HAL
open science

Développement d'une stratégie d'adressage sur or par chimie "click" électro-catalysée : application à la détection sans marquage de biomolécules

Micaël Ripert

To cite this version:

Micaël Ripert. Développement d'une stratégie d'adressage sur or par chimie "click" électro-catalysée : application à la détection sans marquage de biomolécules. Chimie analytique. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10195 . tel-01045177

HAL Id: tel-01045177

https://theses.hal.science/tel-01045177v1

Submitted on 24 Jul 2014

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.

N° d'ordre 195 – 2013 Année 2013

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

par

Micaël RIPERT

DEVELOPPEMENT D'UNE STRATEGIE D'ADRESSAGE SUR OR PAR CHIMIE « CLICK » ELECTRO-CATALYSEE : APPLICATION A LA DETECTION SANS MARQUAGE DE BIOMOLECULES

Mr Gasparutto Didier	Directeur de Recherch, CEA Grenoble	Rapporteur
Mr Morvan François	Directeur de Recherche INSERM UM II	Rapporteur
Mme Jaffrézic-Renault Nicole	Directeur de Recherche CNRS UCBL	
Mr Roux Stéphane	Professeur des Universités UFC	
Mr Léonard Didier	Professeur des Universités UCBL	
Mme Chaix Carole	Directeur de Recherche CNRS UCBL	Directeur de Thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. François-Noël GILLY**
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe LALLE
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur Germain GILLET
Directeur Général des Services	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme le Professeur H. PARROT
Département GEP	Directeur : M. N. SIAUVE
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : Mme S. FLECK
Département Sciences de la Terre	Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. C. COLLIGNON
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. C. VITON
Institut Universitaire de Formation des Maîtres	Directeur : M. A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE

Avant Propos

« Les erreurs sont les portes de la découverte »

James Joyce

Nous réalisons toujours trop tard la chance qui nous a accompagnés pendant nos années d'étude. Les réponses aux interrogations suscitées par les problèmes auxquels, étudiants, nous sommes confrontés, sont alors à notre portée, dispensées par nos enseignants ou bien attendant notre curiosité dans un ouvrage ou un article scientifique.
Ce luxe disparait dès lors que l'on commence un travail de recherche. La théorie et la pratique peuvent rapidement entrer en conflit, et l'expérimentation devient alors le seul moyen pour trouver la vérité, ce qui s'avère souvent bien plus laborieux que ce que nous pensions. Il nous faut alors apprendre de nos erreurs et de nos errances, et s'adapter en conséquence.
La phrase de J. Joyce illustre à merveille ce qu'ont été ces années de thèse, et les erreurs ont bien ouvert la porte de la vérité, vérité scientifique, mais aussi vérité humaine, source d'enrichissement tant professionnel que personnel.
Ce projet ne m'est pas propre puisque de nombreuses personnes m'ont permis de le finaliser.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein de l'institut des sciences analytiques (ISA) de Lyon dirigé par Monsieur Pierre Lanteri. Je lui suis reconnaissant de m'avoir accueilli dans ses locaux pour y effectuer mes recherches.

Mes remerciements les plus vifs vont à Madame Carole Chaix, ma directrice de thèse, pour la confiance qu'elle m'a accordée et dont la rigueur scientifique, unanimement reconnue, a été pour moi un modèle à imiter. Présence chaleureuse et tranquille, elle a su donner de sa personne avec une permanente disponibilité et une compétence jamais démentie.

J'exprime ma reconnaissance pour leur collaboration à Madame Nicole Jaffrézic-Renault, et Monsieur Nadir Meini, tous deux membres de mon unité. Ma gratitude va également à Monsieur Didier Léonard pour sa réalisation des spectres TOF-SIMS décrits dans cette étude. Monsieur Didier Gasparutto et Monsieur François Morvan ont accepté de consacrer de leur temps à la lecture et l'examen de ce travail. Madame Nicole Jaffrézic-Renault, Monsieur

Stéphane Roux et Monsieur Didier Léonard ont continué de montrer leur intérêt en acceptant de juger cette étude. Ma gratitude et mon dévouement leur sont acquis.

Toute ma gratitude encore, à l'équipe du Centre commun de RMN (CCRMN) et du service central d'analyse (SCA) pour m'avoir permis de mener les analyses de RMN et de spectrométrie de masse nécessaires pour mon étude. Je tiens à remercier Monsieur Frédéric Delolme de l'institut de biologie et chimie des protéines (IBCP) de Lyon pour les analyses en MALDI-TOF, ainsi que Madame Céline Brunon du SCA, qui m'a accordé une partie de son temps précieux et pour les analyses en XPS qui m'ont été fournies.

Il m'est particulièrement agréable de mentionner Madame Carole Farre, qui n'a cessé de me prodiguer ses conseils dans le domaine de la synthèse organique, ayant acquis dans celle-ci une expérience dont j'ai pu profiter pleinement. Reconnaissance également à Gabriel de Crozals dont les travaux se sont montrés cruciaux pour enluminer le contenu de ma thèse. Je tiens à remercier ce tandem (véritables Bonnie & Clyde de la chimie) qui a su faire fuir de mes idées noires.
J'associe dans ces remerciements l'ensemble de mes collègues du laboratoire avec qui j'ai partagé les paillasses du laboratoire. Mention spéciale pour Michael Lee et Abdoullatif Baraket dont je suis heureux d'avoir croisé la route.

Une pensée enfin, pour ma famille.
Merci à mes parents et ma sœur pour leur soutien permanent.
Aucun mot de la langue commune ne me permettra jamais d'exprimer correctement les profonds sentiments que j'ai pour eux.

ABBREVIATIONS

BioMEMS	Bio-Micro-Electro-Mechanical-Systems
BSA	Albumine sérique bovine (bovine serum albumin)
CCM	Chromatographie sur couche mince
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CPG	Controlled pore glass
CuAAC	Cu-Catalysed Azide-Alkyne Cycloaddition
CuOTf	Complexes de [trifluorométhanesulfonate] de cuivre
Cy5	Chlorure de 3,3,3',3'-tétraméthylindodicarbocyanine
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DIBO	Dibenzocyclooctyne
DIFO	Difluorinated cyclooctyne
DIPEA	Diisopropyléthylamine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMAP	4-(diméthylamino)pyridine
DMTr-Cl	Chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle
DTPA	Dithiolphosphoramidite
EDC	1-éthyl-3[(3-diméthylamino)propyl]carbodiimide
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELOSA	Enzyme-linked oligosorbent assay
ESI	Ionisation par électronébulisation (ElectroSpray Ionization)
Fc	Ferrocène
HSA	Albumine sérique humaine (Human Serum Albumin)
LCAA	Chaîne longue alkylamine (Long Chain Alkyl Amine)
LOC	Lab. On a Chip
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
NHC	N-hétérocyclique carbène
NHS	*N*-hydrosuccinimide
NP	Nanoparticules fluorescentes à cœur rhodamine B
PNA	Peptide nucleic acid
PEDOT	Poly(éthylènedioxythiophène)
p-TsCl	Chlorure de 4-toluènesulfonyle
PEG	Polyéthylène glycol
PCR	Polymerase Chain Reaction

RMN	Résonance magnétique nucléaire
SAM	monocouche auto-assemblée (Self-assembled monolayer)
SM	Spectrométrie de masse
SPAAC	strain-promoted alkyne-azide cycloaddition
TBTA	tris-(benzyltriazolylméthyl)amine
TCA	Acide trichloroacétique
TCEP	Tris-(2-carboxyéthyl) phosphine
TEM	microscopie électronique en transmission (Transmission Electron Microscopy)
THAP	2',4',6'-Trihydroxyacetophenone mono hydrate
THF	Tétrahydrofurane
THPTA	Tris-(hydroxypropyltriazolylméthyl)amine
T_m	Températures de fusion
ToF-SIMS	Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry
XPS	X-ray photoelectron spectrometry

Nomenclature de l'AND/ARN

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
dA	Désoxyadénosine
dC	Désoxycytidine
dG	Désoxyguanosine
dT	Désoxythymidine
ODN	Oligodésoxyribonucléotide

α	Coefficient de transfert de charge anodique
Γ	Taux de recouvrement (en mol cm^{-2})
CV	Voltampérométrie cyclique (Cyclic Voltammetry)
ΔE	Différence de potentiel entre le pic d'oxydation et le pic de réduction
DPV	Differential pulse voltammetry
E°	potentiel standard d'un couple Ox/ Red
$E_{1/2}$	Potentiel de demi-vague
ECS	Électrode au calomel saturée en KCl
E_{pa}	Potentiels de pic anodique
E_{pc}	Potentiels de pic cathodique
F	Constante de Faraday (96 500 $C \cdot mol^{-1}$)
η	Surtension
I_{ox}	Intensité au pic d'oxydation
k_{et}	constante de transfert électronique
ν	Vitesse de balayage
PBE	Electrolyte d'analyse (20 mM KH_2PO_4/Na_2HPO_4, 250 mM Na_2ClO_4, pH 6,4)
Q	Charge électrique (en C)
R_{ct}	Résistance de transfert de charges
SIE	Spectroscopie par impédance électrochimique
SWV	Square wave voltammetry
TEH	Transfert électronique hétérogène

SOMMAIRE

ABBREVIATIONS **7**

SOMMAIRE **13**

CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE SUR LA CHIMIE « CLICK » ET SYNTHESE DES PRECURSEURS **33**

B. Méthodes d'immobilisation sur surface d'or **35**
B.1. Greffage de biosondes sur surface d'or par la méthode des monocouches auto-assemblées de dérivés alkylthiols. 35
B.2. Electro-fonctionnalisation de surface d'or par des sondes oligonucléotides *via* le greffage de molécules aryl diazonium 38
B.3. Utilisation de films poly(pyrrole) comme polymères électroactifs pour le greffage de sondes et la détection d'ADN 40
B.3.a. Greffage de biomolécules sur des films poly(pyrrole) 41
B.3.b. Détection électrochimique du duplex ADN 42
B.4. Adressage de surface d'or *via* la chimie « click » électrocatalysée 44

