, marqués par la peroxydase, et développés chez la chèvre.....	SIGMA
Anticorps polyclonaux dirigés contre les Ig(A,E et M) humain, marqués à la peroxydase et développés chez la chèvre.....	JACKSON-IMMUNORESEARCH
Lactate oxydase extraite de <i>Pediococcus species</i> .E.C.1.1.3.x.....	SIGMA
Séquence sonde d'oligonucléotide (TTG AGG TGC ATG TTT GTG CC), modifiée en son extrémité 5' par le 4-aminobenzylamine.....	EUROGENTEC
Séquence cible d'oligonucléotide (GG CAC AAA CAT GCA CCT CAA), biotinylée en son extrémité 5'.....	EUROGENTEC

### ii) Tampons et solution

-VBS (*Veronal Buffer Saline*) : tampon veronal 30 mM, NaCl 0,2 M, pH 8,5.

-VBST (*Veronal Buffer Saline Tween*) : tampon veronal 30 mM, NaCl 0,2 M, Tween 0,1 %, pH 8,5.

-VBSTA (*Veronal Buffer Saline Tween Albumin*) : tampon veronal 30 mM, NaCl 0,2 M, Tween 0,1 %, BSA 1 g/L, pH 8,5.

-Solution de mesure de la chimiluminescence catalysée par la HRP: VBS contenant 220  $\mu\text{M}$  de luminol, 20  $\mu\text{M}$  de p-iodophénol et 500  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## II. METHODES

### 1. Sérigraphie

La sérigraphie est réalisée au laboratoire à l'aide de l'appareillage DEK 248 (figure 26). Il utilise un masque tissé de fibres de polyester mono-filament, d'une taille de maille de 0,1 mm (260 *counts per inch*), et d'une épaisseur de 13  $\mu\text{m}$ . Pour sérigraphier, une pression est appliquée sur le racloir en polyuréthane lors de son passage sur le masque, poussant l'encre au travers des motifs (figure 27). L'image des ces motifs est alors reproduite sur le support PVC disposé sous le masque (figure 27. 2.). La pression sur le masque, la vitesse du racloir ainsi que la distance entre le support et le masque sont autant de paramètres à considérer qui influencent la qualité finale des puces.



Figure 26. Appareillage de sérigraphie: DEK 248.

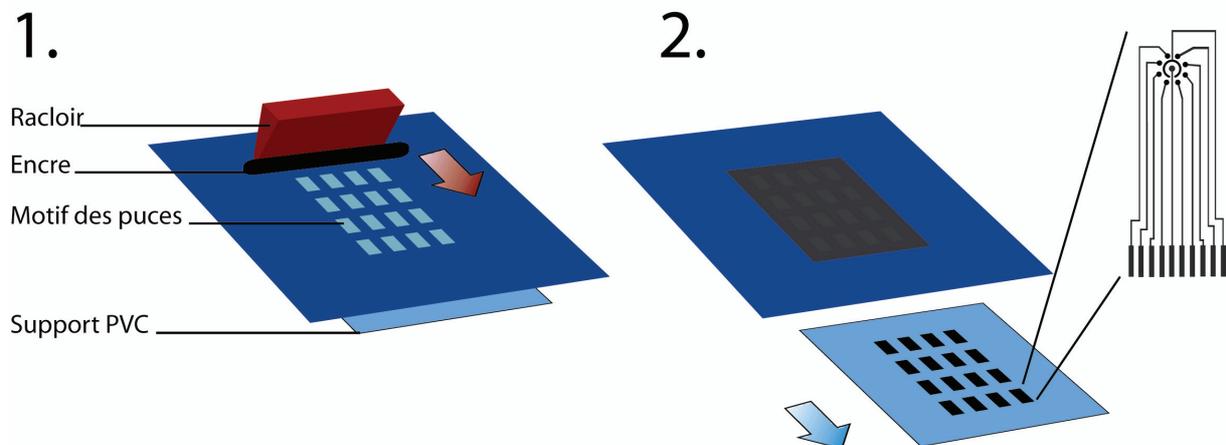
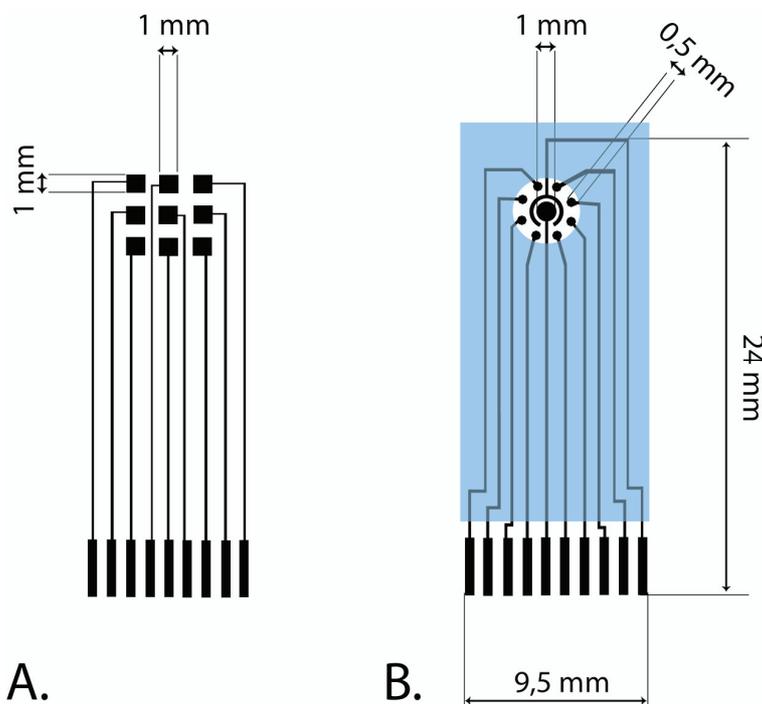


Figure 27. Principe d'impression par sérigraphie. 1) Le racloir en polyuréthane passe sur le masque et pousse l'encre au travers des motifs. 2) Support après impression, comportant 16 puces sérigraphiées.

Deux générations de réseaux d'électrodes ont été conçues et utilisées au cours de ce travail. La première comporte 9 électrodes de forme carrée et de surface identique  $1 \text{ mm}^2$  (figure 28. A.). Le second modèle possède 8 électrodes de travail d'une surface de  $0,2 \text{ mm}^2$ . Ce modèle intègre une contre électrode et une électrode de pseudo-référence, de surface équivalente à la

somme des électrodes de travail (figure 28. B.). La surimpression d'un vernis hydrophobe isolant (parti bleu) permet de délimiter une zone de travail.



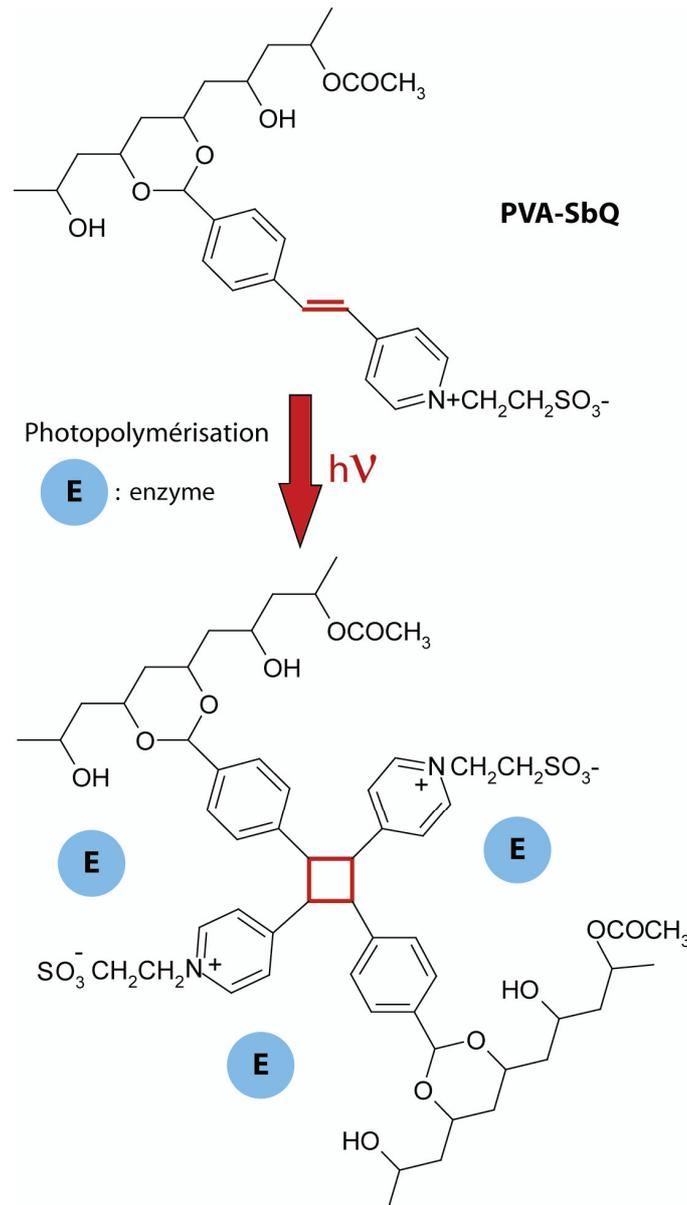
**Figure 28.** Réseaux d'électrodes de carbone sérigraphiées, appelés puces. A) Réseau comprenant 9 électrodes identiques de  $1 \text{ mm}^2$ . B) Réseau comportant 8 électrodes de travail ( $0,2 \text{ mm}^2$  chacune), une contre électrode centrale, et une électrode de pseudo-référence en forme d'anneau. En bleu, vernis isolant hydrophobe imprimé sur le carbone, lors d'une seconde étape.

L'encre de carbone utilisée (Electrodag 423 SS) est composée de particules de graphites d'environ  $1 \mu\text{m}$  de diamètre, dispersées dans un polymère conducteur thermosensible. Les supports PVC comportant les puces fraîchement sérigraphiées sont placés à l'étuve ( $100^\circ\text{C}$ , 20 minutes) afin de permettre la polymérisation et le séchage de l'encre. Pour les puces du second modèle (figure 28. B.), une couche de vernis hydrophobe isolant (Minico M7000) est sérigraphiée à l'aide d'un second masque, par-dessus les électrodes de carbone. Un système d'alignement du masque permet l'ajustement des derniers dépôts afin de délimiter précisément les zones de travail des puces. De la même manière, les supports sont cuits à  $100^\circ\text{C}$  durant 20 minutes afin de permettre la polymérisation et le séchage du vernis.

## 2. Immobilisation d'oxydases par piégeage

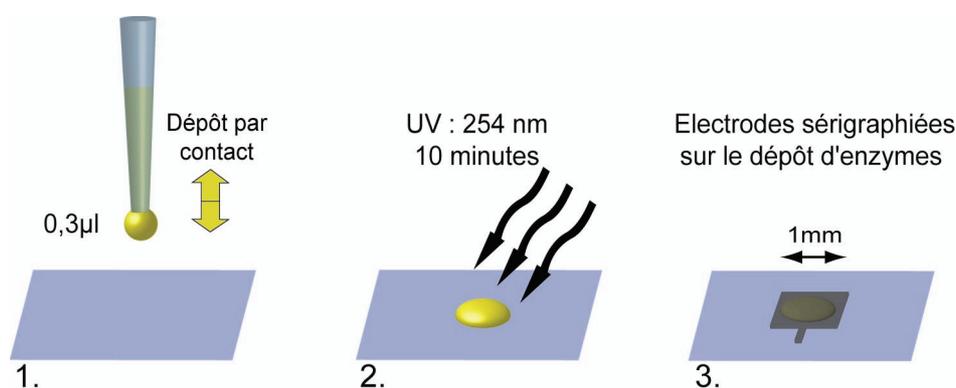
### a. Méthode manuelle

Les enzymes (glucose oxydase, lactate oxydase et choline oxydase) sont immobilisées par une méthode de piégeage/rétention dans un photopolymère, le PVA-SbQ (figure 29).



**Figure 29.** Représentation schématique de l'immobilisation d'enzymes dans le PVA-SbQ. D'après Tsafack *et al.*, (2000).

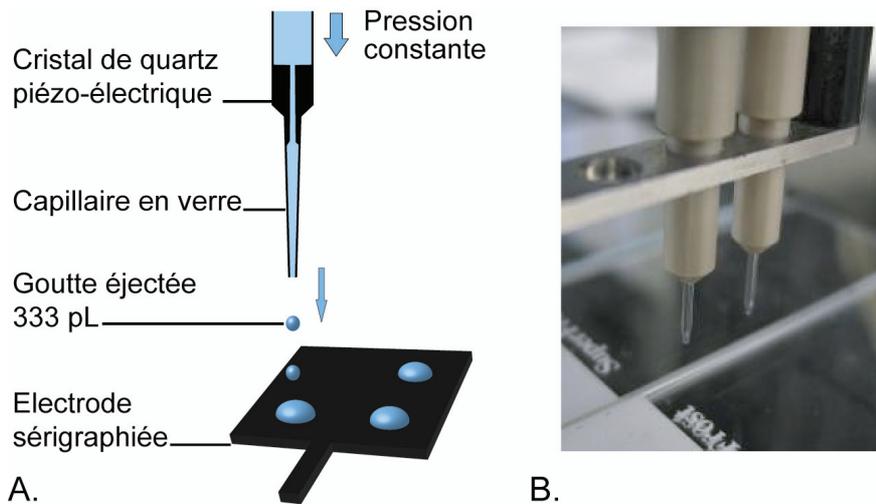
Cette méthode est basée sur le dépôt manuel de 0,3  $\mu\text{L}$  de solution enzymatique sur un support PVC (figure 30). Différentes concentrations sont utilisées selon les enzymes : respectivement, 5 mg/mL, 2 mg/mL et 1 mg/mL pour la God, la Lod et la Chod, dans une solution de PVA-SbQ:H<sub>2</sub>O 1:40. Le support est ensuite placé sous une source UV afin d'initier la polymérisation du PVA-SbQ et ainsi de piéger les oxydases. Ensuite, l'impression par sérigraphie des réseaux d'électrodes est réalisée sur les couches sensibles déposées. Un alignement précis entre les couches et le masque d'impression est alors nécessaire.



**Figure 30.** Immobilisation d'oxydases par la méthode "manuelle". 1) Dépôt par contact. 2) Photopolymérisation. 3) Sérigraphie des matrices d'électrodes sur les couches sensibles.

### b. Méthode automatisée

Un "spotter" piézo-électrique à également été employé afin de déposer les solutions d'oxydases dans le PVA-SbQ. Les différentes solutions d'oxydases (God, Lod) sont déposées à la surface des électrodes sérigraphiées par éjection de gouttes d'un volume de 333 pL (figure 31). Sur chaque électrode ciblée, la couche sensible est formée de quatre dépôts d'un volume de 16 nL chacun, soit un volume total par électrode de 64 nL.



**Figure 31.** A) Immobilisation d'oxydases à la surface d'électrodes sérigraphiées par méthodes "automatisée", à l'aide d'un "spotter" piézo-électrique. B) Photographie des micro-capillaires du *Biochip Arrayer BCA1*.

La God et la Lod sont déposées respectivement à des concentrations de 5 et 2 mg/mL, dans du PVA-SbQ 1:50. Afin de déposer de manière reproductible des solutions contenant du PVA-SbQ, il convient d'appliquer une tension de 140 volts aux bornes du cristal piézo-électrique lors des impulsions visant à éjecter les gouttes. La distance entre la pointe du capillaire et la surface de l'électrode est fixée à 500  $\mu\text{m}$ . Un système de caméra et de pilotage par coordonnées relatives permet d'ajuster les dépôts sur une zone ciblée de la surface d'une électrode avec une précision de 5  $\mu\text{m}$ . Les puces supportant ainsi les couches sensibles sont ensuite placées sous UV afin d'initier la polymérisation du PVA-SbQ (10 minutes).

Quelle que soit la méthode de dépôt employée, les puces sont rincées dans une solution tampon de VBS pendant 10 minutes. Cela permet d'éliminer les enzymes qui ne sont pas piégées efficacement dans le polymère, et évite qu'elles soient relarguées lors des mesures ultérieures.

### 3. Mesure d'activité des oxydases

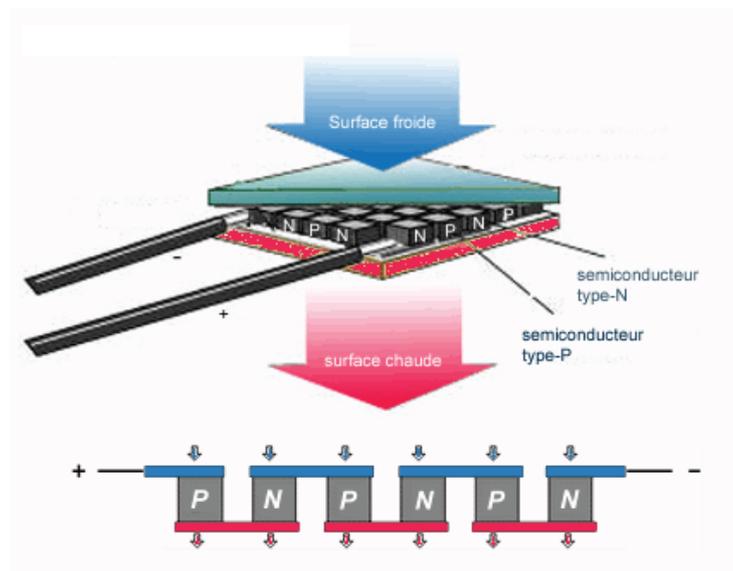
Les activités des différentes solutions enzymatiques ou couches sensibles immobilisées ont été mesurées à l'aide d'un capteur ampérométrique composé d'une électrode combinée (Pt vs

Pt, polarisée à + 650 mV), permettant de détecter la présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le milieu réactionnel.

L'activité de la glucose oxydase est mesurée en présence de 0,2 M de glucose dans un tampon acétate 0,1 M, KCl 0,1 M, pH 5,6 à 25°C. L'activité de la lactate oxydase est mesurée en présence de 40 mM de lactate, dans un tampon phosphate 0,1 M, KCl 0,1 M, pH 6,5 à +37°C.

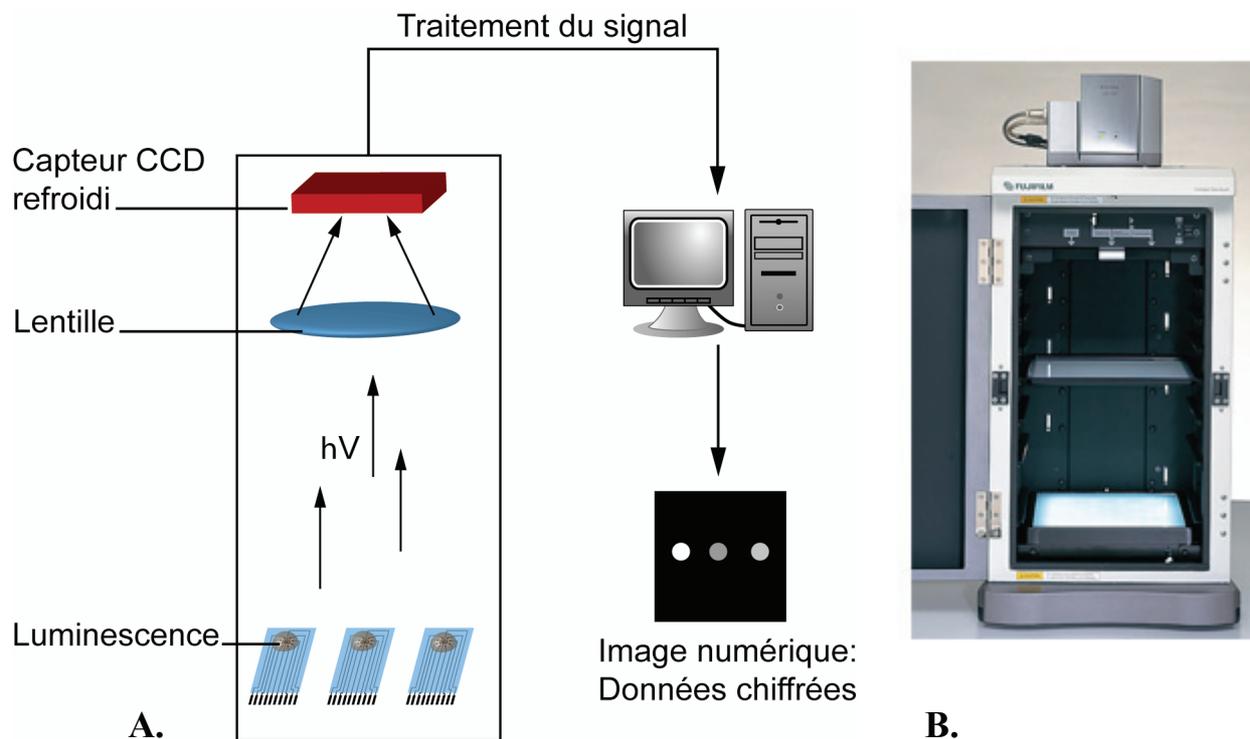
#### 4. Mesures de lumière grâce à la caméra CCD

La caméra CCD FUJIFILM® LAS-1000, est équipée d'un thermo-module, appelé également élément Peltier (figure 32). Le capteur CCD étant apposé à la face froide de cet élément, il permet de le refroidir à une température de -30°C lors des mesures de luminescence. Ainsi, le bruit de fond électronique est considérablement réduit, et il est alors possible de mesurer des intensités lumineuses très faibles sur une durée pouvant aller jusqu'à 20 minutes.



**Figure 32.** Élément Peltier. La face supérieure absorbe la chaleur et rejette celle-ci par son autre face. (D'après [www.er.uqam.ca/nobel/r27734/microel/peltier.gif](http://www.er.uqam.ca/nobel/r27734/microel/peltier.gif))

L'acquisition de la lumière émise à la surface des différentes puces est réalisée à l'aide de la Caméra CCD refroidie placée au sein d'une enceinte isolée de la lumière extérieure (figure 33). Les images numériques obtenues sont utilisées pour quantifier l'intensité lumineuse provenant de chaque électrode à la surface des puces (Image Gauge 4.0).



**Figure 33.** Mesure de luminescence au sein d'une enceinte isolée de la lumière et intégration à l'aide de la caméra CCD. Photo de la caméra CCD FUJIFILM Las-1000 plus, et de l'enceinte (DarkBoxII).

### a. Electrochimiluminescence (ECL)

Les mesures d'ECL ont été réalisées sur les électrodes sérigraphiées dites de première génération (figure 28.A, page 54). Pour cela, 50  $\mu\text{L}$  d'une solution tampon de VBS contenant du luminol à une concentration de 50  $\mu\text{M}$  sont placés sur la surface de l'électrode. Une contre électrode de platine est placée en contact avec la solution afin de pouvoir appliquer le potentiel de travail.

Le déclenchement de l'oxydation du luminol à la surface des électrodes est effectué grâce à l'application d'un potentiel de + 650 mV vs Pt sur la totalité des électrodes du réseau, lorsque la puce est dans l'enceinte de la caméra CCD.

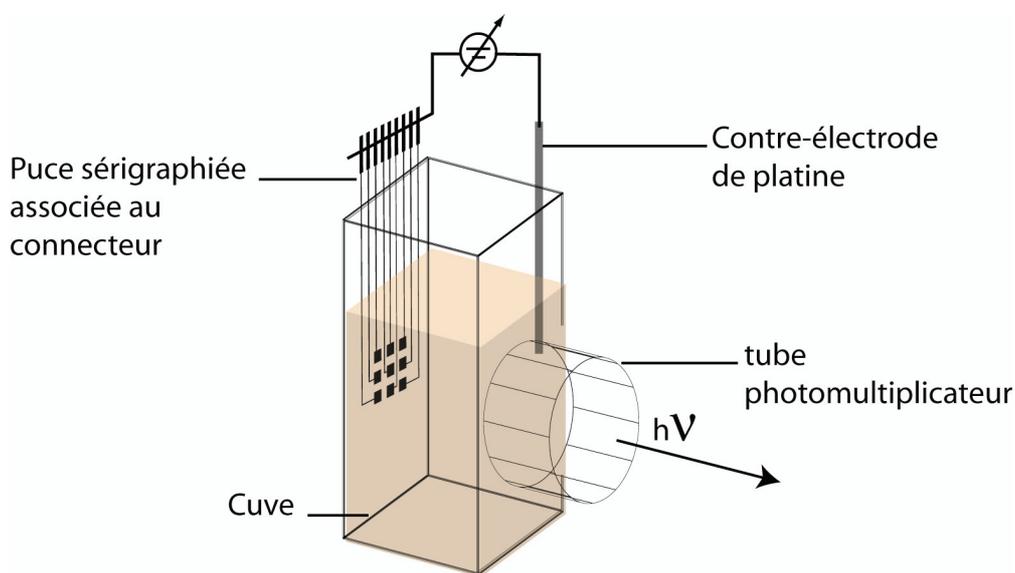
### b. Chimiluminescence (CL)

Les mesures de chimiluminescence ont été réalisées sur des réseaux d'électrodes sérigraphiées de seconde génération (figure 28.B, page 54). Afin de réaliser les mesures, 35

$\mu\text{L}$  d'une solution tampon de VBS, contenant: luminol ( $220 \mu\text{M}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $500 \mu\text{M}$ ), et un amplificateur (para-iodophénol,  $20 \mu\text{M}$ ), ont été placés à la surface des biopuces. Après avoir déposé la solution de mesure, les biopuces sont immédiatement placées dans l'enceinte de la caméra CCD. L'acquisition du signal débute alors, pour une durée fixe pouvant aller de 1 minute à 10 minutes.

## 5. ECL en fonction du potentiel

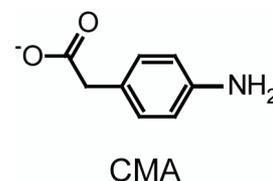
Afin d'étudier le phénomène d'ECL en fonction du potentiel appliqué, un montage utilisant une cuve et un tube photomultiplicateur (PM) a été employé (figure 34). La puce est placée dans une solution de luminol ( $200 \mu\text{M}$ ) et d'  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $10 \mu\text{M}$ ) dans du tampon VBS. Le potentiostat Voltalab PGZ est utilisé afin d'appliquer le potentiel variable, et son déclenchement est synchronisé avec l'acquisition du signal lumineux. La lumière émise à la surface est enregistrée grâce au PM. Le signal est recueilli et traité par le logiciel Apimager EL-3.



**Figure 34.** Montage expérimental pour étudier le signal lumineux (ECL) en fonction du potentiel appliqué.

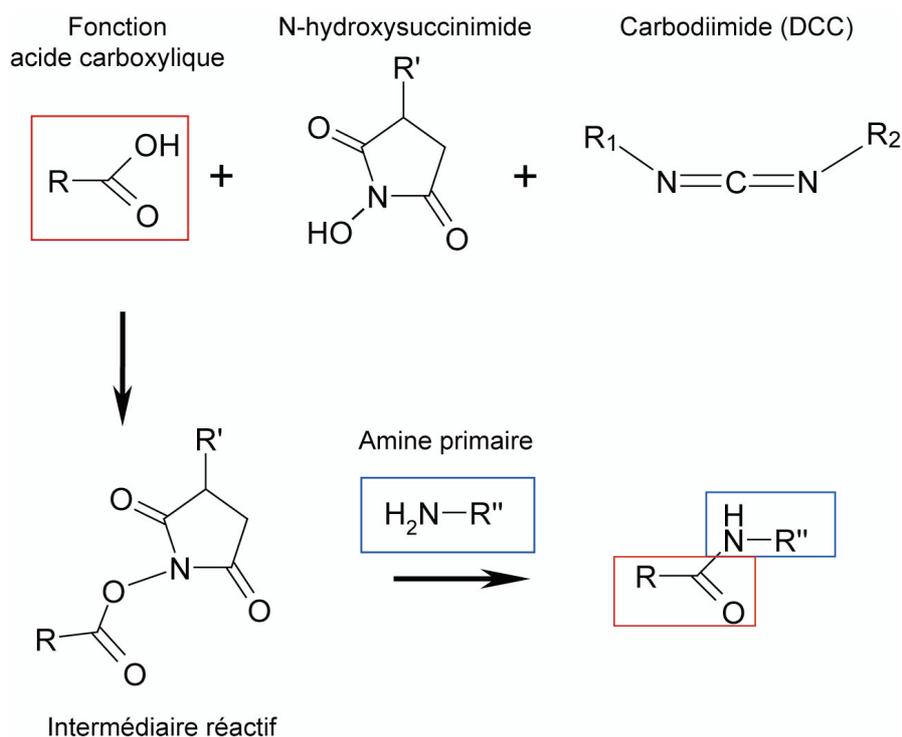
## 6. Réaction de couplage CMA / protéine

Dans le but d'immobiliser par électrogreffage des biomolécules, il a été nécessaire de les fonctionnaliser par un composé susceptible de conduire à un électro-adressage. Dans ce but, la carboxyméthyl-aniline (CMA) a été choisie. Afin de réaliser le couplage, la CMA est au préalable activée au niveau de sa fonction acide carboxylique, suivant la réaction présentée (figure 35).



10 mg de CMA sont activés en présence de 20,6 mg de DCC, et de 11,5 mg de NHS dans 1 mL de DMSO durant 30 minutes sous agitation et à température ambiante. 50  $\mu$ L de surnageant sont prélevés et ajoutés à 500  $\mu$ L de solution protéique à une concentration de 2 ou 5 mg/mL (selon les concentrations initiales de solution d'anticorps) dans du tampon carbonate 0,1 M à pH 11. La réaction de couplage est effectuée à température ambiante sous agitation pendant 2 heures.

Les protéines modifiées sont alors séparées de la CMA libre et des autres molécules n'ayant pas réagi par dessalage sur colonne Pd-10 Sephadex™ G-25 M de 5 mL. La présence des différentes espèces est détectée par absorption UV. Les fractions contenant les protéines modifiées sont ensuite concentrées par filtration sous centrifugation, à l'aide de Microcon® YM-30, dont les filtres possèdent une limite d'exclusion de 30 000 Daltons. Les protéines modifiées sont reprises dans H<sub>2</sub>O, et des aliquots de 100  $\mu$ L à une concentration de 10 mg/mL sont stockées à +4°C.



**Figure 35.** Schéma réactionnel du couplage entre une fonction acide carboxylique et une amine primaire via un carbodiimide en présence de N-hydroxysuccinimide. D'après Hermanson *et al.* (1992).

## 7. Diazotation des dérivés anilines

La CMA en solution aqueuse à une concentration de 1 à 10  $\mu\text{M}$  a été diazotée en présence d'HCl et de  $\text{NaNO}_2$  à des concentrations équimolaires de 15 mM. La solution est placée à  $+4^\circ\text{C}$ , sous agitation durant 10 minutes afin de permettre la réaction de diazotation.

Les anticorps-CMA sont repris à une concentration de 0,1 mg/mL dans l'eau distillée, puis la réaction de diazotation est réalisée pendant 10 minutes à  $+4^\circ\text{C}$ , en présence d'HCl et de  $\text{NaNO}_2$ , à des concentrations finales équimolaires de 15 mM (pH 1,8).

Les oligonucléotides modifiés par l'ABA ont été diazotés par ajout d'une solution d'HCl (1 N) et de  $\text{NaNO}_2$  (1 M), pour atteindre des concentrations finales équimolaires de 20 mM.

La peroxydase modifiée par la CMA a été diazotée en présence d'HCl et  $\text{NaNO}_2$ , à des concentrations finales équimolaires. Différentes études ont été menées avec des concentrations variant de 0,1 mM à 15 mM (pH 1,8 à pH 4).

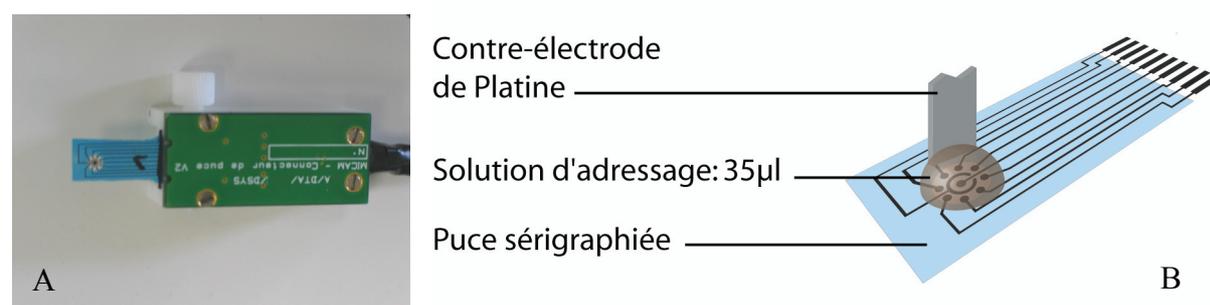
Les solutions fraîchement diazotées sont immédiatement utilisées pour l'électro-adressage.

## 8. Électro-adressage des sels de diazonium et dérivés

Un volume de 35  $\mu\text{L}$  des solutions fraîchement diazotées est placé sur la surface des puces de seconde génération (figure 28.B, page 54). Avant l'adressage d'anticorps-CMA, la surface de la puce est saturée par une solution de VBSTA, durant 20 minutes à + 37°C.

Avant de réaliser l'électro-adressage d'oligonucléotides ou de peroxydase modifiés et diazotés, la surface est simplement hydratée 20 minutes avec de l'eau distillée. Dans tous les cas, la surface est rincée à l'eau distillée avant d'être mise en contact avec la solution d'électro-adressage.

Afin d'effectuer l'électro-adressage, un système à trois électrodes est mis en place de la manière suivante: une contre électrode en platine est mise en contact avec la solution et l'électrode de pseudo-référence de carbone sérigraphiée est utilisée en tant que telle (figure 36.B). Un connecteur particulier possédant 10 voies est utilisé afin de permettre la connexion individuelle de chacune des électrodes (figure 36.A).



**Figure 36.** A) Connecteur multivoies pour réseaux d'électrodes sérigraphiés. B) Montage expérimental utilisé lors de l'électro-adressage de sels de diazonium et dérivés.

Le contrôle du potentiel appliqué aux électrodes est réalisé grâce à un potentiostat multivoies (VMP3). Il permet de suivre individuellement le comportement de chaque électrode de travail.

Lors du dépôt, trois cycles de 0 à -1500 mV sont réalisées à une vitesse de 200 mV/sec. Immédiatement après l'électro-adressage, la surface des puces est rincée à l'eau distillée, afin d'éliminer l'excès de molécules diazotées utilisées.

## 9. Essais sur biopuces

### a. Détection directe d'anticorps immobilisés

Après l'électro-adressage des anticorps-CMA humain ou de lapin, les puces sont traitées par sonication durant 10 minutes dans du tampon VBST. Les surfaces sont alors saturées par 50  $\mu$ L d'une solution de VBSTA pendant 20 minutes, à + 37°C. Dès lors, les anticorps marqués par la peroxydase sont incubés 1 heure à + 37°C à la surface des biopuces (25  $\mu$ L). Les anticorps marqués sont utilisés à des concentrations variables dans du tampon VBSTA. La surface de la puce est ensuite rincée par du tampon VBS pendant 20 minutes à +37°C, avant d'être placée dans la chambre de mesure de la caméra CCD pour l'acquisition des images numériques (cf. § 4, page 58).

### b. Détection du facteur rhumatoïde (RF) dans des sérums humains grâce à un immuno-essai de type "capture"

Après l'électro-adressage des anticorps de lapin modifiés par la CMA et diazotés, les puces sont traitées par sonication 10 minutes dans du tampon VBST. La surface est alors saturée 20 minutes à + 37°C par une solution de PBSTA (Phosphate 0,1 M, NaCl 0,15 M pH 7,4 tween 20 0,1%, BSA 1%), puis incubé en présence de sérums humains dilués (1/10) dans PBSTA pendant une heure à + 37°C. La surface est alors rincée à l'aide de 50  $\mu$ L de PBS durant 20 minutes, puis 25  $\mu$ L d'une solution d'anticorps anti-IgG-humain marqués par la peroxydase à une concentration de 8  $\mu$ g/mL dans PBSTA sont incubés 1 heure à + 37°C. Les biopuces sont finalement rincées 20 minutes dans du tampon VBS puis révélées comme décrit précédemment.

### c. Détection d'anticorps humains grâce à un immuno-essai de type "sandwich"

Après immobilisation par électro-adressage d'anticorps-CMA anti-IgG-humain, les biopuces sont traitées par sonication dans VBST durant 10 minutes. La surface est alors saturée 20 minutes à + 37°C avant d'être incubée 1h à + 37°C en présence d'une solution d'anticorps humain à différentes concentrations dans du VBSTA. La biopuce est alors rincée dans VBS puis incubée durant une heure à + 37°C avec une solution d'IgG anti-anticorps humain marquées par la peroxydase, à une concentration de 0,2  $\mu$ g/mL. Les biopuces sont finalement

rincées 20 minutes dans du tampon VBS puis révélées par chimiluminescence comme décrit précédemment.

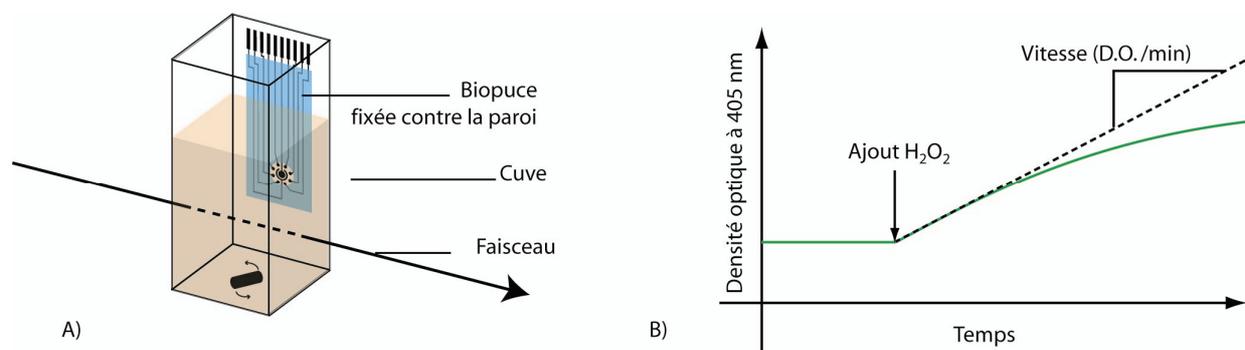
### d. Détection de séquences oligonucléotidiques cibles

Après diazotation et électro-adressage des oligonucléotides-ABA, la surface des biopuces est traitée par sonication dans du tampon VBST durant 10 minutes. L'hybridation est ensuite réalisée par dépôt de 25  $\mu\text{L}$  d'une solution de séquence cible complémentaire biotinylée en son extrémité 5' pendant une heure à + 37°C dans du tampon VBS. La biopuce est ensuite rincée et traitée par sonication dans VBST afin d'éliminer les brins complémentaires non hybridés. Dès lors la surface est saturée 20 minutes à + 37°C par une solution de VBSTA, puis est incubée avec 25  $\mu\text{L}$  d'une solution de streptavidine marquée par la peroxydase à une concentration de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pendant 1 heure à + 37°C. Les biopuces sont finalement rincées 20 minutes dans du tampon VBS, puis révélées, comme décrit précédemment.

## 10. Mesure d'activité de la peroxydase immobilisée

L'activité de la HRP fixée à la surface des biopuces a été quantifiée par une méthode spectrophotométrique. L'ABTS est alors utilisé comme substrat chromogène de la HRP conduisant à la production d'un chromophore ( $\text{ABTS}^{2+}$ ) en présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Childs *et al.*, 1975).

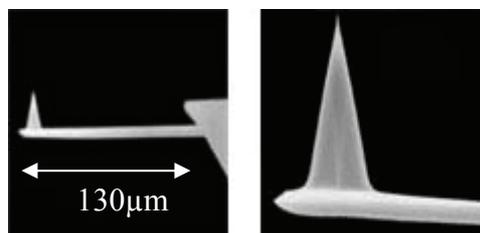
Ainsi, l'apparition du produit de cette réaction est suivie par mesure des variations de densité optique à 405 nm. Pour cela, la surface active de la biopuce est plongée entièrement dans une cuve de spectrophotomètre équipée d'un agitateur magnétique (figure 37), contenant 2 mL d'une solution composée de 2 mM d'ABTS dans du tampon acétate 0,1 M, KCl 0,1 M à pH 5,5. La réaction est déclenchée par ajout d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à une concentration finale de 1 mM.