C. Stratégie de synthèse pour la mise au point de l'électroadressage sur surface d'or par les alkylthiols **46**
C.1. Rappels sur la synthèse automatisée sur support solide *via* la chimie dite aux phosphoramidites 46
C.1.a. Historique 46
C.1.b. Fonctionnement 47
C.2 Synthèse des éléments ferrocène et alkylthiol 49
C.2.a. Synthèse d'un élément ferrocène à terminaison azoture 50
C.2.b. Synthèse d'un élément d'ancrage Alkyl thiol sur surface d'or 51

D. Conclusion **53**

E. Partie expérimentale **54**
E.1. Synthèse du ferrocène éthyle azide 54
E.1.a. Synthese du N,N,N-trimethyl-1-ferrocénylmethanaminium iodide (**1**) 54
E.1.b. Synthèse du 2-ferrocénylacétonitrile **2** 55
E.1.c. Synthèse de l'acide 2-Ferrocénylacétique **3** 56
E.1.d. Synthèse du 2-Ferrocényléthanol **4** 57
E.1.e. Synthèse du 2-Ferrocényléthan 4-méthylbenzènesulfonate **5** 58
E.1.f. Synthèse du 2-azidoéthyl ferrocène **6** 59
E.2. Synthèse supportée des dérivés bis(DTPA) 59

CHAPITRE II :ETUDE DE L'ELECTROFONCTIONNALISATION D'UNE SURFACE D'OR VIA LA CHIMIE DITE « CLICK » **61**

A. Stratégie et mise au point de l'électrofonctionnalisation d'une surface d'or **63**
A.1. Activation de la surface d'or 63
A.2. Détermination du potentiel de réduction du cuivre (II) 65
A.2.a. Rappels sur les propriétés de coordination du cuivre 65
A.2.b. Détermination du potentiel optimal de réduction de Cu(II) en Cu(I) 66
A.3. Procédure de l'électrofonctionnalisation d'une surface d'or par une entité ferrocène-azide 69
A.4. Détermination des propriétés et des constantes caractéristiques électrochimiques du système redox immobilisé sur électrode d'or 72
A.4.a. Taux de recouvrement de l'électrode et rendement de réaction 72
A.4.b. Constantes électrochimiques de l'élément redox greffé 73
A.5. Caractérisation par XPS et par électrochimie de la surface fonctionnalisée par l'élément redox 76
A.6. Etude de la stabilité de stockage des électrodes fonctionnalisées. 78

B. Méthode d'immobilisation de nanoparticules rhodamine sur surface d'or 79
B.1. Fonctionnalisation des nanoparticules pour l'immobilisation 79
B.1.a. Immobilisation des nanoparticules sur CPG 79
B.1.b. Fonctionnalisation des nanoparticules. 80
B.2. Immobilisation des nanoparticules fluorescentes sur surface d'or 82
B.3. Analyse par microscopie à fluorescence de la surface d'or fonctionnalisée par microscopie 83

C. Méthode d'immobilisation des protéines *via* un dérivé biotinylé 84
C.1. Reconnaissance Biotine/streptavidine 84
C.1.a. La biotine 84
C.1.b. La Streptavidine 85
C.1.c. Reconnaissance Streptavidine/biotine 85
C.2. Stratégie de « click » du dérivé biotinylé sur la surface d'or 86
C.3. Caractérisation électrochimique de la surface 87
C.3.a. Caractérisation par impédance des surfaces fonctionnalisées par la biotine et la streptavidine 87
C.4. Etude en microscopie à fluorescence de la surface d'or fonctionnalisée par la biotine *via* des nanoparticules Rhodamine recouverte de streptavidine. 91

D. Conclusion 92

E. Partie expérimentale 94
E.1. Activation de la surface d'or 94
E.2. Réduction de l'élément d'ancrage et greffage 95
E.3. Méthode d'activation électrochimique de la chimie « click » 95
E.4. Méthode d'analyse électrochimique 96
E.5. Synthèse du bis(DTPA) hexyl-1,2,3-triazol-3-éthyl ferrocène ***9*** 96
E.6. Caractérisation des surfaces d'or fonctionnalisées par X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) 97
E.7. Fonctionnalisation des nanoparticules rhodamine 97
E.7.a Réactifs & Appareillages 97
E.7.b Modification des nanoparticules rhodamine par un azoture. 99
E.8. Immobilisation électrochimique des nanoparticules sur surface d'or 99
E.9. Observation des nanoparticules par microscopie optique de fluorescence 100
E.10. Méthode d'immobilisation de la biotine 101
E.10.a. réactifs 101
E.10.b. immobilisation du composé Azide-PEG3-biotine 101
E.11. Reconnaissance Streptavidine-biotine sur surface d'or, suivie par spectrométrie d'impédance et microscopie optique de fluorescence 101
E.11.a. Suivie de la reconnaissance par SIE. 101
E.11.b reconnaissance biotine/streptavidine sur nanoparticules fluorescentes 102

CHAPITRE III : SYNTHESE D'OLIGONUCLEOTIDES MODIFIES PAR DES FERROCENES OU UNE CYANINE 5 POUR LA FONCTIONNALISATION DE SURFACE 103

A. Etude bibliographique sur les oligonucléotides de structure tige-boucle 105
A.1. Amorce d'une amplification enzymatique et outil de détection en solution par fluorescence 105
A.1.a. Les structures tige-boucle pour l'amorce d'une amplification enzymatique 105
A.1.b. Détection en solution par fluorescence à l'aide des « beacons » moléculaires. 107
A.2. Sonde de capture et de détection 108

B. Méthodes d'incorporation de ferrocènes dans les ODN 110
B.1. Incorporation de ferrocènes par modification des bases nucléiques 110
B.2. Incorporation de ferrocènes sur la position 2' des ribonucléosides 111
B.3. Incorporation de ferrocènes à l'extrémité 5' ou 3' d'un oligonucléotide 111

C. Synthèse d'un monomère ferrocényl phosphoramidite et optimisation de son incorporation dans un ODN par synthèse automatisée sur support solide 112

C.1. Synthèse du monomère ferrocényl phosphoramidite ***13*** 112
C.2. Incorporation du monomère ferrocène 114

D. Synthèse de sondes ODN modifiées par des ferrocènes et des groupes fluorophores 115
D.1. Synthèse automatisée d'oligonucléotides de structure tige-boucle 115
D.1.a. Détermination d'une structure fonctionnelle 115
D.1.b. Séquences retenues pour la suite des études..... 116
D.2.Synthèse des ODN modifiés par des ferrocènes en 3' 117
D.3. Modification des ODN par le Bis(DTPA) phosphate pour le greffage sur or 118
D.4. Modification des ODN par des groupements azoture 121
D.5. Synthèse d'ODN modifiés par une cyanine 5 et une terminaison azoture 123

E. Analyse thermodynamique des sondes tige-boucle synthétisées 124
E.1. Analyse de la stabilité thermodynamique des sondes tige-boucle synthétisées 126
E.2. Analyse de la stabilité des duplex formés entre la structure « hairpin » et sa cible complémentaire.... 127

F. Conclusion 130
G.1. Synthèse du ferrocène Phosphoramidite 132
G.1.a. Synthèse du 1-[3-*O*-diméthoxytritylpropyl]-1'-[3'-hydroxypropyl] ferrocène (***12***)..... 132
G.1.b Synthèse de 1-(3-*O*-diméthoxytritylpropyl)-1'-[3'-*O*-(2-cyanoéthyl-*N,N*-diisopropylphorphoramidityl)propyl] ferrocène ***13*** 133
G.2. Synthèse des oligonucléotides..... 134
G.2.a protocoles généraux..... 134
G.2.b. Substitution par l'azoture des oligonucléotides 135
G.3. Caractérisation et purification des oligonucléotides 135
G.3.a. Caractérisation et purification par CLHP. 135
G.3.b. Caractérisation par spectrométrie de masse MALDI-TOF..... 136
G.4 Quantification des oligonucléotides 136
G.5. Séquences des cibles ADN 138
G.6. Protocole de mesure des courbes de fusion des oligonucléotides..... 138
G.6.a préparation des échantillons..... 138
G.6.b. Mesures et calculs effectués sur la courbe de fusion 139

CHAPITRE IV : CARACTERISATION DES SURFACES FONCTIONNALISEES PAR FLUORESCENCE ET ELECTROCHIMIE : DEVELOPPEMENT D'UN TEST D'HYBRIDATION.....141

A. Immobilisation d'un oligonucléotide fluorescent sur surface d'or..... 143
A.1. Stratégie de « click » sur la surface d'or des oligonucléotides..... 143
A.2. Etude de la fluorescence de la surface d'or fonctionnalisée par microscope optique 143

B. Greffage d'ODN modifiés par des ferrocènes sur surface d'or 146
B.1. Greffage des ODN alkylthiol sur la surface d'or 146
B.2. Fonctionnalisation des ODNs azoture *via* la chimie « Click » sur surface d'or..... 148
B.3. Caractérisation électrochimique des sondes immobilisées 148
B.3.a. Caractérisation des sondes $(DTPA)_2$In3Fc et $(DTPA)_2$In4Fc après immobilisation sur électrode..... 148
B.3.b. Caractérisation des sondes N_3In'1Fc, N_3In'4Fc et Tb$(N_3)_3$In'4Fc après immobilisation sur électrode 152

C. Détection électrochimique d'ADN après immobilisation des sondes sur surface d'or 156
C.1. Suivi des variations de la réponse électrochimique des électrodes fonctionnalisées par des sondes (DTPA)2In3Fc et (DTPA)2In4Fc après ajout d'une cible 156
C.2. Suivi de la réponse électrochimique des électrodes fonctionnalisées par les sondes N3In'1Fc, N3In'4Fc et Tb(N3)3In'4Fc après ajout d'une cible 159
C.3. Etude de la stabilité des électrodes fonctionnalisées au cours des analyses électrochimiques..... 165
C.3.a. stabilité des électrodes fonctionnalisées par les sondes $(DTPA)_2$In3Fc et $(DTPA)_2$In4Fc..... 165

C.3.b. stabilité des électrodes fonctionnalisées par les sondes N_3In'1Fc, N_3In'4Fc et Tb(N_3)$_3$In'4Fc 166

D. Conclusion 168

E. Partie expérimentale 170
E.1. Immobilisation de l'ODN modifié par la Cy5 sur surface d'or, et observation par microscopie optique de fluorescence 170
E.1.a. Immobilisation de l'ODN fluorescent sur or. 170
E.1.b. Observation par microscopie optique à fluorescence. 170
E.2. Réduction des sondes ODN alkylthiol et préparation du greffage 171
E.3. Immobilisation des sondes ODN azoture modifiées par des ferrocènes 171
E.4. Méthode électrochimique d'analyse 172

CONCLUSION GENERALE 173

ANNEXES 179

Annexe B. Principe de détermination d'une transition entre deux brins complémentaires par spectroscopie UV. 181
1. Détermination du T_m 182
2. : Détermination des paramètres ΔH°, ΔS° et ΔG° 184
3. cas particulier des « hairpins » (n=1) 186

Annexe C. Programme de synthèse automatisée sur support solide classique. 188

Annexe D. Communication Poster International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 2010 189

Annexe E. Communication Poster Journée Rhône-Alpes des Biomolécules 2011 190

Annexe F. Communication Poster Journée de printemps Société Chimique de France 2012 191

Annexe G. Première publication 192

Annexe H. Seconde publication 193

Annexe I. Troisième Publication, soumise à Materials Science and Engineering C 194

Annexe J. Liste des communications et publications 195

INTRODUCTION

Un biocapteur est un système analytique alliant des technologies différentes, issues par exemple de la biologie moléculaire, de la microélectronique, de l'optique ou encore de l'informatique.

Selon l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC)[1], un biocapteur est défini comme un système qui exploite des réactions biochimiques spécifiques par l'intermédiaire de biomolécules (ADN, peptide, protéine,…), d'enzymes isolées, d'immuno-systèmes, de tissus, d'organites ou de cellules entières pour détecter des composés chimiques, en général par des signaux optiques, électriques, ou thermiques. Dans le domaine de l'analyse biomédicale, le biocapteur repose fréquemment sur la reconnaissance spécifique de deux entités biologiques pour la détection de composés d'intérêt. Le dispositif permet alors la conversion de la modification physico-chimique induite par la réaction de reconnaissance en un signal physique quantifiable. L'espèce à détecter (analyte) est typiquement en solution dans un échantillon, généralement en mélange avec d'autres composés et d'interférents potentiels.

Ainsi, le biocapteur peut se décomposer en plusieurs briques élémentaires (Figure 1):

- Une couche sensible constituée d'un élément biologique, que l'on appelle « ligand » ou biorécepteur, capable d'interagir spécifiquement avec l'espèce à détecter: anticorps, enzymes isolées, organites, peptides, acides nucléiques, lipides, micro-organismes, tissus cellulaires, etc. ... Cet élément biologique est généralement immobilisé sur la surface du capteur.

- Un transducteur, couplé au biorécepteur et choisi de telle sorte que l'interaction du biorécepteur et de l'espèce cible engendre des effets physico-chimiques mesurables, basés sur divers principes (optiques, électriques, mécaniques, thermiques, etc …).

- Un système de traitement de l'information associé à la plateforme de transduction à même d'exploiter les signaux délivrés par le transducteur.

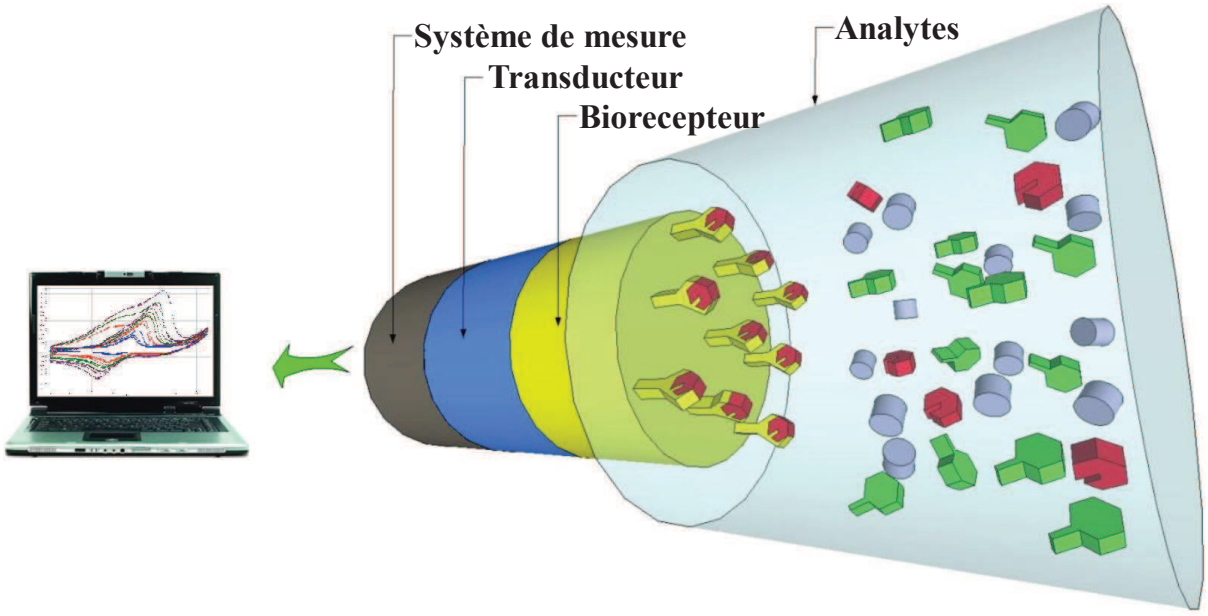


Figure 1 : Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur

Les caractéristiques recherchées pour un biocapteur sont :

- *Sélectivité :* aptitude du biocapteur à détecter spécifiquement l'espèce cible dans le milieu.
- *Sensibilité* : variation d'amplitude du signal de sortie corrélée à la variation de la quantité de cible à détecter.
- *Résolution* : plus petite variation mesurable en relation avec la quantité de cible, la résolution d'un biocapteur dépend de sa sensibilité et du bruit de fond de la mesure.
- *Stabilité (ou robustesse)* : capacité du capteur à maintenir ses performances sans dérive significative sur la plage de mesure.
- *Rapidité* : capacité à délivrer une réponse fiable (détection de concentration) en un temps réduit compatible avec l'application.
- *Biocompatibilité* : capacité à altérer le moins possible les systèmes vivants au contact desquels le capteur est placé.
- *simplicité et coût d'utilisation:* en vue d'une commercialisation, ces paramètres sont importants à considérer dès les premières étapes de conception.

Le premier biocapteur a été mis au point par Clark et coll. en 1953 pour la mesure de la concentration en oxygène dissous dans le sang. La commercialisation de ce biocapteur fut effective en 1973 (Yellow Springs Instrument Company, États-Unis), pour la détection du glucose par mesure ampérométrique du peroxyde d'hydrogène *via* la glucose oxydase. Depuis lors, les capteurs n'ont cessé d'évoluer pour être utilisés de nos jours dans des domaines allant de la médecine et la biologie, à l'agro-alimentaire, en passant par la défense. Plus récemment les biocapteurs ont fait leur apparition pour le suivi de la pollution et la sécurité des édifices publics (détection d'éléments toxiques[2-3]; gaz, explosifs, lutte contre le bioterrorisme[4-5]), ou la télésurveillance de patients[6].

En biologie et en médecine, la mise au point de systèmes de mesure et de détection fiables et adaptés revêt un caractère central dès lors qu'il s'agit d'expliciter de manière qualitative et quantitative les phénomènes biologiques à petites échelles. Pour sonder les mécanismes réactionnels et/ou les propriétés physico-chimiques d'un système biologique ou d'un microorganisme, il est nécessaire de mettre au point des systèmes biocompatibles adaptés à l'échelle du système étudié. L'avènement des techniques et des procédés de microfabrication a rendu possible l'émergence des BioMEMS (Bio-Micro-Electro-Mechanical-Systems), microsystèmes adaptés à l'étude des structures biologiques (ensembles de cellules, cellules uniques, protéines, virus, neurones, anticorps). Les progrès effectués dans le domaine de la microfluidique rendent dorénavant possible de coupler plusieurs types de modules d'intégration et de détection pour la mise au point de véritables laboratoires miniaturisés : les laboratoires sur puce ou LOC (Lab. On a Chip).

De plus, la miniaturisation de ces systèmes de détection a permis l'élaboration des biopuces multiplexées, les plus couramment utilisées étant les puces à ADN.

En fonction du nombre de tests pouvant être parallélisés sur ces plateformes de multidétection, les biopuces offrent différents niveaux de complexité, pouvant aller jusqu'à l'analyse de plus de 400 000 séquences en parallèle dans le cas de la puce Affymetrix. Il se développe néanmoins un grand nombre de puces de faible complexité, plus adaptées à des analyses ciblées, notamment pour le diagnostic et le suivi de pathologies. Ces dernières sont bien moins onéreuses, et sont nettement plus faciles d'accès. L'objectif final de ces développements est la mise au point de systèmes miniaturisés, portables, autonomes et faciles d'utilisation.