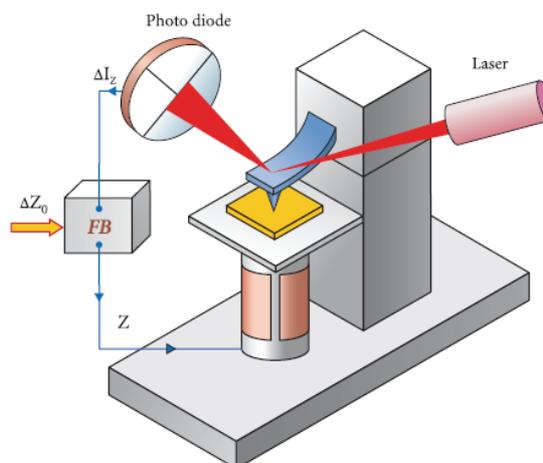
**Figure 37.** A) Montage expérimental utilisé afin de mesurer l'activité de la HRP immobilisée à la surface d'une biopuce. B) Mesure d'activité après ajout d'  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en D.O. / minute.

## 11. Microscopie à force atomique (AFM)

Les micro-leviers (*micro-cantilevers*) employés pour cette méthode sont les NSG-01S, (NT-MDT) (figure 38). Ces pointes en silicium, ont une surface recouverte d'or, permettant une meilleure réflexion du faisceau laser, et ainsi une détection plus sensible des déviations de la pointe lors de ses déplacements sur la surface (figure 39). Les micro-leviers sont utilisés en mode semi-contact "*tapping*" à leur fréquence propre de résonnance (entre 100 et 200 Hz). La vitesse de balayage généralement employé est de 1 Hz (= ligne/seconde). Cette vitesse a été optimisée afin d'obtenir une résolution maximale des détails de la surface. Les images sont réalisées à température ambiante, à l'air et à pression atmosphérique. Avant d'être fixés sur le support pour la mesure, les échantillons sont séchés.



**Figure 38.** Pointe AFM en silicium, couverte d'or, NSG-01S (NT-MDT®).

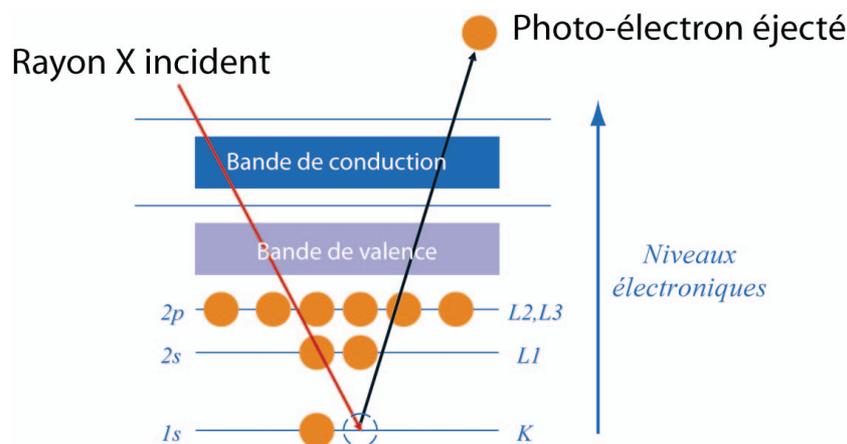


**Figure 39.** A) Microscope à force atomique Solver-Pro de NT-MDT®. B) Principe de fonctionnement du microscope: le laser est réfléchi par la pointe et les mouvements de celle-ci sont enregistrés aux travers du cadran des photodiodes.

## 12. Spectroscopie des photoélectrons X (XPS)

La spectroscopie des rayons X a été employée afin d'obtenir des informations concernant la nature chimique des surfaces étudiées. Brièvement, une partie de la surface est bombardée de photons de haute énergie. Par absorption d'énergie, des électrons des couches électroniques internes des atomes sont éjectés de la surface (figure 40), les énergies des électrons des

orbitales atomiques caractéristiques des atomes en présence sont alors détectées, collectées et quantifiées. On obtient ainsi un pourcentage de composition atomique de la surface étudiée.



**Figure 40.** Schéma de principe énergétique de la spectroscopie des rayons X.

Les premières mesures XPS (article n°2) ont été réalisées à l'aide d'un spectroscope ESCALAB (VG Scientific). Une fenêtre d'analyse de 1 mm est utilisée, ainsi qu'une anode Al (1486,6 eV) à une énergie d'analyse de 50 eV. Pour permettre la réalisation des mesures XPS, des électrodes en carbone sérigraphiées de surface plus élevée (25 mm<sup>2</sup>) ont été élaborées. Le pourcentage atomique est déduit par le calcul des surfaces des pics correspondant selon Scofield (1976).

Afin d'étudier la présence des oligonucléotides électro-adressés sur les électrodes sérigraphiées (article n°4), des mesures XPS ont été réalisées à l'aide d'un appareillage commercial de type KRATOS AXIS Ultra DLD équipé d'une source monochromatique Al K<sub>α</sub> (1486,6 eV, 150 W), d'un analyseur d'énergie d'électron hémisphérique sous vide ( $P < 10^{-9}$  mbar). Le détail de l'utilisation de cet appareillage est décrit dans la partie "matériels et méthodes" de l'article n°4 (*Electronic Supplementary Informations*).

### 13. Détection en imagerie SPR (SPRi)

Les réactions ont été réalisées dans une cellule en téflon d'un volume de 10 μL, branché à une pompe péristaltique dont le débit a été fixé à 50 μL/min. Les interactions sont réalisées dans des solutions tampons de PBS à 10 mM à un pH de 7,4, et à température ambiante. La surface des puces est saturée par une solution contenant 1% de BSA et 0,5 % de tween 20 dans PBS. Les solutions protéiques, dans PBS, sont alors injectées afin de détecter les

interactions produisant des modifications de l'index de réflectivité de la surface. Les changements de réflectivité sont observés et mesurés grâce à une caméra CCD 12-bit et traduit en niveaux de gris (Guedon *et al.*, 2000). La régénération de la surface est effectuée grâce à une solution chaotropique de glycine 0,1 M à pH 2.



---

# RESULTATS

---



# 1. Objectifs et plan de travail

Dans le but d'alléger et de clarifier la rédaction, les résultats obtenus lors de cette thèse sont présentés sous une forme comportant les publications insérées. Toutes les étapes du travail y sont exposées de manière à lier chaque publication, présentant les résultats comme une vue d'ensemble. Chaque publication insérée est introduite et discutée afin de la replacer dans le contexte global de cette thèse. De plus, certains résultats n'ayant pas fait l'objet de publication sont également détaillés afin d'améliorer et de compléter la trame des résultats.

Le premier chapitre (article 1) concerne le développement et l'étude d'un modèle de biopuce enzymatique. Des oxydases sont piégées dans un photopolymère sur un réseau d'électrodes sérigraphié, et l'électrochimiluminescence du couple luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est le mode de détection employé. Les biopuces ainsi réalisées ont permis de détecter de manière concomitante trois métabolites: glucose, lactate et choline.

Le second chapitre (articles 2 à 4) présente l'étude de l'électrogreffage des sels de diazonium sur les électrodes sérigraphiées. Cette étude a abouti au développement d'une méthode d'immobilisation innovante impliquant les propriétés d'électro-adressage des aryldiazoniums. La caractérisation du phénomène d'électro-adressage ainsi que les premières détections d'anticorps immobilisés selon cette méthode sont notamment exposées (article 2).

Basé sur ce principe d'immobilisation (diazotation et électro-adressage), l'article 3 présente la réalisation d'un immuno-essai permettant la détection et le dosage de facteurs rhumatoïdes dans des échantillons de sérums humains.

Enfin le quatrième article présente l'électro-adressage comme une méthode générique d'immobilisation de biomolécules (oligonucléotides, protéines et enzymes), avec pour chaque catégorie une preuve de concept. Un modèle de détection de séquence du gène *p53* est réalisé, ainsi qu'un immuno-essai de type sandwich pour lequel les propriétés de reconnaissance des anticorps électro-adressés sont utilisées.

Le troisième chapitre présente des résultats obtenus sur nos réseaux d'électrodes sérigraphiés sur lesquelles de l'or a été électro-déposé. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr Feng Li, post-doctorante dans notre laboratoire (Mars 2006-Mars 2007). Deux biopuces ont été réalisées, utilisant des électrodes sérigraphiées couvertes d'or électrodéposé : un modèle utilisant des oligonucléotides électro-adressés (séquence du gène *p53*) et un modèle de biopuce à protéine permettant la détection de PSA (antigène prostatique spécifique). L'effet de la présence d'une couche d'or électrodéposée sur les signaux chimiluminescents de ces biopuces est alors étudié et discuté.

Le quatrième chapitre concerne l'étude de l'électro-adressage d'anticorps afin de modifier la surface de supports d'or destinés à réaliser des mesures d'imagerie par SPR (SPRi). Des détections d'interactions par SPRi ont été réalisées, en collaboration avec la société Genoptics<sup>®</sup>, utilisant des d'IgG humain ou de lapin immobilisés par "*pin-electrospotting*". L'immobilisation ainsi que les performances de détection sont caractérisées afin de démontrer le potentiel de cette méthode d'immobilisation.

# Chapitre I

## Electrochimiluminescence sur réseaux d'électrodes sérigraphiés

Article 1 :

### Screen-printed electrode microarray for electrochemiluminescent measurements

Benjamin P. Corgier, Christophe A. Marquette, Loïc J. Blum

*Analytica Chimica Acta* 538 (2005) 1–7

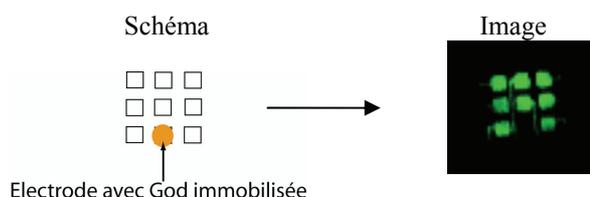
Fort de l'expérience du laboratoire dans le domaine de l'électrochimiluminescence, il a été envisagé de développer un biocapteur basé sur l'ECL du luminol et utilisant comme support des électrodes sérigraphiées. La première génération de réseaux d'électrodes sérigraphiés, présentant neuf électrodes de forme carrée (figure 28.A, page 54) à été utilisée pour cette étude.

L'objectif premier est d'étudier et de démontrer les possibilités qu'offrent de tels supports, dans un premier temps pour la détection électrochimiluminescente, et dans un second temps pour la réalisation de biopuces. Le principe proposé est le suivant : des oxydases (glucose oxydase, lactate oxydase et choline oxydase) sont immobilisées sur les électrodes du réseau, et un des produits générés par celles-ci ( $H_2O_2$ ), lors de la transformation de leur substrat respectif, est détecté grâce à l'électrochimiluminescence du couple luminol/  $H_2O_2$ , sur chaque électrode supportant une couche sensible.

Néanmoins, avant d'aboutir à la réalisation du modèle de biopuce présenté dans l'article 1, plusieurs biopuces d'architecture différentes ont été étudiées afin de déterminer la meilleure méthode permettant une immobilisation efficace des oxydases et un signal ECL satisfaisant.

Afin d'immobiliser les oxydases, une méthode de piégeage par rétention dans un photopolymère : le PVA-SbQ a été choisie. Le but premier étant de retenir suffisamment d'activité enzymatique sur chaque électrode de  $1\text{ mm}^2$ . C'est pourquoi, initialement,  $0,3\ \mu\text{L}$  de solution d'oxydase dans du photopolymère PVA-SbQ ont été simplement déposés par méthode manuelle (§ 2.a, page 55) et polymérisés à la surface des électrodes sérigraphiées.

Après photopolymérisation et rinçage des électrodes afin d'éliminer les enzymes faiblement piégées (ici God), des mesures d'électrochimiluminescence en présence de glucose 0,1 mM et de luminol 50  $\mu$ M ont été réalisées. Pour le cas présenté, seule une électrode supporte l'enzyme immobilisée dans le photopolymère, les huit autres électrodes sont nues. Une image caractéristique des résultats obtenus est présentée figure 41.



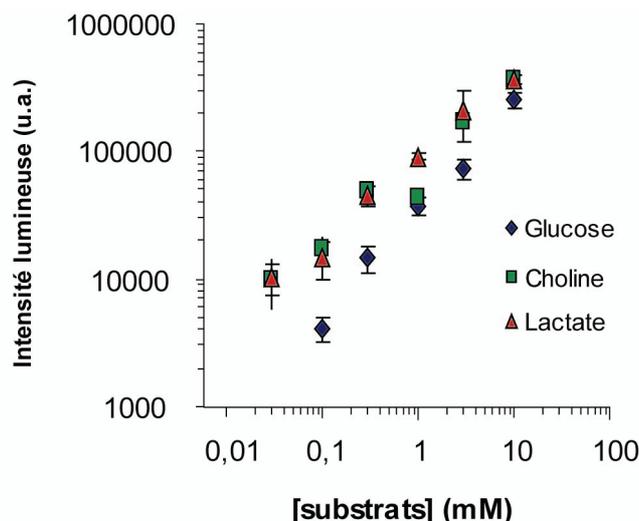
**Figure 41.** Image de l'ECL obtenue sur une biopuce sérigraphiée modifiée par un dépôt de God/PVA-SbQ. Glucose 0,1 mM, Pot.= + 650 mV vs Pt,  $t_{\text{intégration}}=5$  minutes. La solution de Glc /luminol est disposée sur la totalité de la biopuce.

Premièrement, nous observons qu'aucun signal n'est émis à partir de l'électrode supportant la God immobilisée dans le PVA-SbQ. Et deuxièmement, des signaux ECL sont émis à partir des huit autres électrodes, lors de l'application du potentiel sur la totalité des électrodes.

Ces résultats montrent d'une part que l'immobilisation de la God selon la méthode décrite conduit à la passivation de l'électrode considérée puisqu'aucun signal n'est émis à partir de celui-ci. Et d'autre part, ces résultats montrent que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  généré par l'enzyme immobilisée diffuse à la surface de la biopuce puisqu'un signal ECL apparaît au niveau des électrodes nues. Néanmoins, cela confirme que l'enzyme immobilisée dans le PVA-SbQ conserve une certaine activité.

Afin d'éviter les problèmes de passivation de l'électrode supportant les enzymes, il a été envisagé de déposer la solution enzymatique sous l'électrode, avant l'étape de sérigraphie (figure 30, page 56).

Cette méthode d'immobilisation nous a permis de réaliser des biopuces comportant trois enzymes différentes immobilisées sous les électrodes sérigraphiées. Les performances de ce système pour la détection de glucose, de lactate et de choline ont été testées et sont présentées figure 42.



**Figure 42.** Courbes de calibrations de biopuces supportant les trois enzymes (God, Lod ou Chod) dans le PVA-SbQ, sous les électrodes sérigraphiées. n=3. Pot.= + 650 mV vs Pt, Luminol en solution 50  $\mu$ M.

Ces gammes présentent des limites de détection assez satisfaisantes, de 30  $\mu$ M pour la choline et le lactate, et de 0,1 mM pour le glucose. Cependant, l'objectif est de réaliser des mesures sur des échantillons de sérum. Sachant qu'il est nécessaire de diluer ceux-ci au 100<sup>ième</sup> afin de limiter les effets de passivation dus essentiellement à la présence de protéines et compte tenu des concentrations en métabolite attendues (sérum dilué 100 fois : 0,04 mM et 0,02 mM pour le glucose et le lactate respectivement), ces biopuces ne sont pas assez sensibles.

Il a alors été envisagé de modifier la méthode d'immobilisation des oxydases afin de favoriser l'accessibilité des oxydases pour leur substrat. Une méthode de dépôt utilisant le "spotter" a alors été mise au point, grâce à laquelle les dépôts d'oxydases dans le photopolymère sont répartis à la surface de l'électrode, ne couvrant que partiellement celle-ci. Cette méthode est présentée dans l'article 1, et conduit à la réalisation de biopuces dont le principe est exposé figure 1C de l'article 1. Cette méthode permet de déposer un faible volume de solution d'oxydases : 64 nL/électrode, distribué à la surface de celle-ci sous la forme de quatre plots. De plus, la surface de l'électrode n'est pas recouverte en totalité par le photopolymère contenant les enzymes, ce qui permet au luminol en solution d'être aisément électro-oxydé par celle-ci lors du déclenchement de l'ECL.

La caractérisation de ce système ainsi que les performances des biopuces obtenues sont présentées dans l'article 1.



# Screen-printed electrode microarray for electrochemiluminescent measurements

Benjamin P. Corgier, Christophe A. Marquette\*,  
Loïc J. Blum

*Laboratoire de Génie Enzymatique et Biomoléculaire, UMR 5013 EMB2, CNRS-Université Claude Bernard Lyon 1, Bât CPE,  
43, bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne, Cedex, France*

Received 6 January 2005; received in revised form 10 February 2005; accepted 11 February 2005  
Available online 18 March 2005

## Abstract

A microarray of nine screen-printed (SP) graphite electrodes was used to develop multi-parametric electrochemiluminescent (ECL) biochip. The whole biochip is based on the ECL detection of enzymatically generated  $H_2O_2$ . The intrinsic performances of this electrode array were evaluated through the cyclic-voltammetric experiments in 0.1 M ferricyanide. The variations of the specific behaviours (oxidation potential and current) of such a redox mediator were then used to reach the reproducibility of the SP arrays, i.e. 2% for electrode-to-electrode and 4% for biochip-to-biochip variations. In a similar way, electrochemiluminescent cyclic-voltammetric experiments were performed to characterize the ECL reaction triggered at the surface of a SP carbon electrode array. An optimum luminol oxidation potential of +650 mV versus platinum pseudo-reference was found with a reproducibility of 4.4%.

The different sensing layers were obtained through the entrapment of glucose oxidase and lactate oxidase in PVA–SbQ (poly(vinyl alcohol) bearing styrylpyridinium groups) photopolymer deposited at the surface of two from the nine electrode array. An automatic nano-spotter was employed to precisely drop spots of entrapped enzyme at an electrode surface.

Therefore, ECL measurements were performed to establish calibration curves by using a charged coupled device (CCD) camera. Linear ranges, detection limits and reproducibility of these biochips were investigated as a demonstrative example of oxidase-based ECL detection/biosensor. In the present paper, the achieved biosensor arrays allowed the simultaneous detection and quantification of L-lactate and D-glucose with detection limits of 3 and 10  $\mu M$ , respectively.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Carbon electrode arrays; Biochip; Electrochemiluminescence; Glucose; Lactate; Screen-printing

## 1. Introduction

The last 10 years have witnessed a constant growth of interest in the field of large-scale analysis, using proteins or enzymes to perform biochips development. Thus, miniaturizing, parallelizing and reducing the analysis time and cost were required and became a crucial challenge.

Screen-printing (SP) technologies appears to be an interesting tool to permit the achievement of marketable biosen-

sors taking advantage of the low cost and mass production possibilities [1,2].

SP biosensor performances and reliability depend mainly on the detection–transduction system and on the immobilization procedure involved.

Indeed, on one hand, the SP sensors have to be able to generate an interference-free and sensitive signal, and on the other hand, the sensing layer design has to maintain the biological molecules activity and stability.

Up to now, most of the SP electrode-based biosensors are used for single parameter measurements associated with an electrochemical detection [3–9]. Recently, a unique am-

\* Corresponding author. Tel.: +334 72 44 82 14; fax: +334 72 44 79 70.  
E-mail address: [christophe.marquette@univ-lyon1.fr](mailto:christophe.marquette@univ-lyon1.fr) (C.A. Marquette).

perometric multi-enzyme biosensor, assembled on a screen-printed electrode array, has been reported [10].

Most of these sensors are based on the detection of hydrogen peroxide enzymatically generated by oxidase-type enzyme [4,7–9].

The sensitivity and the specificity of those systems are excellent when using simple standard solutions; however, their efficiency appeared to be dramatically lowered when using natural samples. Selective membranes [11] or mediators [12–15] were then used to protect the transducer from the sample matrix and/or to minimize these interference effects.

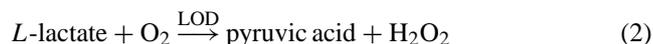
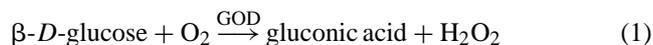
Another alternative to bypass the electrochemical interferences generated by the complex samples is to take advantage of an electrochemiluminescent (ECL) detection system to monitor the hydrogen peroxide enzymatically produced [16].

ECL detection systems are well known to be free of sample matrix interferences, and were previously used to develop mono- [17–20] and multi-parametric biosensors [21].

Those ECL systems were designed based on different electrode materials such as ceramic-carbon composite electrodes [19], glassy carbon electrodes [17,18,22], indium thin oxide electrodes [20], and single screen-printed carbon electrode [23,24].

In the present study, an original approach is proposed, consisting in the use of an electrode array, screen-printed on the surface of a plastic foil. To assess the feasibility of such

an approach, the study was performed with a single microarray of nine independent 1 mm × 1 mm electrodes (Fig. 1A). This offers the possibility to obtain a multi-parametric biosensor, and as an example, glucose oxidase (GOD) and lactate oxidase (LOD) reactions (Eqs. (1) and (2)) were used.



Numerous studies on mono-parametric SP biosensors have been previously reported, describing the enzyme immobilization through either glutaraldehyde cross-linking [5,25], direct enzyme adsorption [13,26], methylene blue electropolymerisation [27] or entrapment in a PVA–SbQ photopolymer-sepharose beads hybrid layer [23,24,28].

This last method permitted the immobilization of active oxidases, while allowing the free diffusion of the enzyme substrates and products through the meshes of the polymer formed [29,30].

In the present work, this system is used to immobilize lactate oxidase and glucose oxidase at the surface of particular electrodes of the SP array. This is achieved by spotting enzyme-photopolymer solutions with an automatic piezoelectric nano-spotter (Fig. 1C).

The electrochemical properties of the SP carbon electrode array are studied and discussed. Moreover, the characteristics and the performances of the achieved biosensor microarray in

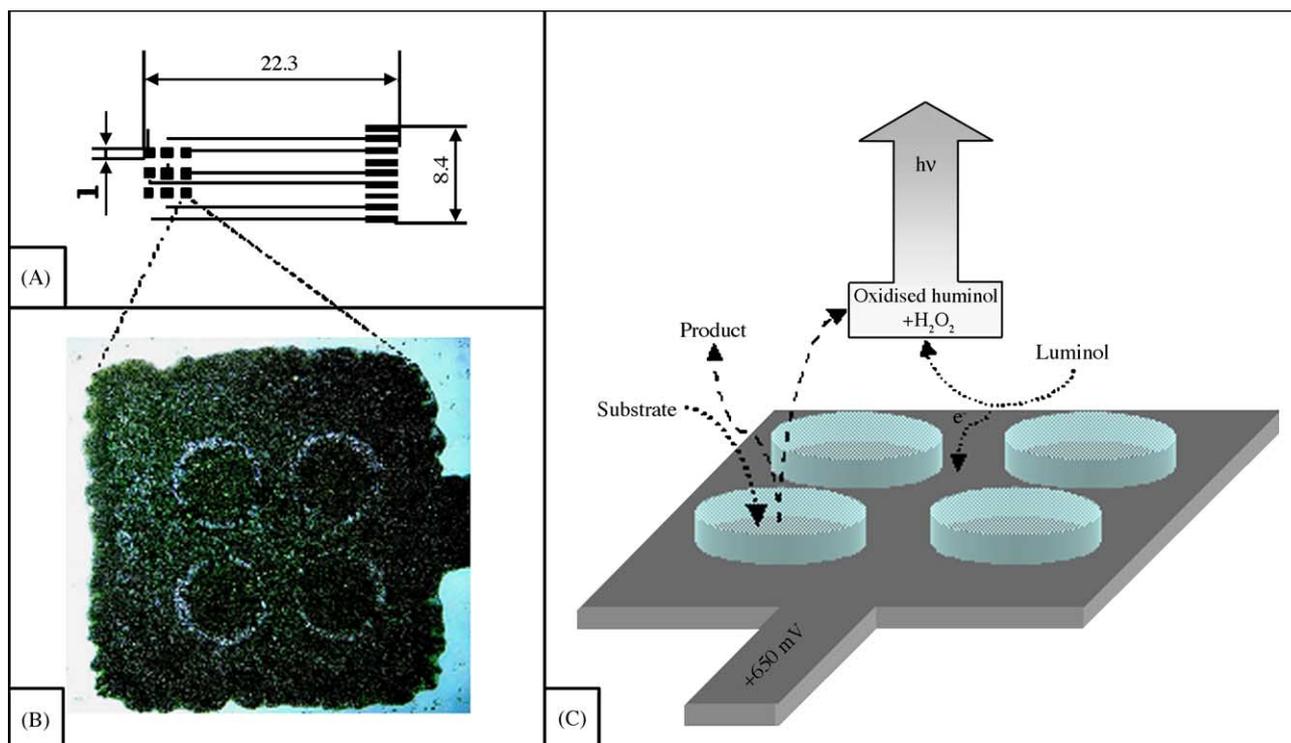


Fig. 1. (A) Schematic representation of the nine electrodes screen-printed array. Size in mm. (B) Optical micrograph of the electrode surface (1 mm × 1 mm) supporting the four spots sensing layer. (C) Schematic representation of the sensing layer organisation and reaction at a carbon electrode surface (1 mm × 1 mm).

standard solutions are presented and compared to previously described systems.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

Glucose oxidase (GOD, EC 1.1.3.4, from *Aspergillus niger*), Lactate oxidase (LOD, EC not available, from *Pediococcus species*), luminol (3-aminophthalhydrazide), L-(+)-lactic-acid (lithium salt) and D-(+)-glucose were purchased from Sigma (France). Poly(vinyl alcohol) bearing styrylpyridinium groups (PVA–SbQ: polymerisation degree 2300, saponification degree 88, SbQ content 1.06%, solid content 11%, pH 6.2) was obtained from Toyo Gosei Kogyo (Chiba, Japan) and used as received. Potassium hexacyanoferrate (III) and veronal (diethylmalonylurea sodium) were purchased from Prolabo (France). All buffers and aqueous solutions were made with distilled demineralised water. A 5.5 mM luminol stock solution was prepared in  $10^{-2}$  M KOH.

### 2.2. Electrode array printing

A DEK 248 screen-printing machine (DEK, UK) was used to fabricate the carbon electrode arrays. A polyester monofilament fibre screen (DEK, UK) characterized by a mesh size of 260 counts per inch and a thickness of  $13\ \mu\text{m}$  was used to print the carbon ink (Electrodag 423 SS, Acheson, France) onto a A5 (21 cm  $\times$  14.8 cm) polyester flexible foil. After printing, the polyester foils supporting 16 electrode arrays were baked 10 min at  $100\ ^\circ\text{C}$  to cure the thermoplastic carbon ink.

### 2.3. Sensing layers deposition

The deposition of the oxidase solutions was performed with an automatic piezoelectric spotter (Biochip Arrayer BCA 1 (Perkin-Elmer, UK)), using an optical assisted system to precisely drop ( $10\ \mu\text{m}$  step) the enzymatic solution at the SP electrode surface.

The sensing layers were spotted as solutions of glucose oxidase and lactate oxidase in 1:50 (v/v) aqueous solution of PVA–SbQ, at protein concentrations of 5 and 2 mg/mL, respectively.

The freshly spotted sensing layers were thus exposed to UV radiation for 10 min and finally washed in 30 mM Veronal buffer, 0.2 M NaCl, pH 8.5 (VBS) for 10 min to eliminate all weakly trapped proteins.

In order to obtain the best spatial repartition of the sensing layer at the electrode surface while keeping an acceptable thickness, four identical spots of oxidase (16 nL each, i.e. a total volume of 64 nL) were deposited on a single 1 mm  $\times$  1 mm electrode. The sensing layer array obtained is presented in Fig. 1B.

### 2.4. Voltammetric studies

The reproducibility of the electrode arrays production was investigated through the electrochemical behaviours of each electrode. These properties were characterized by cycling the electrodes in 0.05 M ferricyanide solution in  $\text{LiClO}_4$  0.1 M. The cyclic-voltammograms were obtained with a Voltalab PGZ 100 potentiostat (Radiometer Analytical). The current was measured while applying a potential scan from  $-1000$  to  $+1000$  mV versus Pt pseudo-reference electrode at a scan rate of 20 mV/s. A specially designed nine-path connector was used to poise the chosen electrodes of the chip.

In a similar way, electrochemiluminescence cyclic-voltammetry was performed by measuring the light intensity emitted while triggering the ECL reaction. Applying a potential scan from 0 to  $+1500$  mV versus Pt pseudo-reference, enables the determination of the optimum luminol oxidation potential. Briefly, a special light-tight reaction cell filled with the ECL substrates (luminol  $200\ \mu\text{M}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$   $10\ \mu\text{M}$ ) was used to place the SP electrode array in front of a photomultiplier tube (PM) model H7711 from Hamamatsu (Japan). The time-resolved collection of the emitted light (Apimager EL600, Apibio, France) was then used to plot the electrochemiluminescent cyclic-voltammograms.

### 2.5. Electrochemiluminescent measurements

The ECL measurements were performed with a CCD camera (Las-1000 Plus, Intelligent Dark Box II, FUJIFILM). The nine electrodes of a chip were poised at a fixed potential of  $+650$  mV versus a platinum pseudo-reference, during all the camera acquisition time (5 min).

The numeric micrographs obtained from the ECL measurements were used to quantify the light emitted from each particular electrode (Image Gauge 3.122, FUJIFILM).

The ECL measurements were performed in VBS containing in addition  $50\ \mu\text{M}$  of luminol and a particular concentration of the enzyme substrates.

### 2.6. Activity determination

The activity of the different enzyme solutions and sensing layers were measured using an hydrogen peroxide amperometric sensor (INCELTECH-SGI, France). The  $\text{H}_2\text{O}_2$  probe was composed of a platinum working electrode polarized at  $+650$  mV versus a platinum pseudo-reference electrode. The probe was connected to a PRGE type polarograph (Tacussel, France).

The glucose oxidase activity was measured in the presence of glucose 0.2 M in acetate buffer 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 5.6 at  $25\ ^\circ\text{C}$ . The lactate oxidase activity measurement was performed in phosphate buffer 0.1 M, KCl 0.1 M, pH 6.5 at  $37\ ^\circ\text{C}$  in the presence of lactate 40 mM. Enzyme activities were expressed in international units (IU).

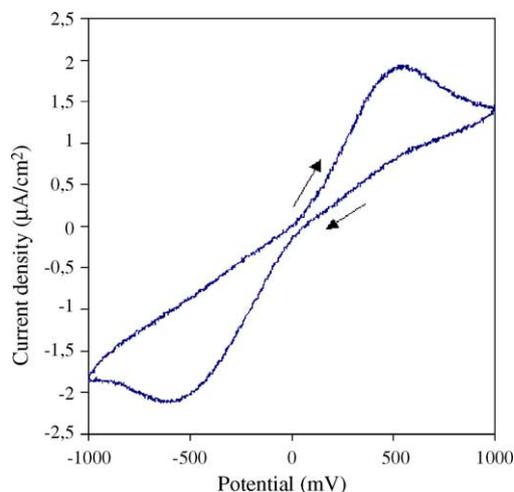


Fig. 2. Cyclic-voltammogram of ferricyanide 0.05 M. Potential scanned from  $-1000$  to  $+1000$  mV vs. Pt pseudo-reference; scan rate 20 mV/s.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Reproducibility of the carbon electrode array production

In a preliminary study, the reproducibility of electrode array production was characterized electrochemically by cycling the electrodes in a 0.05 M ferricyanide solution (Fig. 2). Both peak potentials and peak currents of the redox mediator were recorded on the nine electrodes of 10 different arrays. Table 1 summarises the reproducibility results obtained.

As it can be seen, very low variations on peak current and potential were found within a particular array with a 2% maximum deviation of the oxidation potential and a 7.5% maximum deviation of the oxidation current. The nine electrodes composing a particular array could be then considered as almost identical and used indiscriminately for both the hydrogen peroxide detection and the immobilization of entrapped oxidases.

Moreover, the array-to-array variations of the electrochemical characteristics were found to be also satisfying. A 4% maximum deviation of the oxidation potential and a 16% maximum deviation of the oxidation current were observed.

The electrochemiluminescent behaviour of the SP carbon electrode arrays was also investigated through electrochemiluminescence cyclic-voltammetric measurements.

For that purpose, the nine electrodes of a chip and, electrodes from eight different chips were scanned in the presence of the ECL substrates. The ECL cyclic-voltammograms (i.e. measuring the light intensity emitted at the electrode surface

resulting of the ECL reaction while applying a variable potential) (Fig. 3) were then characterized through the luminol oxidation peak potential determined:  $+650$  mV (versus Pt). The variations of this potential gave then information about the reproducibility of the ECL triggering at the electrode surface.

A good reproducibility was found, with an electrode-to-electrode variation and an array-to-array variation of the peak potential of 4.4 and 6.9%, respectively. The ECL results obtained with different electrode arrays could then be compared easily without risk of signal variations due to the electrode batch heterogeneity.

#### 3.2. Hydrogen peroxide detection

The experiments presented above show that this type of carbon electrode array enables the triggering of the ECL reaction at a potential of  $+650$  mV versus Pt. For future developments and for easiness of use, the entire SP electrode array was planned to be measured concomitantly through an imaging system (CCD camera).

The ECL  $\text{H}_2\text{O}_2$  sensors chip performances were then determined by using such light detection system. Various concentrations of hydrogen peroxide were deposited on the surface of the carbon electrode array (i.e. the whole chip) while only one electrode of the chip was poised at  $+650$  mV versus Pt.

The images obtained from the different experiments are presented in Fig. 4. The performances of the  $\text{H}_2\text{O}_2$  sensor were obtained from the quantification of the ECL images. As a matter of fact, a single  $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$  electrode enabled the detection of hydrogen peroxide over two decades at least and

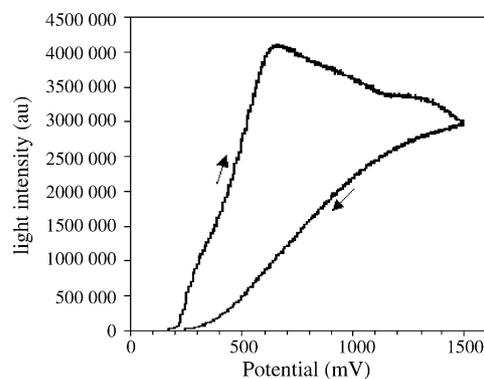


Fig. 3. Electrochemiluminescent cyclic-voltammogram at one particular electrode of the screen-printed array. Luminol 200  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  10  $\mu\text{M}$ . Potential scanned from 0 to 1500 mV vs. Pt; scan rate: 20 mV/s.

Table 1  
Reproducibility of the electrochemical behaviour of the screen-printed electrode arrays

	Oxidation potential (mV)	Oxidation current ( $\mu\text{A}$ )	Reduction potential (mV)	Reduction current ( $\mu\text{A}$ )
Electrode-to-electrode	$500 \pm 12.8$	$3.07 \pm 0.25$	$-557 \pm 10.9$	$-2.64 \pm 0.18$
Array-to-array	$486 \pm 21.6$	$2.91 \pm 0.45$	$-493 \pm 1.7$	$-2.57 \pm 0.41$

Ferricyanide 0.05 M. Potential scanned from  $-1000$  to  $+1000$  mV vs. Pt pseudo-reference; scan rate 20 mV/s.

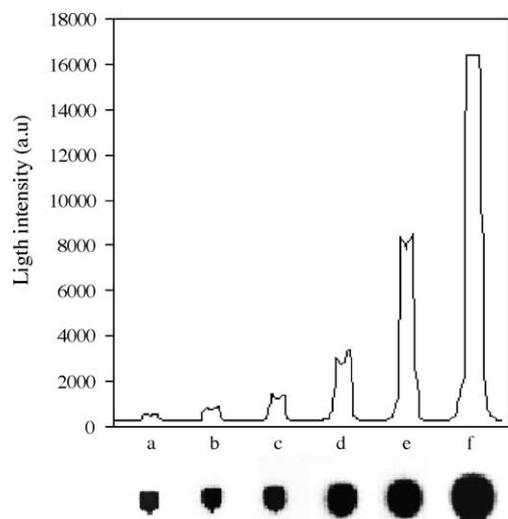


Fig. 4. Micrographs and light intensity profiles of a particular electrode of the screen-printed array in the presence of different  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations: (a)  $3 \times 10^{-7}$  M, (b)  $1 \times 10^{-6}$  M, (c)  $3 \times 10^{-6}$  M, (d)  $1 \times 10^{-5}$  M, (e)  $3 \times 10^{-5}$  M and (f)  $1 \times 10^{-4}$  M. Luminol  $50 \mu\text{M}$ ,  $+650$  mV vs. Pt.

with a detection limit of  $3 \times 10^{-7}$  M (linear range equation:  $y = 0.7503x + 9.1676$ ;  $R^2 = 0.9934$ , Fig. 4).

Moreover, the ECL signal appeared clearly to be spatially localised at the particular electrode surface (Fig. 4). Nevertheless, high hydrogen peroxide concentrations were inducing a glow of the emitted light, leading to less accurate localisation of the emission.

These results suggest the possibility to elaborate biosensors array based on ECL hydrogen peroxide detection, by assembling a particular sensing layer and a single electrode of the SP electrode array.

### 3.3. Characterization of the sensing layers

In biosensor developments, it is well known that the immobilized enzyme activity has a direct effect on the bio-analytical system performances. In the present case, only little amount of glucose oxidase and lactate oxidase were used during the immobilization step, 32 and 8.6 mIU, respectively, corresponding to 320 and 120 ng of dry enzyme preparation.

The catalytic activity recovery after the sensing layers deposition was then a critical step. This recovery was then characterized after measuring the immobilized activities and comparing them with the theoretically spotted activities (Table 2).

As it can be seen, the sensing layers activities were found to be 2.8 mIU for glucose oxidase and 5.5 mIU for lactate oxidase. These values corresponded to 8.8 and 64% of the theoretical activities obtained from the measurement of the enzyme stock solutions activities.

Such differences led to more extensive studies about the activities variations during the immobilization process. Indeed, these activity losses could be attributed either to an enzyme denaturation during the immobilization step, or to

Table 2  
Activity of the different enzyme fractions

	Activity (mIU)
GOD (5 mg/mL) theoretical	32
GOD (5 mg/mL), PVA–SbQ 1:50	14 (43.8%)
GOD, sensing layer	2.8 (8.8%)
LOD (2 mg/mL) theoretical	8.6
LOD (2 mg/mL), PVA–SbQ 1:50	7 (81.4%)
LOD, sensing layer	5.5 (64%)

For the enzyme solutions, activities were calculated for a volume of 64 nL ( $4 \times 16$  nL: total spotted volume for a sensing layer). The percentages in brackets are normalized to the theoretical activity.

a maximum protein mass entrapment capability of the produced sensing layer.

The measurements of the real activities in the spotting solutions (oxidases in PVA–SbQ 1:50) demonstrated a drastic decrease of the enzyme reaction rate. Nevertheless, such a loss could not totally explain the observed difference between the theoretical and the measured sensing layer activities. The spotting process and the polymerisation step were then also incriminated. This phenomenon could be attributed to either a partial entrapment of the oxidases and/or to an increase of the steric constraints on it.

### 3.4. Calibration of the biochip, multi-analytes detection

A large number of glucose and lactate biochips were prepared by spotting the enzyme solutions at the surface of two of the nine electrodes of the SP array, and the analytical performances of the biochip studied.

For that purpose, different analyte concentrations were applied to the biochip, from 1  $\mu\text{M}$  to 1 mM for lactate and from 3  $\mu\text{M}$  to 3 mM for glucose. Four replicate measurements of each concentration were performed with four different biochips and the corresponding calibration curves plotted. The detection limits obtained for lactate and glucose were 3 and 10  $\mu\text{M}$ , respectively, with detections ranging over three decades for both substrates (linear range equation:  $y = 0.8418x + 8.09$  and  $R^2 = 0.9919$  for glucose;  $y = 0.716x + 7.7313$  and  $R^2 = 0.9723$  for lactate).

This biosensor array was then characterized through its ability to selectively perform the detection of one analyte without cross-talking or interference problem from the other electrode/sensing layer. As it could be seen in Fig. 5, the presence at the surface of the biochip of so-

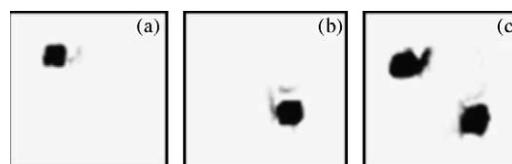


Fig. 5. Micrographs of the biochip obtained with the CCD camera. All the electrodes were poised concomitantly at  $+650$  mV vs. Pt during 5 min. Luminol  $50 \mu\text{M}$  in VBS. (a) Glucose  $100 \mu\text{M}$ , (b) lactate  $100 \mu\text{M}$  and (c) glucose and lactate  $100 \mu\text{M}$ .

lutions containing glucose (Fig. 5a) or lactate (Fig. 5b) at a concentration of 0.1 mM each, did not generate any cross-talking problem during measurement time (5 min). In each case, a perfectly localised and well-defined signal was observed.