Les transducteurs utilisés dans les puces à ADN exploitent principalement des méthodes optiques, gravimétriques ou électrochimiques.

Les transducteurs optiques englobent des techniques très variées comme les mesures par colorimétrie[7], fluorescence[8] ou chimiluminescence[9], mais également la mesure par spectroscopie raman de surface[10] pour l'étude des modes vibrationnels d'un matériau. Un grand nombre de transducteurs optiques est majoritairement basé sur des méthodes de détection indirecte qui nécessitent l'emploi d'une sonde de détection marquée, dans le cas d'un test de type « sandwich » (stratégie ELOSA ou ELISA), ou le marquage des cibles ADN avant l'hybridation sur le microsystème (stratégie Affymetrix). Il existe toutefois des méthodes de détection sans marquage préalable, notamment celles basées sur l'utilisation de « Beacon fluorescents »[11-12] ou celles exploitant la méthode de résonance plasmonique de surface[13]. Ces méthodes sans marquage présentent des sensibilités de l'ordre du nanomolaire[14].

Les transducteurs gravimétriques mesurent une variation de masse à la surface d'un matériau, sans marquage des cibles. Dans le cas des microbalances à quartz[15], il s'agit de mesures correspondant à une variation de résonance d'une surface de quartz sous l'effet d'un champ électrique. Cette technique utilise un disque fin de quartz sur lequel des électrodes sont attachées (Figure 2 A). Les propriétés piézo-électriques du quartz sont exploitées: celui-ci se met à vibrer lors de l'application d'un champ électrique alternatif. L'hybridation de la cible ADN aux sondes greffées sur la surface d'or du disque de quartz induit une augmentation de masse du système et modifie par conséquent la fréquence de résonance du quartz. La mesure des phénomènes vibratoires est également utilisée dans les techniques utilisant les ondes acoustiques de surface [16]. La sensibilité de ces techniques évolue entre 10^{-8} et 10^{-12} M[17].
Une variation de masse induisant une augmentation de courbure d'une lamelle de silicium ou de polymère est la technique exploitée dans le cas des microcantilevers (Figure 2 B)[18].La détection d'une hybridation par un cantilever se fait par mesure optique ou capacitive de la courbure de la lamelle sur laquelle a été préalablement immobilisée une monocouche auto assemblée d'ADN (Figure 2 C). Ces systèmes permettent d'atteindre des sensibilités de 10^{-8} M[19].

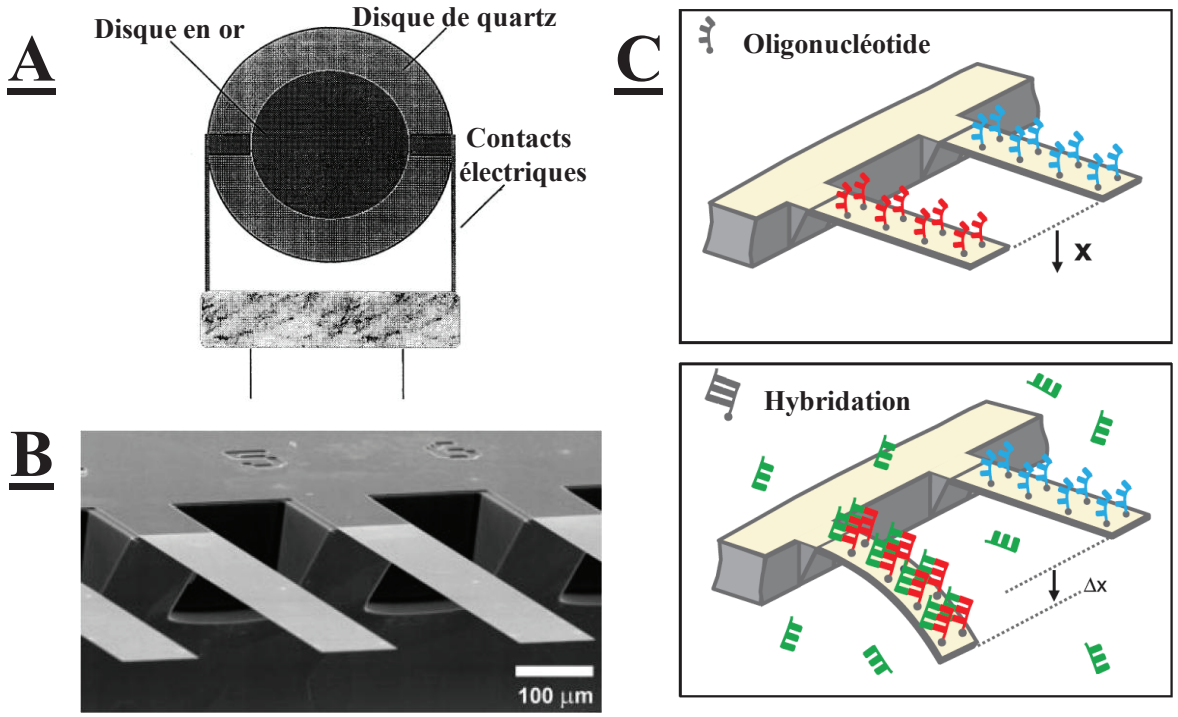


Figure 2 : Schéma d'un cristal piézo-électrique[15] (A), cliché en microscopie électronique à balayage d'une puce comprenant huit microcantilevers en silicium[19] (B) et représentation schématique de la détection d'ADN sur des microcantilevers (C).

Les transducteurs électrochimiques sont couramment utilisés pour la détection d'acide nucléique en raison de leur grande stabilité, leur faible coût ainsi que leur compatibilité avec des systèmes miniaturisés. Le biorécepteur est dans la plupart des cas une sonde ODN ou PNA immobilisée sur une surface conductrice. Les transducteurs utilisent une détection indirecte ou en temps réel (directe).

Les détections indirectes sont effectuées avec ou sans marquage des cibles. Les techniques de marquage sont basées sur la méthode dite « sandwich » utilisant une première sonde immobilisée sur une surface, le tout suivi de l'ajout dans le milieu de la cible ainsi qu'une deuxième sonde modifiée par une molécule redox[20], une nanoparticule d'or[21] ou une enzyme comme la glucose oxydase ou la phosphatase alcaline qui produisent des électrons[22-24]. Les sensibilités obtenues par ces dernières méthodes sont de l'ordre de 10^{-15} à 10^{-12} M.
Les techniques de détection directe ou en temps réel sont effectuées sans le marquage préalable des cibles. Certaines approches utilisent un marqueur redox qui est présent sous diverses formes. On peut décompter trois groupes de techniques de détection directe :

1) La mesure d'impédance de la surface[25-26] qui permet de détecter l'hybridation des sondes ODN. Cette technique ne requiert pas l'utilisation de marqueurs redox, néanmoins leur utilisation en solution comme c'est le cas pour le sel de ferri/ferrocyanure ($Fe(CN)_6^{3-/4-}$), permet d'augmenter la sensibilité de mesure. Les sensibilités de ces méthodes sont comprises entre 10^{-12} et 10^{-8} M[14].

2) La molécule redox en tant qu'intercalant du petit sillon de la double hélice de l'ADN. Lorsqu'il y a hybridation de la cible complémentaire de la sonde, on observe alors une diminution des propriétés électrochimiques de la molécule ou au contraire une apparition d'un signal électrochimique[21]. La sensibilité de ces méthodes est comprise entre 10^{-10} et 10^{-8}M.

3) La méthode des sondes de capture marquées par une molécule redox qui, lors de l'hybridation avec la cible d'intérêt, provoque une variation du signal électrochimique. Ces méthodes offrent des limites de détection avoisinant les 10^{-12}M[27].

L'ensemble des limites de détection atteintes par les différentes techniques de détection développées ont été regroupées dans le tableau suivant (Tableau 1)

transducteurs gravimétriques	Limite de détection (LD)
Balance à quartz	$10^{-8} > LD > 10^{-12}$ M
Cantilevers	Jusqu'à 10^{-8} M
Techniques de détection indirecte	**Limite de détection (LD)**
Enzymes (glucose oxydase, phosphatase alcaline, …)	Jusqu'à 10^{-15} M
Nanoparticules métalliques (Or, Argent, …)	$10^{-9} > LD > 10^{-13}$ M
Techniques de détection directe	**Limite de détection (LD)**
Impédance $(Fe(CN)_6^{3-/4-}$ en solution	10^{-8}M> LD > 10^{-12}M
Intercalant (bleu de méthylène, Doxorubicin, Hoechst 33258, …)	10^{-8}M> LD > 10^{-10}M
Sonde de capture (ferrocène, bleu de méthylène, …)	Jusqu'à 10^{-12}M

Tableau 1 : Récapitulatif des différentes sensibilités atteintes (LD : limite de détection) par les techniques de détection précédemment décrites

L'objectif de cette étude a été de mettre en place un outil de diagnostic pour la détection directe de diverses biomolécules, sans marquage préalable, sur un système de faible complexité. Le principe de détection qui a été envisagé repose sur le suivi des variations de la réponse électrochimique de divers types de sondes, à l'aide d'une modification de ces dernières par une molécule redox, subissant un changement de structure lors de la reconnaissance de la cible. Le principal intérêt de notre système de détection est de mettre en place un test de détection fiable et rapide, laissant envisager une adaptabilité sur un système multiplexé, le tout à moindre coût.

Pour répondre à ces exigences, nous avons choisi dans un premier temps d'utiliser le ferrocène comme molécule redox. Ce dernier, largement décrit dans la littérature, est utilisé depuis longtemps dans notre laboratoire en raison de sa chimie de fonctionnalisation aisée et du faible coût des précurseurs de synthèse dérivés du ferrocène. En outre, cette molécule se montre très sensible aux variations de son environnement électronique, ionique et stérique, s'avérant être un avantage pour le suivi de la réaction de reconnaissance sonde/cible[28].