Moreover, Fig. 5c presents an example of the image obtained in the presence of both analytes. No interference between the two sensing layers was observed, leading to accurate determination of both substrates concomitantly.

Finally, the effect of each substrate, on the detection of the other was studied by determining the calibration curves described above, in the presence and in the absence of a 0.1 mM concentration of the second analyte (data not shown). In both cases, no modification of the detection limit, of the sensitivity or of the linear range could be observed, demonstrating the selectivity of each sensing layer and the efficiency of the electrode chip design.

Compared to multi-parameters micro-biosensors previously described, based either on amperometric [29,31–33] or ECL [21] detections, the sensitivity and the detection limit of the present biochip appeared to be really satisfying. Indeed, the detection limits obtained for multi-analyte detection were generally in the 2–100  $\mu$ M range with linear detections up to 100 mM. Moreover, only few systems [21,31] were able to detect both analytes simultaneously, without complicated set-up, and without any cross-talk effects.

#### 4. Conclusion

The present work demonstrates the analytical possibilities of screen-printed carbon electrode arrays to produce multi-parameters biosensors, based on electrochemiluminescent detection.

First, such devices could lead to the realization of low-cost biochips, since the electrode arrays are easily produced through an automated process using inexpensive reagents (commercial carbon ink). Secondly, the described immobilization method performed with an automatic nano-spotter necessitates only few amounts of enzyme. Indeed, one sensing layer requires a 64 nL drop of a 5 mg/mL oxidase solution. Thus, 1 mg of enzyme should be sufficient to produce 3100 glucose-sensing layers or 7800 lactate-sensing layers. Furthermore, compared to previously described carbon paste-based amperometric biosensors requiring from 10 [15] to 2700 IU [34] of enzyme (GOD), the present sensing layer, involving only 32 mIU, was shown to be really cost effective.

The performances of the present system compared well with those obtained with existing biosensors [8,12–15,17,19,21,26,29,31–34]. Indeed, the screen-printed ECL biochip allows miniaturisation and parallelisation and could be an alternative answer to the increasing need of decentralize tests, not only for clinical analysis but also for environmental and food quality control.

The extension to a larger range of analytes of the present SP carbon electrode array used for the ECL detection of enzymatically generated  $H_2O_2$  is now under investigation, and integration in a microfluidic system will be particularly developed.

#### References

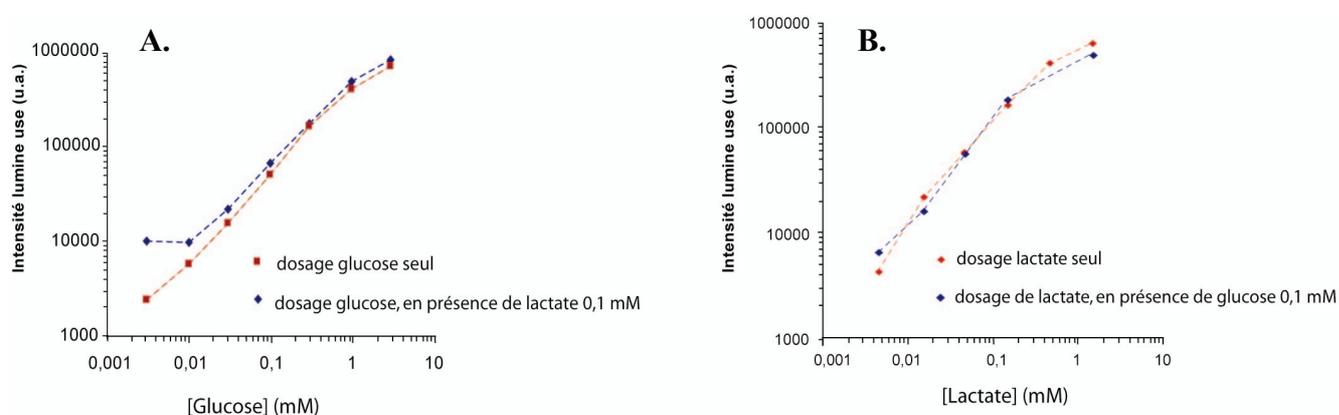
- [1] J.P. Hart, S.A. Wring, *Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 89.
- [2] M. Albareda-Sirvent, A. Mekoçi, S. Alegret, *A Review, Sens. Actuators B* 69 (2000) 153.
- [3] A. Avramescu, T. Noguier, V. Magearu, J.-L. Marty, *Anal. Chim. Acta* 433 (2001) 81.
- [4] A. Vasilescu, S. Andreescu, C. Bala, S.C. Litescu, T. Noguier, J.-L. Marty, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 781.
- [5] G.S. Nunes, G. Jeanty, J.-L. Marty, *Anal. Chim. Acta* 523 (2004) 107.
- [6] J. Rojas, A.F. Tachon, D. Chevalier, T. Noguier, J.L. Marty, *Ch. Ghommidh, Sens. Actuators B* 102 (2004) 284.
- [7] W.A. Collier, D. Janssen, A.L. Hart, *Biosens. Bioelectron.* 11 (1996) 1041.
- [8] C.A. Galan-Vidal, J. Munoz, C. Dominguez, S. Alegret, *Sens. Actuators B* 67 (1997) 55.
- [9] H. Olschewski, A. Erlenkötter, C. Zaborosch, G.-C. Chemnitz, *Enzyme Microb. Tech.* 26 (2000) 537.
- [10] R. Solná, E. Dock, A. Christenson, M. Winther-Nielsen, C. Carlsson, J. Emnéus, T. Ruzgas, P. Skládal, *Anal. Chim. Acta* 528 (2005) 9.
- [11] U. Bilitewski, A. Jäger, P. Rüger, W. Wise, *Sens. Actuators B* 15–16 (1993) 113.
- [12] R. Nagata, K. Yokoyama, S.A. Clark, I. Karube, *Biosens. Bioelectron.* 10 (1994) 261.
- [13] A. Cagnini, I. Palchetti, I. Lioni, M. Mascini, A.P.F. Turner, *Sens. Actuators B* 24–25 (1995) 85.
- [14] F. Ricci, A. Amine, C.S. Tuta, A.A. Ciucu, F. Lucarelli, G. Palleschi, D. Moscone, *Anal. Chim. Acta* 485 (2003) 111.
- [15] K. Ohfuji, N. Sato, N. Hamada-Sato, T. Kobayashi, C. Imada, H. Okuma, E. Watanabe, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004) 1237.
- [16] S. Sakura, *Anal. Chim. Acta* 262 (1992) 49.
- [17] C.A. Marquette, L.J. Blum, *Anal. Chim. Acta* 381 (1999) 1.
- [18] V.C. Tsafack, C.A. Marquette, B. Leca, L.J. Blum, *Analyst* 125 (2000) 151.
- [19] L. Zhu, Y. Li, F. Tian, B. Xu, G. Zhu, *Sens. Actuators B* 84 (2002) 265.
- [20] R. Wilson, J. Kremesköter, D.J. Schiffrin, J.S. Wilkinson, *Biosens. Bioelectron.* 11 (1996) 805.
- [21] C.A. Marquette, A. Degiuli, L.J. Blum, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2003) 433.
- [22] C.A. Marquette, D. Thomas, A. Degiuli, L.J. Blum, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 922.
- [23] C.A. Marquette, B.D. Leca, L.J. Blum, *Luminescence* 16 (2001) 159.
- [24] B. Leca, L.J. Blum, *Analyst* 125 (2000) 789.
- [25] M.A. Carsol, M. Macini, *Talanta* 47 (1998) 335.
- [26] F. Ge, X.E. Zhang, Z.P. Zhang, X.M. Zhang, *Biosens. Bioelectron.* 13 (1998) 333.
- [27] A. Silber, N. Hampf, W. Schuhmann, *Biosens. Bioelectron.* 11 (1996) 215.
- [28] B.D. Leca, A.M. Verdier, L.J. Blum, *Sens. Actuators B* 74 (2001) 190.
- [29] J. Perdomo, H. Hinkers, C. Sundermeier, W. Seifert, O. Martinez Morell, M. Knoll, *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 512.
- [30] V.C. Tsafack, C.A. Marquette, F. Pizzolato, L.J. Blum, *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 125.

- [31] F. Palmisano, R. Rizzi, D. Centonze, P.G. Zambonin, *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 531.
- [32] I. Moser, G. Jobst, G.A. Urban, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 297.
- [33] M. Badea, A. Curulli, G. Palleschi, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 689.
- [34] A. Guzman-Vasquez de Prada, N. Pena, C. Parrado, A.J. Reviejo, J.M. Pingarron, *Talanta* 62 (2004) 896.



## Travaux annexes :

Utilisant le type de biopuce présenté dans l'article 1, les éventuels phénomènes d'interférences entre les deux couches sensibles (God et Lod) ont été étudiés. L'influence de la présence de lactate à une concentration de 0,1 mM sur la mesure du glucose en solution est présentée figure 43.A. Ces résultats montrent que la présence de lactate produit des interférences sur les mesures de glucose lorsque la concentration en glucose est inférieure à 30  $\mu\text{M}$ . Cet effet est uniquement attribué à l'oxydation du lactate par la glucose oxydase (Marquette *et al.*, 2003b). D'autre part, aucun effet notable de la présence de glucose dans la solution de mesure n'a été observé sur la mesure de lactate (figure 43.B).



**Figure 43.** Courbes de calibration des biopuces supportant quatre spots à la surface d'une électrode. Le glucose et le lactate sont également détectés en présence de l'autre métabolite à une concentration de 0,1 mM.

Les biopuces ont alors été testées sur des échantillons de sérums humains reconstitués dont les concentrations en glucose et lactate sont connues. Les dosages de lactate et de glucose ont été réalisés de manière simultanée et comparés aux valeurs attendues (tableau 2). Compte tenu des concentrations en lactate attendues, les interférences générées par sa présence sont négligeables.

**Tableau 2.** Dosage de glucose et de lactate dans des sérums humains reconstitués (1/100 dans VBS).

	Métabolite dosé	Valeurs mesurées (mM ; n=4)	Valeurs attendues (mM)
Sérum "normal"	$\beta$ -D-glucose	$3,2 \pm 0,7$	$4,3 \pm 0,6$
	L-lactate	$1,1 \pm 0,4$	$2 \pm 0,7$
Sérum "pathologique"	$\beta$ -D-glucose	$9,9 \pm 2,5$	$10,6 \pm 0,9$
	L-lactate	$4 \pm 1,2$	$4,8 \pm 0,7$

Ainsi, les résultats montrent que les valeurs mesurées sont proches des valeurs attendues avec néanmoins une sous évaluation de la concentration de chaque analyte. Cet effet peut être attribué aux constituants présents dans les sérums qui perturbent les mesures, malgré une dilution au 100<sup>ème</sup>.

Les différentes expériences réalisées sur ces électrodes sérigraphiées ont permis de démontrer la faisabilité de biopuces enzymatiques utilisant des réseaux d'électrodes de carbone sérigraphiés pour la création de biopuces. Ceux-ci sont des supports conducteurs de choix, élaborés de façon reproductible et pouvant être utilisées notamment afin de réaliser des détections électrochimiluminescentes.

## Chapitre II

### Les sels de Diazonium, immobilisation de biomolécules

Article 2 :

**Diazonium-Protein Adducts for Graphite Electrode Microarrays Modification: Direct  
And Addressed Electrochemical Immobilization**

Benjamin P. Corgier, Christophe A. Marquette, Loïc J. Blum

*Journal of the American Chemical Society* 127 (2005) 18328-18332

Article 3 :

**Direct electrochemical addressing of immunoglobulins:  
Immuno-chip on screen-printed microarray**

Benjamin P. Corgier, Christophe A. Marquette, Loïc J. Blum

*Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 1522–1526

Article 4 :

**A Versatile Method for Direct and Covalent Immobilization of DNA  
and Proteins on Biochips**

Benjamin P. Corgier, Alain Laurent, Pascal Perriat, Loïc J. Blum, and Christophe A.  
Marquette

*Angewandte Chemie International Edition* 46 (2007) 4108-4110

**Article 2 :****Diazonium-Protein Adducts for Graphite Electrode Microarrays Modification: Direct and Addressed Electrochemical Immobilization**

Benjamin P. Corgier, Christophe A. Marquette, Loïc J. Blum

*Journal of the American Chemical Society* 127 (2005) 18328-18332

Dans le but d'étudier et de développer une méthode d'immobilisation pour biopuces, les propriétés de greffage électrochimique des sels de diazonium ont été étudiées sur nos réseaux d'électrodes sérigraphiés.

L'objectif est d'utiliser ces propriétés afin de parvenir à adresser électrochimiquement des biomolécules sur les électrodes sérigraphiées. À partir de cette étude, les réseaux d'électrodes de seconde génération ont été employés (figure 28.B, page 54). Ils possèdent des électrodes de travail d'une surface plus faible ( $0,2 \text{ mm}^2$ ), et surtout, la zone de travail est délimitée par un vernis isolant.

L'article 2 présente en premier lieu la caractérisation des propriétés d'électro-adressage des sels de diazonium sur ces électrodes sérigraphiées. Ce phénomène est suivi par voltammétrie cyclique (figure 2 de l'article 2), puis le dépôt formé à l'aide du 4-bromo-aryldiazonium est caractérisé par XPS (figure 3 de l'article 2).

Après avoir démontré les possibilités de greffage des sels de diazonium covalent sur ces réseaux d'électrodes sérigraphiées, la diazotation puis l'électro-adressage de la carboxyméthyl-aniline (CMA) sont présentés (figure 2 de *Supporting Information*). Une stratégie innovante d'électro-adressage d'anticorps modifiés par du CMA a alors été élaborée (figure 1 de l'article 2). Les conditions furent optimisées afin d'obtenir une méthode de greffage spécifique qui permet la détection de ces protéines immobilisées. Les propriétés des couches sensibles obtenues ainsi que les performances de ce modèle de biopuce utilisant des anticorps immobilisés modifiés par la CMA sont présentées et discutées (figure 4 de l'article 2).

Cette méthode d'immobilisation a également été utilisée pour l'immobilisation de plusieurs couches sensibles sur la même biopuce. Ainsi, deux anticorps provenant de deux espèces différentes (lapin et humain) modifiés par la CMA ont été électro-adressés successivement sur des électrodes sérigraphiées d'un même réseau, et les images obtenues lors de la détection chimiluminescente des couches sensibles formées sont présentées figure 5 de l'article 2.

## Diazonium–Protein Adducts for Graphite Electrode Microarrays Modification: Direct and Addressed Electrochemical Immobilization

Benjamin P. Corgier, Christophe A. Marquette,\* and Loïc J. Blum

Contribution from the Laboratoire de Génie Enzymatique et Biomoléculaire, UMR 5013 EMB2, CNRS Université Claude Bernard Lyon 1, Bât CPE, 43, boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne, Cedex, France

Received October 11, 2005; E-mail: christophe.marquette@univ-lyon1.fr

**Abstract:** Diazonium cation electrodeposition was investigated for the direct and electro-addressed immobilization of proteins. For the first time, this reaction was triggered directly onto diazonium-modified proteins. Screen-printed (SP) graphite electrode microarrays were studied as active support for this immobilization. A 10-microelectrode (eight working electrodes, 0.2 mm<sup>2</sup> each; one reference; and one auxiliary) setup was used to study the addressing possibilities of the method. These electrode microarrays were shown to be able to covalently graft diazonium cations through electrochemical reduction. Cyclic voltammetry and X-ray photoelectron spectroscopy were used to characterize the electrochemical grafting onto our SP graphite surface and suggested that a diazonium monolayer was deposited. Rabbit and human immunoglobulins (IgGs) were then chemically coupled to an aniline derivative (4-carboxymethylaniline), followed by diazotation to form an aryl diazonium function available for the electrodeposition. These modified proteins were both successfully electro-addressed at the surface of the graphite electrodes without cross-talk or interference. The immuno-biochip obtained using this novel approach enabled the specific detection of anti-rabbit IgG antibodies with a detection limit of 50 fmol of protein. A promising strategy to immobilize markedly different biological entities was then presented, providing an excellent spatial specificity of the electro-addressing.

### Introduction

Chemical modification of surfaces has proven to be one of the best strategies to ensure the covalent immobilization of a large scale of either organic or biological molecules. Indeed, following the extended use of molecule adsorption onto activated polystyrene surfaces (96-well plate material), the coming of microarray developments has generated a dramatic increase in surface chemistry research programs. Thus, silane on glass<sup>1–5</sup> or silicon<sup>6,7</sup> and thiol on gold<sup>8–11</sup> were the first to be brought to the forefront because of their well-known chemistry. However, these techniques, when used for microarray developments,

always require a physical addressing of the molecules of interest following the surface modification, i.e., spotting of nanodrops or photolithography technologies.

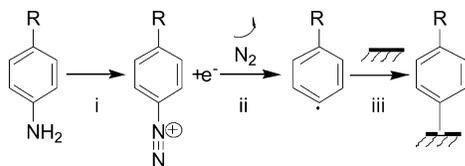
Other solutions to obtain the precise localization of immobilized molecules on a surface include the use of active materials such as electrode arrays acting as catalyst of the immobilization reaction. This is mainly obtained through the electropolymerization of insoluble polymers (polypyrrole,<sup>12–14</sup> polyaniline<sup>15,16</sup> and derivatives), entrapping or supporting the molecule of interest.

A step further could be achieved by the use of aryl diazonium cations to perform a direct electrochemical grafting at the surface of a conducting electrode<sup>17–19</sup> (Scheme 1). Diazonium-based procedures offer the advantages of simplicity, efficiency, and speed of the chemistry involved: (i) the diazotation reaction of an aniline derivative leads easily to the formation of an aryl

- (1) Kallury, K. M. R.; Krull, U. J.; Thompson, M. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 169–172.
- (2) Maskos, U.; Southern, E. M. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20* (7), 1679–1684.
- (3) Gray, D. E.; Case-Green, S. C.; Fell, T. S.; Dobson, P. J.; Southern, E. M. *Langmuir* **1997**, *13* (10), 2833–2842.
- (4) Okamoto, T.; Suzuki, T.; Yamamoto, N. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18* (4), 438–441.
- (5) Chrisey, L. A.; Lee, G. U.; O’Ferrall, C. E. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24* (15), 3031–3039.
- (6) Macanovic, A.; Marquette, C.; Polychronakos, C.; Lawrence, M. F. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32* (2), e20–e27.
- (7) Marquette, C. A.; Lawrence, I.; Polychronakos, C.; Lawrence, M. F. *Talanta* **2002**, *56*, 763–768.
- (8) Patolsky, F.; Weizmann, Y.; Willner, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (5), 770–772.
- (9) Trau, D.; Lee, T. M. H.; Lao, A. I. K.; Lenigk, R.; Hsing, I. M.; Ip, N. Y.; Carles, M. C.; Sucher, N. J. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (13), 3168–3173.
- (10) Wegner, G. J.; Lee, H. J.; Corn, R. M. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (20), 5161–5168.
- (11) Long, Y. T.; Li, C. Z.; Sutherland, T. C.; Kraatz, H. B.; Lee, J. S. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (14), 4059–4065.

- (12) Coche-Guerente, L.; Cosnier, S.; Innocent, C.; Mailley, P.; Moutet, J. C.; Morelis, R. M.; Leca, B.; Coulet, P. R. *Electroanalysis* **1993**, (5), 647–652.
- (13) Liljegen, G.; Nyholm, L. *Analyst* **2003**, *128* (3), 232–236.
- (14) Marquette, C. A.; Laurenceau, E.; Mallet, F.; Chaix, C.; Blum, L. J.; Mandrand, B. *Anal. Biochem.* **2005**, *340* (1), 14–23.
- (15) Guadarrama, A.; Rodríguez-Mendez, M. L.; Sanz, C.; Ríos, J. L.; De Saja, J. A. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *432* (2), 283–292.
- (16) Cao, T.; Chen, J.; Cao, W.; Wei, F.; Liao, W.; Zhao, X.; Jiao, X. *Langmuir* **2003**, *19* (20), 8127–8129.
- (17) Downard, A. J. *Electroanalysis* **2000**, *12* (14), 1085–1096.
- (18) Barbier, B.; Pinson, J.; Desarmot, G.; Sanchez, M. J. *Electrochem. Soc.* **1990**, *137* (6), 1757–1764.
- (19) Delamar, M.; Hitmi, R.; Pinson, J.; Savéant, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (14), 5883–5884.

**Scheme 1.** (i) Diazotation of Aniline Derivative, (ii) Electroreduction of Diazonium Cation, and (iii) Covalent Linkage to the Electrode Surface



diazonium, (ii) the electrochemical reduction of this latter species generates an aryl radical, which attacks the surface and forms an X-C bond (where X is the electrode material, namely, Au, C, Cu, Si).

This technique of derivatization has already been demonstrated on a wide range of conducting materials such as carbon,<sup>19–28</sup> carbon nanotubes,<sup>29</sup> silicon,<sup>30–33</sup> metals,<sup>34–38</sup> and diamond.<sup>39</sup> In most cases, the electrochemical addressing was performed in organic solvent (acetonitrile), and the modified electrode was subsequently grafted with an interesting molecule (in some cases a protein).

An innovative approach is presented herein based on the modification of proteins with aniline derivatives (NH<sub>2</sub>-Ar-R) and the subsequent diazotation and electro-addressing of the modified proteins at a graphite electrode surface (Figure 1). This approach benefits the possibility of diazonium reduction in acidic aqueous medium<sup>28,40–42</sup> and enables, to our knowledge, for the first time, a true addressed electrochemical covalent grafting of proteins at an electrode surface. The conducting material used is a 10-electrode microarray, developed and characterized previously by our group<sup>14,43</sup> and obtained through a screen-

printing (SP) technique. This technology is presented as a promising tool for achieving marketable biosensors, taking advantage of low-cost and mass-production possibilities.<sup>44,45</sup>

Herein, a biological model is presented based on rabbit immunoglobulin (IgG) first functionalized with 4-carboxymethyl-aniline (CMA) and then diazotated and electro-addressed on target electrodes of the microarray (Figure 1). X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and cyclic voltammetry were used to characterize the diazonium reduction and grafting on this electrode material.

Validation of the quality of the addressed immobilization was performed through the recognition of the immobilized proteins by peroxidase-labeled anti-IgG antibodies and the measurement, with a CCD camera imaging system, of the chemiluminescent signals emitted.

## Experimental Section

**Reagents.** 4-Aminophenylacetic acid (4-carboxymethylaniline; CMA), 4-bromobenzenediazonium tetrafluoroborate (BrDz), bovine serum albumin (BSA), immunoglobulin from human serum (human IgG), luminol (3-aminophthalhydrazide), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), and peroxidase-labeled polyclonal anti-rabbit IgG antibodies developed in goat and polyoxyethylenesorbitan monolaureate (tween 20) were purchased from Sigma (Lyon, France). Sodium nitrite and Veronal (diethylmalonylurea sodium) were purchased from Prolabo (Fontenay Sous Bois, France). Immunoglobulins from rabbit serum (rabbit IgG) were obtained from Life Line Lab (Pomezia, Italy). Peroxidase-labeled polyclonal anti-human IgG (H + L) antibodies developed in goat were purchased from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). All buffers and aqueous solutions were made with distilled demineralized (dd) water.

**Electrode Microarray Preparation.** A DEK 248 screen-printing machine (DEK, Lyon, France) was used to produce the graphite electrode microarrays. A polyester monofilament fiber screen (DEK, Dorset, U.K.) characterized by a mesh size of 260 counts per inch and a thickness of 13 μm was used to print the graphite ink (Electrodag 423 SS, Acheson, Erstein, France) onto a polyester flexible foil. After being printed, the polyester foils supporting 16 electrode arrays were baked for 10 min at 100 °C to cure the thermoplastic carbon ink.

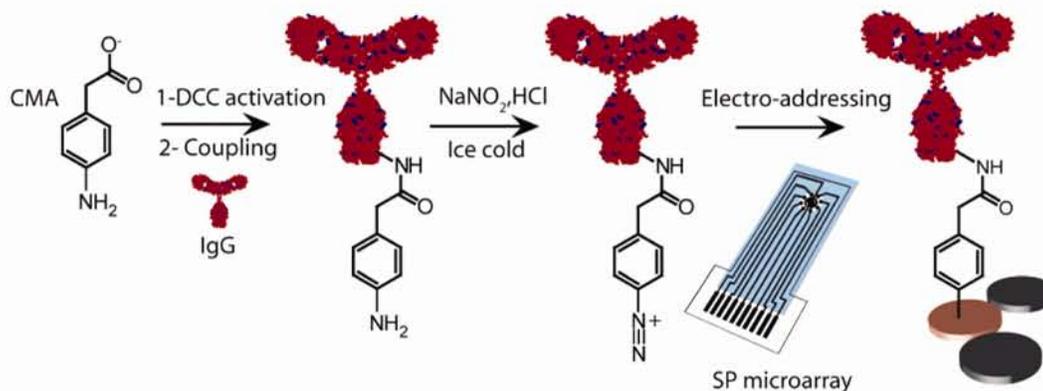
A second layer, composed of insulating polymer (MINICO M 7000, Acheson, Erstein, France) was then printed onto the microarrays to define a window (easily covered with a 35-μL drop of solution) delimiting the active area composed of eight 0.2-mm<sup>2</sup> working electrodes, one ring-shaped reference electrode, and one central auxiliary electrode (Figure SI 1, Supporting Information).

**X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS).** XPS spectra were realized on a 1-mm analysis window with an ESCALAB instrument (VG Scientific) using an Al anode (Kα X-rays at 1486.6 eV) and an analysis energy of 50 eV. Larger screen-printed electrodes (25 mm<sup>2</sup>), prepared as described above, were used to achieve convenient XPS experiments. The atom percentages were determined from the peak areas, the sensitivity factors given by the VG software (inelastic mean free path and transmission function), and the cross section for X-ray excitation as calculated by Scofield.<sup>46</sup>

**Protein Modifications.** A two-step reaction protocol was elaborated to modify the proteins. First, 10 mg of 4-carboxymethylaniline (CMA) was activated in the presence of 20.6 mg of DCC and 11.5 mg of NHS in 1 mL of DMSO for 30 min under stirring. Then, 20 μL of the activated CMA was added to 500 μL of a 5 mg/mL protein solution in 0.1 M carbonate buffer, pH 11. The protocols were identical for both

- (20) Combellas, C.; Kanoufi, F.; Pinson, J.; Podvorica, F. *I. Langmuir* **2005**, *21* (1), 280–286.
- (21) Liu, S.; Tang, Z.; Shi, Z.; Niu, L.; Wang, E.; Dong, S. *Langmuir* **1999**, *15* (21), 7268–7275.
- (22) Kuo, T. C.; McCreery, R. L.; Swain, G. M. *Electrochem. Solid-State Lett.* **1999**, *2* (6), 288–290.
- (23) Kariuki, J. K.; McDermott, M. T. *Langmuir* **1999**, *15* (19), 6534–6540.
- (24) Bahr, J. L.; Tour, J. M. *Chem. Mater.* **2001**, *13* (11), 3823–3824.
- (25) Liu, Y. C.; McCreery, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (45), 11254–11259.
- (26) Saby, C.; Ortiz, B.; Champagne, G. Y.; Bélanger, D. *Langmuir* **1997**, *13* (25), 6805–6813.
- (27) Allongue, P.; Delamar, M.; Desbat, B.; Fagebaume, O.; Hitmi, R.; Pinson, J.; Savéant, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (1), 201–207.
- (28) Delamar, M.; Désarmot, G.; Fagebaume, O.; Hitmi, R.; Pinson, J.; Savéant, J. M. *Carbon* **1997**, *35* (6), 801–807.
- (29) Lee, C. S.; Baker, S. E.; Marcus, M. S.; Yang, W.; Eriksson, M. A.; Hamers, R. J. *Nano Lett.* **2004**, *4* (9), 1713–1716.
- (30) De Villeneuve, C. H.; Pinson, J.; Bernard, M. C.; Allongue, P. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101* (14), 2415–2420.
- (31) Allongue, P.; Henry De Villeneuve, C.; Pinson, J.; Ozanam, F.; Chazalviel, J. N.; Wallart, X. *Electrochim. Acta* **1998**, *43* (19–20), 2791–2798.
- (32) Allongue, P.; Henry de Villeneuve, C.; Cherouvrier, G.; Cortès, R.; Bernard, M. C. *J. Electroanal. Chem.* **2003**, *161*, 550–551.
- (33) Adenier, A.; Bernard, M. C.; Chehimi, M. M.; Cabet-Deliry, E.; Desbat, B.; Fagebaume, O.; Pinson, J.; Podvorica, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (19), 4541–4549.
- (34) Pinson, J.; Podvorica, F. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34* (5), 429–439.
- (35) Chaussé, A.; Chehimi, M. M.; Karsi, N.; Pinson, J.; Podvorica, F.; Vautrin-Ul, C. *Chem. Mater.* **2002**, *14* (1), 392–400.
- (36) Bernard, M. C.; Chaussé, A.; Cabet-Deliry, E.; Chehimi, M. M.; Pinson, J.; Podvorica, F.; Vautrin-Ul, C. *Chem. Mater.* **2003**, *15* (18), 3450–3462.
- (37) Adenier, A.; Cabet-Deliry, E.; Lalot, T.; Pinson, J.; Podvorica, F. *Chem. Mater.* **2002**, *14* (11), 4576–4585.
- (38) Laforgue, A.; Addou, T.; Bélanger, D. *Langmuir* **2005**, *21* (15), 6855–6865.
- (39) Wang, J.; Firestone, M. A.; Auciello, O.; Carlisle, J. A. *Langmuir* **2004**, *20* (26), 11450–11456.
- (40) Heald, C. G. R.; Wildgoose, G. G.; Jiang, L.; Jones, T. G. J.; Compton, R. G. *ChemPhysChem* **2004**, *5* (11), 1794–1799.
- (41) Ruffien, A.; Dequaire, M.; Brossier, P. *Chem. Commun.* **2003**, *9* (7), 912–913.
- (42) Dequaire, M.; Degrand, C.; Limoges, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (29), 6946–6947.
- (43) Corgier, B. P.; Marquette, C. A.; Blum, L. *J. Anal. Chim. Acta* **2005**, *538* (1–2), 1–7.

- (44) Hart, J. P.; Wring, S. A. *Trends Anal. Chem.* **1997**, *16* (2), 89–103.
- (45) Albareda-Sirvent, M.; Merkoçi, A.; Alegret, S. *Sens. Actuators B: Chem.* **2000**, *69* (1), 153–163.
- (46) Scofield, J. H. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1976**, *8* (2), 129–137.



**Figure 1.** Strategy for direct electro-addressing of modified antibody onto SP graphite electrode surface. CMA, 4-carboxymethylaniline; DDC, *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide.

rabbit and human IgG modification. This coupling solution was left for 2 h under stirring at room temperature before being purified on a P-10 Sephadex G-25M 5 mL column (Supelco, Bellefonte, PA). The desalted modified protein obtained was then concentrated to 10 mg/mL under centrifugation using MicroconYM-3 (Millipore, Billerica, MA). The obtained retentate was recovered in 100  $\mu$ L of dd water and stored at +4  $^{\circ}$ C.

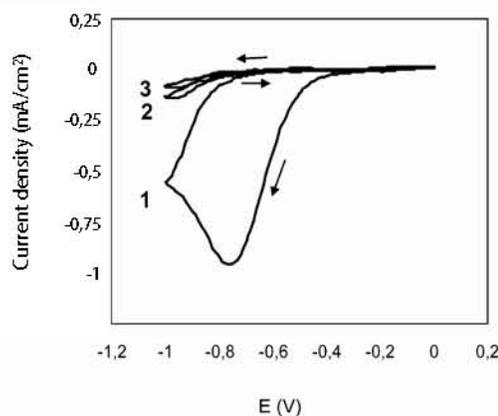
**Diazotation of 4-Carboxymethylaniline.** The aniline derivative CMA, either free or coupled to protein, was diazotated in an aqueous solution of 20 mM HCl and 20 mM NaNO<sub>2</sub> for 10 min under stirring in ice-cold water. The diazonium solution formed was then immediately used to perform electro-addressing.

**Electrodeposition of Diazonium Derivatives.** Electro-addressing was achieved by directly depositing on the SP microarray surface a 35- $\mu$ L drop of either 5 mM free diazonium solution or 0.1 mg/mL modified proteins. Therefore, three cyclic voltammograms were obtained from 0 to -1000 mV, on the chosen electrodes of the microarray at a scan rate of 200 mV/s. The cyclic voltammograms were obtained with a Voltalab PGZ 100 potentiostat (Radiometer Analytical). A specially designed 10-path connector was used to control the potential application on the electrodes of the SP microarray. An external platinum counter electrode and a ring-shaped carbon reference electrode of the screen-printed chip were used to achieve a three-electrode setup. After deposition, the carbon electrodes were fully rinsed with distilled water and sonicated to remove unbound molecules.

**Protein Detection Procedure.** Following electro-addressing, sonication, and washing, the SP microarrays were saturated for 20 min at 37  $^{\circ}$ C with VBSTA (30 mM Veronal, 0.2 M NaCl, pH 8.5, with addition of 1% Tween and 1 g/L BSA). Peroxidase-labeled anti-rabbit or anti-human IgG antibodies at various concentrations in VBSTA were incubated for 1 h at 37  $^{\circ}$ C on the microarrays and then washed with VBS (30 mM Veronal, 0.2 M NaCl, pH 8.5) for 20 min. Finally, the SP microarrays were covered with a 35- $\mu$ L drop of VBS containing in addition 200  $\mu$ M luminol, 20  $\mu$ M *p*-iodophenol, and 500  $\mu$ M hydrogen peroxide, and introduced into a charge-coupled device (CCD) cooled camera light measurement system (Las-1000 Plus, Intelligent Dark Box II, Fujifilm, Tokyo, Japan). The emitted light was then collected and integrated for 10 min. The numeric micrographs obtained were quantified with a Fujifilm image analysis program (Image Gauge 3.122).

## Results and Discussion

Screen-printed (SP) microarrays, previously described and characterized,<sup>14,43</sup> were used as robust and single-use supports to study the possibilities of electrochemically addressing diazonium cations and diazonium-cation-modified proteins. First, the reduction and deposition of aryl diazonium cations at the surface of our SP graphite microarrays was investigated to validate the possibility of electro-addressing these molecules.



**Figure 2.** Cyclic voltammograms of 4-bromobenzenediazonium (5 mM) in 0.1 M HCl and 0.1 M KCl. Potential scanned from 0 to -1000 mV vs graphite pseudoreference electrode. Three cycles performed at a scan rate of 200 mV/s.

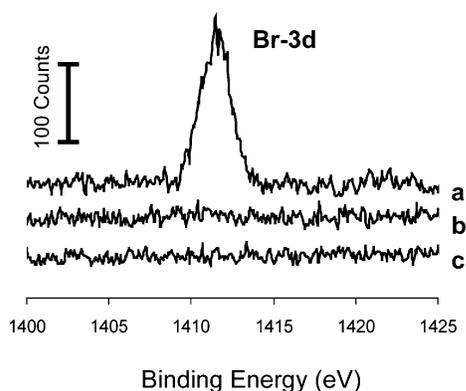
4-Bromobenzenediazonium (BrDz) was used to study this electroreduction process at our SP graphite electrode surface. This derivative was chosen for its bromide residue, which is easily evidenced through XPS measurements. Optimized deposition of BrDz was shown to be obtained using three potential scans from 0 to -1000 mV in aqueous solutions of 0.1 M HCl and 0.1 M KCl.

The three consecutive cyclic voltammograms obtained are presented in Figure 2. They are characterized by a first cycle exhibiting a well-defined, reproducible, and irreversible reduction peak at -750 mV. This feature corresponds to the typical electroreduction wave of the diazonium function, leading to the elimination of a nitrogen molecule and the production of an aryl radical (Scheme 1, steps i and ii). This radical was previously shown to attack the surface and to form a covalent bond between the aryl group and the electrode material (Scheme 1, step iii).<sup>39,42,47</sup>

More information could be obtained from Figure 2 about the deposited layer. Very low currents were observed during the second and third voltammetric cycles, evidencing surface saturation and suggesting that a monolayer of fixed molecules was achieved. Indeed, very fast deposition processes (30 s), as used herein, usually lead to the grafting of only one molecular layer.<sup>48,49</sup>

(47) Vakurov, A.; Simpson, C. E.; Daly, C. L.; Gibson, T. D.; Millner, P. A. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *20* (6), 1118–1125.

(48) Anariba, F.; DuVall, S. H.; McCreery, R. L. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (15), 3837.



**Figure 3.** X-ray photoelectron spectra of (a) electro-addressed BrDz, (b) control experiment without BrDz electroreduction, and (c) bare SP graphite electrode.

XPS experiments were performed on our SP graphite surface to demonstrate the electro-addressed deposition of the bromo aryl. Three SP graphite electrodes—either unmodified, modified with adsorbed BrDz, or modified with electrodeposited BrDz—were scanned at 50 eV, particularly focusing the analysis on the binding energies corresponding to the Br 3d and the N 1s electrons.

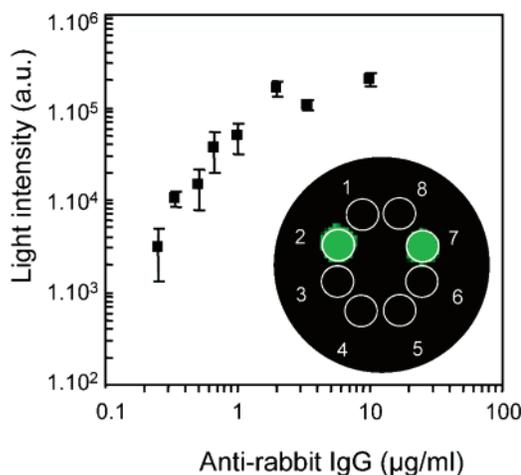
The electrodeposited electrode (Figure 3, curve a) exhibited a peak at 1412 eV, indicating the presence of bromide atoms at the surface with a relative composition of 2.6%. Conversely, no signal from the presence of Br could be found either on the electrode modified by dipping in a BrDz solution (Figure 3, curve b) or on the bare unmodified electrode (Figure 3, curve c).

Exclusively bromo aryl seems then to be present at the surface of the graphite electrode, following the electroreduction of BrDz. Moreover, no detectable signal was obtained for the N 1s decomposition at the electrodeposited electrode (data not shown), confirming the elimination of nitrogen and the agreement of the present reaction with the commonly accepted mechanism presented in Scheme 1.

The use of this electrochemical deposition to address proteins at the surface of our SP microarrays requires, first, the use of an aniline derivative that can be easily linked to the proteins and, second, the achievement of its diazotation under gentle conditions. 4-Carboxymethylaniline (CMA) was found to be such a potential candidate as it contains a carboxylic acid function that is easily activated and grafted through carbodiimide reaction.

Diazotation reaction conditions of the CMA aniline residue, adapted from ref 50, were optimized to fit with the pH and salt concentration requirements for biocompatibility. The cyclic voltammograms obtained during the electrodeposition of freshly diazotated CMA were found to be characteristic of an aryl diazonium grafting (Figure SI 2, Supporting Information), with behaviors similar to those obtained during BrDz deposition onto the SP graphite electrodes. Thus, a clear reduction wave was observed in the presence of diazotated CMA, whereas no current at all could be obtained from the nondiazotated aniline derivative.

The diazotation and electrodeposition of CMA was then shown to be easily obtained, and subsequently, its coupling to



**Figure 4.** Dose response curve of anti-rabbit IgG antibodies. Error bars are the standard deviation of four microarrays. Inset: chemiluminescent micrograph of a SP graphite microarray incubated with peroxidase-labeled anti-rabbit IgG antibodies (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Electrodes 2 and 7 were electro-addressed with CMA–rabbit IgG.

rabbit IgG was elaborated to produce proteins ready to be addressed (CMA–rabbit IgG). The rabbit IgG primary sequence suggests that up to 80 primary amines (essentially lysine) are available for grafting. Attempting as much as possible to keep the protein in its native conformation after immobilization, CMA was reacted with IgG molecules using stoichiometric reagent conditions (moles of CMA vs moles of primary amine).

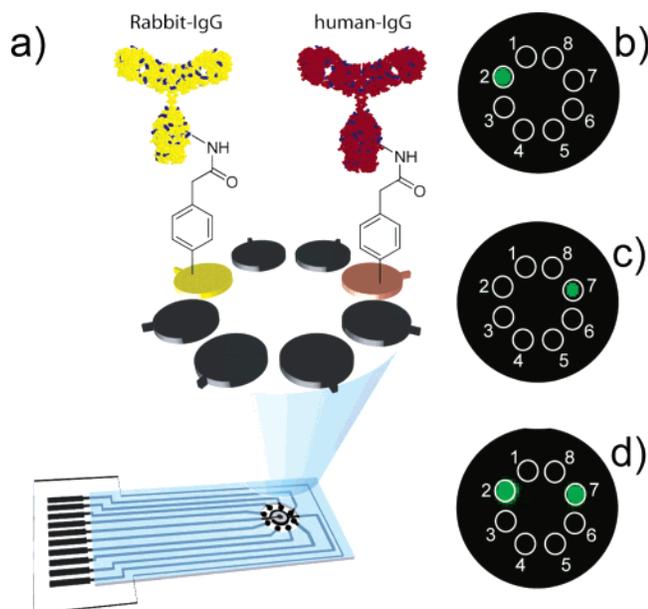
The CMA–rabbit IgG conjugates obtained were diazotated according to the procedure optimized above with free CMA and electrodeposited onto the SP graphite microarray. Nevertheless, the low protein concentration used (0.1 mg/mL) did not enable the recording of any diazonium reduction peak as the corresponding maximum concentration of coupled diazonium was found to be 100 times lower than the CMA concentration used above (<50  $\mu\text{M}$ ).