Afin d'optimiser les performances du système de détection, dans le cas de la reconnaissance de cibles ADN, le ferrocène doit se situer proche de la zone d'hybridation de la sonde avec sa cible. Barton et coll. ont démontré un effet électronique basé sur les propriétés de conduction d'une double hélice d'ADN permettant de visualiser l'hybridation. L'introduction d'un site abasique dans une sonde ODN immobilisée à la surface d'une électrode entraîne la perte du signal électrochimique de l'intercalant redox présent dans la double hélice. À l'opposé, une sonde ODN parfaitement complémentaire à sa cible permet, dans les mêmes conditions, l'obtention d'un signal électrochimique mesurable[29] (Figure 3).

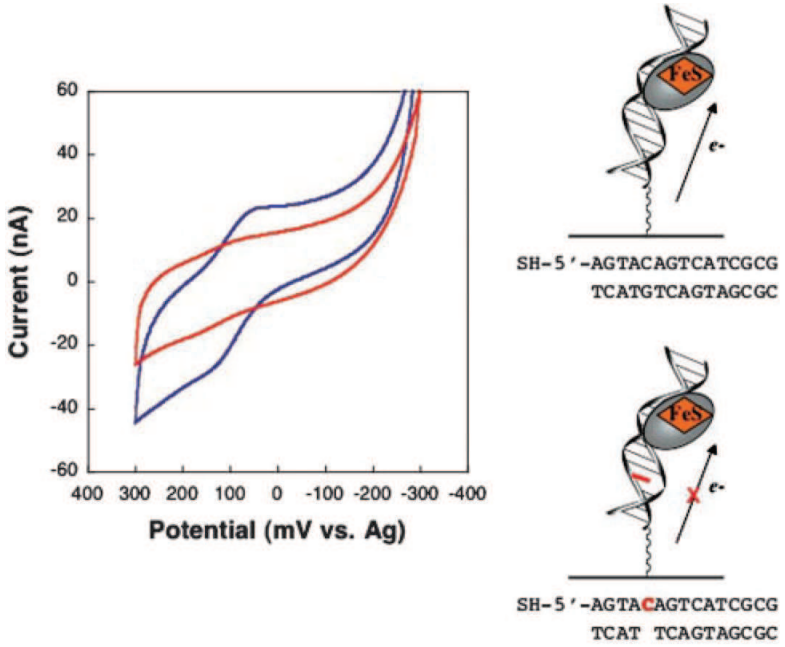


Figure 3 : Système élaboré par Barton et Coll. pour mettre en évidence la conduction de la double hélice. Le voltampérogramme bleu représente le signal obtenu pour une séquence complémentaire, le voltampérogramme rouge représente le cas d'une séquence possédant un site abasique entre la surface et le marqueur redox ($[4Fe4S]^{2+}$ ou FeS)[29].

Lors d'une étude parallèle, Anne et Coll. ont montré que le ferrocène doit être à proximité de la zone d'hybridation pour la conception d'un système de détection par capture. Bien que le duplex conserve certaines propriétés élastiques en fonction de la longueur du bras alkyle

reliant l'ODN à l'électrode[30], la prise de rigidité du double brin formé conduit à l'éloignement du ferrocène par rapport à l'électrode et à une forte diminution du signal électrochimique[31](Figure 4).

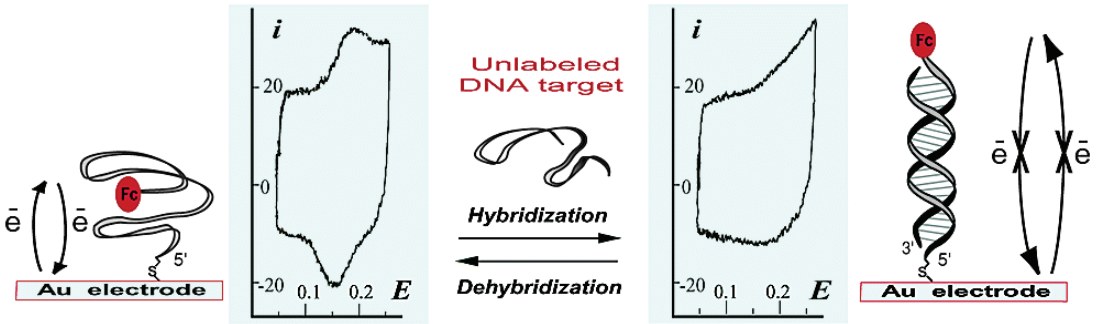


Figure 4 : Conformation d'une sonde oligonucléotidique modifiée par un ferrocène à son extrémité 3' et immobilisée sur une surface d'or, avant et après la réaction de reconnaissance de la cible complémentaire[32].

Dans ce travail, nous avons choisi de développer des sondes modifiées par des ferrocènes, inspirées des systèmes précédemment décrits, pour la conception de puce à ADN. Néanmoins, nous avons voulu mettre en place une stratégie applicable pour l'adressage des sondes sur un réseau d'électrodes d'or. Une des pistes les plus suivies durant la dernière décennie a été l'utilisation de la cycloaddition 1,3 dipolaire de type Huisgen. Ce type de réaction, plus connu sous le nom de chimie « click », a largement été décrit puis optimisé par Sharpless dans le cas de la réaction entre un alcyne et un azoture. Les récents développements innovants décrits par quelques auteurs et qui nous intéressent dans ce travail concernent la catalyse électrochimique de cette réaction de « click » sur électrode.

La chimie « click » présente l'avantage d'être réalisée en milieu aqueux, avec une certaine facilité de mise en place, et de très bons rendements. Il est toutefois à noter que le cuivre I est la seule forme du cuivre permettant l'activation de la réaction de chimie « click », laissant envisager un possible contrôle de la réaction par modification de l'état d'oxydation du catalyseur. Devaraj et al. ont récemment démontré qu'il était possible de catalyser cette réaction en appliquant un potentiel négatif sur l'électrode or à greffer[33]. Ce potentiel permet de réduire localement le cuivre sous sa forme active, ouvrant de nouvelles possibilités pour l'adressage d'électrodes.

Dans le cadre de ce travail, nous avons choisi de développer une méthode basée sur cette chimie afin de mettre en place une voie d'adressage des biomolécules plot à plot, exploitant ses avantages, applicable à la détection sans marquage de biomolécules.

Le premier chapitre de ce travail de thèse sera consacré à une étude bibliographique sur la chimie « click » et les différentes méthodes d'immobilisation sur surface compatibles avec l'électrochimie. Il sera nécessaire dans un premier temps de tirer un maximum d'informations de cette chimie afin de l'optimiser pour trouver une voie compatible avec l'adressage de sondes sur or. Dans ce but, une approche utilisant l'affinité des thiols pour l'or a été exploitée afin de mettre en place l'immobilisation d'un élément permettant d'effectuer la réaction sur la surface d'or.

Le second chapitre aura pour objectif de mettre en place une stratégie adéquate pour l'élaboration de systèmes de détection en utilisant la chimie « click » de Huisgen. L'étude se portera sur l'électrofonctionnalisation d'une surface d'or et l'optimisation des conditions opératoires de cette chimie *via* l'immobilisation d'un dérivé ferrocène à la surface. Nous développerons par la suite le potentiel de cette stratégie en adaptant cette chimie pour l'immobilisation de divers objets sur une surface d'or, notamment des nanoparticules fluorescentes, ainsi que des protéines, par l'intermédiaire de la formation du complexe biotine/streptavidine.

Le troisième chapitre de ce travail sera consacré à l'élaboration de sondes de capture marquées par des ferrocènes. Cette stratégie de détection est inspirée des travaux proposés par Heeger et Coll. [27]. Ces sondes présentent l'intérêt de deux configurations structurelles très différentes : une configuration fermée sous forme « hairpin » et une configuration ouverte lors de la formation du duplex sonde/cible. Ainsi, nous traiterons ici de la synthèse d'oligonucléotides modifiés de structure tige-boucle *via* la chimie des phosphoramidites.

Le dernier chapitre se focalisera sur l'étude électrochimique des différentes sondes tige-boucle immobilisées sur or par la chimie « click ». Les deux groupes de sondes de capture seront immobilisée selon deux méthodes : une méthode d'immobilisation reposant sur la chimie des alkylthiol et une méthode d'immobilisation reposant sur la chimie « click » développée dans le second chapitre. Cette étude sera suivie par une succession de tests *in vitro* d'hybridation d'ADN ciblé, effectués dans un milieu complexe, afin de déterminer la limite de détection de nos systèmes.

CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE SUR LA CHIMIE « CLICK » ET SYNTHESE DES PRECURSEURS

B. Méthodes d'immobilisation sur surface d'or

L'immobilisation de sondes ODN sur un support permet de localiser la réaction d'hybridation au voisinage de celui-ci. Cette méthode optimise le transfert électronique aux interfaces avec l'électrode, dans le cas d'une détection électrochimique, optimisant la sensibilité du système.
Une molécule redox immobilisée à la surface de l'électrode a moins de risque d'être perturbée par le milieu dans lequel est présent sels et autres éléments capables d'interférer dans le processus. Par ailleurs, l'immobilisation est l'étape clé pour la réalisation d'un système de multidétection. L'utilisation de microsystèmes présentant plusieurs électrodes de travail permet de fonctionnaliser chacune d'entre elles différemment et de détecter ainsi plusieurs cibles de façon simultanée dans un même échantillon. Un tel système peut ensuite être intégré dans un système microfluidique permettant de diminuer considérablement le volume de l'échantillon. Le passage en flux dynamique d'un échantillon sur une surface d'électrodes améliore la capture des cibles, en les concentrant sur la surface. La possibilité de laver les surfaces avant mesure permet aussi d'améliorer la sensibilité du système.
Les surfaces d'or ont toute une panoplie de méthodes de greffage, la plus répandue étant le greffage des thiols sur or, sous la forme d'une monocouche. Dans l'optique d'un adressage multiple, la fonctionnalisation peut éventuellement se faire par électrodépôt de polymères semi-conducteurs tels que les (poly)pyrroles ou par élaboration de monocouches en utilisant des sels aryl diazonium. Enfin, il existe des méthodes d'immobilisation par l'utilisation de la «click » électroactivée. Les spécificités de ces méthodes s'adaptent plus ou moins à la détection de cible ADN. Les principales voies de fonctionnalisation de surface d'or seront rapidement décrites.

B.1. Greffage de biosondes sur surface d'or par la méthode des monocouches auto-assemblées de dérivés alkylthiols.

Les équipes de Nuzzo et Coll.[89] ainsi que de Bain et coll.[90-92] ont été pionnières quant à la modification d'électrodes par des alkylthiols pour des applications de capteurs. Cette technique est la plus répandue pour le greffage de biomolécules sur des électrodes de différente nature, tels que l'or, l'argent, le platine ou le cuivre.
Les alkylthiols s'adsorbent spontanément sur ces surfaces pour former des liens covalents avec le métal. Il en résulte la formation d'une monocouche de chaînes alkyles, diversement fonctionnalisées, qui possède une inclinaison de 20° à 30° par rapport à la normale du plan.

Une fois la surface du métal nettoyée, la solution d'alkylthiols forme rapidement une monocouche, suivie d'une lente réorganisation pouvant durer plusieurs heures[90]. Les monocouches mixtes peuvent être formées en mettant en contact, avec la surface, une solution ou les espèces à greffer sont toutes présentes. Il en résulte une monocouche relativement homogène des différentes molécules[92]. Dans le cas où la longueur des chaînes entre les différents composés est très importante, il est nécessaire de commencer le greffage de la surface par les chaînes les plus longues, puis d'uniformiser la monocouche en mettant la surface en contact avec la solution contenant les chaînes les plus courtes[93] .

Toutefois, il est à noter que ce procédé possède une limitation d'utilisation. L'énergie de la liaison Au-S n'est que de 30 à 45 kcal/mol [94] ce qui s'avère être notablement plus faible qu'une liaison covalente C-C, de l'ordre de 80-150 kcal/mol. Ces faibles valeurs d'énergie de liaison induisent une relative instabilité dans le temps de la monocouche alkylthiol et obligent les opérateurs à travailler dans une gamme de potentiels compris entre -1 V et +1 V *vs* ECS. Cette fenêtre varie en fonction de la longueur des chaînes et les groupements chimiques terminaux utilisés[95-96]. La liaison Au-S est sujette à l'oxydation sous forme de sulfinate (SO_2^-) ou de sulfonate (SO_3^-) en présence d'oxygène et de lumière[97]. La sensibilité à l'oxydation des thiols est directement fonction de la longueur et du groupement terminal de la chaîne[98]. Les soufres oxydés ainsi formés ont une énergie de liaison plus faible que les thiolates à la surface de l'or, provoquant des lacunes dans la monocouche et compromettant la stabilité des signaux électrochimiques[99].

Une autre approche pour stabiliser l'accroche des éléments thiol sur la surface d'or consiste à augmenter le nombre de liaisons soufre par entité chimique à greffer. C'est ainsi que l'équipe de Liepold et Coll. [100] a imaginé des oligonucléotides présentant plusieurs groupements thiols voisins sur la partie terminale de la sonde. L'accroche à la surface se fait par des unités appelées dithiolphosphoramidite (DTPA), compatibles avec la synthèse automatisée d'oligonucléotides. L'augmentation du nombre de ces unités au sein d'une même sonde oligonucléotidique permet d'accroître de façon plus que significative la stabilité du greffage des sondes au cours du temps. Il est toutefois noté une légère baisse de la surface fonctionnalisée, qui s'explique vraisemblablement par une gêne stérique engendrée par les sondes déjà greffées à la surface d'or.

En dépit de ces limitations, les monocouches alkylthiols sont très utilisées pour la fonctionnalisation de surface par des biomolécules telles que des peptides[101-102], des PNA[103] ou de l'ADN[93]. Le greffage d'oligonucléotides sur des surfaces or a particulièrement été approfondi par l'équipe d'Anne et Coll. [31]. La présence d'une cible ADN modifie la

conformation des brins sondes greffés sur la surface de détection. Cette modification de conformation en forme duplex rigidifie le brin, réduisant considérablement sa mobilité dans la solution et modifiant son angle d'inclinaison par rapport à la surface d'or. De ces observations, de nombreuses études physico-chimiques et électrochimiques ont été menées sur le comportement des brins d'ADN lorsqu'ils sont sous forme simple brin[30, 104] ou duplex[105].

Kelley et Coll. ont notamment pu observer que le double brin d'ADN faisait un angle de 45° avec la normale du plan[106], légèrement supérieur à celui observé pour des chaînes alkylthiol conventionnelles.

Tarlov et coll.[93, 107] ont procédé à l'immobilisation de mercaptoalcool de taille identique au bras alkylthiol de l'oligothiol utilisé. Cette « passivation » a pour effet de combler les lacunes et de redresser la base des sondes, permettant une meilleure organisation de la monocouche à la surface de l'électrode (Figure I.B.1.)

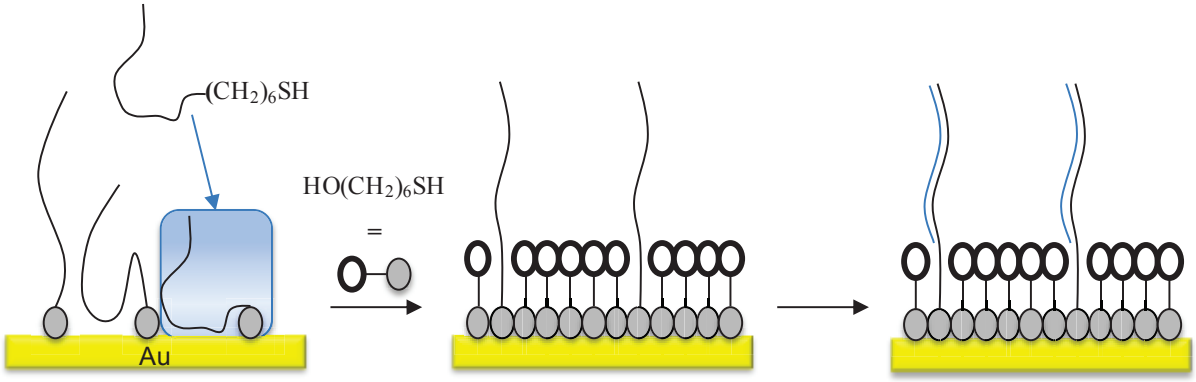


Figure I.B.1. : Méthode de passivation de la surface par du mercaptoalcool employée par Tarlov et Coll.

L'organisation en monocouche des sondes greffées à la surface par des liens thiol amplifie la variation de signal due aux changements de conformation induits par l'hybridation avec la cible complémentaire. Ces effets de structure sont d'une grande importance dans l'optique de la mise au point d'un système de détection par électrochimie sur surface d'or.

La fonctionnalisation de surface d'or par adsorption des thiols a également permis la mise au point de systèmes de multidétection [108] . Contrairement aux méthodes utilisant des sels d'aryl diazonium ou des poly(pyrrole), il est nettement plus difficile, par la méthode des alkylthiols, d'envisager un adressage de sondes diverses sur un système à plots multiples. Les temps de greffage sont bien plus longs, le micro spotting est difficile et il n'existe aucune méthode

connue d'électroadressage. Pavlovic et coll. ont donc imaginé une stratégie singulière. Leur système de départ est préventivement greffé par une première sonde. La suite de la manipulation consiste à remplacer cette sonde par désorption sélective d'une partie des plots [108]. Ils ont ainsi pu faire une multidétection pour deux cibles différentes sur la même puce. Ce procédé est toutefois très limité car il n'empêche pas totalement les contaminations plots à plots.

Une autre méthode de greffage faisant intervenir des thiols consiste à synthétiser des oligonucléotides phosphorothioates. À partir de la méthode de synthèse supportée des phosphorothioates développée par l'équipe de Beaucage[109], des oligonucléotides sont modifiés sur quelques phosphates internucléosidiques de leur extrémité 3' ou 5' [110-111] (Figure I.B.2.).

Figure I.B.2. : système de détection électrochimique de type « sandwich » développé par Iharra et Coll.[110] faisant intervenir une sonde de détection modifiée par des fonctions phosphorothioates qui permettent son immobilisation sur la surface de l'électrode

Ce type de sonde oligonucléotidique chemisorbée sur une surface d'or a été utilisé par Ihara et Coll. [110] afin de développer un système de détection électrochimique de type « sandwich ». Une première sonde oligonucléotidique de détection, complémentaire d'une partie de la cible ADN à détecter, est tout d'abord fixée sur l'électrode. La cible ainsi qu'une deuxième sonde oligonucléotidique de détection, complémentaire d'une autre partie de la cible, sont ensuite introduites dans le système. La deuxième sonde est modifiée par une molécule de ferrocène. Le « sandwich » ainsi formé permet l'obtention d'un signal électrochimique qui ne peut apparaître qu'en présence de la cible complémentaire. Le signal est alors dit « ON ». Cette méthode de greffage est relativement facile à mettre en œuvre, mais la densité de greffage de sonde est bien moindre que dans le cas d'une fonction thiol située à l'extrémité de l'oligonucléotide.