An indirect demonstration was then performed to detect the electrodeposited rabbit IgG. Peroxidase-labeled anti-rabbit IgG antibodies were used to specifically detect the immobilized proteins through chemiluminescent imaging of the SP microarray surface. As the inset of Figure 4 shows, a clear distinction between the addressed electrodes (nos. 2 and 7) and the six unaddressed electrodes was obtained. Moreover, no nonspecific adsorption of the proteins onto either the graphite material or the SP support (PVC or insulating layer) was observed, demonstrating extremely interesting potentialities for analytical applications.

This possibility of using the addressed electrodeposited protein as an analytical tool was studied by applying to the SP microarrays a range of peroxidase-labeled anti-rabbit IgG antibody concentrations from 0.25 to 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and determining a dose–response curve (Figure 4). A classical ligand/receptor binding curve was obtained with a pseudolinear relation for antibody concentrations ranging from 0.25 to 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , followed by a plateau at higher concentrations. Assuming that the immobilization of the proteins occurred as a monolayer, a limited number of macromolecules are accessible for recognition, leading to saturation at high antibody concentrations. These performances compared well with those obtained using SP

(49) Brooksby, P. A.; Downard, A. J. *Langmuir* **2004**, *20* (12), 5038–5045.

(50) Bourdillon, C.; Delamar, M.; Demaille, C.; Hitmi, R.; Moiroux, J.; Pinson, J. J. *Electroanal. Chem.* **1992**, *336*, 113–123.



**Figure 5.** (a) Illustration of the SP carbon electrode microarray supporting two distinct sensing layers covalently immobilized by electrochemical addressing. Chemiluminescent micrograph of an SP microarray modified with both rabbit and human CMA–IgG and incubated with peroxidase-labeled (b) anti-rabbit IgG antibodies ( $2 \mu\text{g/mL}$ ), (c) anti-human antibodies ( $0.1 \mu\text{g/mL}$ ), and (d) both anti-rabbit IgG antibodies ( $2 \mu\text{g/mL}$ ) and anti-human antibodies ( $0.1 \mu\text{g/mL}$ ). Electrode 2 was electro-addressed first with CMA–rabbit IgG, and then electrode 7 was electro-addressed with CMA–human IgG.

support and protein trapped in an electropolymer<sup>14</sup> or using a standard support such as coated glass slides.<sup>51</sup>

To be fully useful for analytical use, the present addressing system needs to be applied to the sequential immobilization of different proteins.

Two CMA proteins, rabbit and human IgGs, were then synthesized, diazotated, and sequentially electro-addressed to different electrodes of the SP microarray, as presented in Figure 5a.

Despite the fact that, in the addressing protocol, rabbit IgG was deposited first and was then in contact with the diazotated solution of CMA–human IgG, the reactivity of the immobilized rabbit IgG was preserved, and a fully acceptable chemiluminescent signal was obtained (Figure 5b, when compared to the dose–response curve presented above). As shown in Figure 5c, peroxidase-labeled anti-human IgG antibodies also react properly with the immobilized human IgG without cross-reactivity with the immobilized rabbit IgG. Moreover, the two sensing layers could be used concomitantly to detect anti-rabbit and anti-human IgG (Figure 5d).

Thus, the consecutive electro-addressing of two different proteins did not alter the specificity and the sensitivity of the detection, and no cross-talk between the two protein layers was observed, indicating that only the specificity of the antigen/antibody interaction was involved in the detection process.

(51) Cretich, M.; Pirri, G.; Damin, F.; Solinas, I.; Chiari, M. *Anal. Biochem.* **2004**, *332* (1), 67–74.

To validate the possibility of producing eight electro-addressed sensing layers on the different electrodes of a microarray, eight different solutions of diazotated CMA–rabbit IgG were sequentially electrodeposited. Eight sensing layers composed of electro-addressed rabbit IgG were then obtained on a single SP microarray, with good reproducibility (data not shown), and characterized by a consistent chemiluminescent signal emitted from each electrode.

## Conclusion and Perspectives

Screen-printed (SP) graphite electrode microarrays demonstrated their ability to be modified with electro-addressed diazonium cations. Thus, an innovative approach was elaborated to electro-address proteins. Biomolecules were first modified with the aniline derivative 4-carboxymethylaniline (CMA) and then successfully electrodeposited—i.e., without parasitic reduction of the protein part—at the graphite surface through an optimized protocol compatible with biomolecules such as rabbit and human antibodies (IgG).

For the first time ever, such direct electro-addressing of multiple proteins was then described. The immuno-biochip obtained was shown to exhibit interesting detection properties and very low nonspecific binding.

The present system appeared to offer a promising strategy for strongly immobilizing different biological entities—proteins, nucleic acid strands, and peptides—with excellent spatial addressing of the interesting molecules onto electrode microarrays. Indeed, the CMA coupling procedure is compatible with the majority of the biomolecules that could be kept in their native configuration in rather acidic solutions. This is the case, for example, for DNA sequences, carbohydrate structures, peptides, and numerous proteins. Moreover, less drastic conditions could be examined for saving protein activity such as enzyme catalytic activity.

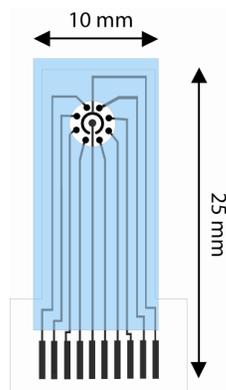
Interesting possibilities should also be obtained by concomitantly using the present modification system with poly(lysine)-tagged proteins. Thus, grafting CMA preferentially onto the polyamine tag<sup>52</sup> will lead to the electro-addressing of oriented proteins at the surface, enhancing the protein immobilization quality and thus the immuno-biochip performances.

**Acknowledgment.** The authors acknowledge P. Delichere from the Institut de Recherches sur la Catayse (Lyon, France) for his useful help in the recording and interpretation of XPS spectra.

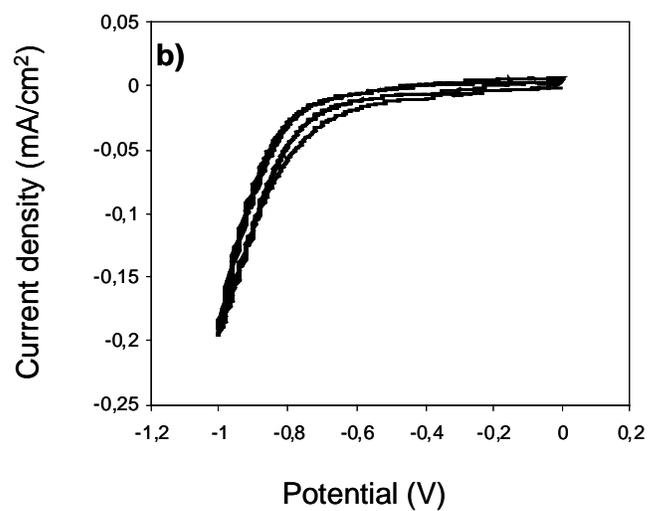
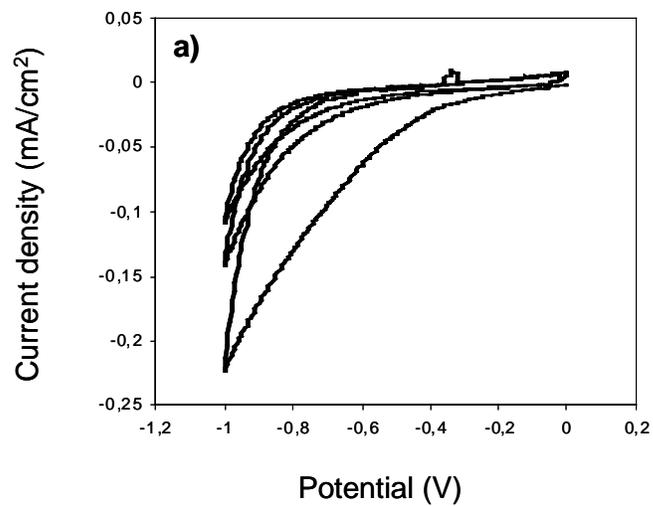
**Supporting Information Available:** Diagram of the SP graphite electrode microarray and electrochemical (cyclic voltammetry) data for the electrodeposition of 4-carboxymethylaniline (CMA). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

JA056946W

(52) Allard, L.; Cheynet, V.; Oriol, G.; Imbert-Laurenceau, E.; Mandrand, B.; Delair, T.; Mallet, F.; Gervasi, G. *Bioconj. Chem.* **2004**, *15*, 458–466.



**SI 1.** The screen-printed electrode microarray. Graphite ink is printed on a transparency foil and subsequently covered with an insulating layer defining a 3 mm diameter window.

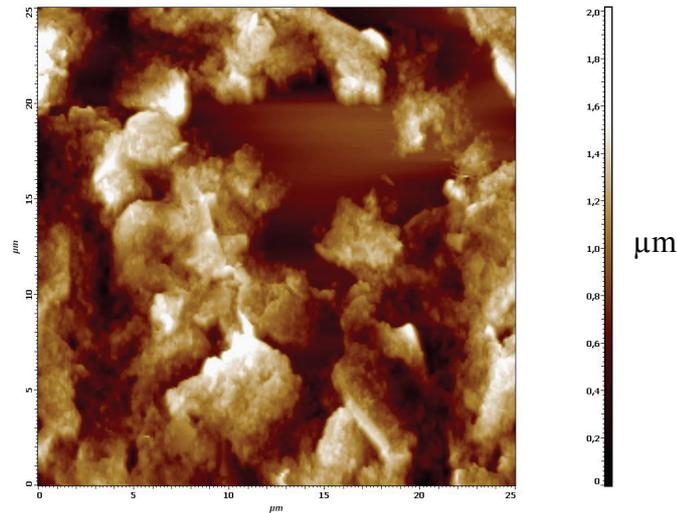


**SI 2.** Cyclic voltammograms of a) 5 mM diazotated CMA and b) 5 mM non-diazotated CMA. Potential scanned from 0 to -1000 mV vs. graphite pseudo-reference electrode. 3 cycles performed at a scan rate of 200 mV/s



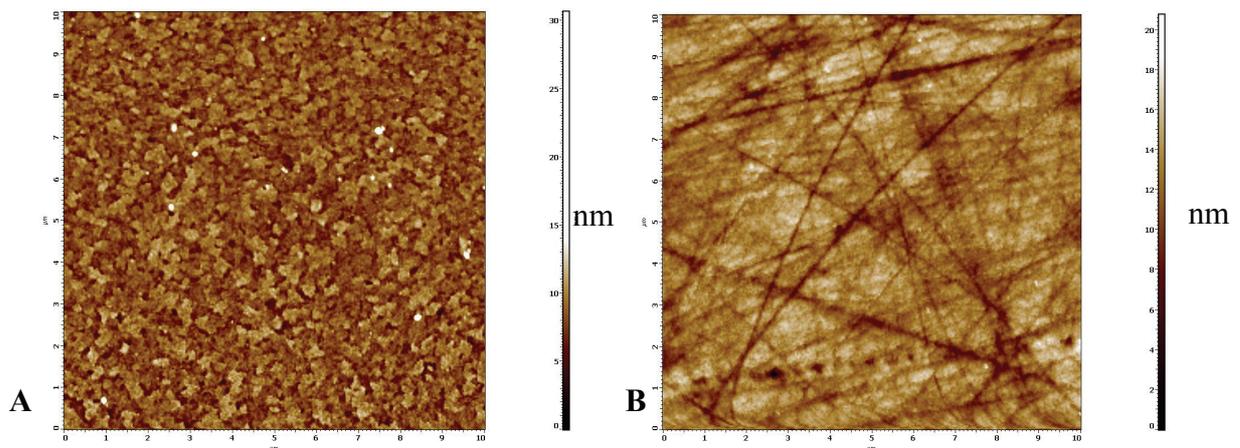
### Travaux annexes :

Afin de caractériser les dépôts de protéines modifiées électro-adressées, des études par AFM ont été réalisées. Il a été nécessaire d'utiliser d'autres supports que nos électrodes sérigraphiées. En effet, celles-ci sont trop rugueuses pour permettre de distinguer d'éventuelles modifications de surface (figures 44).



**Figure 44.** Image obtenue par AFM en mode contact, d'une surface de carbone (25 x 25 μm) de nos réseaux d'électrodes sérigraphiés.

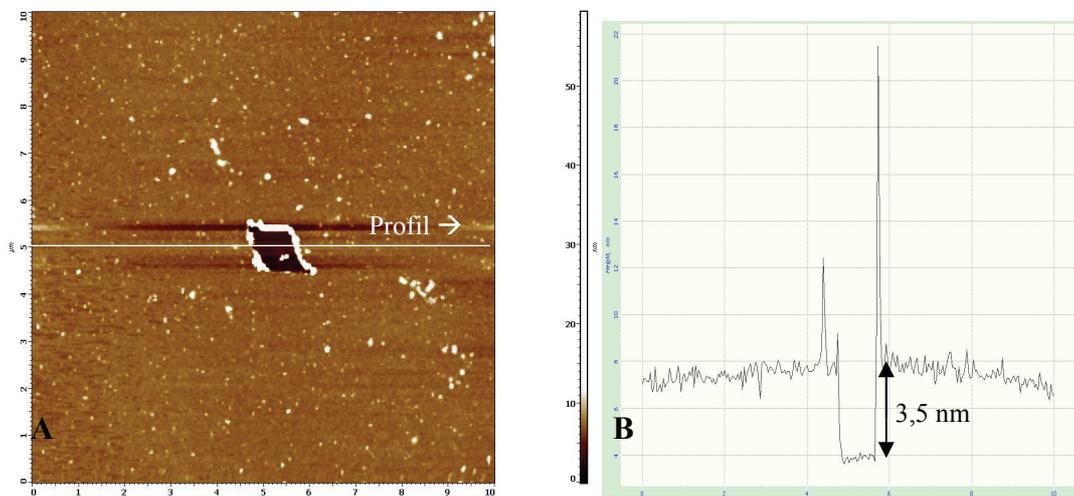
Ainsi, il a été envisagé d'utiliser des surfaces d'apparence plus planes. La figure 45 présente les images obtenues par AFM sur des surfaces de carbone vitreux ou de verre supportant une couche d'ITO. Ces images montrent que la rugosité intrinsèque de ces supports est trop élevée pour permettre de visualiser un changement éventuel dû à un électro-adressage d'anticorps.



**Figure 45.** Image obtenue par AFM en mode semi-contact, 10 x 10 μm, **A)** Surface de verre d'ITO. **B)** Surface de carbone vitreux.

En effet, la surface de l'ITO n'est pas plane, mais composée de fines particules déposées. Cela est dû à la technique de fabrication par pulvérisation cathodique "*electro-sputtering*". D'autre part de nombreuses rayures sont présentes sur le carbone vitreux, elles sont provoquées par le nettoyage à l'aide de pâte contenant des fragments de diamant (1  $\mu\text{m}$ ). Ces deux supports ne permettant pas d'observer clairement les dépôts d'anticorps, une plaque de silicium monocristallin (111) a alors été choisie comme support afin d'électro-adresser et d'imager les anticorps de lapin modifiés par la CMA.

La figure 46 présente une image par AFM en mode semi-contact d'une surface de 10 x 10  $\mu\text{m}$  de silicium sur laquelle ont été électro-adressés des anticorps modifiés. Au centre, on distingue clairement une zone de 1 x 1  $\mu\text{m}$ . Il s'agit d'une image préalablement réalisée en mode contact, où la pointe a été appuyée sur le support et a alors "gratté" la surface. Ainsi l'épaisseur de la couche de protéines déposées est mise en évidence. Le profil (figure 46.B) indique une épaisseur de 3,5 nm. Cela correspond bien à l'épaisseur d'une monocouche d'anticorps déposés (Thomson, 2005). La figure 46.B fait apparaître 2 pics (28 et 55 nm) qui correspondent à des surépaisseurs dues à l'accumulation de protéines engendrée par le grattage. Cette expérience suggère que notre méthode permet bien d'électrogreffer une monocouche d'anticorps.



**Figure 46.** **A)** Image AFM en mode semi-contact, 10 x 10  $\mu\text{m}$ , d'une couche d'anticorps de lapin modifiés par la CMA et électro-adressés sur une surface plane de silicium monocristallin (111). Au centre, la surface a été grattée lors de la réalisation d'une image en mode "contact" de taille 1 x 1  $\mu\text{m}$ . **B)** Profil de la section horizontale de l'image AFM.

Ainsi, le premier article de cette étude a permis de présenter une stratégie innovante d'immobilisation de couches sensibles par d'électro-adressage de biomolécules via les propriétés des aryldiazoniums. Le greffage covalent des diazoniums a été mis en évidence et le modèle de détection d'anticorps de lapin immobilisés peut ainsi servir de base au développement de biopuces plus élaborées.

**Article 3 :**

**Direct electrochemical addressing of immunoglobulins:  
Immuno-chip on screen-printed microarray**  
Benjamin P. Corgier, Christophe A. Marquette, Loïc J. Blum  
*Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 1522–1526

Cet article décrit la suite des travaux réalisés en utilisant l'électro-adressage des anticorps de lapin modifiés par la CMA, puis immobilisés sur les réseaux d'électrodes sérigraphiées de seconde génération. L'objectif est d'utiliser cette stratégie d'électro-adressage pour créer des biopuces afin de réaliser des dosages de facteurs rhumatoïdes dans des échantillons de sérums humains, grâce à un immuno-essai de type capture (figure 4 de l'article 3).

**Le facteur rhumatoïde**

Le facteur rhumatoïde (RF) est le nom générique donné à un ensemble d'immunoglobulines présentes chez certains mammifères, et notamment chez l'homme. Le RF est un ensemble d'anticorps dirigés contre des déterminants antigéniques, spécifiquement contre les chaînes  $\gamma$ , situés dans la région Fc des immunoglobulines de type G des mammifères. Le RF est impliqué chez 70 à 80% des patients présentant une arthrite rhumatoïde classique (Cathcart, 1975) ou définitive et chez seulement 20% des patients présentant une arthrite rhumatoïde juvénile. Les facteurs rhumatoïdes peuvent être des immunoglobulines de type A, D, E, G, ou M.

Le RF n'étant pas spécifique d'une espèce en particulier, des IgG de lapin sont utilisés comme standard afin de détecter cette famille d'anticorps. Ainsi les résultats sont donnés en unité arbitraire en fonction de leur interaction avec des IgG polyclonaux de lapin, et ne correspondent pas à une quantité d'anticorps définie.

Les résultats présentés dans cet article démontrent la possibilité d'immobiliser par électro-adressage des couches sensibles afin de réaliser des détections immunologiques dans des échantillons complexes, sans interférence due au milieu.

De plus des électro-adressages d'anticorps-CMA ont été réalisés de manière consécutive sur les huit électrodes de travail d'un réseau, démontrant ainsi les potentialités d'immobilisation séquentiel de multiples couches sensibles pour la réalisation de biopuces. Il est démontré qu'il

est possible d'électro-adresser des anticorps sur les huit électrodes d'une puce, en conservant les propriétés de reconnaissance de chaque couche sensible. De plus, il a été montré que les huit électro-adressages successifs n'engendrent pas de fixation non-spécifique, que ce soit sur les électrodes de carbone non-adressées (Réf. et CE) ou sur le reste du support.

Cette propriété est très intéressante dans le but d'immobiliser différentes couches sensibles composées de diverses protéines sur plusieurs électrodes d'un même réseau, de manière directe et simple en changeant de solution après chaque étape de rinçage/électro-adressage. Cela permettrait de réaliser des biopuces capables d'effectuer des détections multiples au sein d'un seul échantillon.

Short communication

## Direct electrochemical addressing of immunoglobulins: Immuno-chip on screen-printed microarray

Benjamin P. Corgier, Christophe A. Marquette\*, Loïc J. Blum

*Laboratoire de Génie Enzymatique et Biomoléculaire, UMR 5013 EMB2, CNRS -Université Claude Bernard Lyon 1,  
Bât CPE, 43, bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne, Cedex, France*

Received 20 January 2006; received in revised form 24 April 2006; accepted 5 May 2006

Available online 19 June 2006

### Abstract

An original immobilisation technology is presented for the development of chemiluminescent protein biochips, suitable for measurement in complex matrices. The immobilisation strategy involved is based on diazotated aniline derivatives, which could be electro-addressed, thus creating a covalent linkage with a conducting material surface. The present electrochemical system is a cost effective and mass-produced carbon paste screen-printed (SP) microarray composed of eight 0.2 mm<sup>2</sup> working electrodes, one carbon pseudo-reference electrode and one auxiliary electrode.

Rabbit immunoglobulins (IgG) were chemically modified with an aniline derivative (4-carboxymethylaniline) in order to be easily electro-grafted to the SP microarray surface. The possibility of successively electro-address the eight sensing layers of a particular array, with a good reproducibility (more than 80%) and without loss of reactivity was demonstrated. Moreover, these immobilised proteins were subsequently used as a capture agent for the determination of rheumatoid factor (RF) in human sera. The absence of non-specific signal or interference problem enabled the detection of RF values in complex samples in the 5.3–485 IU/ml range with a good correlation with the standard Auraflex® ELISA test method.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Chemiluminescence; Diazonium; Electro-addressing; Protein microarray; Screen-printing

### 1. Introduction

Protein biochips in high- or low-throughput format are promising tools suitable for a wide variety of experiments, such as proteomic (Boutell et al., 2004), drug discovery (Bodovitz et al., 2005) and diagnostic (Lee et al., 2005), based on protein–protein, protein–nucleic acid, and protein–ligand interactions (Zhu and Snyder, 2003).

High-density arrays, and more generally biochips involving a high number of immobilised proteins, are usually prepared by depositing proteins at the surface of a homogeneously activated support (Zhu and Snyder, 2003; Tomizaki et al., 2005). This approach was inherited from the nucleic acid microarrays field, extensively developed during the last 15 years (Venkatasubbarao, 2004). Nevertheless, whereas DNA strands that are relatively stable and having a constant backbone structure were easily immobilised through a homogeneous surface chemistry, proteins that have low stability and high structure

variability were found to be a great challenge to immobilise. The obtained protein microarrays are then hardly quantitative and difficult to interpret, and are usually not appropriate for protein based diagnostics since precise and accurate quantitative results are required.

Low-throughput arrays could be, in particular conditions, an answer to these required performances. Indeed, lowering the number of immobilised proteins enabled the tuning of the grafting chemistry to meet the stability requirements of the different proteins (Marquette et al., 2005a; Marquette and Blum, 2004).

The present work focuses on the development of low-density diagnostic biochips and particularly on the possibilities of protein immobilisation in a controlled and addressed manner.

Such a grafting procedure could be obtained, for example through electrochemical addressing, firstly, developed to design enzyme based electrochemical biosensors (Coche-Guerente et al., 1993) and recently employed for biochip developments (Liljegren and Nyholm, 2003; Guadarrama et al., 2001; Marquette et al., 2005b).

These immobilisation procedures were essentially based on the electro-polymerisation of pyrrole, aniline or phenol to pro-

\* Corresponding author. Tel.: +334 72 44 82 14; fax: +334 72 44 79 70.  
E-mail address: [christophe.marquette@univ-lyon1.fr](mailto:christophe.marquette@univ-lyon1.fr) (C.A. Marquette).

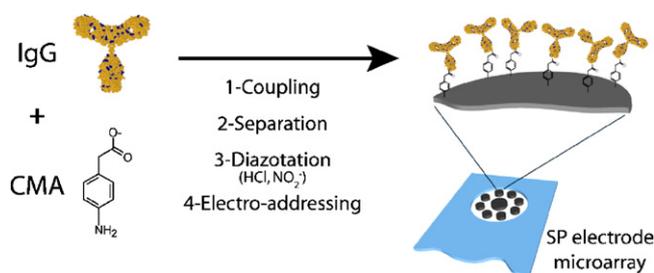


Fig. 1. Schematic representation of the developed technology for the direct electro-addressing of antibodies at the surface of a carbon SP microarray. CMA: 4-carboxymethylaniline.

duce, at the surface of an electrode, insoluble films of polymer entrapping or grafting the proteins (Cosnier, 1999). Satisfying analytical results were obtained with those systems, giving equal performances to the standard assays, but with still unclear information about the organisation of the sensing layer at the surface of the electrode. Indeed, it is always really challenging to discriminate between a possible entrapment of the protein in the polymer and an actual co-polymerisation of the modified protein (pyrrole-protein, for example (Marquette et al., 2005b)).

We have recently pointed out the analytical potentialities of single-use low-cost screen-printed (SP) microarrays, either for enzyme based electrochemiluminescent biochip (Corgier et al., 2005b), protein-polypyrrole based immuno-biochip (Marquette et al., 2005b) or nucleic acid based capacitive biochip (Marquette et al., 2006).

We have also demonstrated the potential use of aryl diazonium salts (Downard, 2000; Barbier et al., 1990; Delamar et al., 1997) (Supplementary Material 1) to directly electro-immobilised proteins (Corgier et al., 2005a). It was shown that type G immunoglobulins (IgG) covalently modified with 4-carboxymethylaniline (CMA) could be grafted, to the surface of a specific electrode, through the electro-reduction of an in situ generated diazonium function (Fig. 1). This technology is use herein to develop an easy to handle, disposable and cheap biochip for the case study detection of rheumatoid factor (RF) in human sera.

Rheumatoid factor is known to refer to a group of immunoglobulins (Ig), with specificity preferentially towards the Fc region of human or animal IgG (Moore and Dorner, 1993). The methods usually involved in the RF detection are then indirect immuno-fluorescence microscopy or immunochemical assays (Miles et al., 1998).

Here, we propose to achieve a chemiluminescent RF capture immuno-assay using rabbit IgG as capture agent directly immobilised at the surface of our SP carbon microarray. The performances of the capture assay and its use in human sera will be presented and discussed.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents

4-Aminophenylacetic acid (4-carboxymethylaniline), 4-iodophenol (*p*-iodophenol), bovine serum albumin (BSA), lumi-

nol (3-aminophthalhydrazide), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), *N,N'*-dicyclohexyl-carbodiimide (DCC), peroxidase labelled polyclonal anti-rabbit IgG antibodies developed in goat and polyoxyethylenesorbitan monolaureate (Tween20) were obtained from Sigma (France). Hydrogen peroxide and Veronal (Diethylmalonylurea sodium) were purchased from Prolabo (France). Peroxidase labelled polyclonal anti-human Ig(G, A, M) antibodies developed in goat were supplied by Jackson Immuno Research (USA). Immunoglobulins from rabbit serum (rabbit IgG) and human sera containing various concentrations of rheumatoid factor were obtained from Life Line Lab (Pomezia, Italy). All buffers and aqueous solutions were made with distilled demineralised (d.d.) water.

### 2.2. Electrode microarray preparation

A DEK 248 screen-printing machine (DEK, France) was used to produce the graphite electrode microarrays. A polyester monofilament fibre screen (DEK, UK) characterised by a mesh size of 260 counts per inch and a thickness of 13  $\mu\text{m}$  was used to print the graphite ink (Electrodag 423 SS, Acheson, France) onto a polyester flexible foil. After printing, the polyester foils supporting 16 electrode arrays were baked 10 min at 100  $^{\circ}\text{C}$  to cure the thermoplastic carbon ink.

A second layer, composed of insulating polymer (MINICO M 7000, Acheson, France) was then printed on the microarrays to define a window (easily covered with a 35  $\mu\text{l}$  drop of solution) delimiting the active area composed of eight 0.2  $\text{mm}^2$  working electrodes, one ring-shaped pseudo-reference electrode and one central auxiliary electrode (Supplementary Material 2).

### 2.3. Immunoglobulins modification

A two-steps reaction protocol was elaborated to modify the proteins. First, 10 mg of 4-carboxymethylaniline were activated in the presence of 20.6 mg of DCC, and 11.5 mg of NHS in 1 ml of DMSO for 30 min under stirring. Then 20  $\mu\text{l}$  of the activated CMA were added to 500  $\mu\text{l}$  of a 5 mg/ml protein solution in 0.1 M carbonate buffer, pH 11. This coupling solution was left to react for 2 h under stirring at room temperature before being purified on a Pd-10 Sephadex<sup>®</sup> G-25M 5 ml column (Supelco, USA). These desalted modified proteins were then concentrated to 10 mg/ml under centrifugation using Microcon YM-3 (Millipore, USA). The obtained retentate was recovered in 100  $\mu\text{l}$  of d.d. water and stored at +4  $^{\circ}\text{C}$ .

### 2.4. Diazotation of 4-carboxymethylaniline modified protein

The CMA derivatives of the aniline-protein adducts, were diazotated in an aqueous solution of 20 mM HCl, 20 mM NaNO<sub>2</sub> for 10 min under stirring at 0  $^{\circ}\text{C}$ . The diazonium solution formed was then immediately used to perform electro-addressing. For un-modified proteins diazotation, the antibodies and the reagents concentrations were kept constant.

### 2.5. Electro-deposition of diazonium derivatives

Protein electro-addressing was achieved in a 35  $\mu$ l drop of freshly diazotated CMA-modified antibodies solution at a concentration of 0.1 mg/ml, directly deposited on the SP microarray surface. For non-diazotated modified proteins and diazotated un-modified proteins deposition, the volume and proteins concentration were kept constant.

Therefore, three cyclic voltammograms were performed from 0 to  $-1500$  mV (versus the screen-printed pseudo-reference), on the chosen electrodes of the microarray at a scan rate of 200 mV/s. The cyclic voltammetry experiments were achieved with a Voltalab PGZ 100 potentiostat (Radiometer Analytical, France). A specially designed ten paths connector was used to control the potential application on the electrodes of the SP microarray. An external platinum counter electrode and the ring-shaped carbon pseudo-reference electrode of the screen-printed chip were used to achieve a three-electrodes set-up. After deposition, the carbon electrodes were fully rinsed with distilled water and also sonicated to wash out all unbound molecules.

### 2.6. Polyclonal anti-rabbit antibody binding test

Following electro-addressing, sonication and washing, the SP microarrays were saturated for 20 min at 37 °C with VBSTA (30 mM Veronal, 0.2 M NaCl, pH 8.5 with addition of 0.1% Tween20 and 1% BSA). Peroxidase labelled anti-rabbit IgG antibodies at various concentrations in VBSTA were incubated on the microarrays for 1 h at 37 °C and then washed with VBS (30 mM Veronal, 0.2 M NaCl, pH 8.5) for 20 min.

Finally, the SP microarrays were covered with a 35  $\mu$ l drop of VBS containing in addition 220  $\mu$ M of luminol, 200  $\mu$ M of *p*-iodophenol and 500  $\mu$ M of hydrogen peroxide and introduced into a charged coupled device (CCD) cooled camera light measurement system (Las-1000 Plus, Intelligent Dark Box II, FUJIFILM). The emitted light was then collected and integrated for 10 min. The numeric micrographs obtained were quantified with a FUJIFILM image analysis program (Image Gauge 3.122).

### 2.7. Rheumatoid factor (RF) detection in human sera

Following the electro-addressing step and the washing procedure, human sera were incubated on the biochip as 1:10 dilution in PBSTA (0.1 M phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.4 with addition of 0.1% Tween20 and 1% BSA) at 37 °C during 1 h. At that time, the biochip surface was rinsed in PBS (0.1 M phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.4), saturated for 20 min in PBSTA and then left to incubate during 1 h at 37 °C with peroxidase labelled anti-human Ig(G, A, M) antibodies at a concentration of 8  $\mu$ g/ml in PBSTA. The microarrays were finally washed in VBS for 20 min before being placed in the CCD camera's measurement chamber for light integration (identical conditions as those described for polyclonal anti-rabbit antibody binding test).

## 3. Results

The present protein biochip design is based on the electro-addressed immobilisation of rabbit antibodies at the surface of screen-printed microarrays. This covalent grafting is obtained through the electro-reduction of aryl-diazonium cation modified proteins (Supplementary Material 1). These adducts are obtained after the binding of carbodiimide activated 4-carboxymethylaniline to the antibodies, followed by the diazotation of the bound aniline derivatives. Once immobilised, the rabbit antibodies could be used as solid phase grafted antigens in capture chemiluminescent immunoassays.

### 3.1. Electro-addressed protein sensing layer

In order to validate the proposed immobilisation strategy (Fig. 1), the grafted antibodies were directly detected as antigen target for peroxidase labelled anti-rabbit antibodies followed by a chemiluminescent imaging of the SP microarray surface. Different biochips were prepared by electro-addressing either diazotated CMA modified proteins, CMA modified proteins or diazotated proteins.

The Fig. 2 presents the micrographs obtained for the different biochips. As it could be seen, using the diazotated CMA modified protein (Fig. 2a), clear distinction between the addressed electrodes (Nos. 2 and 7) and the six un-addressed electrodes was obtained. Moreover, no non-specific adsorption of the proteins neither onto the graphite material nor onto the SP support (PVC or insulating layer) was observed, demonstrating really interesting potentialities for analytical applications. The Fig. 2b and c presents the images obtained after the revelation of the

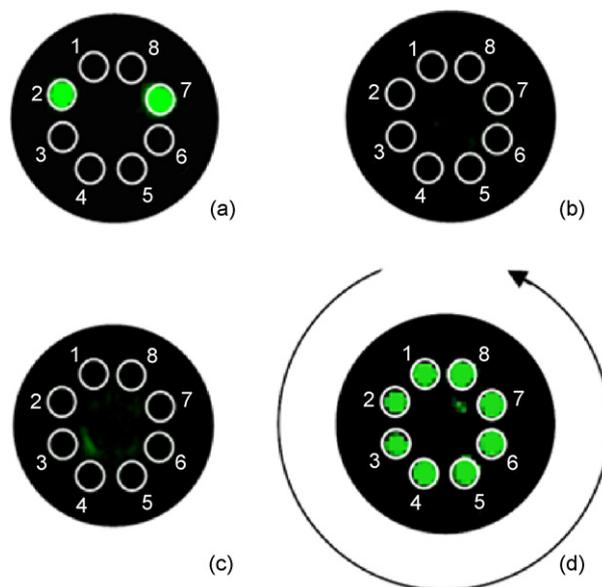


Fig. 2. Chemiluminescent images of different biochips prepared by electro-addressing of: (a) diazotated CMA modified proteins, (b) CMA modified proteins, (c) diazotated proteins and (d) chemiluminescent image of a SP microarray consecutively modified by electro-addressing CMA-IgG onto its eight working electrodes. Each electrode was electro-addressed with a fresh diazonium-IgG solution. The arrow represents the electro-addressing order from 1 to 8.

biochips prepared with CMA modified proteins and diazotated proteins, respectively. As a matter of fact, no chemiluminescent signal was emitted from those biochips, evidencing the necessity of both grafted CMA and diazotation of the aniline derivatives, for the achievement of electro-addressed immobilisation.

In order to demonstrate the possibility to create a multi-sensing layers biochip, the eight working electrodes of a SP microarray were sequentially electro-addressed using eight fractions of diazotated CMA modified proteins. Following the eight electro-depositions, the biochip was homogeneously treated with peroxidase labelled anti-rabbit antibodies to enable the chemiluminescent imaging of the immobilised proteins.

The chemiluminescent image obtained is presented in Fig. 2d. This micrograph clearly shows that all the electrodes were successfully electro-addressed, giving eight reproducible sensing layers (signal intensity variability: 17%), suitable for chemiluminescent immunoassay. Thus, despite the fact that in the sequential addressing protocol the already deposited rabbit IgGs were in contact with the diazotated solution of the following protein fraction, the reactivity of the different sensing layers were preserved and a fully acceptable chemiluminescent signal was obtained.

The present immobilisation strategy should then be compatible with the elaboration of biochips based on multiple proteins immobilisation, such as multi-parameters immuno-biochips.

### 3.2. Immuno-biochip possibilities

The possibility to use the addressed electro-deposited proteins as analytical tool was studied by applying to the SP microarrays a range of peroxidase labelled polyclonal anti-rabbit IgG antibody concentrations from 0.25 to 10  $\mu\text{g/ml}$  and determining a dose-response curve (Fig. 3). A classical ligand-receptor binding curve was obtained with a pseudo-linear relation for

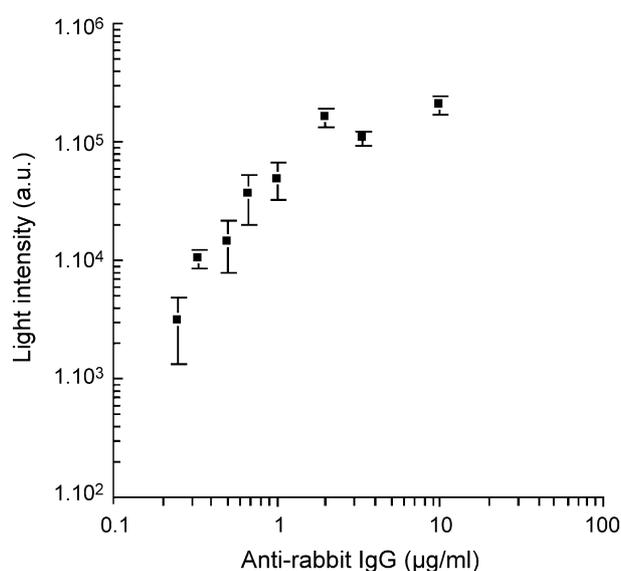


Fig. 3. Chemiluminescent detection of peroxidase labelled anti-rabbit IgG on SP microarrays. Error bars represent the standard deviation (S.D.) of four measurements (each point is the mean of four different electrodes present at the surface of two different biochips).

antibody concentrations ranging from 0.25 to 2  $\mu\text{g/ml}$  and a limit of detection of 0.25  $\mu\text{g/ml}$ , followed by a plateau at higher concentrations. Assuming that the immobilisation of the proteins occurred as a monolayer (Corgier et al., 2005a), a limited number of macromolecules are accessible for recognition, leading to saturation at high antibody concentrations. These performances compared well with those obtained using SP support and protein trapped in electro-polymer (Marquette et al., 2005b), or with standard support such as coated glass slides (Cretich et al., 2004).

In order to fully demonstrate the efficiency of the electro-addressing technique for the development of biochip based immunoassays, the SP microarrays supporting grafted rabbit-IgG were used to perform rheumatoid factor detection in human serum samples.

Rheumatoid factor is defined as a group of immunoglobulins of any isotypes Ig(A, D, E, G, M) with specificity towards the Fc region of human and animals IgG. RF was found to be largely involved in rheumatoid arthritis (70–80% of the cases (Cathcart, 1975)) and others autoimmune diseases, such as Sröjen's syndrome (Fox, 2005). Therefore, RF presence and level in human serum is an interesting model for precise parameter determination in complex matrices.

A capture immunoassay for RF testing (Cretich et al., 2004) was then elaborated on the active surface of the electrode microarray. A schematic representation of the macromolecular recognition events at the SP microarray surface is presented in the insert of Fig. 4, where the immobilised rabbit IgG are used to capture RF from the samples, which are subsequently revealed with peroxidase labelled anti-human antibodies. In order to validate the feasibility of such a detection system on our biochip, further human samples were analysed.

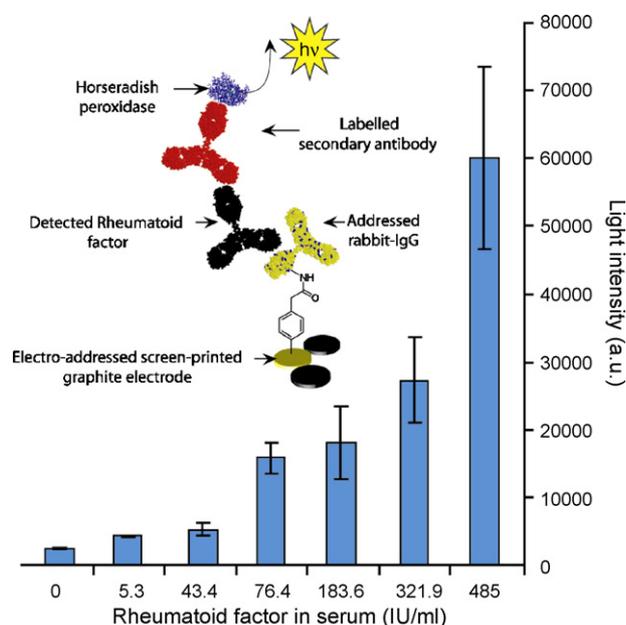


Fig. 4. Schematic representation of the capture immunoassay performed on a screen-printed graphite electrode. RF presence was revealed with peroxidase labelled secondary anti-human antibodies. Histogram: chemiluminescent detection of RF in human sera using SP microarrays. Error bars represent the S.D. of four measurements.

Thus, SP microarrays were incubated with 1:10 dilution of human serum containing different concentrations of RF from 0 to 485 IU/ml (according to the Auraflex<sup>®</sup> ELISA test).

The numeric micrographs obtained through the chemiluminescent imaging system were quantified and enabled the achievement of a dose-response graph for the detection of RF in human sera (Fig. 4). As it can be seen, the measured light intensity increased with the RF value in the serum samples, giving the possibility of RF detection in the 5.3–485 IU/ml range.

The effect of the complex matrix, i.e. 1:10 dilution of crude human sera, was minor and the non-specific signal generated by the binding of non-RF human antibodies was found to be negligible. Indeed, this value, represented by the light intensity obtained in the presence of the serum sample depleted in RF (0 IU/ml), was found to be low when compared to the lowest signal obtained in the presence of 5.3 IU/ml of RF.

#### 4. Conclusion

A disposable immuno-biochip for RF detection in human serum samples was investigated, taking advantage of the simplicity of the screen-printing technology. The electro-addressing method of IgG-diazonium adducts was successfully used to reach that objective and substitute the classical chemical coating procedures (Marquette and Blum, 2006) which usually required complex instrumentations, such as contact printing or piezoelectric spotting apparatus. The present method was therefore found to be a real implementation of the protein immobilisation already existing technologies.

Interesting biosensing performances of the developed system were demonstrated, supported by the reproducibility and robustness of the produced sensing layer. Thus, modified proteins were easily electro-addressed at the surface of an electrode network, which was shown to not suffer of the classical non-specific signal problems (Kusnezow et al., 2003). Indeed, the developed system was shown to be free of matrix interference, even in crude human sera, and to enable the sensitive serological detection of specific antibodies (rheumatoid factor).

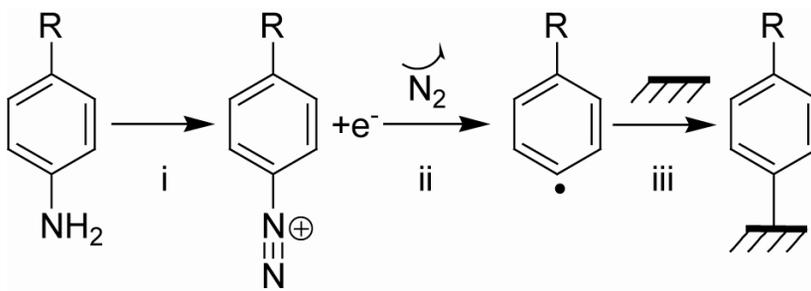
The present electro-addressing method should be in a near future extended to a multi-detection system with the possibility of immobilising further target proteins.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bios.2006.05.016.

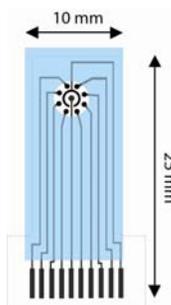
#### References

- Barbier, B., Pinson, J., Desarmot, G., Sanchez, M., 1990. *J. Electrochem. Soc.* 137, 1757–1764.
- Bodovitz, S., Joos, T., Bachmann, J., 2005. *Drug Discov. Today* 10, 283–287.
- Boutell, J.M., Hart, D.J., Godber, B.L.J., Kozlowski, R.Z., Blackburn, J.M., 2004. *Proteomics* 4, 1950–1958.
- Cathcart, E.S., 1975. *Rheumatoid Factors Laboratory Diagnostics Procedure in the Rheumatic Diseases*. Little Brown, Boston.
- Coche-Guerente, L., Cosnier, S., Innocent, C., Mailley, P., Moutet, J.C., Morelis, R.M., Leca, B., Coulet, P.R., 1993. *Electroanalysis*, 647–652.
- Corgier, B.P., Marquette, C.A., Blum, L.J., 2005a. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 18328–18332.
- Corgier, B.P., Marquette, C.A., Blum, L.J., 2005b. *Anal. Chim. Acta* 538, 1–7.
- Cosnier, S., 1999. *Biosens. Bioelectron.* 14, 443–456.
- Cretich, M., Pirri, G., Damin, F., Solinas, I., Chiari, M., 2004. *Anal. Biochem.* 332, 67–74.
- Delamar, M., Désarmot, G., Fagebaume, O., Hitmi, R., Pinson, J., Savéant, J.M., 1997. *Carbon* 35, 801–807.
- Downard, A.J., 2000. *Electroanalysis* 12, 1085–1096.
- Fox, R.I., 2005. *Lancet* 366, 321–331.
- Guadarrama, A., Rodríguez-Mendez, M.L., Sanz, C., Ríos, J.L., De Saja, J.A., 2001. *Anal. Chim. Acta* 432, 283–292.
- Kusnezow, W., Jacob, A., Walijew, A., Diehl, F., Hoheisel, J.D., 2003. *Proteomics* 3, 254–264.
- Lee, M.Y., Park, C.B., Dordick, J.S., Clark, D.S., 2005. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, pp. 983–987.
- Liljegen, G., Nyholm, L., 2003. *Analyst* 128, 232–236.
- Marquette, C.A., Blum, L.J., 2004. *Anal. Chim. Acta* 506, 127–132.
- Marquette, C.A., Blum, L.J., 2006. State of the art and recent advances in immunoanalytical systems. *Biosens. Bioelect.* 21 (8), 1424–1433.
- Marquette, C.A., Degiuli, A., Imbert-Laurenceau, E., Mallet, F., Chaix, C., Mandrand, B., Blum, L.J., 2005a. *Anal. Bioanal. Chem.* 381, 1019–1024.
- Marquette, C.A., Laurenceau, E., Mallet, F., Chaix, C., Blum, L.J., Mandrand, B., 2005b. *Anal. Biochem.* 340, 14–23.
- Marquette, C.A., Lawrence, M.F., Blum, L.J., 2006. DNA covalent immobilization onto screen-printed electrode networks for direct label-free hybridization detection of p53 sequences. *Anal. Chem.* 78 (3), 959–964.
- Miles, J., Charles, P., Riches, P., 1998. *Ann. Clin. Biochem.* 35, 19–47.
- Moore, T.L., Dorner, R.W., 1993. *Clin. Biochem.* 26, 75–84.
- Tomizaki, K.Y., Usui, K., Mihara, H., 2005. *ChemBiochem* 6, 782–799.
- Venkatasubbarao, S., 2004. *Trends Biotechnol.* 22, 630–637.
- Zhu, H., Snyder, M., 2003. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 55–63.



Supplementary Material 1. i) diazotation of an aniline derivative, ii) electro-reduction of diazonium at a conductive electrode surface, iii) covalent grafting to the electrode surface.

### Supplementary material 1



Supplementary Material 2. Screen-printed carbon electrode microarray, covered with an insulating layer (in blue).

### Supplementary material 2

**Article 4 :****A Versatile Method for Direct and Covalent Immobilization of DNA  
and Proteins on Biochips**

Benjamin P. Corgier, Alain Laurent, Pascal Perriat, Loïc J. Blum, and Christophe A.  
Marquette

*Angewandte Chemie International Edition* 46 (2007) 4108-4110

Cet article présente l'électro-adressage de biomolécules modifiées par des dérivés de l'aniline comme une méthode d'immobilisation potentiellement générique pour le développement de biopuces. En effet, il est démontré grâce à des exemples concrets, que l'électro-adressage permet d'immobiliser à la fois des protéines (anticorps), des oligonucléotides et des enzymes.

Ainsi, des anticorps anti-IgG-humain ont été fonctionnalisés par la CMA, puis électro-adressés et utilisés pour la réalisation d'un immuno-essai de type sandwich. Ce modèle permet de démontrer que les anticorps modifiés et immobilisés via l'électro-adressage gardent leur propriété de reconnaissance spécifique, et que cette méthode n'est pas dénaturante pour les protéines immobilisées.

D'autre part, une séquence contenant le codon 273 du gène codant pour la protéine p53, composée de 20 nucléotides et fonctionnalisée par le 4-amino-benzylamine (4-ABA) a été électro-adressée afin d'obtenir une biopuce à oligonucléotides. Les propriétés d'électro-adressage de ce dérivé (4-ABA) sont présentées, ainsi que le greffage de l'oligo-ABA (figure 2 de l'article 3). L'électro-adressage est également caractérisé par XPS, afin de connaître la densité de surface d'oligonucléotides immobilisés. Ces résultats ont été obtenus en collaboration avec le professeur P. Perriat, travaillant au sein du GEMPPM (Groupe d'Etudes de Métallurgie Physique et de Physique des Matériaux) à l'INSA de Lyon. Cette partie est détaillée dans "*Electronic Supplementary Material*", présentée à la suite de l'article.

Enfin, un modèle de biopuce a été réalisé par électro-adressage d'une enzyme. La peroxydase a été ainsi modifiée par la CMA et directement électro-adressée sur des réseaux d'électrodes sérigraphiées. La présence de la peroxydase active immobilisée a été mise en évidence directement au travers de sa capacité à catalyser la réaction de chimiluminescence du luminol.

## Le gène de la protéine p53

La protéine p53 joue le rôle de "gardien de l'intégrité du génome" (Lane, 1992). En effet elle est à l'origine d'un mécanisme cellulaire visant à protéger la cellule lorsqu'elle subit de fortes altérations de son génome. Dans la plupart des cellules, la protéine p53 est présente à un niveau basal très faible et sa présence accrue au sein des cellules peut avoir deux effets : soit un blocage du cycle cellulaire, permettant la réparation des lésions de l'ADN avant une éventuelle reprise de ce cycle, soit une induction de l'apoptose, conduisant ainsi à l'élimination de la cellule.

L'étude du gène *p53* et de ses mutations présente un fort intérêt puisque des mutations du gène *p53* sont impliquées dans plus de 50 % des cancers et que 90% de ces mutations sont regroupées dans la région centrale de la protéine p53 (représentant 5 exons du gène *p53*). Ces codons, comme notamment le codon 273, correspondent, après transcription/traduction, à des acides aminés qui sont directement impliqués lors de la fixation de la protéine p53 sur l'ADN. Ce gène, et plus précisément certaines portions de celui-ci, présente donc un très fort intérêt scientifique et médical.

## Biochips

## A Versatile Method for Direct and Covalent Immobilization of DNA and Proteins on Biochips

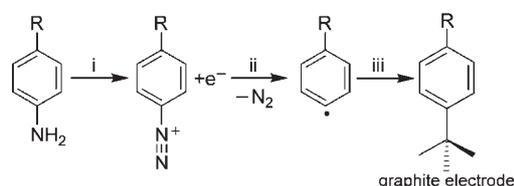
Benjamin P. Corgier, Alain Laurent, Pascal Perriat, Loïc J. Blum, and Christophe A. Marquette\*

The immobilization of biological molecules is a crucial step in biochip research because it is directly related to the biosensing performances obtained. To date, even though a wide variety of biochips have been developed,<sup>[1]</sup> no generic procedure has emerged that could be easily applied to both proteins and nucleic acids, and more generally to interaction-based biochips. Nowadays, an obvious need exists to develop a flexible immobilization process to provide strong, stable, and accessible binding of the sensing element, thus leading to sensitive and reproducible biochip performances.

We have recently<sup>[2]</sup> presented an immobilization strategy that enables the direct grafting of aryl diazonium modified noncatalytic proteins (antigens) onto the surface of screen-printed graphite electrode (SP) biochips (see the Supporting Information). This approach leads to spatially resolved grafting of proteins onto conducting surfaces. The biomolecules were first modified with aniline derivatives, which were oxidized into aryl diazonium functions prior to the electroaddressing.

This technique is based on the particular electrochemical property of aryl diazonium salts.<sup>[3]</sup> These molecules could be electroaddressed at the surface of a polarized electrode to form a covalent C–C bond between the aryl group and the electrode material (Scheme 1). This electrochemical-grafting property of aryl diazonium derivatives was previously confirmed on a large variety of conductive and semiconductive materials, such as carbon, metal, silicon, diamond, and recently indium tin oxide (ITO) electrodes.<sup>[4–8]</sup>

Herein, we present a proof of concept of this unique electroaddressing procedure for the immobilization of bio-



**Scheme 1.** Aniline derivative electroaddressing mechanism: i) diazotization of the aniline derivative, ii) electroreduction of diazonium at a conductive electrode surface, iii) covalent grafting to the carbon electrode surface through a C–C bond.

molecules as different as antibodies, nucleic acids, and enzymes. The potential of the electroaddressing chemistry is illustrated with different biosensing architectures (oligonucleotide-based assays, capture immunoassays, and sandwich immunoassays), all involving a chemiluminescent detection system with horseradish peroxidase as label.

The first demonstration of an analytical application of the electroaddressing of aryl diazonium modified biomolecules is based on oligonucleotide-functionalized biochips. To our knowledge, only a few works deal with the direct covalent binding of oligonucleotides on conducting material.<sup>[7,9]</sup> Herein, a 20mer sequence from a “hot spot” of the exon 8 of the p53 tumor suppressor gene<sup>[8]</sup> was functionalized with 4-aminobenzylamine (4-ABA), electroaddressed, and used as stationary-phase probe sequence for hybridization testing of a biotinylated target sequence (Figure 1 a). The probe sequence was functionalized at its 5' end with 4-ABA to provide oriented grafting.

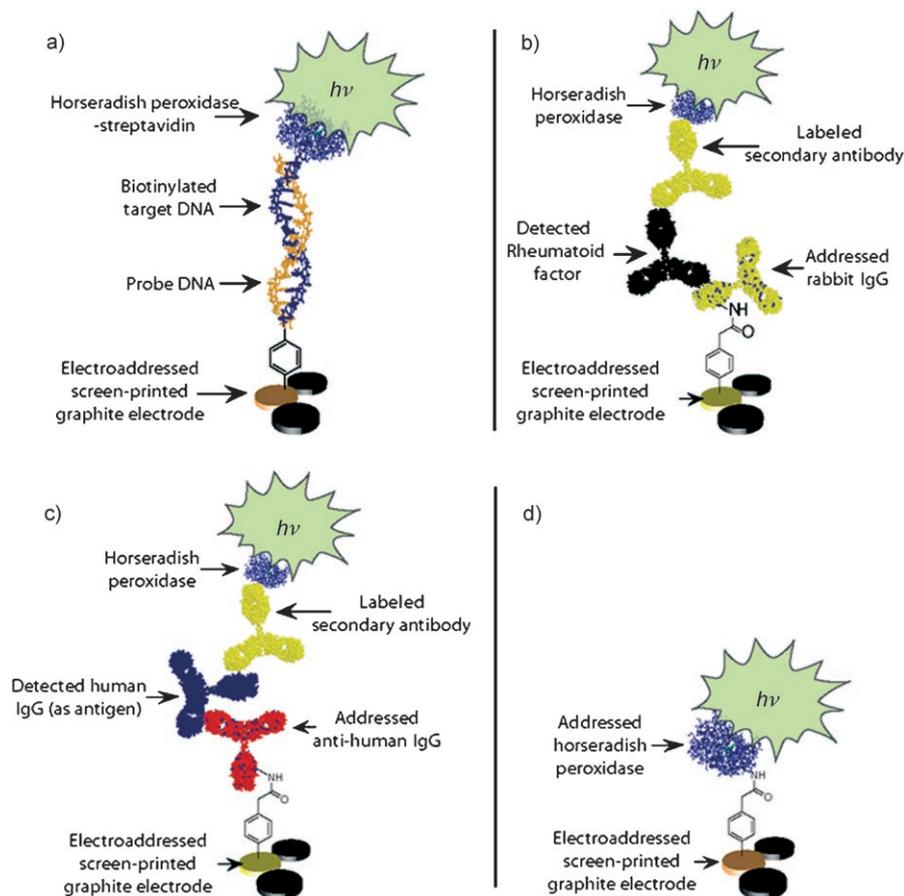
Typical electroaddressing experiments are presented in Figure 2 for diazotate-free 4-ABA and the diazotated probe sequence. The diazonium reduction wave was observed at  $-1.1$  V versus a carbon pseudoreference electrode with, in the case of the addressing of the modified probe, clear saturation of the electrode surface characterized by the decrease of the reducing current at  $-1.1$  V versus C. The influence of the probe concentration ( $1$ – $10$   $\mu\text{M}$ ) during the electroaddressing step was studied. A peaklike profile was obtained and a maximum signal value was reached for SP biochips modified with  $5$   $\mu\text{M}$  of probe. At higher probe surface densities, classical inhibitory effect<sup>[10]</sup> was observed owing to steric hindrance at the grafted surface. The probe surface density was estimated by an X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) experiment (see the Supporting Information) and was found to be  $3.75 \times 10^{13}$  molecules  $\text{cm}^{-2}$ . This result compares well with similar XPS experiments for surface-coverage determination on gold substrates.<sup>[11]</sup> The spatial definition of the addressing was validated through the chemiluminescent image obtained after immobilization, hybridization, and detection. A typical

[\*] B. P. Corgier, Prof. L. J. Blum, Dr. C. A. Marquette  
Laboratoire de Génie Enzymatique et Biomoléculaire  
UMR 5246: Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et  
Supramoléculaire  
CNRS-Université Lyon 1  
Bât CPE, 43, bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne (France)  
Fax: (+33) 4724-47970  
E-mail: christophe.marquette@univ-lyon1.fr  
Homepage: <http://lgeb.univ-lyon1.fr>

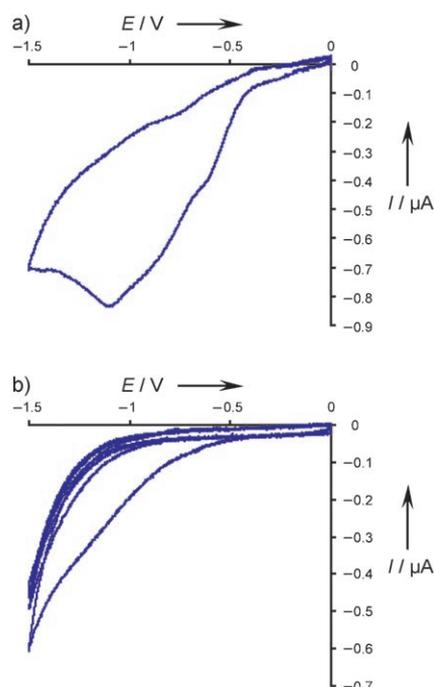
A. Laurent  
bioMérieux  
Parc Polytec. 5  
rue des Berges, 38024 Grenoble (France)

P. Perriat  
GEMPPM  
Bât. Blaise Pascal  
UMR 5510 CNRS-INSA Lyon  
69621 Villeurbanne (France)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.angewandte.org> or from the author.



**Figure 1.** Different proofs of concept of the electroaddressed immobilization of a) a probe DNA sequence, b) an immunoglobulin antigen, c) an active anti-human antibody, and d) an active enzyme (horseradish peroxidase). The aniline-modified biomolecules are immobilized at the surface of  $0.2\text{-mm}^2$  screen-printed graphite electrodes.



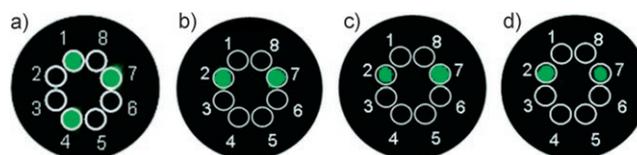
**Figure 2.** Cyclic voltammograms of a) 4-aminobenzylamine (4-ABA;  $10\text{ mM}$ ) and b) a 4-ABA-modified probe sequence ( $10\text{ }\mu\text{M}$ ). Conditions: scan rate:  $200\text{ mVs}^{-1}$ ;  $15\text{ mM HCl}$ ,  $15\text{ mM NaNO}_2$ .

micrograph obtained for the detection of a  $25\text{ nm}$  target sequence is shown in Figure 3 a. Three electrodes of the biochip are electroaddressed (nos. 1, 4, and 7) and produce a chemiluminescent signal, whereas no signal is obtained either from the nonaddressed electrodes or from the insulating layer and the plastic foil of the working area.

Similar studies were performed with 4-carboxyaniline (4-CMA) modified proteins as addressed biomolecules. First, rabbit immunoglobulins (IgG) were used as immobilized antigens and involved in the detection of rheumatoid factor (RF)—a family of human antibodies largely involved in rheumatoid diseases,<sup>[12]</sup> the presence of which could be detected by anti-rabbit-IgG activity of the serum. This assay, a capture format (Figure 1 b), is not considered a sandwich assay because the immobilized rabbit IgGs are not used as active antibodies but as capture antigens. Nevertheless, the success of the assay is determined by the accessibility of the different epitopes of the immobilized IgG toward the numerous paratopes of the polyclonal human sera antibodies.<sup>[13]</sup> The immobilized protein layer is probably composed of both native and denatured antibodies as a consequence of the necessary acidic conditions used during the diazotization step.

The chemiluminescent images obtained after capture of the RF (Figure 3 b) again show the absence of signal from surfaces other than those of the addressed electrodes (nos. 2 and 7). The addressing of the antigen proteins was thus specifically localized on the chosen electrodes and no non-specific adsorption of the different components of the assay occurred on the biochip surface.

Different human serum samples containing known concentrations of rheumatoid factor were incubated on the



**Figure 3.** Chemiluminescent micrographs of a) a probe sequence electroaddressed (at electrode nos. 1, 4, and 7) biochip hybridized with target sequence  $25\text{ nm}$ , b) a capture assay biochip incubated with RF  $76\text{ IU mL}^{-1}$  ( $\text{IU} = \text{international unit}$ ; addressed at electrode nos. 2 and 7), c) a sandwich assay biochip detecting  $60\text{ nM}$  of human IgG (addressed at electrode nos. 2 and 7), and d) a horseradish peroxidase electroaddressed biochip (addressed at electrode nos. 2 and 7).

rabbit-IgG-modified biochip surface. A clear correlation between the measured chemiluminescent signal and the concentration of RF in the serum samples was found, which allows the detection of RF in the range 5.3–485 IU mL<sup>-1</sup> with an acceptable accuracy comparable to those of previous works (standard Auraflex ELISA test and reference [13]).

For the immobilization technique to be fully demonstrated as useful for biosensing, a second immunochemical application based on a sandwich immunoassay procedure is presented. It involves the recognition properties of electro-addressed anti-human IgGs. In this case, the binding properties of the grafted antibodies are directly implicated in the detection process of the antigen in solution, in our case, a human IgG (Figure 1c). Thus, the loss of integrity of every immobilized antibody would have a dramatic effect on the recognition event. The chemiluminescent micrograph obtained after the completion of the sandwich assay (60 nm of free human IgG) on a anti-human-IgG-modified biochip shows clearly that the system is operational (Figure 3c). Indeed, no nonspecific interactions could be detected and the biochip provided very intense specific signals emitted only from the electroaddressed working electrodes (nos. 2 and 7). The immobilized anti-human-IgG antibodies were thus involved in the recognition of the free target protein, which shows that the proposed immobilization procedure maintains a convenient structural conformation of the grafted biomolecules, thus allowing them to be implicated in the recognition process.

Finally, a proof of concept for the immobilization of enzymes was performed with 4-CMA-modified horseradish peroxidase directly electroaddressed at the surface of a screen-printed graphite biochip. Because of the fragility of the biocatalyst, the diazotation conditions were modified (pH was increased to 2.5; see the Supporting Information). Under these conditions, the immobilized horseradish peroxidase was found to be fully active. The micrograph obtained (Figure 3d) shows an intense chemiluminescent signal localized at the electroaddressed electrodes (nos. 2 and 7). Such results are really promising in view of the interest of the biosensor community<sup>[14]</sup> in the immobilization of heme-containing enzymes on the surfaces of conducting materials and their direct electron transfer for sensing hydrogen peroxide. In this

case, with a maximum distance of 1.5 nm between the enzyme and the electrode, the system should present interesting properties.

In summary, we have shown that it is possible to electro-address fragile biomolecules at the surface of screen-printed graphite electrode biochips. The proposed method, based on the biomolecules modification with aryl diazonium prior to the addressing, was used to immobilize fully reactive oligonucleotides, antigens, antibodies, and enzymes. Work is in progress in our laboratory to use the present versatile immobilization technology to produce biochips suitable for application.

Received: December 11, 2006

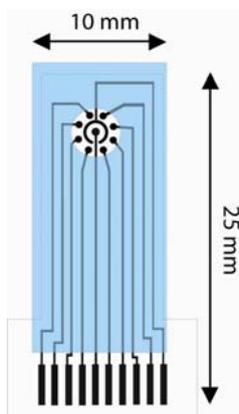
Revised: February 21, 2007

Published online: April 13, 2007

**Keywords:** biochips · diazo compounds · electrochemistry · immobilization · proteins

- [1] D. Stoll, M. F. Templin, J. Bachmann, T. O. Joos, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2005**, *8*, 239.
- [2] B. P. Corgier, C. A. Marquette, L. J. Blum, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18328.
- [3] M. Delamar, R. Hitmi, J. Pinson, J. M. Saveant, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5883.
- [4] J. Pinson, F. Podvorica, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 429.
- [5] S. Maldonado, T. J. Smith, R. D. Williams, S. Morin, E. Barton, K. J. Stevenson, *Langmuir* **2006**, *22*, 2884.
- [6] P. A. Brooksby, A. J. Downard, *Langmuir* **2004**, *20*, 5038.
- [7] A. Ruffien, M. Dequaire, P. Brossier, *Chem. Commun.* **2003**, 912.
- [8] T. Fujiki, S. Haraoka, S. Yoshioka, K. Ohshima, A. Iwashita, M. Kikuchi, *Int. J. Oncol.* **2002**, *20*, 669.
- [9] C. A. Marquette, M. F. Lawrence, L. J. Blum, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 959.
- [10] G. Ramsay, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 40.
- [11] D. Y. Petrovykh, H. Kimura-Suda, M. J. Tarlov, L. J. Whitman, *Langmuir* **2004**, *20*, 429.
- [12] T. L. Moore, R. W. Dorner, *Clin. Biochem.* **1993**, *26*, 75.
- [13] M. Cretich, G. Pirri, F. Damin, I. Solinas, M. Chiari, *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 67.
- [14] B. J. Ryan, N. Carolan, C. O'Fagain, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 355.

***Electronic Supplementary Material***  
*Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 4108–4110



*Electronic Supplementary Material 1*

Screen-printed carbon electrode microarray, covered of an insulating layer (blue part).

## Experimental

### *Reagents and solutions*

4-Aminophenylacetic acid (4-CarboxyMethylAniline; CMA), bovine serum albumin (BSA), IgG from human serum, luminol (3-aminophthalhydrazide), N-hydroxysuccinimide (NHS), N,N'-dicyclohexyl-carbodiimide (DCC), horseradish peroxidase (HRP), peroxidase-labelled streptavidin, peroxidase-labelled polyclonal anti-rabbit IgG antibodies developed in goat and polyoxyethylenesorbitan monolaureate (tween20) were purchased from Sigma (France). Peroxidase-labelled polyclonal anti-human Ig(G, A, M) antibodies developed in goat were obtained from Jackson ImmunoResearch (USA). Immunoglobulins from rabbit serum (rabbit IgG) and human sera containing various concentrations of rheumatoid factor were supplied by Life Line Lab (Pomezia, Italy). Probe oligonucleotide sequences (TTG AGG TGC ATG TTT GTG CC) modified with 4-aminobenzylamine (4-ABA) at the 5'-end and target oligonucleotide sequences (GG CAC AAA CAC GCA CCT CAA) biotinylated at the 5'-end were purchased from Apibio (France). All buffers and aqueous solutions were made with distilled demineralised (d.d.) water.

### *Electrode microarrays preparation*

A DEK 248 screen-printing machine (DEK, France) was used to produce the graphite electrode microarrays. A polyester monofilament fibre screen (DEK, U.K.) characterised by a mesh size of 260 counts per inch and a thickness of 13  $\mu\text{m}$  was used to print the graphite ink (Electrodag 423 SS, Acheson, France) onto a polyester flexible foil. After printing, the polyester foils supporting 16 electrode arrays were baked 10 minutes at 100°C to cure the thermoplastic carbon ink.

A second layer, composed of insulating polymer (MINICO M 7000, Acheson, France) was then printed on the microarrays to define a window (easily covered with a 25  $\mu\text{l}$  drop of solution) delimiting the active area composed of eight 0.2 mm<sup>2</sup> working electrodes, one ring-shaped pseudo-reference electrode and one central auxiliary electrode (*Electronic Supplementary Material I*).

### *Proteins modification*

The proteins modification reaction was realized in the presence of a 60-times excess of CMA in order to reach a loading of the antibody with the diazonium unit of 1.

A two steps reaction protocol was elaborated to modify the proteins, either immunoglobulins or HRP. First, 10 mg of 4-carboxymethylaniline were activated in the presence of 20.6 mg of DCC, and 11.5 mg of NHS in 1 ml of DMSO for 30 minutes under stirring. Then 20  $\mu$ l of the activated CMA were added to 500  $\mu$ l of a 5 mg/ml protein solution in 0.1 M carbonate buffer pH 11. This coupling solution was left for 2 hours under stirring at room temperature before being desalted on a Sephadex™ G-25F column (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). The desalted modified protein obtained was then concentrated to 10 mg/ml under centrifugation using MicroconYM-30 (MILLIPORE, Billerica, USA). The obtained retentate was recovered in 100  $\mu$ l of d.d. water, and stored at +4°C.

#### *Diazotation and electro-deposition of modified oligonucleotide, immunoglobulins and HRP*

The aniline adducts of the functionalised biomolecules were diazotated for 10 minutes at 0°C in the presence of 15 mM HCl, 15 mM NaNO<sub>2</sub> or 3.15 mM HCl, 3.15 mM NaNO<sub>2</sub>, for oligonucleotide and immunoglobulin or HRP, respectively. That solution was poured onto the active window of the electrode microarray. Therefore, three cyclic voltammograms were performed from 0 to -1500 mV (vs. carbon pseudo-reference), on the chosen electrodes of the microarray, at a scan rate of 200 mV/sec. The cyclic voltammograms were achieved with a Voltalab PGZ 100 potentiostat (Radiometer Analytical, France). A specially designed ten paths connector was used to control the potential application on the electrodes of the SP microarray. An external platinum counter electrode and the ring-shaped carbon pseudo-reference electrode of the screen-printed chip were used to achieve a three-electrode set-up.

After deposition, the carbon electrodes were fully rinsed with distilled water and also sonicated in VBST (30 mM veronal, 0.2 M NaCl with addition of 0.1% tween20, pH 8.5) to wash out all unbound molecules.

#### *Capture immunoassay proof of concept*

For rheumatoid factor detection, the SP microarrays were functionalised with rabbit IgG as capture agent. After a 20 minutes saturation step in PBSTA (0.1 M phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.4 with addition of 0.1% tween20 and 1% BSA), human sera were incubated on the biochip as 1:10 dilution in PBSTA at 37°C during 1 hour. At that time, the biochip surface was rinsed in PBS (0.1 M phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.4), saturated for 20 minutes in PBSTA, then left to incubate during 1 hour at 37°C with peroxidase-labelled anti-human Ig(G, A, M) antibodies at a concentration of 8  $\mu$ g/ml in PBSTA. The microarrays were finally washed in VBS (30 mM veronal, 0.2 M NaCl, pH 8.5) for 20 minutes before being placed in the CCD camera's (Las-1000 Plus, Intelligent Dark Box II, FUJIFILM) measurement chamber for light integration during 10 minutes (measuring

solution: VBS containing in addition 220  $\mu\text{M}$  of luminol, 200  $\mu\text{M}$  of p-iodophenol and 500  $\mu\text{M}$  of hydrogen peroxide). The numeric micrographs obtained were quantified with a FUJIFILM image analysis program (Image Gauge 3.122).

#### *Sandwich immunoassay proof of concept*

On chip sandwich immunoassays of human immunoglobulins were performed on anti-human IgG modified screen-printed microarrays. The biochip surface was saturated for 20 minutes with VBSTA and incubated with 25  $\mu\text{l}$  of a solution of human IgG in VBSTA for 1 hour at 37°C. The biochip was then rinsed in VBS and incubated for 1 hour with HRP labelled anti-human-IgG at a concentration of 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The SP microarray was then washed with VBS before being placed in the CCD camera's measurement chamber to perform the chemiluminescent detection (as described above).

#### *Oligonucleotide based assay proof of concept*

The hybridisation was performed on nucleic acid modified biochip. Briefly, 25  $\mu\text{l}$  of a solution of biotinylated complementary strand was left to incubate for 1 hour at +37°C, rinsed and sonicated in VBST to remove all unbound oligonucleotides. The surface was then saturated for 20 minutes with VBSTA and incubated for one hour with peroxidase-labelled streptavidin at a concentration of 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in VBSTA. At that time, the SP microarray surface was rinsed with VBS before being placed in the CCD camera's chamber for light integration (as described above).

#### *DNA surface coverage determination by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)*

XPS experiments were carried out using a commercial KRATOS AXIS Ultra DLD spectrometer equipped with a monochromatic Al  $K_{\alpha}$  source (1486.6 eV, 150 W), a hemispherical electron energy analyzer and a hybrid lens and working at vacuum  $<10^{-9}$  mbar. Two types of normal emission angle-integrated scans were carried out for the samples in this study: survey scans from 0 to 1400 eV boundary energy and high resolution scans with 20 eV windows and 40 eV pass energy. For all samples, the area analyzed was 700 $\mu\text{m}$  x 300 $\mu\text{m}$ . Charge neutralization was also achieved and the peaks referenced to the C-(C,H) components of the C1s band at 284.6 eV. Spectra relative to C 1s, O 1s, N 1s, P 2p and Cl 2p photoelectron peaks were measured at energies around respectively 284.5 eV, 532.5 eV, 400.1 eV, 133.4 eV and 199.6 eV. The areas of elements' peaks allows to calculate atomic ratios according to the formula (as an example of N and P)

$$\frac{P}{N} = \frac{kn \text{ area}(P)}{kp \text{ area}(N)}$$

where  $k_n$  and  $k_p$  are the N and P sensitivity factors. Sensitivity factors which contain attenuation from the free electron mean path and from the transfer function of the spectrometer are given by KRATOS software.

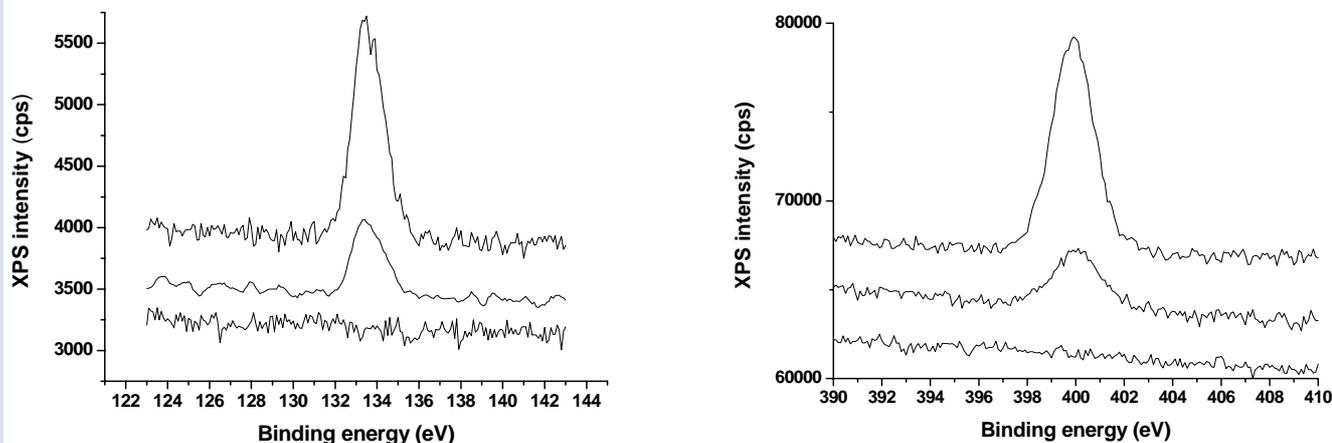


Figure : P 2p (left) and N 1s (right) XPS spectra of the following samples : (bottom) the graphite substrate, (middle) a reference sample for which a defined quantity of DNA was deposited substrate, (up) the sample of interest where DNA was electro-grafted at a concentration of  $5\mu\text{M}$ , according to the procedure described above.

The quantity of single strand DNA (ssDNA) grafted on the graphite substrate was determined using XPS by comparison with (i) a bare graphite substrate and (ii) a reference sample consisting of a graphite substrate on which a known quantity of ssDNA ( $1/8\text{ ssDNA}/\text{nm}^2$ ) was deposited and dried. The spectra of N1s and P2p are plotted in the Figure and the raw areas and the atomic concentrations of all the elements recorded are given in Table. Neither N nor P is detected on the bare substrate. For the two other samples, N and P are detected in greater quantity for the sample of interest. In both cases, the atomic concentrations of N and P are negligible compared to that of C. This indicates that ssDNA does not continuously coat the substrate and/or that the zone analyzed is deeper than the DNA shell. Then the quantity of ssDNA on the surface should be proportional to both the N and P atomic concentrations given by XPS. This is exactly verified since the quantity of ssDNA grafted on the sample of interest is  $3.2\pm 0.3$  greater than the quantity deposited on the reference sample when taking into the N ratios and  $3.2\pm 0.5$  when taking into account the P ratios. This implies that  $3/8\text{ ssDNA per nm}^2$  (i.e.  $3.75 \cdot 10^{13}\text{ molecules}/\text{cm}^2$ ) were grafted on graphite in the sample of interest. These results are in accordance with a proper surface coverage already evidenced by XPS on gold substrate<sup>[1]</sup>.

Peak	Reference sample		5 $\mu$ M DNA electro-addressed	
	Raw area (cps)	Atomic concentration (%)	Raw area (cps)	Atomic concentration (%)
O 1s	16533	5.22	25604	8.81
N 1s	1112	0.56	3261	1.78
C 1s	103116	86.12	86637	78.92
Cl 2p	31370	8.04	36728	10.26
P 2p	146	0.07	444	0.22

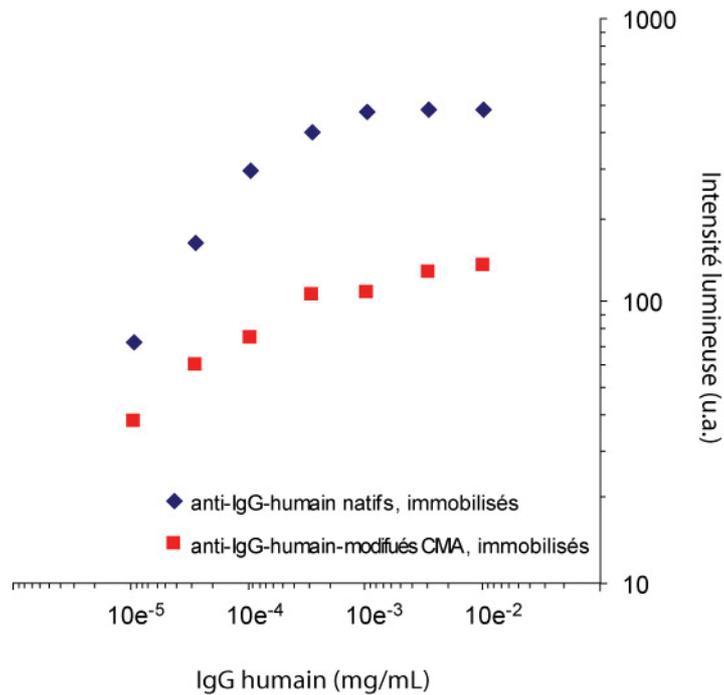
[1] D. Y. Petrovykh, H. Kimura-Suda, M. J. Tarlov, L. J. Whitman, *Langmuir* **2004**, 20, 429.



## Travaux annexes :

### Activité de reconnaissance des IgG immobilisés : immuno-essai de type sandwich

L'immuno-essai de type sandwich réalisé sur les électrodes sérigraphiées a été reproduit sur plaque ELISA afin de comparer la réactivité des anticorps anti-IgG-humain natifs, avec celle des anticorps anti-IgG-humain modifiés par la CMA (figure 47).