B.2. Electro-fonctionnalisation de surface d'or par des sondes oligonucléotides *via* le greffage de molécules aryl diazonium

Cette chimie a été initiée par Delamar et Coll. en 1992[112]. Ils ont relaté le greffage du (4-nitrophényl)diazonium tétrafluoroborate sur une électrode de carbone vitreux sous l'action

d'un courant électrique. L'électrode ainsi fonctionnalisée a permis l'obtention d'un signal réversible du nitrobenzène par voltampérométrie cyclique. Ce mode de fonctionnalisation a ouvert la voie vers une méthode attractive pour la fabrication de micro capteurs.

La modification des électrodes avec des sels d'aryl diazonium s'effectue par l'adsorption du radical aryl dans acétonitrile ou en milieu aqueux acide (pH < 2). Le mécanisme de la réaction sur des électrodes de carbone, décrit pour la première fois par Delamar et coll., est représenté dans la figure I.B.3.

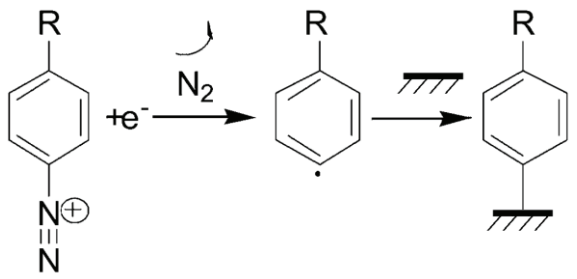


Figure I.B.3. : Mécanisme de la réaction de greffage covalent d'un aryl diazonium sur surface en carbone [113]

Le greffage par réduction des sels d'aryl diazonium est typiquement effectué par voltampérométrie cyclique ou en imposant un potentiel fixe. Cette dernière méthode apporte un meilleur contrôle du dépôt des molécules sur électrode.

La liaison C-C formée avec la surface de carbone est bien plus forte qu'une liaison S-Au. La monocouche ainsi formée a ainsi une stabilité accrue à forte température et permet l'utilisation d'une fenêtre de potentiel bien plus large. Toutefois la formation de la couche sensible n'est que très peu contrôlée. Les radicaux générés électrochimiquement à la surface interviennent dans des réactions secondaires parasites, perturbant la régularité de la couche formée [114]. Ces réactions sont fonction du substituant du cycle benzénique situé en *para* du sel d'aryl diazonium [115]. Il est également possible d'engendrer une liaison sans perte du groupement diazonium générant une hydrazine attachée sur la surface [116].

Une grande variété de surfaces a pu être fonctionnalisée par la réaction de sels d'aryl diazonium. La surface de carbone est à l'heure actuelle le support le plus utilisé compte tenu de l'historique de la réaction et de son coût peu élevé[113, 117-118].

Corgier et coll. ont greffé de façon directe des oligonucléotides, des protéines et des anticorps sur une surface de carbone sans passer par un intermédiaire ester activé[119-120]. D'autres types de surface ont été utilisées, à savoir des métaux (Au, Co, Ni, Zn, Pt)[121], du diamant [122] ou

encore du silicium [123]. Un grand nombre de biomolécules telles que des peptides[124], des enzymes[125], des protéines[126] ou de l'ADN[127] a ainsi pu être immobilisé.
Harper et coll. ont mis au point un système de détection simultanée d'acide nucléiques et de protéines (Figure I.B.4.)[128].

Figure I.B.4. : système de détection électrochimique simultanée d'acide nucléiques et de protéines proposé par Harper et Coll.[128]. (A) électroadressage des sels d'aryl diazonium substitués en para par un acide carboxylique, sur la moitié des électrodes disponibles. (B) formation de l'ester activé et couplage de l'ODN. (C) électroadressage sur l'autre moitié des électrodes des sels d'aryl diazonium substitués en para par un anticorps

Des sels d'aryl diazonium substitués en *para* par un acide carboxylique ont tout d'abord été électroadressés sur la moitié des électrodes disponibles. L'acide a ensuite été modifié par un ester activé permettant le couplage d'un ODN modifié à l'une de ses extrémités par une amine primaire. L'autre moitié des électrodes a enfin été fonctionnalisée par des sels d'aryl diazonium substitués en *para* par un anticorps. Ce système a permis la mise en place d'une détection simultanée de cibles ADN et de protéines. La détection a été effectuée par chronoampérométrie à un potentiel de 0 V *vs* Ag/AgCl. La reconnaissance de la cible complémentaire a été matérialisée par l'obtention d'une forte augmentation de l'intensité par rapport à celle obtenue en l'absence de cible.

Bien que cette méthode présente de grands avantages quant à la stabilité dans le temps ainsi que le multi-adressage, la chimie de formation des diazoniums demande un équipement adapté et un certain savoir-faire.

B.3. Utilisation de films poly(pyrrole) comme polymères électroactifs pour le greffage de sondes et la détection d'ADN

Parmi les polymères conjugués existants qui peuvent être électrodéposés sur une électrode, le poly(pyrrole) est un composé intéressant pour l'utilisation biologique car il est utilisable en milieux aqueux et à pH physiologique. Il est communément utilisé pour le greffage de molécules biologiques telles que des ADN, des peptides ou des sucres[129-130]. D'autres

polymères conducteurs comme le poly(éthylènedioxythiophène) (PEDOT)[131] , le poly(thiophène)[132] ou la poly(aniline)[133-134] ont également été étudiés.

B.3.a. Greffage de biomolécules sur des films poly(pyrrole)

Le poly(pyrrole) est élaborée par électropolymérisation sous l'effet d'un potentiel[135]. Des unités pyrrole, pouvant être ou ne pas être fonctionnalisées, sont polymérisées à la surface d'une électrode sous l'effet d'un potentiel anodique. La charge délivrée pendant l'électropolymérisation permet de contrôler l'épaisseur du film poly(pyrrole) ainsi que son homogénéité à la surface même de l'électrode.

Dans les années 90, l'équipe de Garnier a utilisé des pyrroles modifiés par des biomolécules. Il s'agissait d'unités pyrrole sur lesquelles ont été greffées des acides aminés[136] puis des dimères de peptides[137]. Livache et coll. ont par la suite fonctionnalisé l'azote des unités pyrrole par des ODN[138]. Les dérivés obtenus ont alors été copolymérisés avec des unités pyrrole non modifiées. La formation des films poly(pyrrole) par électropolymérisation aboutit à un adressage ciblé sur les électrodes de travail activées et constitue un outil idéal pour l'élaboration de systèmes de multidétection. Ces travaux préliminaires ont conduit à la mise au point de la puce MICAM (Figure I.B.5.) : il s'agit d'une puce composée par 128 électrodes de travail en or multiplexées ayant chacune une surface de $2{,}5.10^{-5}$ cm². Chaque électrode peut donc être indépendamment fonctionnalisée permettant une multidétection[129, 139-140].

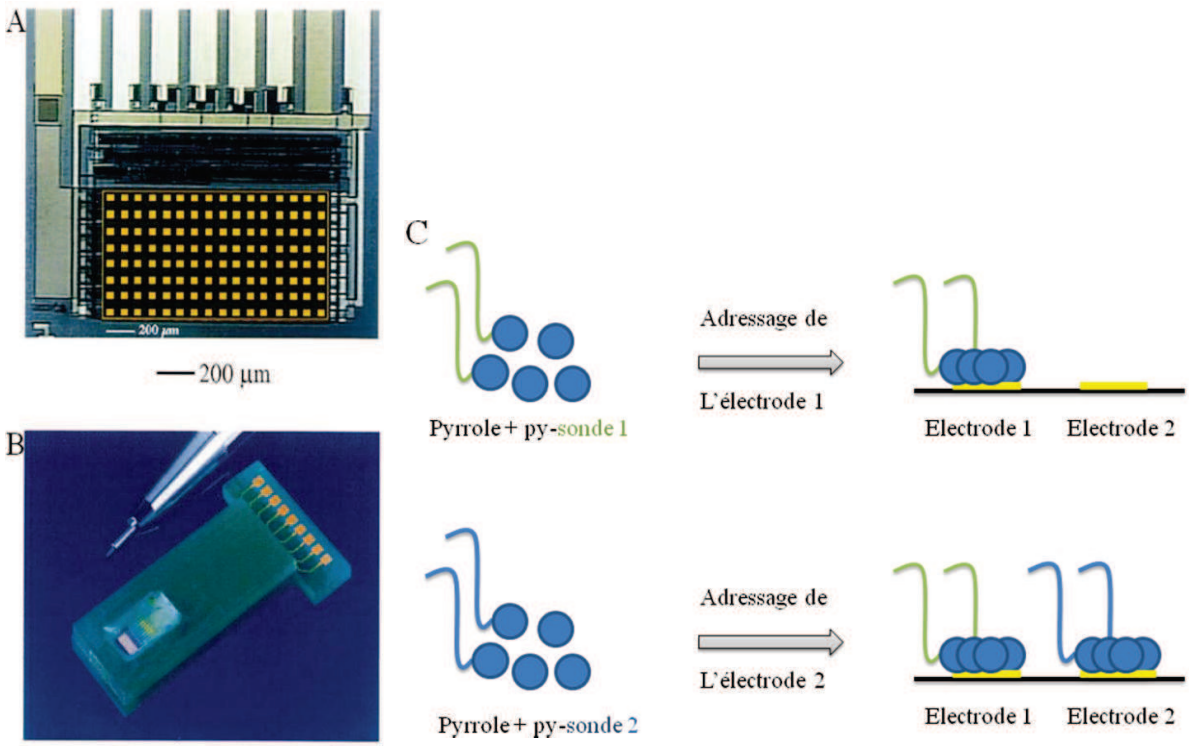


Figure I.B.5. : Système de la puce à ADN MICAM. A) grossissement des 128 électrodes multiplexées. B) vue générale de la puce C) schéma de la fonctionnalisation individualisée des électrodes de travail par des films poly(pyrrole) modifiés par des sondes ADN[129, 140]

Les cibles biologiques d'intérêt sont préalablement biotinylées de façon à permettre une détection par fluorescence en présence du conjugué Streptavidine-*R*-phycoérythrine[129].