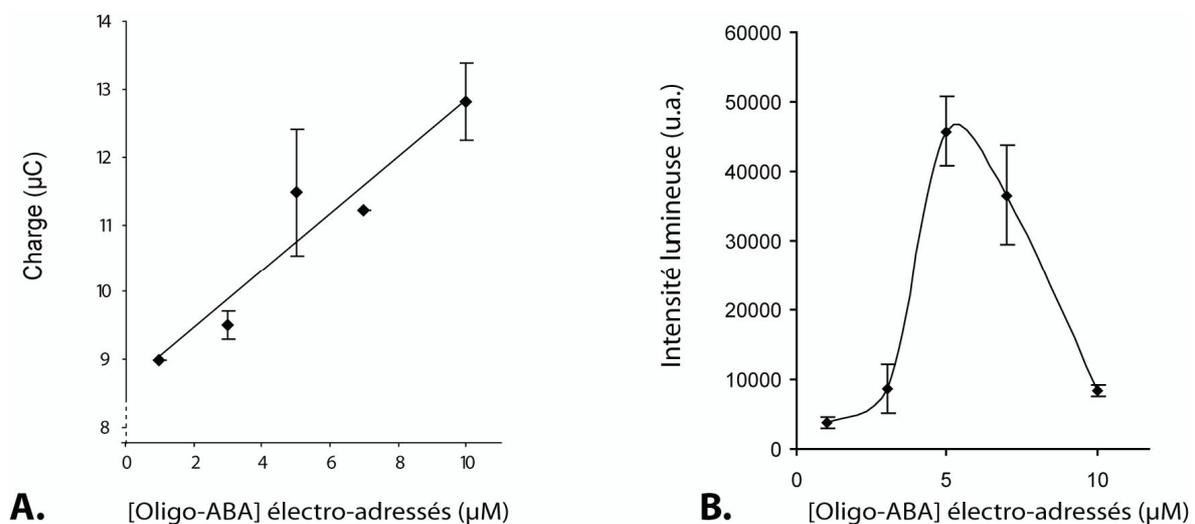
**Figure 47.** Immuno-essais de type sandwich sur plaque ELISA. Comparaison de la réactivité des anticorps anti-IgG-humain natifs, et des anticorps anti-IgG-humain modifiés par la CMA, immobilisés en fond de plaque.

On constate ainsi que les anticorps modifiés par la CMA ont une activité de reconnaissance diminuée par rapport aux mêmes anticorps sous leur forme native. Néanmoins, ils conservent une partie de leur activité, permettant ainsi de réaliser une détection efficace sur biopuces.

### Influence de la concentration d'oligonucléotide lors de l'adressage

L'effet de la concentration en sonde oligonucléotidique, lors de l'électro-adressage sur les électrodes sérigraphiées a été étudié. Des couches sensibles d'oligonucléotides-ABA, ont été formées en utilisant des concentrations allant de 1 à 10  $\mu\text{M}$  lors de l'électro-adressage. La représentation de la charge déposée lors de l'électro-adressage, permet de démontrer que la quantité de sondes oligonucléotidiques fixée augmente bien avec sa concentration lors de l'électro-adressage (figure 48.A).

Chaque biopuce a ensuite été incubée en présence de séquence cible à une concentration saturante de 200 nM. Après révélation par chimiluminescence, l'intensité lumineuse de chaque biopuce a été comparée (figure 48.B). L'effet observé est clairement celui dû à la variation de densité de surface de sondes immobilisées. Au-delà de 5  $\mu\text{M}$ , la plus forte densité greffée ne permet plus une hybridation aussi efficace des brins complémentaires, dû à un effet d'encombrement stérique (Ramsay, 1998; Marquette *et al.*, 2006). Cela se traduit par une chute du signal lumineux mesuré.



**Figure 48.** **A)** Charge transférée lors de l'électro-adressage en fonction de la concentration en oligonucléotide-ABA ( $n=3$ ). **B)** Intensité lumineuse obtenue après hybridation avec une concentration de cible de 200 nM. ( $n=3$ )  $t_{\text{intégration}}=3$  minutes.

Cette étude a permis de fixer la concentration en sonde à utiliser lors de l'électro-adressage à une valeur de 5  $\mu\text{M}$  afin d'obtenir la plus grande sensibilité lors de la détection des brins cibles.

### **Electro-adressage HRP-CMA ; effet du pH**

Comme indiqué dans l'article 4, la peroxydase a été fonctionnalisée par la CMA, diazotée puis immobilisée par électro-adressage. Les premiers essais réalisés ont montré que la peroxydase immobilisée dans des conditions optimisées pour les systèmes précédents (anticorps, oligonucléotides) était inactive. En effet, lors de l'étape de diazotation dans une solution à pH 1,8 (15 mM de HCl), la peroxydase perd la totalité de son activité. Et d'autre part, lors de l'immobilisation à des valeurs de pH supérieures à 2,5, aucun électro-adressage n'a pu être mis en évidence. Un compromis entre conservation de l'activité de l'enzyme et qualité de la diazotation a alors été nécessaire. Un pH de 2,5 a alors été choisi.



## Chapitre III

### Electrodéposition d'or : amplification de chimiluminescence

Article 5 :

#### On-Chip Chemiluminescent Signal Enhancement using Nanostructured Gold Modified-Carbon Microarrays

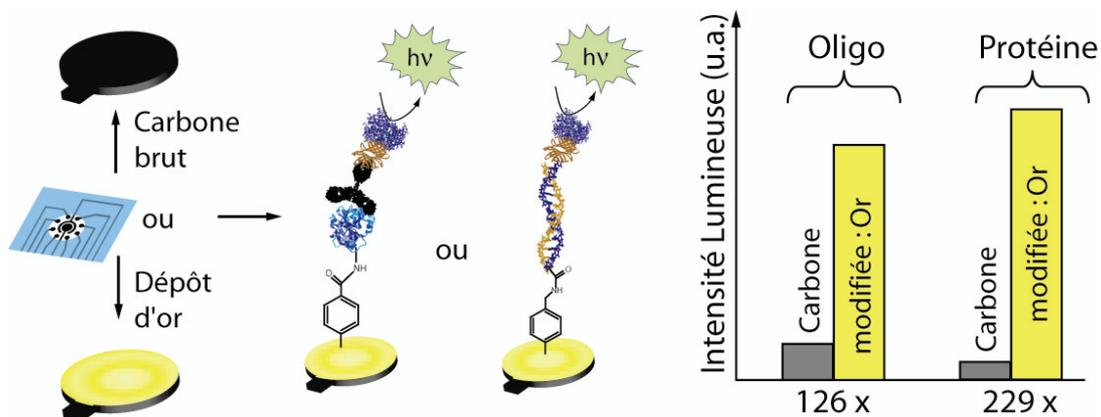
Benjamin P. Corgier, Feng Li, Loïc J. Blum and Christophe A. Marquette

Article accepté dans *Langmuir*

La possibilité d'électrodéposition d'or, à partir d'or en solution a été mise en évidence sur les réseaux d'électrodes sérigraphiés de seconde génération. Cet article présente la caractérisation et l'étude de ce phénomène, par microscopie optique et AFM. La formation de couches d'or a été étudiée en fonction de la charge totale utilisée (figure 2 de l'article 5). Les conditions optimales ont été déterminées afin d'obtenir une surface d'électrode homogène, totalement recouverte d'or.

Deux modèles de biopuces ont alors été réalisés par électro-adressage de protéine (PSA : antigène prostatique spécifique) ou d'oligonucléotides (20<sup>mer</sup> du gène *p53*) modifiés par un dérivé aniline et diazotés, à la surface d'électrodes recouvertes d'or (figure 1 de l'article 5).

Ainsi, les effets de la couche d'or sur l'immobilisation des biomolécules, mais aussi sur le signal chimiluminescent ont été caractérisés (tableau 1 de l'article 5). Il a été montré que les couches d'or électrodéposées augmentent la surface spécifique de chaque électrode, et ont un fort effet d'amplification sur la détection CL catalysée par la peroxydase (figure 49).



**Figure 49.** Représentation schématique des modèles de biopuce mis au point afin de mettre en évidence l'amplification de la détection chimiluminescente, due à la présence d'une couche d'or électrodéposée.

Les performances des deux biopuces pour la détection de sondes oligonucléotidiques ou de PSA libre (par compétition) sont présentées (figure 4 de l'article 5).

Ainsi il a été démontré que les couches d'or pouvaient être électrodéposées de manière précise et homogène uniquement sur les électrodes de carbone sérigraphiées. La possibilité de réaliser des électro-adressages de biomolécules à la surface de ces couches composées de particules d'or a été montrée. De plus, l'effet de la présence de cette couche sur la détection chimiluminescente est présenté. Celle-ci permet alors d'accroître considérablement le signal émis par rapport à l'utilisation d'une surface de carbone brut (facteur 126 pour la détection d'oligonucléotides et 229 pour la détection de protéines), permettant également d'abaisser les limites de détection. Ces phénomènes sont présentés et discutés dans cet article.

# On-Chip Chemiluminescent Signal Enhancement Using Nanostructured Gold-Modified Carbon Microarrays

Benjamin P. Corgier, Feng Li, Loïc J. Blum, and Christophe A. Marquette\*

Laboratoire de Génie Enzymatique et Biomoléculaire, Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, Université Lyon 1-CNRS 5246 ICBMS, Bâtiment CPE-43, bd du 11 novembre 1918-69622 Villeurbanne, Cedex, France

Received March 9, 2007. In Final Form: June 1, 2007

An original method for the enhancement of chemiluminescent (CL) on-chip detection of protein and oligonucleotides is presented. This enhancement is based on the electrodeposition of a gold nanostructured layer onto a screen-printed (SP) carbon microarray prior to the immobilization of biomolecules through a well-established diazonium adduct electrodeposition. Morphological studies of the Au layer (optical and atomic force microscopy) show that the metal film is composed of nanostructured 800 nm diameter particles covering the entire graphite surface and yielding a high surface area. Using these modified SP microarrays, enhancement factors of 229 and 126 were obtained for prostate-specific antigen (PSA) and p53 oligonucleotide detection, respectively. These enhancements were associated with three different phenomena: an enhancement of the catalyzed chemiluminescent reaction by the gold surface, an increase of the specific surface area for immobilization of the probe biomolecules, and an opposite quenching effect due to the overlapping of the gold absorption and CL emission peaks. For free PSA and target oligonucleotide detection, enhanced performances were obtained, giving detection limits of 5 ng/mL and 0.1 nM, respectively.

## Introduction

In the past 20 years, numerous groups<sup>1</sup> including ours<sup>2</sup> have dedicated their research to the development of chemiluminescent biosensors and biochips. Recently, screen-printed (SP) graphite electrode microarrays were successfully used as active support for biochip development.<sup>3,4</sup> These single-use graphite microarrays were composed of a 10-microelectrode setup (8 carbon working electrodes, 1 pseudoreference electrode, and 1 auxiliary electrode) and were used in impedance-based assays,<sup>5</sup> electrochemiluminescent biosensing,<sup>4</sup> and chemiluminescent immunoassays.<sup>3,6,7</sup>

For these latter systems, diazonium cation electrodeposition<sup>8</sup> has been investigated for the direct and electroaddressed immobilization of biomolecules. For the first time, this reaction was triggered directly onto diazonium-modified biomolecules.

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: christophe.marquette@univ-lyon1.fr.

(1) (a) Zhang, Z.; Jiang, H.; Xing, Z.; Zhang, X. *Sens. Actuators, B* **2004**, *102* (1), 155–161. (b) Panoutsou, P.; Economou, A. *Talanta* **2005**, *67* (3), 603–609. (c) Marks, R. S.; Margalit, A.; Bychenko, A.; Bassis, E.; Porat, N.; Dagan, P. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2000**, *89*, 117–126. (d) Luo, J.-X.; Yang, X. C. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *485* (1), 57–62. (e) Liu, C. H.; Li, Z. P.; Du, B. A.; Duan, X. R.; Wang, Y. C. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (11), 3738–3744. (f) Davidsson, R.; Johansson, B.; Passoth, V.; Bengtsson, M.; Laurell, T.; Emnéus, J. *Lab on a Chip* **2004**, *4* (5), 488–494.

(2) (a) Marquette, C. A.; Coulet, P. R.; Blum, L. J. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *398*, 173–182. (b) Tsafack, V. C.; Marquette, C. A.; Pizzolato, F.; Blum, L. J. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15* (3–4), 125–133. (c) Marquette, C. A.; Blum, L. J. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *506* (2), 127–132. (d) Marquette, C. A.; Hezard, P.; Degiuli, A.; Blum, L. J. *Sens. Actuators, B* **2006**, *113* (2), 664–670. (e) Marquette, C. A.; Cretich, M.; Blum, L. J.; Chiari, M. *Talanta* **2006**, *71* (3), 1312–1318. (f) Blum, L. J. *Bio- and Chemi-Luminescent Sensors*; World Scientific: Singapore, 1997.

(3) Marquette, C. A.; Laurenceau, E.; Mallet, F.; Chaix, C.; Blum, L. J.; Mandrand, B. *Anal. Biochem.* **2005**, *340* (1), 14–23.

(4) Corgier, B. P.; Marquette, C. A.; Blum, L. J. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *538* (1–2), 1–7.

(5) Marquette, C. A.; Lawrence, M. F.; Blum, L. J. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (3), 959–964.

(6) Corgier, B. P.; Marquette, C. A.; Blum, L. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (51), 18328–18332.

(7) Corgier, B. P.; Marquette, C. A.; Blum, L. J. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *22* (7), 1522–1526.

(8) Pinson, J.; Podvorica, F. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34* (5), 429–439.

This unique electroaddressing procedure was proven to be efficient for the immobilization of a variety of biomolecules such as antibodies, oligonucleotides, and enzymes.<sup>9</sup> The versatility of the electroaddressing chemistry was illustrated through biosensing architectures, that is, oligonucleotide-based assay, capture immunoassay, and sandwich immunoassay,<sup>7</sup> all involving a chemiluminescent detection system using horseradish peroxidase (HRP) as the label.

In an attempt to increase the sensitivity of the actual chemiluminescent system, our group and collaborators have recently demonstrated that HRP chemiluminescence could be enhanced by the proximity of rough gold surfaces prepared by pulsed-laser deposition.<sup>10,11</sup> Both an optic and a catalytic effect were proposed to explain the observed CL enhancement.

The aim of this paper is to demonstrate the possibility of enhancing the CL analytical signals obtained from our diazonium–biomolecule biochips through the use of gold-modified screen-printed electrodes.

Surface assemblies of gold nanoparticles<sup>12</sup> on electrode surfaces have received much attention and have been assumed to be an interesting approach for biosensor development due to their larger specific surface area. Thus, Au nanoparticles were deposited from colloidal solutions at the surface of carbon-, gold-, or boron-doped diamond electrodes through simple self-assembly.<sup>13,14</sup> The electrochemical performances of the composite electrodes were then solely attributed to the deposited nanoparticles. More

(9) Corgier, B. P.; Laurent, A.; Perriat, P.; Blum, L. J.; Marquette, C. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 4108–4110.

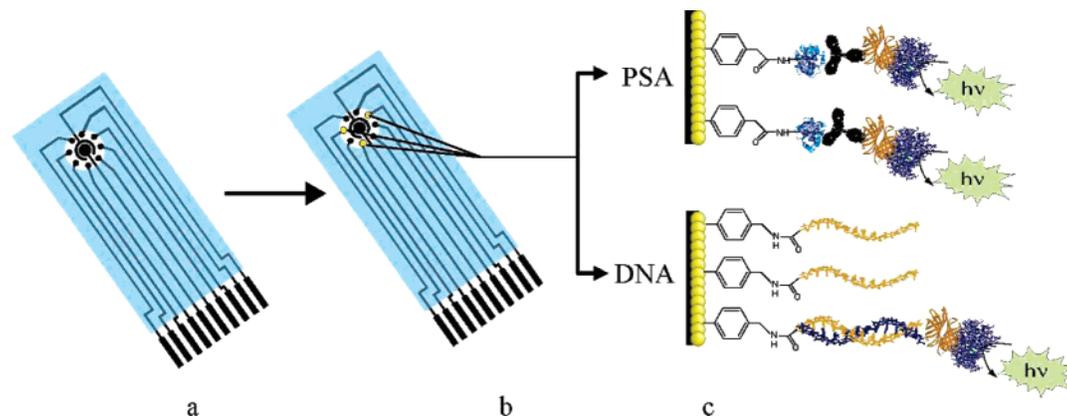
(10) Lu, G.; Cheng, B.; Shen, H.; Chen, Z.; Yang, G.; Marquette, C. A.; Blum, L. J.; Tillement, O.; Roux, S.; Ledoux, G.; Descamps, A.; Perriat, P. *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *88* (2), 023903–023906.

(11) Lu, G.; Shen, H.; Cheng, B.; Chen, Z.; Marquette, C. A.; Blum, L. J.; Tillement, O.; Roux, S.; Ledoux, G.; Ou, M.; Perriat, P. *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *89* (22), 223128–223131.

(12) Shipway, A. N.; Katz, E.; Willner, I. *ChemPhysChem* **2000**, *1* (1), 18–52.

(13) Sine, G.; Duo, I.; El Roustom, B.; Foti, G.; Comminellis, C. *J. Appl. Electrochem.* **2006**, *36* (8), 847–862.

(14) Tang, D. P.; Yuan, R.; Chai, Y. Q. *Electroanalysis* **2006**, *18* (3), 259–266.



**Figure 1.** Overview of biochip production from (a) the SP biochip to (b) the gold deposited biochip and (c) the PSA or p53 oligonucleotide-modified Au\*SP biochip.

complex techniques were also developed to deposit Au nanoparticles onto electrodes using additional linkers such as thiol containing molecules (cysteine and (3-mercaptopropyl) trimethoxysilane),<sup>15–18</sup> giving similar electrochemical results but with a higher stability for the deposited layer. A more straightforward technique based on metal electrodeposition<sup>19</sup> was chosen in the present study. Indeed, it is well-known that gold can be electrodeposited on carbon from an aqueous acidic solution through a nucleation and 3-D growth mechanism under mass transport control.

In this paper, the deposition of such a gold layer onto our screen-printed biochips (and its effect on the chemiluminescent signal) is studied. Particular attention is paid to the influence of the gold layer on the analytical performances of oligonucleotide- or protein-based chemiluminescent biochips. A 20<sup>mer</sup> sequence from a “hot spot” of exon 8 of the p53 tumor suppressor gene<sup>20</sup> was used as the model oligonucleotide, and prostate-specific antigen (PSA)<sup>21–23</sup> was chosen as the model protein system.

### Experimental Section

**Reagents.** 4-Aminophenylacetic acid (4-carboxymethylaniline (CMA)), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, bovine serum albumin (BSA), luminol (3-aminophthalhydrazide), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween 20), and peroxidase-labeled streptavidin were purchased from Sigma (France).

Human prostate-specific antigen (PSA) and anti-PSA biotin conjugated monoclonal antibody, developed in mice, were obtained from EXBIO Company (Czech Republic). ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) was purchased from Boehringer Mannheim (France). The probe oligonucleotide sequence (TTG AGG TGC ATG TTT GTG CC) modified with 4-aminobenzylamine (ABA) at the 5'-end and the target oligonucleotide sequence (GG CAC AAA CAT GCA CCT CAA) biotinylated at the 5'-end were purchased from Eurogentech S.A. (Belgium). All other

chemicals were of reagent grade and were used as received. All buffers and aqueous solutions were prepared with distilled demineralized (dd) water.

**Gold Electrodeposition onto Screen-Printed Biochips.** Screen-printed (SP) electrode arrays were produced as previously described.<sup>5,6</sup> The active area of the biochip is composed of eight 0.2 mm<sup>2</sup> working electrodes, one ring-shaped pseudoreference electrode, and one central auxiliary electrode (Figure 1a). A specially designed 10-path connector was used to control the potential/current applied to each of the working electrodes using a VMP3 multichannel potentiostat (BioLogic Science Instruments, France).

The gold deposition procedure was carried out through galvanostatic chronopotentiometry in a solution composed of 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 0.1 M HCl. A constant current of  $-15 \mu\text{A}$  was applied for 6 min, yielding a fixed charge of  $|Q| = 1.5 \mu\text{A}\cdot\text{h}$  transferred to each electrode. Following the deposition, the screen-printed biochips were rinsed with dd water and were ready for diazonium–biomolecule adduct deposition.

**PSA Modifications.** A two-step reaction protocol was elaborated to modify the protein. First, 10 mg of CMA was activated in the presence of 20.6 mg of DCC and 11.5 mg of NHS in 1 mL of DMSO for 30 min under stirring, and then 6  $\mu\text{L}$  of the activated CMA was added to 400  $\mu\text{L}$  of a 0.25 mg/mL protein solution in 0.1 M carbonate buffer (pH 11). This solution was left to react for 2 h under stirring at room temperature before being purified and concentrated to 0.25 mg/mL under centrifugation using Microcon YM-3 (Millipore). The obtained retentate was recovered in 400  $\mu\text{L}$  of dd water and stored at +4 °C.

**Diazotization and Electroaddressing of Aniline Derivative-Modified Protein and Oligonucleotide.** Prior to any electroaddressing, the screen-printed microarrays were saturated for 20 min in VBSTA (30 mM Veronal and 0.2 M NaCl, pH 8.5 with the addition of 0.1% Tween 20 and 1% BSA).

The CMA–PSA adduct was diazotated at a concentration of 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in an aqueous solution of 20 mM HCl and 20 mM NaNO<sub>2</sub> for 10 min under stirring in ice. The ABA–oligonucleotide probe adduct was diazotated at a concentration of 3  $\mu\text{M}$  in an aqueous solution of 20 mM HCl and 20 mM NaNO<sub>2</sub> for 10 min under stirring in ice. The diazonium solutions thus formed were then immediately used to perform electroaddressing by directly depositing a 25  $\mu\text{L}$  drop of the freshly diazotated biomolecule solutions onto the SP microarray surface (bare or gold covered). Three cyclic voltammograms were then performed on the chosen electrodes of the microarray, from 0 to  $-1500 \text{ mV}$  versus Pt, at a scan rate of 200 mV/sec. An external platinum counterelectrode and the ring-shaped carbon pseudoreference electrode of the screen-printed chip were used to achieve a three-electrode setup. After deposition, the carbon or gold covered electrodes were fully rinsed with dd water and were also sonicated to remove any unbound molecules.

**Hybridization Test Procedure.** Hybridization was performed on oligonucleotide-modified biochips. Briefly, 25  $\mu\text{L}$  of a solution of the biotinylated complementary strand, at a particular concentration

(15) El-Deab, M. S.; Okajima, T.; Ohsaka, T. *J. Electrochem. Soc.* **2006**, *153* (12), E201–E206.

(16) Huang, H. Z.; Liu, Z. G.; Yang, X. R. *Anal. Biochem.* **2006**, *356* (2), 208–214.

(17) Kongkanand, A.; Kuwabata, S. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (49), 23190–23195.

(18) Zhang, B.; Li, J. F.; Zhong, Q. L.; Ren, B.; Tian, Z. Q.; Zou, S. Z. *Langmuir* **2005**, *21* (16), 7449–7455.

(19) Martin, H.; Carro, P.; Creus, A. H.; Gonzalez, S.; Salvarezza, R. C.; Arvia, A. J. *Langmuir* **1997**, *13* (1), 100–110.

(20) Fujiki, T.; Haraoka, S.; Yoshioka, S.; Ohshima, K.; Iwashita, A.; Kikuchi, M. *Int. J. Oncol.* **2002**, *20* (4), 669–679.

(21) Bostwick, D. G. *Am. J. Clin. Pathol.* **1994**, *102* (4), S31–S37.

(22) Niemela, P.; Lovgren, J.; Karp, M.; Lilja, H.; Pettersson, K. *Clin. Chem.* **2002**, *48* (8), 1257–1264.

(23) Zhu, L.; Koistinen, H.; Wu, P.; Narvanen, A.; Schallmeiner, E.; Fredriksson, S.; Landegren, U.; Stenman, U. H. *Biol. Chem.* **2006**, *387* (6), 769–772.

in VBST (30 mM Veronal and 0.2 M NaCl, pH 8.5 with addition of 0.1% Tween 20), was left to incubate for 1 h at +37 °C and then rinsed in VBS (30 mM Veronal and 0.2 M NaCl, pH 8.5) to remove all unbound oligonucleotides. The surface was then saturated for 20 min with VBSTA and incubated for 30 min with peroxidase-labeled streptavidin at a concentration of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in VBSTA. At that time, the SP microarray surface was rinsed with VBS before being placed in the charge-coupled device (CCD) camera's chamber for light integration for 10 min (Las-1000 Plus, Intelligent Dark Box II, FUJIFILM; measuring solution: VBS containing 220  $\mu\text{M}$  of luminol, 200  $\mu\text{M}$  of *p*-iodophenol, and 500  $\mu\text{M}$  of hydrogen peroxide). The numeric micrographs thus obtained were quantified with a FUJIFILM image analysis program (Image Gauge 3.4).

**Free PSA Detection Test.** Free PSA determination was carried out by mixing 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anti-PSA monoclonal antibody with various concentrations of free PSA in PBSTA (0.1 M PBS, 0.15 M NaCl, 0.1% Tween 20, and 1.0 g/L BSA, pH 7.4). These solutions were incubated for 1 h at +37 °C on the surface of the PSA-modified SP microarrays and then washed with VBS to remove all unbound antibody. The surface was then saturated for 20 min with VBSTA and incubated for 30 min with peroxidase-labeled streptavidin at a concentration of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in VBSTA. At that time, the SP microarray surface was rinsed with VBS before being placed in the CCD camera's chamber for light integration (as described above).

**Enzyme Label Activity Determination.** For determination of the enzyme label activity (horseradish peroxidase), the entire working area of the biochip was dipped in a 2 mL spectrophotometer cell. The measuring solution was composed of 2 mM ABTS, 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 0.1 M acetate buffer, and 0.1 M KCl (pH 5.5). The activity of the enzyme label bound to the immobilized-hybridized double strand was followed at 405 nm under continuous stirring to avoid any diffusion limitation.

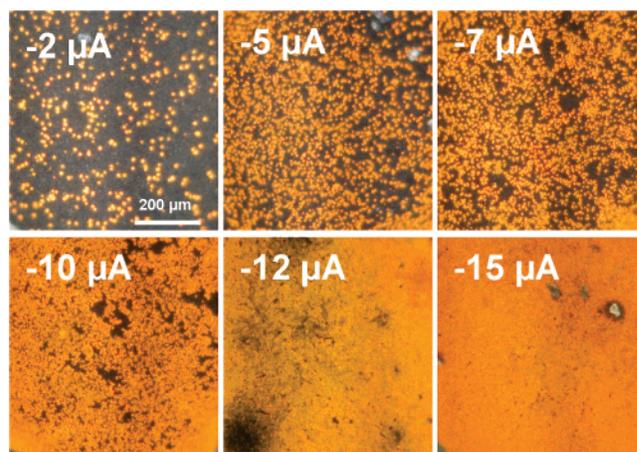
## Results and Discussion

SP electrode microarrays were used as solid support for protein- and oligonucleotide-based assays. The different steps involved in the achievement of the chemiluminescent analytical signal are illustrated in Figure 1. Briefly, protein or oligonucleotide diazonium adducts were electrodeposited onto gold-modified SP electrodes and were subsequently recognized by their specific antibody or target sequence, respectively. Each specific target was labeled with biotin, used to bind a horseradish peroxidase (HRP)-labeled streptavidin, which enabled the chemiluminescent detection of specific biomolecular interactions.

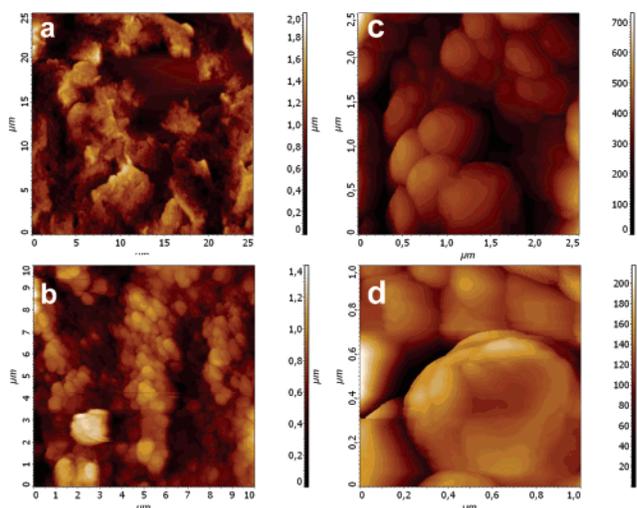
This chemiluminescent reaction was previously shown to be enhanced in the vicinity of a rough gold thin film, and this enhancement was found to be linked to both optical and catalytic effects (through activated oxygen species).<sup>24</sup> This phenomenon forms the basis of the present work in which two electrodeposition technologies were merged: the electroaddressing of biomolecule aryl diazonium adducts and the electrodeposition of textured gold films.

Figure 2 presents the optical micrographs of six SP electrodes modified with electrodeposited gold (Au\*SP) in a galvanostatic experiment. The nucleation of the gold film formation, from precise locations on the SP electrode, is clearly seen from the  $-2 \mu\text{A}$  optical micrograph. An obvious increase of the gold layer homogeneity was observed as the applied current was increased from  $-2$  to  $-15 \mu\text{A}$  during the deposition. The nanoscale composition of the Au film was studied through atomic force microscopy (Figure 3). A homogeneous bed of 800 nm width gold particles was found to completely cover the initial graphite SP paste (Figure 3a). Larger magnification of one particle (Figure 3d) reveals the surface morphology of each individual particle.

(24) Zhang, Z. F.; Cui, H.; Lai, C. Z.; Liu, L. J. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (10), 3324–3329.



**Figure 2.** Optical microscopy images of six different Au\*SP electrodes prepared with increasing applied current (constant time of 6 min).



**Figure 3.** Atomic force microscopy (NT-MDT, tapping mode) images of (a) a bare SP electrode and (b–d) different magnifications of an Au\*SP electrode. The individual 800 nm particle roughness is 16.5 nm (rms).

**Table 1. Chemiluminescence Measurements onto SP and Au\*SP Biochips**

	bare SP	gold-modified SP
DNA target sequence <sup>a</sup>		
light intensity	20 676 au	2 606 580 au
(enhancement factor)		(126)
DNA target sequence		
measured label activity <sup>b</sup>	7.5 mU/mm <sup>2</sup>	16.1 mU/mm <sup>2</sup>
anti-PSA mAb <sup>c</sup>		
light intensity	4624 au	1 059 140 au
(enhancement factor)		(229)

<sup>a</sup> Target sequence is 100 nM. <sup>b</sup> One unit =  $10^{-3}$  OD/minute. <sup>c</sup> Anti-PSA mAb concentration is 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

The enhancement effect of the  $-15 \mu\text{A}$  gold layer on the detection of protein/protein and oligonucleotide interactions was evaluated using PSA and probe oligonucleotide-modified Au\*SP. Table 1 presents the chemiluminescent signals and the enhancement factors for both biorecognition systems. Enhancement factors of 229 and 126 were obtained for monoclonal anti-PSA antibody (mAb) interactions and target sequence interactions, respectively. These drastic increases of the CL signal validate our gold enhancement approach.

The immobilization of the aniline-functionalized oligonucleotide probe sequence was used to more precisely assess the causes for the observed enhancements in the presence of the nanostructured gold layer. As described above, a 126 improvement factor was obtained when the probe oligonucleotides were immobilized at the surface of the Au\*SP electrodes. Such an increase of the chemiluminescent signal could have two different causes: the expected enhancement of the chemiluminescent signal simply due to the presence of gold (as referred to in the Introduction)<sup>10,11</sup> and/or a more efficient immobilization of the biomolecules onto the electrode surface.

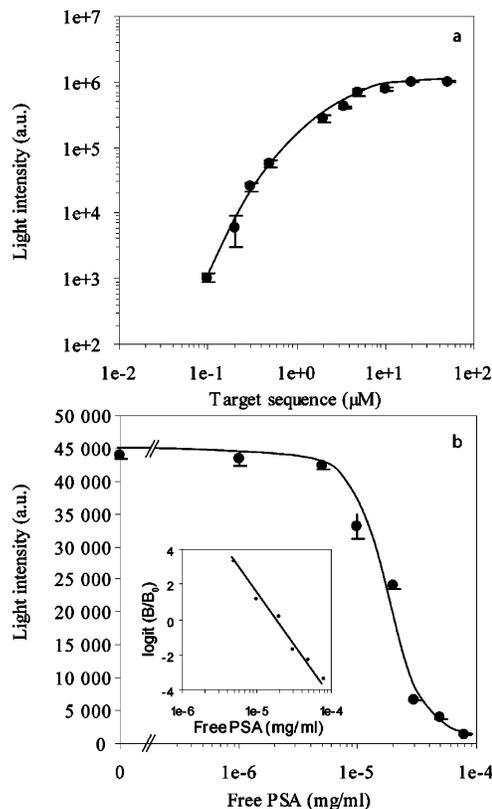
To discriminate between or validate these two possibilities, a colorimetric measurement which is insensitive to the presence of gold was used to evaluate and compare the label (HRP) activity bound to the immobilized hybridized double strands. SP and Au\*SP electrodes were then modified with oligonucleotide probes and incubated with a 100 nM target sequence, and the peroxidase label activity was measured through a colorimetric assay at 405 nm.

The results obtained (Table 1) show that HRP activity retained onto the Au\*SP electrode was only 2 times higher than the activity measured onto the bare SP electrodes. This higher activity is most probably related to an increase of the specific surface area of the Au\*SP electrodes (see AFM images). This is expected to lead to a higher amount of immobilized oligonucleotide probes while maintaining a reasonable probe surface density. Thus, the main contribution to the chemiluminescent signal enhancement observed with Au\*SP electrodes should be attributed to the effect of the gold on the chemiluminescent reaction.<sup>10,11</sup> Upon closer scrutiny of the enhancement results obtained for both protein- and oligonucleotide-modified Au\*SP electrodes, a clear difference appears between the two systems. Indeed, the CL enhancement for the protein was found to be twice that of the oligonucleotide Au\*SP microarrays. This difference between the two systems should then be related to the decrease in the metal quenching effect (i.e., with the increased distance between the emitting aminophthalate excited state and the metal surface). Förster transfer theory predicts that such a quenching possesses inverse fourth power dependence with the distance  $d$  between the donor and acceptor.<sup>25</sup> In our case, the distance between the surface and the peroxidase (i.e., the location of the generated emitting species) varies from 10.2 nm for the oligonucleotide biochips to almost 25 nm for the protein biochips.

Therefore, the observed enhancement may well be associated with three different phenomena: (i) an enhancement of the catalyzed chemiluminescent reaction by the gold surface,<sup>24</sup> (ii) an increase of the specific surface area for immobilization of the probe biomolecules, and (iii) an opposite quenching effect due to the overlapping of the gold absorption and the CL emission spectra.

Based on the Au\*SP biochip chemiluminescence enhancement, the two assay formats (i.e., immobilized p53 oligonucleotide and PSA antigen) were studied and characterized according to their analytical performances.

The probe oligonucleotide-based assay was used to detect the target sequence through hybridization. The calibration curve obtained is presented in Figure 4a. As shown by the error bars, this biochip model exhibits a very good reproducibility. The detection limit of the system was found to be 0.1 nM oligonucleotide target sequence in a 25  $\mu$ L sample, corresponding to  $1.5 \times 10^9$  molecules. In addition, the system provides a specific detection ranging over 2 orders of magnitude, from 0.1 to 10 nM. For higher concentrations, the hybridization



**Figure 4.** (a) Target sequence calibration curve ( $n = 3$ ) and (b) free PSA competition calibration curve ( $n = 3$ ) obtained from the chemiluminescent Au\*SP biochips. Inset: logit linearization of the PSA calibration curve.

sites at the surface of the electrode rapidly saturated and a plateau was obtained. These results could be compared to those from previous work by our group using the same p53 sequence immobilized directly onto SP carbon electrodes.<sup>5</sup> The Au\*SP system therefore provides an increase of 1 order of magnitude for the detection range with a lowering of the detection limit from 1 to 0.1 nM.

PSA antigen was detected through a competitive immunoassay in which the immobilized protein was in competition with the free PSA of the sample for binding to its specific monoclonal antibody. The competition calibration curve is presented in Figure 4b. As shown, a sensitive detection of PSA was performed with a detection limit of 5 ng/mL. When compared with the 4–10 ng/mL concentration of free PSA in healthy males, the observed detection limit appears to be sufficient for clinical applications, since the appearance of prostate cancer is characterized by an increase of free PSA in the blood.

The inset in Figure 4b represents the logit linearization of the calibration curve. The logit function is defined as

$$\text{logit} = \ln \left[ \frac{(B/B_0)}{(1 - B/B_0)} \right]$$

where  $B$  is the chemiluminescent signal obtained in the presence of a given concentration of free PSA and  $B_0$  is the signal in the absence of free PSA. This representation enables readings to be taken over a detection range of 5–80 ng/mL free PSA.

## Conclusions

The enhancement effect of a gold electrodeposited layer on the chemiluminescent (CL) signal of screen-printed biochips

was investigated. The biochips, prepared through a well-established electrografting procedure of biomolecules with aryl diazonium adducts, were found to be sensitive to the presence of this gold layer. Three different phenomena were proposed to contribute to the enhancement: (i) an enhanced CL catalysis, (ii) an increase of the geometric area, and (iii) an opposite quenching effect due to the overlap of the gold absorption and the CL emission peaks. These three effects lead to the achievement of high enhancement of the CL signals obtained on both protein (PSA) and oligonucleotide (p53) biochips, allowing for more

sensitive detection of the free protein and the target sequence. The present Au\*SP electrodes combined with the biomolecule electrografting technology method will in the near future be extended to a multiplexed detection system with the possibility of immobilizing further target proteins.

**Acknowledgment.** Published with the support of the European Commission, Sixth Framework Program, Information Society Technologies. CAREMAN (No. 017333).

LA700689B



## Chapitre IV

### Electro-adressage pour l'imagerie par SPR

Après avoir démontré que l'immobilisation de biomolécules par électro-adressage sur les électrodes couvertes d'une couche d'or était réalisable, il a été envisagé de tirer avantage de ces propriétés afin d'immobiliser des plots de biomolécules sur des supports d'or pour réaliser des mesures par SPR.

Les détections par SPR étant hautement dépendantes de l'organisation des couches sensibles immobilisées et de l'intégrité des entités immobilisées, une étude complète utilisant l'électro-adressage de biomolécules précédemment décrit a été menée.

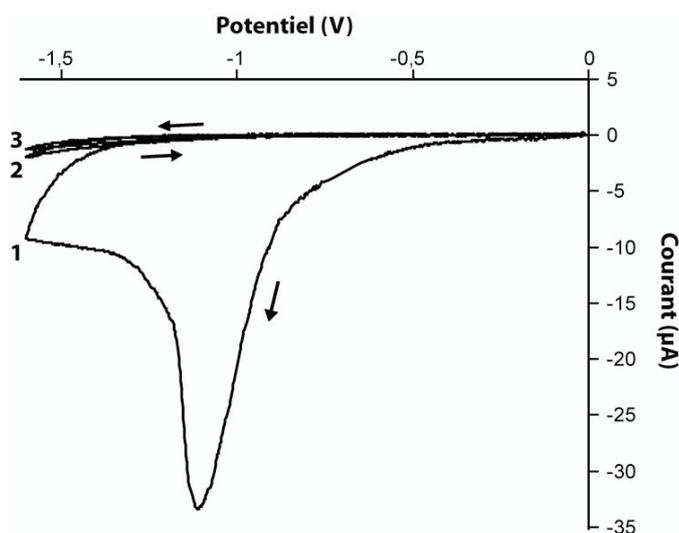
Ce chapitre présente les différentes étapes de l'étude et de la caractérisation de cette méthode d'immobilisation à la surface des puces utilisées pour la SPRi (imagerie par SPR). Les propriétés d'électro-adressage de sels de diazonium en solution, réalisé par "*pin-electrospotting*" à la surface de ces puces, sont étudiées. L'électro-adressage d'anticorps de lapin modifiés par la CMA est alors mis en évidence grâce à une révélation chimiluminescente. Des expériences sont alors réalisées en SPRi avec des anticorps extraits d'espèces différentes (lapin et humain) afin de démontrer les potentialités des biopuces pour la SPRi utilisant des anticorps modifiés électro-adressés. Des études sur la charge appliquée et sur la concentration lors de l'électro-adressage sont alors menées, permettant ainsi d'optimiser l'immobilisation afin d'améliorer la détection.

L'ensemble de ce travail sur l'immobilisation de biomolécules sur support pour SPRi a été réalisé en collaboration avec la société Genoptics<sup>®</sup>, où le Dr. Marielle Anger-Leroy a réalisé les mesures d'imagerie par SPR.

## 1. Propriété de greffage de diazonium seul, sur support SPRi

L'électro-adressage des sels de diazonium sur la surface d'or d'un support pour SPRi a en premier lieu été étudié en utilisant le 4-bromobenzène diazonium (BrDz) en solution. 100  $\mu\text{L}$  d'une solution aqueuse (4°C) de 10 mM de BrDz ont été électro-déposés à la surface du support, grâce à trois voltamogrammes successifs (figure 50). La surface d'or est alors utilisée comme électrode de travail, et le potentiel est appliqué par rapport à une pseudo-référence de platine, placée dans la pointe contenant la solution.

On observe distinctement un pic de réduction irréversible localisé à -1110 mV lors du premier balayage. Cette vague est caractéristique de la réduction électrochimique des fonctions aryldiazoniums à la surface d'électrode d'or (Laforgue *et al.*, 2005; Lyskawa *et al.*, 2006). De plus, les second et troisième cycles montrent un faible courant et l'absence de pic d'électroréduction, indiquant un effet de passivation de la surface. Cela met en évidence la fixation d'une monocouche de bromo-benzène, ce qui est couramment observé lors de l'utilisation de protocoles de courte durée (ici : 45 secondes) (Anariba *et al.*, 2003; Brooksby *et al.*, 2004).

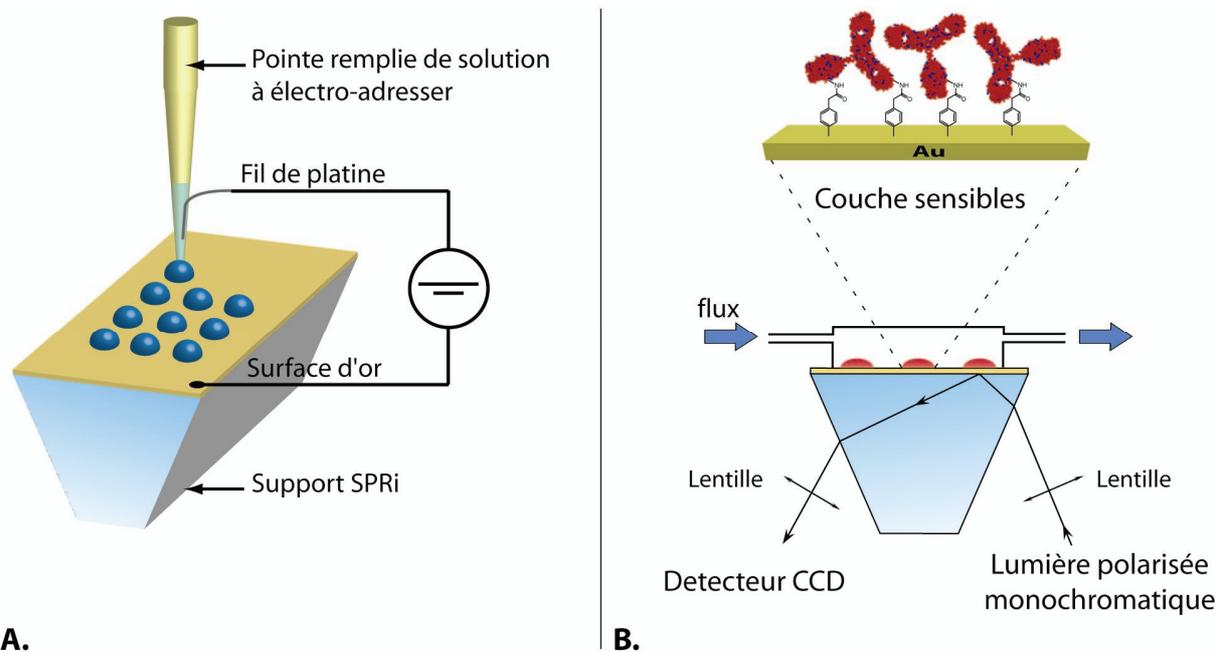


**Figure 50.** Electrodeposition de Br-Dz à une concentration de 10 mM dans H<sub>2</sub>O à 4°C. Electrode de travail: surface d'or du support pour SPRi. Pseudo-référence: platine. Vitesse de balayage: 200 mV/sec.

## 2. Electro-adressage d'anticorps sur support SPRi

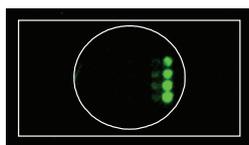
Les possibilités d'électro-adressage d'aryldiazoniums sur les supports d'or de SPR ayant été démontrées, des anticorps de lapin modifiés par la CMA ont été utilisés afin de mettre en

évidence l'immobilisation de biomolécules par électro-adressage sur ces supports. L'immobilisation a été réalisée grâce à un montage électrochimique de "*pin-electrospotting*" mettant en œuvre un système à deux électrodes (figure 51.A).



**Figure 51.** A) Schéma du montage électrochimique de dépôt par "*pin-electrospotting*". B) Schéma de principe de mesures d'imagerie par SPR, après électro-adressage d'anticorps modifiés formant des couches sensibles.

La présence des anticorps ainsi immobilisés a été révélée par interaction directe avec des anticorps anti-IgG-de-lapin marqués par la peroxydase, permettant de réaliser une détection chimiluminescente. Une image de la chimiluminescence émise par les plots de 1 mm de diamètre électro-adressés à la surface d'un support d'or pour SPRi est présentée figure 52. Cette image confirme que les anticorps modifiés ont bien été électro-adressés à la surface de la puce. Le signal lumineux provient spécifiquement des quatre plots d'anticorps de lapin modifiés et immobilisés, montrant que les couches sensibles formées sont fortement fixées à la surface, et ont résisté aux diverses étapes de rinçages et d'incubations.



**Figure 52.** Image de la chimiluminescence issue des quatre plots d'IgG de lapin modifiés par la CMA et électro-adressés (0,4 mg/mL diazotés ; -2,5 V vs Pt durant 2 sec).  $t_{\text{intégration}} = 10 \text{ min}$ .

### 3. Optimisation de l'électro-adressage

Dans cette partie, les caractéristiques des couches sensibles d'immunoglobulines électro-adressées ont été étudiées par imagerie SPR.

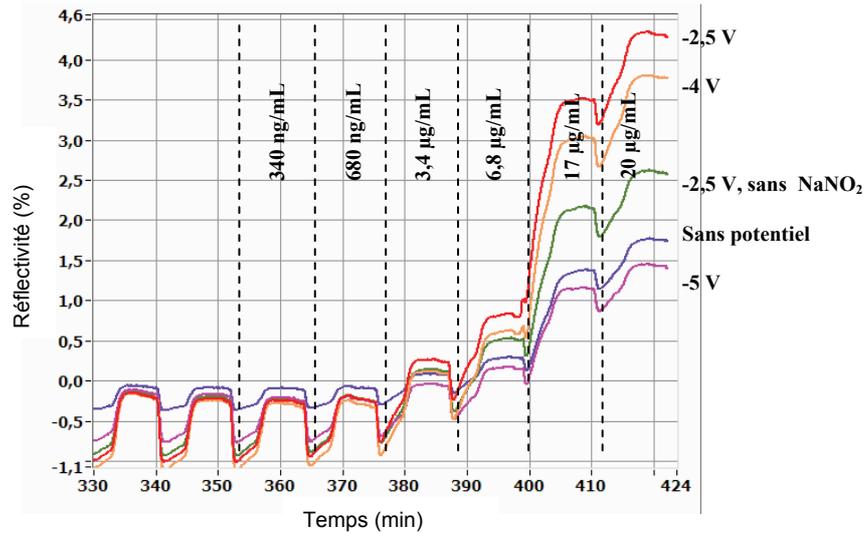
#### a. Protocole électrochimique

Des anticorps de lapin, modifiés par la CMA, ont été utilisés afin de déterminer le potentiel optimum d'électro-adressage à appliquer lors du dépôt par "*pin-electrospotting*". Il a été choisi de mettre en place un protocole utilisant un potentiel constant, appliqué pendant 2 secondes entre la surface et l'électrode de pseudo-référence de platine. Après séchage et rinçage du support, les mesures de SPRi sont réalisées (figure 51.B).

Des sensorgrammes obtenus lors de l'interaction d'anticorps anti-IgG de lapin injectés sont présentés figure 53. Ces résultats préliminaires montrent que les interactions entre des protéines greffées et des anticorps en solution peuvent être détectées par SPRi. Egalement, une augmentation du signal SPRi (réflectivité) en fonction de la concentration d'anticorps spécifiques présents dans la solution injectée en solution est observée.

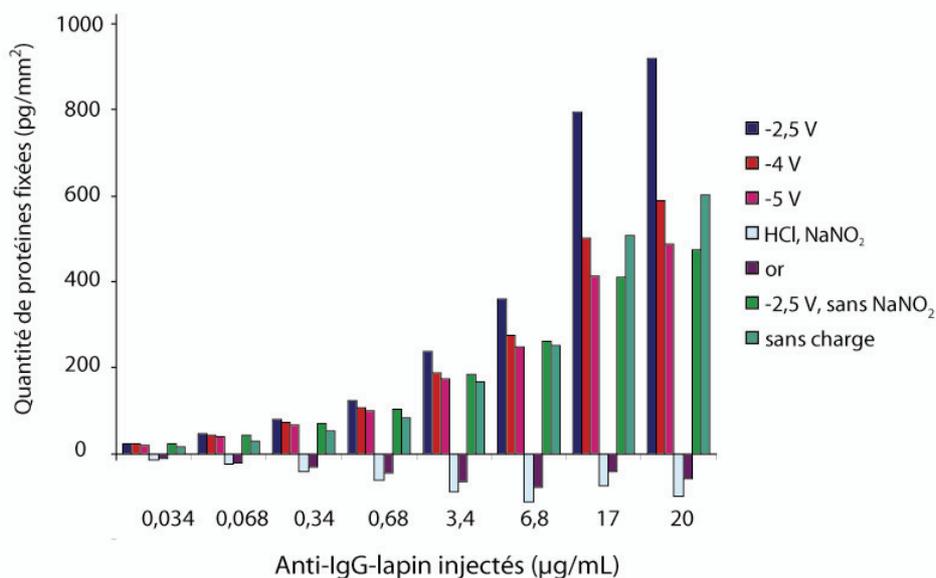
En fonction du protocole d'électro-adressage utilisé, les plots n'ont pas tous la même sensibilité vis-à-vis des anticorps en solution. En effet, des trois potentiels présentés ici (-2,5 V ; -4 V et -5 V, vs Pt), le plot immobilisé par polarisation à un potentiel de -2,5 V est celui qui permet de générer le plus grand signal de SPRi au cours de l'interaction. Un potentiel plus élevé ne semble pas produire une immobilisation efficace.

Lorsqu'aucun potentiel n'est appliqué, ou que la diazotation des dérivés anilines n'est pas réalisée (sans NaNO<sub>2</sub>), des anticorps modifiés sont tout de même présents et peuvent interagir avec les anticorps injectés. Ceci est dû à la forte capacité d'adsorption non-spécifique de la surface d'or.



**Figure 53.** Sensorgramme obtenu par mesure de SPRi sur une biopuce utilisant des IgG de lapin modifiés par de la CMA, diazotés et électro-adressés à une concentration de 0,4 mg/mL et à des potentiels variables, durant 2 secondes. Détection effectuée par injection d'anti-IgG de lapin à des concentrations croissantes allant de 340 ng/mL à 20 µg/mL.

Pour chaque plot, on peut représenter la quantité maximale de protéine fixée lors de l'interaction, en fonction de la concentration d'anticorps anti-IgG de lapin injectés (figure 54).



**Figure 54.** Histogramme représentant la quantité d'anticorps anti-IgG de lapin fixée en fonction de la quantité injectée, au niveau de chaque plot. Cette valeur est issue de la différence de réflectivité maximale mesurée par rapport au signal initial du plot.

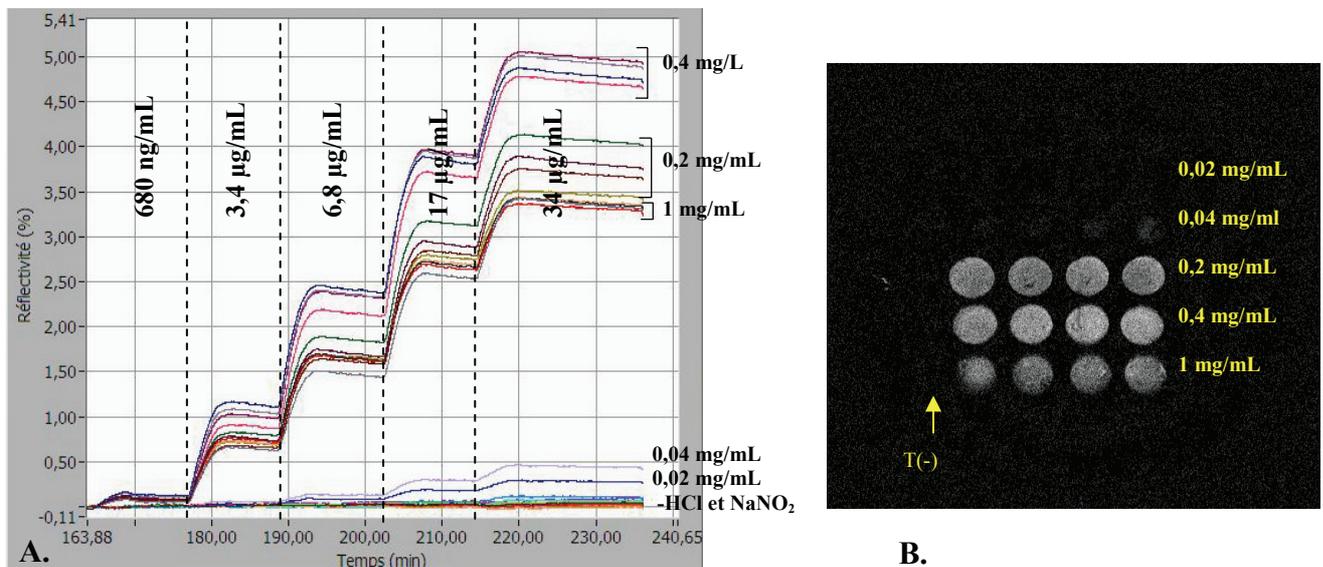
On remarque que les anticorps modifiés et adressés à l'aide d'un potentiel de -2,5 V vs Pt produisent une couche sensible permettant de fixer un maximum d'anticorps présents dans

l'échantillon. De plus, la quantité de protéines fixée sur un plot d'or non-modifié ainsi que sur un plot ayant subi le protocole électrochimique en présence de HCl et NaNO<sub>2</sub>, sont représentés. Ces deux derniers résultats montrent que les interactions qui ont lieu sur les autres plots sont dues uniquement à la présence d'anticorps modifiés par la CMA et électro-adressés.

Ces comparatifs de protocoles électrochimiques nous ont permis de fixer les conditions de dépôt à -2,5 V vs Pt durant 2 secondes.

### b. Influence de la concentration en IgG-CMA lors de l'électro-adressage

Ayant optimisé le protocole électrochimique permettant d'immobiliser les IgG de lapin modifiés par la CMA, une étude de l'influence de la concentration en protéine lors de l'électro-adressage a été menée. Des concentrations allant de 0,02 mg/mL à 1 mg/mL ont été utilisées afin d'électrodéposer les protéines, et les propriétés des couches sensibles formées ont été comparées (figure 55).



**Figure 55.** A) Sensorgrammes obtenus sur une biopuce par SPRi utilisant des anticorps de lapin modifiés par la CMA, diazotés et électro-adressés à des concentrations variables allant de 0,07 mg/mL à 0,4 mg/mL. Détection effectuée par injection d'anti-IgG de lapin à des concentrations croissantes allant de 680 ng/mL à 34 µg/mL. B) "Image différence", obtenue par soustraction du signal de lors de la détection moins le signal brute de cette surface modifiée. Cela représente le signal dû aux interactions spécifiques, correspondant aux sensorgrammes, pour une concentration d'anticorps anti-IgG de lapin en solution de 17 µg/mL.

On remarque comme précédemment que les couches sensibles formées à partir d'une concentration à 0,4 mg/mL d'anticorps modifiés et électro-adressés produisent le plus fort signal lors de l'interaction, quelle que soit la concentration de la solution d'anticorps injectée.

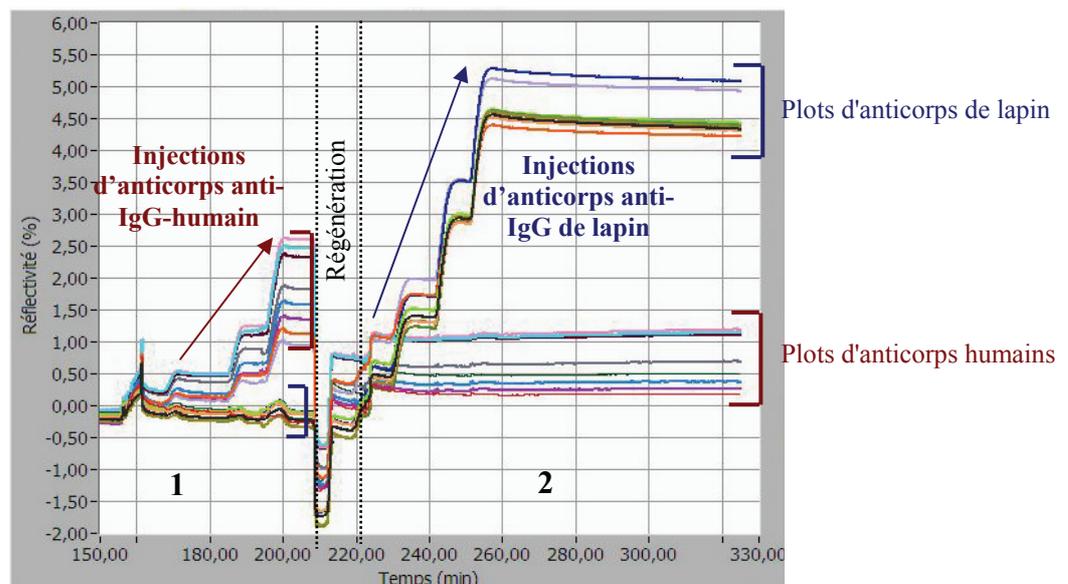
Pour des concentrations plus élevées, le signal obtenu par SPRi est plus faible, suggérant un problème de densité de protéines immobilisées et d'encombrement stérique.

La stabilité des biomolécules immobilisées a ensuite été étudiée. Pour cela, nous avons testé l'effet d'une injection de solution chaotrope de régénération (glycine 0,1 M, pH 2) en début d'expérience, avant toute injection. Aucune modification de la ligne de base n'a alors été observée, indiquant que les biomolécules électro-adressées sont fixées de manière stable à la surface du support, grâce aux liaisons covalentes formées entre les groupements aryl et la surface d'or.

Cette étude sur l'optimisation de l'électro-adressage sur support d'or pour SPRi nous a permis de déterminer une concentration en protéine à adresser, ainsi qu'un protocole électrochimique optimum afin de fixer des plots de protéines et ainsi de réaliser des couches sensibles utilisables pour la détection d'interactions en SPRi.

#### 4. Spécificité des interactions

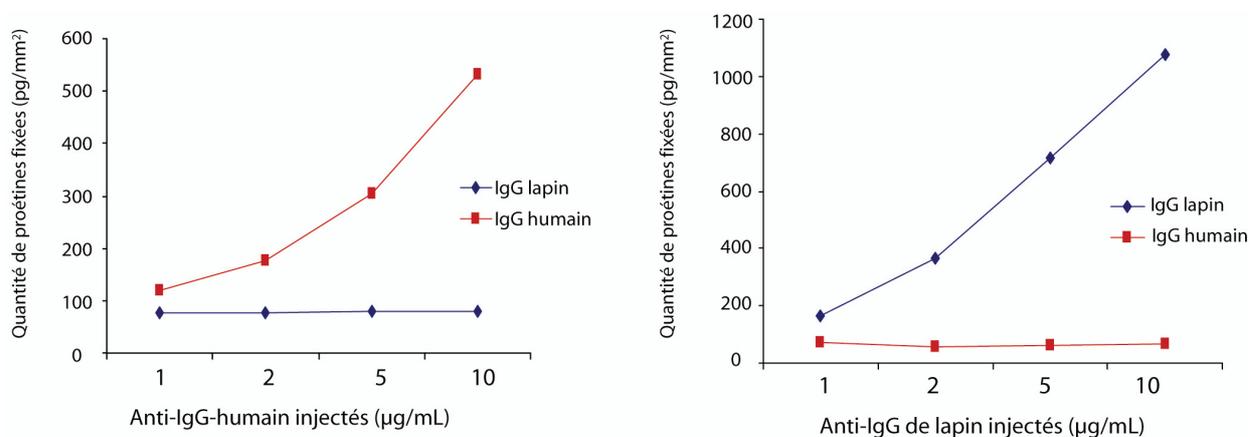
Après avoir optimisé les conditions de "*pin-electrospotting*", la spécificité des interactions observées a été étudiée. Afin de caractériser la spécificité de détection par SPRi sur des protéines électro-adressées, des IgG humain et de lapin ont été immobilisés sur un même support, et les interactions avec des anticorps anti-IgG-humain ou de lapin ont été étudiées sur les couches sensibles formées (figure 56).



**Figure 56.** Sensorgrammes obtenus sur une biopuce par SPRi utilisant des anticorps humains et de lapin modifiés par la CMA et immobilisés par "*pin-electrospotting*". Les interactions avec les anticorps anti-IgG-humain ou anticorps anti-IgG de lapin sont réalisées successivement et séparées par une étape de régénération.

Les signaux observés semblent être uniquement le fruit des interactions spécifiques antigènes/anticorps puisqu'aucune interaction non-spécifique inter-espèce n'a lieu. Cette figure montre que seuls les plots d'anticorps humains modifiés par la CMA et électro-adressés interagissent avec les IgG anti-IgG-humain injectés (figure 57, partie 1). A l'inverse, les IgG anti-IgG de lapin injectés, interagissent uniquement avec les plots d'anticorps de lapin modifiés par la CMA et immobilisés (figure 57, partie 2).

En effet, comme on peut l'observer sur les courbes représentant la quantité de protéine fixée sur les couches sensibles, les deux systèmes de détection sont tout à fait indépendants (figure 57).



**Figure 57.** Courbe représentant la quantité fixée par plot d'IgG humain ou de lapin, en fonction des solutions injectée (anticorps anti-IgG-humain ou de lapin). Courbes tracées à partir des sensorgrammes (figure 56) sur une biopuce utilisant des anticorps humains et de lapin modifiés par la CMA immobilisés par "*pin-electrospotting*". Les interactions avec des anticorps anti-IgG-humain ou anticorps anti-IgG de lapin sont réalisées successivement.

## 5. Conclusion partielle

Dans ce chapitre, il a été démontré que l'électrogreffage des aryldiazoniums et de ces dérivés pouvait être utilisé pour l'immobilisation de plots de protéines à la surface de supports d'or afin de réaliser des mesures de SPRi. Des anticorps de lapin modifiés par la CMA ont pu être diazotés et immobilisés par "*pin-electrospotting*", montrant une fixation efficace et stable à la surface du support.

Puisqu'on observe que les mesures d'interaction réalisées par SPRi sont reproductibles, on peut conclure que l'élaboration des surfaces réalisées par cette méthode est reproductible. De plus, nous avons montré que le greffage était dû en majorité à la diazotation et à l'électroréduction des dérivés diazonium, bien que des anticorps puissent se fixer sans application du protocole électrochimique.

Grâce à notre méthode d'immobilisation optimisée, le seuil de détection d'anticorps anti-IgG de lapin en solution est proche de 500 ng/mL (3,33 nM), ce qui est une limite encourageante pour la détection d'anticorps par SPRi (Grosjean *et al.*, 2005; Shankaran *et al.*, 2007).

Dès lors, afin d'étudier et d'exploiter au mieux l'électro-adressage de biomolécules sur supports d'or pour SPRi, il est envisagé d'immobiliser directement des anticorps dont l'activité de reconnaissance serait utilisée pour la détection d'antigènes en solution.



---

**CONCLUSION**

**ET**

**PERSPECTIVES**

---



## Conclusion

L'objectif de ce travail était d'utiliser des supports conducteurs, en particulier des réseaux d'électrodes sérigraphiés, afin de réaliser des biopuces. Pour cela, il a été nécessaire de mettre au point des méthodes d'immobilisation adaptées à ces supports et aux modes de détections envisagées, telles que l'électrochimiluminescence ou la chimiluminescence catalysée par la peroxydase.

Ainsi, la première génération de réseaux d'électrodes de carbone sérigraphiés a été étudiée en termes de reproductibilité et de capacité à déclencher l'électrochimiluminescence du couple luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reproductibilité de la méthode de production des réseaux a été évaluée par des mesures de voltammétrie cyclique. Elle a été établie à 98% électrode à électrode et à 96 % de puce à puce. Dès lors, le potentiel optimum de déclenchement de l'ECL du luminol a été déterminé et fixé à + 650 mV vs Pt, puis ces électrodes ont été utilisées afin de détecter le peroxyde d'hydrogène en solution (limite de détection : 0,3 µM).

Un modèle de biopuce enzymatique dont deux des électrodes supportent des couches sensibles composées d'oxydases piégées dans le PVA-SbQ a été réalisé. L'optimisation de ce modèle a conduit à la réalisation d'une biopuce permettant la détection spécifique du β-D-glucose et du L-lactate en solution avec des limites de détection respectivement de 10 µM et 3 µM. Il a également été montré que cette biopuce permettait de réaliser des mesures dans des échantillons complexes tels que des sérums humains.

Dans un second temps, nous nous sommes attachés à élaborer une stratégie innovante d'immobilisation de biomolécules. Pour cela, une seconde génération de réseaux d'électrodes de carbone sérigraphiés a été conçue, comportant une zone de travail délimitée grâce à la surimpression d'un vernis.

Les propriétés de greffage covalent par électro-adressage de sels de diazonium sur nos réseaux ont été décrites et caractérisées, puis l'électro-adressage d'anticorps modifiés par un dérivé aniline a été mis en évidence à la surface de nos électrodes de carbone sérigraphiées. Cette étude a été réalisée grâce à la réalisation de détections immunochimiques directes. Nous avons ainsi montré qu'il était possible de détecter 50 fmol d'anticorps en solution dans 25 µl (2 nM).

Il a été montré qu'avec cette biopuce il était possible de réaliser des électro-adressages successifs sur les huit électrodes d'une même biopuce offrant alors une reproductibilité satisfaisante (17% de variabilité du signal).

Après caractérisation de ce procédé d'électrogreffage, une biopuce reposant sur ce principe a été élaborée afin de réaliser des dosages de facteurs rhumatoïdes, dans des échantillons de

sérums humains, grâce à un immuno-essai de type capture. Ces résultats laissent envisager la possibilité de déposer plusieurs couches sensibles formées de différentes biomolécules, permettant de réaliser des détections multiples et simultanées, dans des échantillons biologiques.

Puis, afin de mettre en évidence tout le potentiel de la méthode d'électro-greffage de biomolécules sur nos réseaux d'électrodes de carbone, des anticorps anti-IgG-humain ont été immobilisés. Avec ce modèle, nous avons pu démontrer grâce à un immuno-essai de type sandwich, que les propriétés de reconnaissance des entités électro-adressées étaient conservées. De plus, un modèle de biopuce à oligonucléotides a également été réalisé par électro-adressage de brins modifiés. Enfin cette méthode a été adaptée à l'immobilisation d'enzymes, en électro-adressant la peroxydase. L'ensemble de ces résultats permet de présenter cette stratégie d'immobilisation de biomolécules comme une preuve de concept pour une méthode générique d'obtention de biomolécules électro-greffées.

Dans un troisième temps, une méthode d'électrodéposition d'or a été adaptée et étudiée sur nos électrodes de carbone sérigraphiées. L'effet de la présence de cette couche sur nos biopuces à protéines ou oligonucléotides électro-greffés a ensuite été étudié. Un fort facteur d'amplification de la chimiluminescence (100 à 200 selon le modèle) a été mis en évidence et utilisé afin d'améliorer les performances de détection de nos biopuces. Ainsi, ces biopuces ont permis d'atteindre des limites de détection de 0,1 nM pour les oligonucléotides et de 5 ng/mL pour la détection de PSA libre (antigène prostatique spécifique).

Parallèlement, l'électro-adressage d'anticorps modifiés par la 4-carboxyméthylaniline a été adapté à une méthode de "*pin-electrospotting*" afin de former des plots de biomolécules sur des supports d'or pour réaliser des détections en imagerie par SPR. Le procédé a alors été optimisé, et les potentialités de cette méthode d'immobilisation pour la SPRi ont été mises en évidence, par l'étude des détections par SPRi des couches sensibles, formées d'anticorps électro-adressés.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de mettre en évidence les avantages de la méthode d'électro-adressage de biomolécules élaborée. En effet, cette stratégie permet d'immobiliser des biorécepteurs en créant des liaisons covalentes avec la surface des électrodes. De plus, en formant une simple couche de biomolécules à la surface, celles-ci restent très accessibles, contrairement aux méthodes dites de piégeage, notamment celles utilisant des électro-polymères. D'un point de vue technique, la méthode est directe, permettant à la fois de localiser le lieu du dépôt et de greffer les biomolécules en une seule étape, à l'aide d'un protocole de courte durée (45 sec). Mais son principal avantage est son caractère versatile. En effet, nous avons démontré que l'électro-adressage impliquant des sels de diazonium est

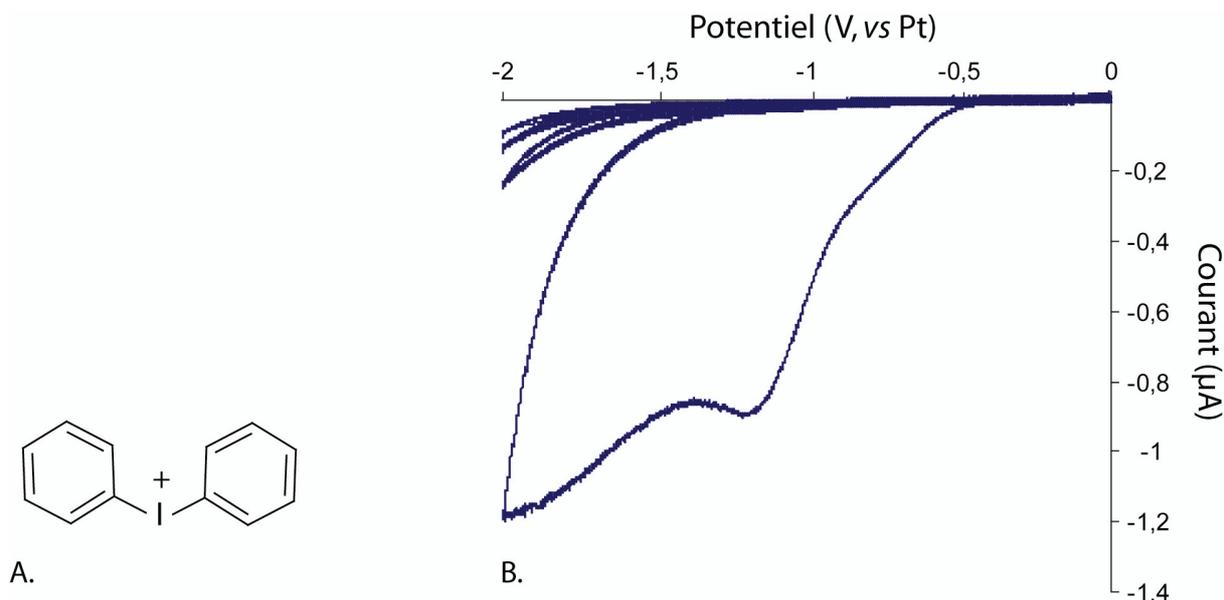
compatible avec des enzymes, des oligonucléotides ou des anticorps et permet de réaliser des biopuces reposant sur des détections immunologiques variées, de type : direct, "sandwich", "capture" ou compétitif. De plus cette méthode semble être applicable à tout type de support conducteur ou réseaux d'électrodes, ce qui élargit encore le champ des possibilités de réalisations.

## Perspectives

Sur le plan purement technologique, la méthode d'électro-adressage développée nous permet d'envisager la détection de plusieurs composés, simultanément, en utilisant une biopuce comportant autant de couches sensibles de nature différente que d'électrodes, électrogreffées successivement sur chacune des électrodes de travail.

Concernant le phénomène d'électro-adressage lui-même, d'autres molécules que les aryldiazoniums peuvent potentiellement être utilisées, afin d'obtenir un électrogreffage covalent. En effet, il a été récemment décrit que des sels de diaryl-iodoniums pouvaient être électro-adressés à la surface d'électrodes de carbone vitreux (Vase *et al.*, 2005 ; 2007). Ainsi, une expérience d'électrogreffage de diphényl-iodonium a été réalisée à la surface de nos électrodes de carbone sérigraphié (figure 58). Comme pour les molécules d'aryldiazonium, ces résultats semblent montrer que l'électro-adressage a bien lieu : vague/pic d'électroréduction et passivation de la surface lors des cycles suivants.

Ces molécules pourraient être utilisées afin de fonctionnaliser des biomolécules, puis selon notre modèle être électrogreffées. L'intérêt recherché serait d'employer une chimie différente, ne nécessitant pas de réaction de diazotation. En effet, il est nécessaire d'utiliser des solutions à un pH très acide ( $\text{pH} < 2,5$ ) afin de diazoter les dérivés anilines. Cette étape indispensable de notre méthode peut engendrer une diminution d'activité, comme celle observée avec le modèle d'électrogreffage de la peroxydase du raifort modifiée.



**Figure 58.** A) Diphényl-iodonium. B) Electro-réduction de ce composé à la surface d'une électrode de carbone sérigraphiée ( $0,2 \text{ mm}^2$ ). Trois cycles réalisés à  $200 \text{ mV/sec}$ , Pot. vs-Pt,  $50 \text{ mM}$  de diphényl-iodonium dans  $\text{H}_2\text{O}$ .

Sur un plan plus fondamental, il paraît intéressant d'étudier par la suite l'électro-adressage de biomolécules sur des matériaux conducteurs de différente nature, notamment le platine, le fer ou l'argent, ou bien semi-conducteurs tels que le silicium dopé. Nous pourrions ainsi comparer le phénomène de greffage par électro-réduction sur l'ensemble des matériaux conducteurs, et rechercher des performances plus intéressantes pour l'immobilisation de biomolécules. Avec l'utilisation de semi-conducteurs, il est envisageable de créer des biopuces permettant de réaliser des détections de biomolécules sans marquage, par mesure d'impédance.

D'autre part, il serait assurément intéressant d'utiliser des nanotubes de carbone, en tirant avantage des propriétés de transferts électronique de ceux-ci. Nous pourrions notamment envisager d'électrogreffer ceux-ci sur une électrode afin de modifier les propriétés électrochimiques de celle-ci, et d'augmenter la surface spécifique. L'excellente conductivité des nanotubes serait alors mise en jeu afin d'électro-adresser des biomolécules par-dessus ceux-ci.

Il pourrait également être envisagé de greffer des aryldiazoniums sur des matériaux non-conducteurs, par électroréduction de ceux-ci grâce à des électrodes placées à proximité de la surface. Nous pourrions ainsi immobiliser des biomolécules en tirant avantage de la flexibilité d'utilisation de matériaux tels que le PDMS. Ces méthodes pourraient permettre d'immobiliser par covalence des biomolécules sur du PDMS afin d'élaborer des systèmes microfluidiques.

D'autre part, l'étude de l'influence de la présence de particules de métaux sur les réactions de chimiluminescence catalysée par la peroxydase en milieu hétérogène pourrait être approfondie. L'or n'est certainement pas le seul métal dont la présence sous forme de particules possède ces propriétés d'amplification de la chimiluminescence catalysé par la peroxydase immobilisée par-dessus.

En effet nous pourrions étudier ce phénomène et son mécanisme avec des dépôts de métaux tels que le cuivre, celui-ci ayant également montré des propriétés d'électrodéposition (Kongstein *et al.*, 2005). De plus les mécanismes électroniques, ainsi que les effets de la distance HRP-métal, ou de la taille des particules mises en présence sont autant de paramètres intéressants à étudier et à comprendre.



---

# REFERENCES

---



## Références

- Adenier, A., M. C. Bernard, M. M. Chehimi, E. Cabet-Deliry, B. Desbat, O. Fagebaume, J. Pinson and F. Podvorica (2001). "Covalent modification of iron surfaces by electrochemical reduction of aryldiazonium salts." *Journal of the American Chemical Society* **123**(19): 4541-4549.
- Adenier, A., E. Cabet-Deliry, T. Lalot, J. Pinson and F. Podvorica (2002). "Attachment of polymers to organic moieties covalently bonded to iron surfaces." *Chemistry of Materials* **14**(11): 4576-4585.
- Albrecht, H. O. (1928). "Über die Chemiluminescenz des Aminophthalsäurehydrazids." *Zeitschrift für Physikalische Chemie-international journal of research in physical chemistry & chemical physics* **136**: 321-330.
- Allongue, P., C. H. De Villeneuve, J. Pinson, F. Ozanam, J. N. Chazalviel and X. Wallart (1998). "Organic monolayers on Si(111) by electrochemical method." *Electrochimica Acta* **43**(19-20): 2791-2798.
- Allongue, P., C. H. De Villeneuve, G. Cherouvrier, R. Cortès and M. C. Bernard (2003). "Phenyl layers on H-Si(1 1 1) by electrochemical reduction of diazonium salts: Monolayer versus multilayer formation." *Journal of Electroanalytical Chemistry* **161**: 550-551.
- Alvarez-Romero, G. A., A. Rojas-Hernandez, A. Morales-Perez and M. T. Ramirez-Silva (2004). "Determination of beta-D-glucose using flow injection analysis and composite-type amperometric tubular biosensors." *Biosensors & Bioelectronics* **19**(9): 1057-1065.
- Anariba, F., S. H. DuVall and R. L. McCreery (2003). "Mono-and multilayer formation by diazonium reduction on carbon surfaces monitored with atomic force microscopy "scratching"." *Analytical Chemistry* **75**(15): 3837.
- Andersson, H., C. Jonsson, C. Moberg and G. Stemme (2002). "Self-assembled and self-sorted array of chemically active beads for analytical and biochemical screening." *Talanta* **56**(2): 301-308.
- Asavapiryanont, S., G. K. Chandler, G. A. Gunawardena and D. Pletcher (1984). "The electrodeposition of polypyrrole films from aqueous solutions." *Journal of Electroanalytical Chemistry* **177**(1-2): 229-244.
- Badea, M., A. Curulli and G. Palleschi (2003). "Oxidase enzyme immobilisation through electropolymerised films to assemble biosensors for batch and flow injection analysis." *Biosensors & Bioelectronics* **18**(5-6): 689-698.
- Bahr, J. L. and J. M. Tour (2001). "Highly functionalized carbon nanotubes using in situ generated diazonium compounds." *Chemistry of Materials* **13**(11): 3823-3824.
- Bekir Yildiz, H., S. Kiralp, L. Toppare and Y. Yagci (2005). "Immobilization of invertase in conducting polypyrrole/PMMA-co-PMTM graft copolymers." *Journal of Applied Polymer Science* **96**(2): 502-507.
- Berglund, G. I., G. H. Carlsson, A. T. Smith, H. Szoke, A. Henriksen and J. Hajdu (2002). "The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution." *Nature* **417**(6887): 463-468.
- Bernard, M. C., A. Chaussé, E. Cabet-Deliry, M. M. Chehimi, J. Pinson, F. Podvorica and C. Vautrin-UI (2003). "Organic layers bonded to industrial, coinage, and noble metals through electrochemical reduction of aryldiazonium salts." *Chemistry of Materials* **15**(18): 3450-3462.
- Bianco, P., J. Haladjian and C. Bourdillon (1990). "Immobilization Of Glucose-Oxidase On Carbon Electrodes." *Journal Of Electroanalytical Chemistry* **293**(1-2): 151-163.
- Blum, L. J. and P. R. Coulet (1991). *Biosensor principles and applications*, Marcel Dekker Inc.

- Blum, L. J. (1997). *Bio-,Chemi-Luminescent Sensors*. Singapore, World Scientific.
- Blum, L. J. and A. B. Collaudin (1997). "Enhanced luminescent response of a fibre-optic sensor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by a high-salt-concentration medium." *Sensors and Actuators B: Chemical* **39**(1-3): 189-194.
- Boozer, C., G. Kim, S. X. Cong, H. W. Guan and T. Londergan (2006). "Looking towards label-free biomolecular interaction analysis in a high-throughput format: a review of new surface plasmon resonance technologies." *Current Opinion In Biotechnology* **17**(4): 400-405.
- Bourdillon, C., M. Delamar, C. Demaille, R. Hitmi, J. Moiroux and J. Pinson (1992). "Immobilization Of Glucose-Oxidase On A Carbon Surface Derivatized By Electrochemical Reduction Of Diazonium Salts." *Journal Of Electroanalytical Chemistry* **336**(1-2): 113-123.
- Brighamburke, M. and D. J. Oshannessy (1993). "A Microscale Method Employing Surface-Plasmon Resonance Detection For The Determination Of Conditions For Immunoaffinity Chromatography Of Proteins." *Chromatographia* **35**(1-2): 45-49.
- Brockman, J. M., A. G. Frutos and R. M. Corn (1999). "A multistep chemical modification procedure to create DNA arrays on gold surfaces for the study of protein-DNA interactions with surface plasmon resonance imaging." *Journal Of The American Chemical Society* **121**(35): 8044-8051.
- Brooksby, P. A. and A. J. Downard (2004). "Electrochemical and Atomic Force Microscopy Study of Carbon Surface Modification via Diazonium Reduction in Aqueous and Acetonitrile Solutions." *Langmuir* **20**(12): 5038-5045.
- Cai, H., Y. Xu, P. G. He and Y. Z. Fang (2003). "Indicator free DNA hybridization detection by impedance measurement based on the DNA-doped conducting polymer film formed on the carbon nanotube modified electrode." *Electroanalysis* **15**(23-24): 1864-1870.
- Campbell, A. K. (1988). *Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine*. Cambridge (G.B.), VCH Publishers.
- Cathcart, E. S. (1975). *Rheumatoid factors laboratory diagnostics procedure in the rheumatic diseases*. Boston, Little Brown.
- Chaki, N. K. and K. Vijayamohan (2002). "Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications." *Biosensors & Bioelectronics* **17**(1-2): 1-12.
- Chaussé, A., M. M. Chehimi, N. Karsi, J. Pinson, F. Podvorica and C. Vautrin-UI (2002). "The electrochemical reduction of diazonium salts on iron electrodes. The formation of covalently bonded organic layers and their effect on corrosion." *Chemistry of Materials* **14**(1): 392-400.
- Cherif, B., A. Roget, C. L. Villiers, R. Calemczuk, V. Leroy, P. N. Marche, T. Livache and M. B. Villiers (2006). "Clinically related protein-peptide interactions monitored in real time on novel peptide chips by surface plasmon resonance imaging." *Clinical Chemistry* **52**(2): 255-262.
- Childs, R. E. and W. G. Bardsley (1975). "The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen." *Biochemical Journal* **145**(1): 93-103.
- Clark, L. C. and C. Lyons (1962). "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery." *Annals of the New York Academy of Sciences* **102**: 29-46.
- Clark, M. F., R. M. Lister and M. Barjoseph (1986). "Elisa Techniques." *Methods In Enzymology* **118**: 742-766.
- Cook, L., R. Larter, P. D. Shen and T. Geest (1993). "Kinetics Of The Peroxidase Oxidase Reaction With Immobilized Enzyme." *Journal Of Physical Chemistry* **97**(35): 9060-9063.

- Corgier, B. P., C. A. Marquette and L. J. Blum (2005). "Diazonium-Protein Adducts for Graphite Electrode Microarrays Modification: Direct and Addressed Electrochemical Immobilization." *Journal of the American Chemical Society* **127**(51): 18328-18332.
- Cosnier, S., A. Le Pellec, R. S. Marks, K. Perie and J. P. Lellouche (2003). "A permselective biotinylated polydicarbazole film for the fabrication of amperometric enzyme electrodes." *Electrochemistry Communications* **5**(11): 973-977.
- Darain, F., D.-S. Park, J.-S. Park and Y.-B. Shim (2004). "Development of an immunosensor for the detection of vitellogenin using impedance spectroscopy." *Biosensors & Bioelectronics* **19**(10): 1245-1252.
- Dawson, J. H. (1988). "Probing Structure-Function Relations In Heme-Containing Oxygenases And Peroxidases." *Science* **240**(4851): 433-439.
- de Prada, A. G. V., N. Pena, C. Parrado, A. J. Reviejo and J. M. Pingarron (2004). "Amperometric multidetection with composite enzyme electrodes." *Talanta* **62**(5): 896-903.
- De Ruijter, W. J. (1995). "Imaging properties and applications of slow-scan charge-coupled device cameras suitable for electron microscopy." *Micron* **26**(3): 247-275.
- Delamar, M., R. Hitmi, J. Pinson and J. M. Saveant (1992). "Covalent Modification Of Carbon Surfaces By Grafting Of Functionalized Aryl Radicals Produced From Electrochemical Reduction Of Diazonium Salts." *Journal Of The American Chemical Society* **114**(14): 5883-5884.
- Dequaire, M., C. Degrand and B. Limoges (1999). "Biotinylation of screen-printed carbon electrodes through the electrochemical reduction of the diazonium salt of p-aminobenzoyl biocytin." *Journal Of The American Chemical Society* **121**(29): 6946-6947.
- DeVilleneuve, C. H., J. Pinson, M. C. Bernard and P. Allongue (1997). "Electrochemical formation of close-packed phenyl layers on Si(111)." *Journal Of Physical Chemistry B* **101**(14): 2415-2420.
- Diaz, A. F., K. K. Kanazawa and G. P. Gardini (1979). "Electrochemical Polymerization Of Pyrrole." *Journal Of The Chemical Society-Chemical Communications*(14): 635-636.
- Dobrowolski, J. A., F. C. Ho, D. Menagh, R. Simpson and A. Waldorf (1987). "Transparent, Conducting Indium Tin Oxide-Films Formed On Low Or Medium Temperature Substrates By Ion-Assisted Deposition." *Applied Optics* **26**(24): 5204-5210.
- Dotsikas, Y. and Y. L. Loukas (2007). "Effect of the luminol signal enhancer selection on the curve parameters of an immunoassay and the chemiluminescence intensity and kinetics." *Talanta* **71**(2): 906-910.
- Downard, A. J. (2000). "Electrochemically assisted covalent modification of carbon electrodes." *Electroanalysis* **12**(14): 1085-1096.
- Dumont, J. and G. Fortier (1996). "Behavior of glucose oxidase immobilized in various electropolymerized thin films." *Biotechnology And Bioengineering* **49**(5): 544-552.
- Epstein, B. and T. Kuwana (1967). "Electrooxidation of phthalhydrazides." *Journal of Electroanalytical Chemistry* **15**: 389-397.
- Epstein, J. R., I. Biran and D. R. Walt (2002). "Fluorescence-based nucleic acid detection and microarrays." *Analytica Chimica Acta* **469**(1): 3-36.
- Espina, V., E. C. Woodhouse, J. Wulfkuhle, H. D. Asmussen, E. F. Petricoin and L. A. Liotta (2004). "Protein microarray detection strategies: focus on direct detection technologies." *Journal Of Immunological Methods* **290**(1-2): 121-133.

- Eteshola, E. and D. Leckband (2001). "Development and characterization of an ELISA assay in PDMS microfluidic channels." *Sensors and Actuators B: Chemical* **72**(2): 129-133.
- Fang, S., H. J. Lee, A. W. Wark and R. M. Corn (2006). "Attomole Microarray Detection of MicroRNAs by Nanoparticle-Amplified SPR Imaging Measurements of Surface Polyadenylation Reactions." *Journal Of The American Chemical Society* **128**(43): 14044-14046.
- Garnier, F., H. K. Youssoufi, P. Srivastava and A. Yassar (1994). "Enzyme Recognition By Polypyrrole Functionalized With Bioactive Peptides." *Journal Of The American Chemical Society* **116**(19): 8813-8814.
- Genies, E. M., G. Bidan and A. F. Diaz (1983). "Spectroelectrochemical Study Of Polypyrrole Films." *Journal Of Electroanalytical Chemistry* **149**(1-2): 101-113.
- Gerard, M., A. Chaubey and B. D. Malhotra (2002). "Application of conducting polymers to biosensors." *Biosensors & Bioelectronics* **17**(5): 345-359.
- Gill, I. and A. Ballesteros (2000). "Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals." *Trends In Biotechnology* **18**(7): 282-296.
- Godoy, S., B. Leca-Bouvier, P. Boullanger, L. J. Blum and A. P. Girard-Egrot (2005). "Electrochemiluminescent detection of acetylcholine using acetylcholinesterase immobilized in a biomimetic Langmuir-Blodgett nanostructure." *Sensors and Actuators B: Chemical* **107**(1): 82-87.
- Green, J.-B. D., M. T. McDermott, M. D. Porter and L. M. Siperko (1995). "Nanometer-Scale Mapping of Chemically Distinct Domains at Well-Defined Organic Interfaces Using Frictional Force Microscopy." *Journal Of Physical Chemistry* **99**(27): 10960-10965.
- Grosjean, L., B. Cherif, E. Mercey, A. Roget, Y. Levy, P. N. Marche, M. B. Villiers and T. Livache (2005). "A polypyrrole protein microarray for antibody-antigen interaction studies using a label-free detection process." *Analytical Biochemistry* **347**(2): 193-200.
- Guedon, P., T. Livache, F. Martin, F. Lesbre, A. Roget, G. Bidan and Y. Levy (2000). "Characterization and optimization of a real-time, parallel, label-free, polypyrrole-based DNA sensor by surface plasmon resonance imaging." *Analytical Chemistry* **72**(24): 6003-6009.
- Haab, B., M. Dunham and P. Brown (2001). "Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions." *Genome Biology* **2**(2): research0004.1 - research0004.13.
- Halliwell, C. M., E. Simon, C. S. Toh, P. N. Bartlett and A. E. G. Cass (2002). "Immobilisation of lactate dehydrogenase on poly(aniline)-poly(acrylate) and poly(aniline)-poly-(vinyl sulphonate) films for use in a lactate biosensor." *Analytica Chimica Acta* **453**(2): 191-200.
- Han, J. H., H. Boo, S. Park and T. D. Chung (2006). "Electrochemical oxidation of hydrogen peroxide at nanoporous platinum electrodes and the application to glutamate microsensor." *Electrochimica Acta* **52**(4): 1788-1791.
- Harvey, N. (1929). "Luminescence during Electrolysis." *Journal Of Physical Chemistry* **33**(10): 1456-1459.
- Hasunuma, T., S. Kuwabata, E. Fukusaki and A. Kobayashi (2004). "Real-time quantification of methanol in plants using a hybrid alcohol oxidase-peroxidase biosensor." *Analytical Chemistry* **76**(5): 1500-1506.
- Hermanson, G. T., A. K. Mallia and P. K. Smith (1992). Immobilized affinity ligand techniques, academic Press, Inc.

- Hoogvliet, J. C., P. Vanos, E. J. Vandermark and W. P. Vanbennekorn (1991). "Modification Of Glassy-Carbon Electrode Surfaces With Mediators And Bridge Molecules." *Biosensors & Bioelectronics* **6**(5): 413-423.
- Houseman, B. T., J. H. Huh, S. J. Kron and M. Mrksich (2002). "Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity." *Nature Biotechnology* **20**(3): 270-274.
- Hsieh, H. V., Z. A. Pfeiffer, T. J. Amiss, D. B. Sherman and J. B. Pitner (2004). "Direct detection of glucose by surface plasmon resonance with bacterial glucose/galactose-binding protein." *Biosensors & Bioelectronics* **19**(7): 653-660.
- Huang, R. P. (2001). "Detection of multiple proteins in an antibody-based protein microarray system." *Journal Of Immunological Methods* **255**(1-2): 1-13.
- Ionescu, R. E., S. Herrmann, S. Cosnier and R. S. Marks (2006). "A polypyrrole cDNA electrode for the amperometric detection of the West Nile Virus." *Electrochemistry Communications* **8**(11): 1741-1748.
- IUPAC (1997). IUPAC Compendium of Chemical Terminology 2nd Edition.
- Jang, Y., S. Y. Oh and J.-K. Park (2006). "In situ electrochemical enzyme immunoassay on a microchip with surface-functionalized poly(dimethylsiloxane) channel." *Enzyme and Microbial Technology* **39**(5): 1122.
- Jones, V. W., J. R. Kenseth, M. D. Porter, C. L. Mosher and E. Henderson (1998). "Microminiaturized Immunoassays Using Atomic Force Microscopy and Compositionally Patterned Antigen Arrays." *Analytical Chemistry* **70**(7): 1233-1241.
- Jordan, C. E., A. G. Frutos, A. J. Thiel and R. M. Corn (1997). "Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of DNA Hybridization Adsorption and streptavidin/DNA Multilayer Formation at Chemically Modified Gold Surfaces." *Analytical Chemistry* **69**(24): 4939 - 4947.
- Joshi, P. P., S. A. Merchant, Y. D. Wang and D. W. Schmidtke (2005). "Amperometric biosensors based on redox polymer-carbon nanotube-enzyme composites." *Analytical Chemistry* **77**(10): 3183-3188.
- Kang, S. K., J. H. Kim, J. H. An, E. K. Lee, J. H. Cha, G. B. Lim, Y. S. Park and D. J. Chung (2004). "Synthesis of polythiophene derivatives and their application for electrochemical DNA sensor." *Polymer Journal* **36**(12): 937-942.
- Kartalov, E. P., W. F. Anderson and A. Scherer (2006). "The analytical approach to polydimethylsiloxane microfluidic technology and its biological applications." *Journal Of Nanoscience And Nanotechnology* **6**(8): 2265-2277.
- Kasai, S., Y. Hirano, N. Motochi, H. Shiku, M. Nishizawa and T. Matsue (2002). "Simultaneous detection of uric acid and glucose on a dual-enzyme chip using scanning electrochemical microscopy/scanning chemiluminescence microscopy." *Analytica Chimica Acta* **458**(2): 263-270.
- Kim, H., M. D. Kane, S. Kim, W. Dominguez, B. M. Applegate and S. Savikhin (2007). "A molecular beacon DNA microarray system for rapid detection of E. coli O157:H7 that eliminates the risk of a false negative signal." *Biosensors & Bioelectronics* **22**(6): 1041-1047.
- Kim, K., M. Jang, H. S. Yang, E. Kim, Y. T. Kim and J. Kwak (2004). "Electrochemically induced and controlled one-step covalent coupling reaction on self-assembled monolayers." *Langmuir* **20**(10): 3821-3823.
- Kongstein, O. E., U. Bertocci and G. R. Stafford (2005). "In situ stress measurements during copper electrodeposition on (111)-textured Au." *Journal Of The Electrochemical Society* **152**(3): C116-C123.

- Kretschmann, E. and H. Raether (1968). "Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light." *Zeitschrift fur Naturforschung A (Astrophysik, Physik und Physikalische Chemie)* **23a**(12): 2135.
- Kuroda, N., R. Shimoda, M. Wada and K. Nakashima (2000). "Lophine derivatives and analogues as new phenolic enhancers for the luminol-hydrogen peroxide-horseradish peroxidase chemiluminescence system." *Analytica Chimica Acta* **403**(1-2): 131-136.
- Kuwana, T. (1963). "Electro-oxidation followed by light emission." *Journal of Electroanalytical Chemistry* **6**(2): 164-167.
- Kwan, R. C. H., P. Y. T. Hon, K. K. W. Mak and R. Renneberg (2004). "Amperometric determination of lactate with novel trienzyme/poly(carbamoyl) sulfonate hydrogel-based sensor." *Biosensors & Bioelectronics* **19**(12): 1745-1752.
- Laforgue, A., T. Addou and D. Bélanger (2005). "Characterization of the deposition of organic molecules at the surface of gold by the electrochemical reduction of aryldiazonium cations." *Langmuir* **21**(15): 6855-6865.
- Lane, D. P. (1992). "Cancer - P53, Guardian Of The Genome." *Nature* **358**(6381): 15-16.
- Leca, B. and L. J. Blum (2000). "Luminol electrochemiluminescence with screen-printed electrodes for low-cost disposable oxidase-based optical sensors." *The Analyst* **125**(5): 789-791.
- Lee, H. J., D. Nedelkov and R. M. Corn (2006). "Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of Antibody Arrays for the Multiplexed Detection of Low Molecular Weight Protein Biomarkers." *Analytical Chemistry* **78**(18): 6504-6510.
- Lev, O., Z. Wu, S. Bharathi, V. Glezer, A. Modestov, J. Gun, L. Rabinovich and S. Sampath (1997). "Sol-gel materials in electrochemistry." *Chemistry Of Materials* **9**(11): 2354-2375.
- Li, C. M., W. Chen, X. Yang, C. Q. Sun, C. Gao, Z. X. Zheng and J. Sawyer (2005a). "Impedance labelless detection-based polypyrrole protein biosensor." *Frontiers In Bioscience* **10**: 2518-2526.
- Li, G. T., S. Bhosale, S. Y. Tao, S. Bhosale and J. H. Fuhrhop (2005b). "Conducting polythiophenes with a broad spectrum of reactive groups." *Journal Of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* **43**(19): 4547-4558.
- Li, G. X., X. W. Zheng and Z. J. Zhang (2006a). "Electrogenerated chemiluminescence (ECL) determination of ephedrine with a self-assembly multilayer Ni(II)-polyluminol modified electrode." *Microchimica Acta* **154**(1-2): 153-161.
- Li, L., M. A. Arnold and J. S. Dordick (1993). "Mathematical-Model For The Luminol Chemiluminescence Reaction Catalyzed By Peroxidase." *Biotechnology And Bioengineering* **41**(11): 1112-1120.
- Li, Y., A. W. Wark, H. J. Lee and R. M. Corn (2006b). "Single-Nucleotide Polymorphism Genotyping by Nanoparticle-Enhanced Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of Surface Ligation Reactions." *Anal. Chem.* **78**(9): 3158-3164.
- Liss, M., B. Petersen, H. Wolf and E. Prohaska (2002). "An aptamer-based quartz crystal protein biosensor." *Analytical Chemistry* **74**(17): 4488-4495.
- Livache, T., A. Roget, E. Dejean, C. Barthet, G. Bidan and R. Teoule (1994). "Preparation Of A Dna Matrix Via An Electrochemically Directed Copolymerization Of Pyrrole And Oligonucleotides Bearing A Pyrrole Group." *Nucleic Acids Research* **22**(15): 2915-2921.

- Livache, T., H. Bazin, P. Caillat and A. Roget (1998a). "Electroconducting polymers for the construction of DNA or peptide arrays on silicon chips." *Biosensors & Bioelectronics* **13**(6): 629-634.
- Livache, T., B. Fouque, A. Roget, J. Marchand, G. Bidan, R. Teoule and G. Mathis (1998b). "Polypyrrole DNA Chip on a Silicon Device: Example of Hepatitis C Virus Genotyping." *Analytical Biochemistry* **255**(2): 188-194.
- Livache, T., P. Guedon, C. Brakha, A. Roget, Y. Levy and G. Bidan (2001). "Polypyrrole electrospotting for the construction of oligonucleotide arrays compatible with a surface plasmon resonance hybridization detection." *Synthetic Metals* **121**(1-3): 1443-1444.
- Lofas, S. and B. Johnsson (1990). "A Novel Hydrogel Matrix On Gold Surfaces In Surface-Plasmon Resonance Sensors For Fast And Efficient Covalent Immobilization Of Ligands." *Journal Of The Chemical Society-Chemical Communications*(21): 1526-1528.
- Lofas, S., B. Johnsson, A. Edstrom, A. Hansson, G. Lindquist, R. M. M. Hillgren and L. Stigh (1995). "Methods For Site Controlled Coupling To Carboxymethyldextran Surfaces In Surface-Plasmon Resonance Sensors." *Biosensors & Bioelectronics* **10**(9-10): 813-822.
- Lopez-Crapez, E., T. Livache, J. Marchand and J. Grenier (2001). "K-ras mutation detection by hybridization to a polypyrrole DNA chip." *Clinical Chemistry* **47**(2): 186-194.
- Lupu, A., D. Compagnone and G. Palleschi (2004). "Screen-printed enzyme electrodes for the detection of marker analytes during winemaking." *Analytica Chimica Acta* **513**(1): 67-72.
- Lyskawa, J. and D. Belanger (2006). "Direct Modification of a Gold Electrode with Aminophenyl Groups by Electrochemical Reduction of in Situ Generated Aminophenyl Monodiazonium Cations." *Chemistry Of Materials*: 4755-4763.
- Ma, K.-S., H. Zhou, J. Zoval and M. Madou (2006). "DNA hybridization detection by label free versus impedance amplifying label with impedance spectroscopy." *Sensors and Actuators B: Chemical* **114**(1): 58-64.
- MacBeath, G., A. N. Koehler and S. L. Schreiber (1999). "Printing Small Molecules as Microarrays and Detecting Protein-Ligand Interactions en Masse." *Journal Of The American Chemical Society* **121**(34): 7967-7968.
- MacBeath, G. and S. L. Schreiber (2000). "Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination." *Science* **289**(5485): 1760-1763.
- Madaras, M. B., I. C. Popescu, S. Ufer and R. P. Buck (1996). "Microfabricated amperometric creatine and creatinine biosensors." *Analytica Chimica Acta* **319**(3): 335-345.
- Maldonado, S., T. J. Smith, R. D. Williams, S. Morin, E. Barton and K. J. Stevenson (2006). "Surface modification of indium tin oxide via electrochemical reduction of aryldiazonium cations." *Langmuir* **22**(6): 2884-2891.
- Mallard, F., G. Marchand, F. Ginot and R. Campagnolo (2005). "Opto-electronic DNA chip: High performance chip reading with an all-electric interface." *Biosensors & Bioelectronics* **20**(9): 1813-1820.
- Mannelli, I., V. Courtois, P. Lecaruyer, G. Roger, M. C. Millot, M. Goossens and M. Canva (2006). "Surface plasmon resonance imaging (SPRI) system and real-time monitoring of DNA biochip for human genetic mutation diagnosis of DNA amplified samples." *Sensors And Actuators B-Chemical* **119**(2): 583-591.
- Marquette, C. A. and L. J. Blum (1998). "Electrochemiluminescence of luminol for 2,4-D optical immunosensing in a flow injection analysis system." *Sensors and Actuators, B: Chemical* **51**: 100-106.

- Marquette, C. A. and L. J. Blum (1999). "Luminol electrochemiluminescence-based fibre optic biosensors for flow injection analysis of glucose and lactate in natural samples." *Analytica Chimica Acta* **381**: 1-10.
- Marquette, C. A., S. Ravaud and L. J. Blum (2000). "Luminol electrochemiluminescence-based biosensor for total cholesterol determination in natural samples." *Analytical Letters* **33**(9): 1779-1796.
- Marquette, C. A., I. Lawrence, C. Polychronakos and M. F. Lawrence (2002). "Impedance based DNA chip for direct Tm measurement." *Talanta* **56**: 763-768.
- Marquette, C. A. and L. J. Blum (2003a). "Self-containing reactant biochips for the electrochemiluminescent determination of glucose, lactate and choline." *Sensors and Actuators B: Chemical* **90**(1-3): 112-117.
- Marquette, C. A., A. Degiuli and L. J. Blum (2003b). "Electrochemiluminescent biosensors array for the concomitant detection of choline, glucose, glutamate, lactate, lysine and urate." *Biosensors & Bioelectronics* **19**(5): 433-439.
- Marquette, C. A. and L. J. Blum (2004). "Conducting elastomer surface texturing: a path to electrode spotting: Application to the biochip production." *Biosensors & Bioelectronics* **20**(2): 197-203.
- Marquette, C. A., E. Laurenceau, F. Mallet, C. Chaix, L. J. Blum and B. Mandrand (2005). "Electro-addressed immobilisation of recombinant HIV-1 P24 capsid protein onto screen-printed arrays for serological testing." *Analytical Biochemistry* **340**(1): 14-23.
- Marquette, C. A. and L. J. Blum (2006a). "Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry." *Analytical And Bioanalytical Chemistry* **385**(3): 546-554.
- Marquette, C. A., M. F. Lawrence and L. J. Blum (2006b). "DNA Covalent Immobilization onto Screen-Printed Electrode Networks for Direct Label-Free Hybridization Detection of p53 Sequences." *Analytical Chemistry* **78**(3): 959-964.
- Marquette, C. A., B. P. Corgier, K. A. Heyries and L. J. Blum (2007). "Biochips: non-conventional strategies for biosensing elements immobilization." *Frontiers In Bioscience: In Press*.
- Maskiewicz, R., D. Sogah and T. C. Bruice (1979). "Chemiluminescent reactions of lucigenin. 1. Reactions of lucigenin with hydrogen peroxide." *Journal Of The American Chemical Society* **101**(18): 5347-5354.
- Mendoza, L. G., P. McQuary, A. Mongan, R. Gangadharan, S. Brignac and M. Eggers (1999). "High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)." *Biotechniques* **27**(4): 778-+.
- Merenyi, G., J. Lind and T. E. Eriksen (1990). "Luminol Chemi-Luminescence - Chemistry, Excitation, Emitter." *Journal Of Bioluminescence And Chemiluminescence* **5**(1): 53-56.
- Millan, K. M., A. J. Spurmanis and S. R. Mikkelsen (1992). "Covalent immobilization of DNA onto glassy-carbon electrodes." *Electroanalysis* **4**(10): 929-932.
- Mistrik, P., F. Moreau and J. M. Allen (2004). "BiaCore analysis of leptin-leptin receptor interaction: evidence for 1: 1 stoichiometry." *Analytical Biochemistry* **327**(2): 271-277.
- Moser, I., G. Jobst and G. A. Urban (2002). "Biosensor arrays for simultaneous measurement of glucose, lactate, glutamate, and glutamine." *Biosensors & Bioelectronics* **17**(4): 297-302.
- Mulchandani, A., A. S. Bassi and A. Nguyen (1995). "Tetrathiafulvalene-Mediated Biosensor For L-Lactate In Dairy-Products." *Journal Of Food Science* **60**(1): 74-78.

- Murata, M., C. Gouda, K. Yano, S. Kuroki, T. Suzutani and Y. Katayama (2003). "Piezoelectric sensor for endocrine-disrupting chemicals using receptor-co-factor interaction." *Analytical Sciences* **19**(10): 1355-1357.
- Nelson, B. P., T. E. Grimsrud, M. R. Liles, R. M. Goodman and R. M. Corn (2001). "Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of DNA and RNA Hybridization Adsorption onto DNA Microarrays." *Analytical Chemistry* **72**(1): 1-7.
- Ohfuji, K., N. Sato, N. Hamada-Sato, T. Kobayashi, C. Imada, H. Okuma and E. Watanabe (2004). "Construction of a glucose sensor based on a screen-printed electrode and a novel mediator pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*." *Biosensors & Bioelectronics* **19**(10): 1237-1244.
- Palmisano, F., P. G. Zambonin and D. Centonze (2000). "Amperometric biosensors based on electrosynthesised polymeric films." *Fresenius Journal Of Analytical Chemistry* **366**(6-7): 586-601.
- Pei, J., F. Tian and T. Thundat (2004). "Glucose Biosensor Based on the Microcantilever." *Analytical Chemistry* **76**(2): 292-297.
- Perdomo, J., H. Hinkers, C. Sundermeier, W. Seifert, O. M. Morell and M. Knoll (2000). "Miniaturized real-time monitoring system for L-lactate and glucose using microfabricated multi-enzyme sensors." *Biosensors & Bioelectronics* **15**(9-10): 515-522.
- Pinson, J. and F. Podvorica (2005). "Attachment of organic layers to conductive or semiconductive surfaces by reduction of diazonium salts." *Chemical Society Reviews* **34**(5): 429-439.
- Polsky, R., J. C. Harper, S. M. Dirk, D. C. Arango, D. R. Wheeler and S. M. Brozik (2006). "Diazonium-Functionalized Horseradish Peroxidase Immobilized via Addressable Electrodeposition: Direct Electron Transfer and Electrochemical Detection." *Langmuir*.
- Ramsay, G. (1998). "DNA chips: State-of-the art." *Nature Biotechnology* **16**(1): 40-44.
- Ressine, A., S. Ekstrom, G. Marko-Varga and T. Laurell (2003). "Macro-/nanoporous silicon as a support for high-performance protein microarrays." *Analytical Chemistry* **75**(24): 6968-6974.
- Richter, M. M. (2004). "Electrochemiluminescence (ECL)." *Chemical Reviews* **104**(6): 3003-3036.
- Rothenhausler, B. and W. Knoll (1988). "Surface-Plasmon Microscopy." *Nature* **332**(6165): 615-617.
- Saby, C., B. Ortiz, G. Y. Champagne and D. Bélanger (1997). "Electrochemical modification of glassy carbon electrode using aromatic diazonium salts. 1. Blocking effect of 4-nitrophenyl and 4-carboxyphenyl groups." *Langmuir* **13**(25): 6805-6813.
- Sakura, S. (1992). "Electrochemiluminescence of hydrogen peroxide-luminol at a carbon electrode." *Analytica Chimica Acta* **262**(1): 49-57.
- Sampath, S. and O. Lev (1996). "Inert metal-modified, composite ceramic-carbon, amperometric biosensors: Renewable, controlled reactive layer." *Analytical Chemistry* **68**(13): 2015-2021.
- Sangodkar, H., S. Sukeerthi, R. S. Srinivasa, R. Lal and A. Q. Contractor (1996). "A biosensor array based on polyaniline." *Analytical Chemistry* **68**(5): 779-783.
- Sapelnikova, S., E. Dock, T. Ruzgas and J. Emneus (2003). "Amperometric sensors based on tyrosinase-modified screen-printed arrays." *Talanta* **61**(4): 473-483.
- Sapsford, K. E. and F. S. Ligler (2004). "Real-time analysis of protein adsorption to a variety of thin films." *Biosensors & Bioelectronics* **19**(9): 1045-1055.

- Sargent, A. and O. A. Sadik (1999). "Monitoring antibody-antigen reactions at conducting polymer-based immunosensors using impedance spectroscopy." *Electrochimica Acta* **44**(26): 4667-4675.
- Sato, N. and H. Okuma (2006). "Amperometric simultaneous sensing system for D-glucose and L-lactate based on enzyme-modified bilayer electrodes." *Analytica Chimica Acta* **565**(2): 250-254.
- Schoning, M. J., M. Jacobs, A. Muck, D. T. Knobbe, J. Wang, M. Chatrathi and S. Spillmann (2005). "Amperometric PDMS/glass capillary electrophoresis-based biosensor microchip for catechol and dopamine detection." *Sensors And Actuators B-Chemical* **108**(1-2): 688-694.
- Shankaran, D. R., K. V. Gobi and N. Miura (2007). "Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest." *Sensors and Actuators B: Chemical* **121**(1): 158.
- Shi, M., Y. Peng, J. Zhou, B. Liu, Y. Huang and J. Kong (2006). "Immunoassays based on microelectrodes arrayed on a silicon chip for high throughput screening of liver fibrosis markers in human serum." *Biosensors & Bioelectronics* **21**(12): 2210.
- Smith, E. A., W. D. Thomas, L. L. Kiessling and R. M. Corn (2003). "Surface plasmon resonance imaging studies of protein-carbohydrate interactions." *Journal Of The American Chemical Society* **125**(20): 6140-6148.
- Solná, R., E. Dock, A. Christenson, M. Winther-Nielsen, C. Carlsson, J. Emnéus, T. Ruzgas and P. Skládal (2005). "Amperometric screen-printed biosensor arrays with co-immobilised oxidoreductases and cholinesterases." *Analytica Chimica Acta* **528**(1): 9-19.
- Souteyrand, E., J. P. Cloarec, J. R. Martin, C. Wilson, I. Lawrence, S. Mikkelsen and M. F. Lawrence (1997). "Direct Detection of the Hybridization of Synthetic Homo-Oligomer DNA Sequences by Field Effect." *Journal of Physical Chemistry B* **101**(15): 2980 -2985.
- Sreekumar, A., M. K. Nyati, S. Varambally, T. R. Barrette, D. Ghosh, T. S. Lawrence and A. M. Chinnaiyan (2001). "Profiling of cancer cells using protein microarrays: Discovery of novel radiation-regulated proteins." *Cancer Research* **61**(20): 7585-7593.
- Sui, G., J. Wang, C. C. Lee, W. Lu, S. P. Lee, J. V. Leyton, A. M. Wu and H. R. Tseng (2006). "Solution-Phase Surface Modification in Intact Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Channels." *Anal. Chem.* **78**(15): 5543-5551.
- Suzuki, H., H. Arakawa and I. Karube (2001). "Fabrication of a sensing module using micromachined biosensors." *Biosensors & Bioelectronics* **16**(9-12): 725-733.
- Svensson, B. E. (1988). "Abilities Of Peroxidases To Catalyze Peroxidase Oxidase Oxidation Of Thiols." *Biochemical Journal* **256**(3): 757-762.
- Tajima, I., O. Asami and E. Sugiura (1998). "Monitor of antibodies in human saliva using a piezoelectric quartz crystal biosensor." *Analytica Chimica Acta* **365**(1-3): 147-149.
- Templin, M. F., D. Stoll, M. Schrenk, P. C. Traub, C. F. Vohringer and T. O. Joos (2002). "Protein microarray technology." *Trends In Biotechnology* **20**(4): 160-166.
- Thomson, N. H. (2005). "Imaging the substructure of antibodies with tapping-mode AFM in air: the importance of a water layer on mica." *Journal Of Microscopy-Oxford* **217**: 193-199.
- Thorpe, G. H. and L. J. Kricka (1987). Enhanced chemiluminescent assays for horseradish peroxidase; characteristics and application. *Bioluminescence and chemiluminescence: New perspectives*, 199, eds. John Wiley.

- Thorpe, G. H. G., L. J. Kricka, S. B. Moseley and T. P. Whitehead (1985). "Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: Application in luminescence-monitored enzyme immunoassays." *Clinical Chemistry* **31**(8): 1335-1341.
- Thorpe, G. H. G. and L. J. Kricka (1986). Enhanced chemiluminescent reactions catalysed by horseradish peroxidase. *Methods in Enzymology*. **133**: 331-353.
- Tokel, N. E. and A. J. Bard (1972). "Electrogenerated chemiluminescence. IX. Electrochemistry and emission from systems containing tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) dichloride." *Journal Of The American Chemical Society* **94**(8): 2862-2863.
- Tsujimoto, M., K. Maruyama, Y. Mishima and J. Motonaka (2003). "Enzyme biosensor based on an electropolymerized osmium redox polymer." *International Journal Of Modern Physics B* **17**(8-9): 1517-1522.
- Umana, M. and J. Waller (1986). "Protein-Modified Electrodes - The Glucose-Oxidase Polypyrrole System." *Analytical Chemistry* **58**(14): 2979-2983.
- Vase, K. H., A. H. Holm, S. U. Pedersen and K. Daasbjerg (2005). "Immobilization of aryl and alkynyl groups onto glassy carbon surfaces by electrochemical reduction of iodonium salts." *Langmuir* **21**(18): 8085-8089.
- Vase, K. H., A. H. Holm, K. Norrman, S. U. Pedersen and K. Daasbjerg (2007). "Covalent Grafting of Glassy Carbon Electrodes with Diaryliodonium Salts: New Aspects." *Langmuir, in Press*.
- Vedrine, C., S. Fabiano and C. Tran-Minh (2003). "Amperometric tyrosinase based biosensor using an electrogenerated polythiophene film as an entrapment support." *Talanta* **59**(3): 535-544.
- Walcarius, A. (2001). "Electrochemical applications of silica-based organic-inorganic hybrid materials." *Chemistry Of Materials* **13**(10): 3351-3372.
- Wang, J., M. A. Firestone, O. Auciello and J. A. Carlisle (2004). "Surface Functionalization of Ultrananocrystalline Diamond Films by Electrochemical Reduction of Aryldiazonium Salts." *Langmuir* **20**(26): 11450 -11456.
- Wang, J., M. P. Chatrathi and G. E. Collins (2007). "Simultaneous microchip enzymatic measurements of blood lactate and glucose." *Analytica Chimica Acta* **585**(1): 11-16.
- Welinder, K. G. (1979). "Amino-Acid Sequence Studies Of Horseradish-Peroxidase.4. Amino And Carboxyl Termini, Cyanogen-Bromide And Tryptic Fragments, The Complete Sequence, And Some Structural Characteristics Of Horseradish Peroxidase-C." *European Journal Of Biochemistry* **96**(3): 483-502.
- White, E. H., O. Zafiriou, H. H. Kagi and J. H. M. Hill (1964). "Chemilunimescence of Luminol: The Chemical Reaction." *Journal Of The American Chemical Society* **86**(5): 940-941.
- Whitehead, T. P., G. H. G. Thorpe, T. J. N. Carter, C. Groucutt and L. J. Kricka (1983). "Enhanced Luminescence Procedure For Sensitive Determination Of Peroxidase-Labeled Conjugates In Immunoassay." *Nature* **305**(5930): 158-159.
- Wilchek, M. and E. A. Bayer (1988). "The Avidin Biotin Complex In Bioanalytical Applications." *Analytical Biochemistry* **171**(1): 1-32.
- Wink, T., S. J. vanZuilen, A. Bult and W. P. vanBennekom (1997). "Self-assembled monolayers for biosensors." *Analyst* **122**(4): R43-R50.
- Wolowacz, S. E., B. Hin and C. R. Lowe (1992). "Covalent Electropolymerization Of Glucose-Oxidase In Polypyrrole." *Analytical Chemistry* **64**(14): 1541-1545.

- Woodbury, R. L., S. M. Varnum and R. C. Zangar (2002). "Elevated HGF Levels in Sera from Breast Cancer Patients Detected Using a Protein Microarray ELISA." *Journal of Proteome Research* **1**(3): 233-237.
- Wu, H. M., R. Olier, N. Jaffrezicrenault, P. Clechet, A. Nyamsi and C. Martelet (1994). "Covalent Immobilization Of Glucose-Oxidase Onto Graphitic Electrodes." *Electrochimica Acta* **39**(3): 327-331.
- Yakovleva, J., R. Davidsson, M. Bengtsson, T. Laurell and J. Emneus (2003). "Microfluidic enzyme immunosensors with immobilised protein A and G using chemiluminescence detection." *Biosensors & Bioelectronics* **19**(1): 21-34.
- Zhao, Y.-D., D.-W. Pang, S. Hu, Z.-L. Wang, J.-K. Cheng and H.-P. Dai (1999). "DNA-modified electrodes; part 4: optimization of covalent immobilization of DNA on self-assembled monolayers." *Talanta* **49**(4): 751.
- Zhu, H., J. F. Klemic, S. Chang, P. Bertone, A. Casamayor, K. G. Klemic, D. Smith, M. Gerstein, M. A. Reed and M. Snyder (2000). "Analysis of yeast protein kinases using protein chips." *Nature Genetics* **26**(3): 283-289.
- Zhu, H., M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R. A. Dean, M. Gerstein and M. Snyder (2001). "Global analysis of protein activities using proteome chips." *Science* **293**(5537): 2101-2105.
- Zhu, J., C. Tian, W. Wu, J. Wu, H. Zhang, D. Lu and G. Zhang (1994). "Fabrication and characterization of glucose sensors based on a microarray H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> electrode." *Biosensors & Bioelectronics* **9**(4-5): 295-300.







---

## Résumé

Ce travail présente l'utilisation de réseaux d'électrodes de carbone sérigraphiés pour la réalisation de biopuces. Dans un premier temps, un modèle biopuce enzymatique basé sur la détection électrochimiluminescente et permettant le dosage de métabolites sanguins est présenté.

Puis, un principe novateur d'immobilisation de biomolécules aboutissant à leur fixation covalente sur les réseaux conducteurs est présenté. Cette méthode directe impliquant les propriétés d'électro-adressage des sels de diazonium est caractérisée. Elle est alors utilisée afin d'électro-adresser des anticorps, et de réaliser des détections immunologiques. Une biopuce à oligonucléotide est également réalisée selon ce modèle.

L'électrodéposition d'or à la surface des électrodes ainsi que son effet sur l'électro-adressage et sur la détection chimiluminescente sont présentés.

Une troisième partie expose l'électro-adressage de biomolécules sur des surfaces d'or afin de réaliser des détections en imagerie par SPR.

---

## Title

### **Biomolecule electro-grafting on conductive supports for the development of biochips based on optical detection**

---

## Summary

This thesis presents screen-printed carbon microarray as immobilisation support for biochips. First, a model of enzymatic biochip based on an electrochemiluminescent detection and allowing the measuring of metabolites in serum samples is presented.

Then, an innovative immobilization strategy for biomolecules, leading to a covalent grafting on conductive microarrays is presented. This direct method, involving the electro-addressing properties of aryl-diazonium salts is characterized and used to electro-address antibodies, and to perform immuno-assays. As well, an oligonucleotide biochip is realized based on this model.

Gold electro-deposition at the surface of screen-printed electrodes, and its effects on biomolecule electro-addressing and on chemiluminescent detection are presented.

A third part presents the biomolecule electro-addressing on gold surfaces in order to realize SPR imaging detection.

---

## Discipline

**BIOCHIMIE**

---

**Mots-clés:** biopuce, chimiluminescence, diazonium, électro-adressage, électrochimiluminescence, électrodéposition d'or, facteur rhumatoïde, immobilisation, immuno-essai, p53, sérigraphie, SPRi.

---

**Keywords:** biochip, chemiluminescence, diazonium, electro-addressing, electrochemiluminescence, gold electrodeposition, immobilization, immuno-assay, p53 rheumatoid factor, screen-printing, SPRi.

---

## Laboratoire de recherche :

Laboratoire de Génie Enzymatique et Biomoléculaire  
Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires  
Université Claude-Bernard Lyon 1 - CNRS 5246 ICBMS  
Bâtiment CPE, 43, bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne, Cedex, France.