B.3.b. Détection électrochimique du duplex ADN

Dans l'optique d'une détection par électrochimie, l'équipe de Garnier à fonctionnalisé des surfaces en utilisant des monomères pyrrole ester activé [141]. La signature électrochimique du poly(pyrrole) permet de suivre la réaction de reconnaissance sonde/cible. La position 3 du pyrrole est fonctionnalisée, afin de maintenir une bonne conductivité à la surface. Pour ce faire, le monomère a tout d'abord été électrocopolymérisé avec un monomère pyrrole acide acétique. La proportion de chacun des monomères a permis de déterminer le taux de fonctionnalisation de la surface. Un ODN ayant une amine primaire terminale a ensuite été couplé à l'ester activé présent sur le polymère conducteur. L'intérêt de ne coupler l'ODN qu'après la copolymérisation est que les deux monomères pyrrole ont une cinétique de polymérisation très proche. L'utilisation de monomères pyrrole-ODN pour la

copolymérisation modifie le taux de fonctionnalisation, ce dernier ayant une cinétique de polymérisation plus lente.

Le suivi de l'hybridation de l'ODN sonde avec sa cible complémentaire par ce système a été effectué par voltampérométrie cyclique[142] et par impédance[143]. La formation du duplex a été visualisée en voltampérométrie cyclique par diminution du I_{ox} et, en impédance, par une augmentation de la résistance de transfert de charges.

La sensibilité de ce système est de l'ordre du picomolaire mais il est limité par la faible variation de la réponse électrochimique du pyrrole durant la réaction d'hybridation. En effet, la largeur à mi-hauteur du signal redox de ces polymères est très large (> 200 mV) et la précision de lecture est donc faible.

La sensibilité de ces systèmes de détection a été améliorée en partie par l'équipe de Korri-Youssoufi et Coll.[144-145] mais aussi par l'équipe de Bouchet et Coll.[28] . Il s'agit de systèmes de détection utilisant des ferrocènes comme marqueurs redox, affinant la signature électrochimique des polymères conducteurs, support des sondes biologiques.

Dans le premier cas, des monomères pyrrole ferrocène ester activé en position 3 ont été copolymérisés avec un monomère pyrrole acide acétique. Les monomères pyrrole utilisés sont fonctionnalisés en position 3 afin de maintenir une bonne conductivité du polymère correspondant. Un ODN ayant une amine primaire terminale a ensuite été couplé à l'ester activé. Le signal électrochimique analysé par CV donne des pics fins correspondant à l'oxydation et à la réduction du ferrocène. La reconnaissance de la cible complémentaire conduit à une diminution en intensité des pics d'oxydation et de réduction. La sensibilité de ce système de détection donnée par les auteurs est de 100 pM.

Dans le second cas, 3 monomères pyrrole ont été copolymérisés : un monomère pyrrole ferrocène, un monomère pyrrole ODN et un monomère éthanol-3-pyrrole. Après la copolymérisation sur une surface de graphite, le polymère conducteur se présentait sous forme de cylindre de copolymères. Le film polymère perd sa structure cylindrique après l'hybridation avec la sonde ADN. Les ferrocènes intégrés dans la structure même du polymère voient donc leur signal électrochimique directement influencé par l'hybridation de l'ODN. Ce changement de structure induit une diminution de l'intensité du pic d'oxydation. Le système permet la détection de cibles à une concentration minimale de 100 pM.

L'utilisation des films poly(pyrrole) pour la mise au point d'un système de détection d'acide nucléique est avantageuse car sa synthèse par électropolymérisation permet un adressage sélectif des sondes sur une puce électrochimique, ainsi que le contrôle de l'épaisseur du film et de sa reproductibilité. Les monomères pyrrole sont néanmoins des molécules relativement

instables qui peuvent facilement polymériser. Ces molécules nécessitent donc beaucoup de précautions dans leur utilisation ainsi que dans leur stockage. De plus il se pose également un problème de distance des sites de reconnaissance vis-à-vis de l'électrode. Le polymère risque d'interférer dans les transferts électroniques et ainsi de noyer les variations de signal.

B.4. Adressage de surface d'or *via* la chimie « click » électrocatalysée

La réaction de CuAAC a été rapportée comme un outil pertinent pour l'immobilisation de ligands sur un support solide, notamment pour la préparation de puces à ADN. Son utilisation a déjà été rapportée en présence de cuivre (I) / TBTA[146] , sans que la notion d'adressage ne soit évoquée.

Toutefois, au cours de ces dernières années, cette méthode a été grandement améliorée par l'équipe de Devaraj et Coll.[33] par le développement d'une méthode de chimie « click » électroassistée, permettant de générer *in situ* le cuivre (I). Celui-ci est obtenu par application d'un potentiel négatif menant à la réduction du cuivre (II) en présence d'acide bis(bathophénanthroline) disulfonique. Cette électrogénération de Cuivre (I) a l'avantage d'être réalisée dans la région proche de l'électrode, développant ainsi une nouvelle voie d'électroadressage sur or (Figure I.B.6.).

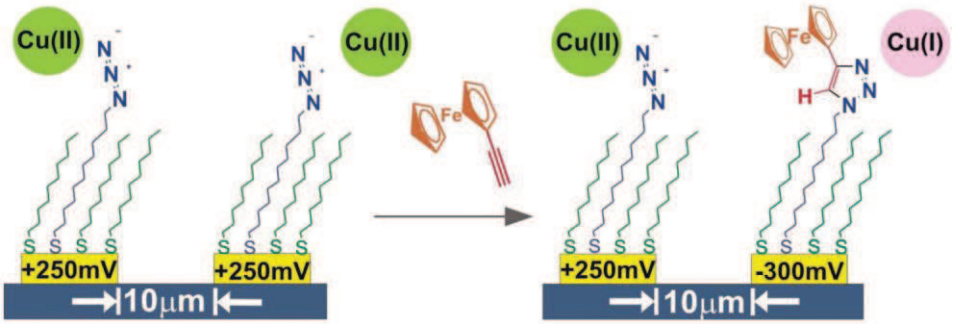


Figure I.B.6. : Immobilisation de l'éthynyl-ferrocène sur une monocouche d'or.

Il est possible d'éviter toute contamination croisée dans un système multi-électrodes par application d'un potentiel positif sur les électrodes qui ne doivent pas être fonctionnalisées.

Dans cette optique, Hansen et coll[147] ont fonctionnalisé des électrodes avec un polymère conducteur de PEDOT modifié par un groupement azoture. L'application d'un potentiel négatif leur a permis d'immobiliser sélectivement deux fluorophores distincts.

De façon similaire, l'équipe de Canete et Coll.[148-149] a utilisé cette méthode pour la fabrication de puces à ADN. La sonde immobilisée est un oligonucléotide modifié par un groupement bleu de méthylène (Figure I.B.7)

Figure I.B.7. : Structure des sondes oligonucléotidiques pour la réaction de « click » électroactivée[149]

Cette méthode permet la détection de la cible complémentaire par hybridation de celle-ci avec la sonde de capture. La détection de cette hybridation est réalisée par Voltammétrie impulsionnelle différentielle (DPV). L'hybridation de la cible entraine la diminution du signal DPV. Les seuils de détection de ces systèmes ne sont pas précisés par les auteurs.

Cette méthode d'immobilisation de biomolécules sur surface d'or semble très prometteuse et sera donc retenue dans cette étude. La synthèse des entités nécessaires pour la réalisation de cette stratégie sera détaillée dans la partie suivante.

C. Stratégie de synthèse pour la mise au point de l'électroadressage sur surface d'or par les alkylthiols

C.1. Rappels sur la synthèse automatisée sur support solide *via* la chimie dite aux phosphoramidites

Nous avons décidé d'utiliser la synthèse automatisée afin de concevoir notre élément d'accroche sur surface d'or pour la chimie « click ». L'outil sera utilisé plus amplement dans la suite des travaux, notamment lorsque nous procéderons à la réalisation d'oligonucléotides modifiés. Nous rappellerons, donc, dans cette partie les éléments d'un cycle d'incorporation classique.

C.1.a. Historique

Les équipes de Caruthers et Beaucage sont les premières à avoir introduit la notion de synthèse supportée d'ADN *via* la chimie dite aux phosphoramidites [150]. A partir d'un premier nucléoside greffé sur un support de CPG (controlled pore glass), l'élaboration d'une chaine ADN est faite par la croissance du premier nucléoside par couplages successifs de synthons phosphoramidites.

Originalement, le premier nucléoside a été attaché au support *via* un lien ester formé entre l'hydroxyle en 3' du désoxyribose et les fonctions acide carboxylique d'un support de type gel de silice, comme décrit dans l'article de Matteucci [151]. Les fonctions acide résiduelles ont été neutralisées avant de faire réagir le premier nucléoside de la séquence. Dans l'article de Matteucci, la réaction de ce dernier était menée sur l'hydroxyle libre en 5', en présence de 1H-tétrazole qui joue le rôle d'activateur, avec un monomère nucléotidique protégé en 5' par un DMT et fonctionnalisé en 3' par un méthoxy phosphite. Le temps de couplage était de l'ordre de 20 minutes. Les rendements obtenus ont été supérieurs à 93 % pour un dimère. Cette procédure a servi de base pour de nombreuses équipes de recherche[151-154] et a abouti, après quelques optimisations de certaines des fonctions réactionnelles des monomères, à la mise au point d'un système automatisé de synthèse supportée d'ADN/ARN. Désormais, les monomères nucléotidiques classiques présentent en 3' la fonction alcool fonctionnalisée par un 3'-[(2-cyanoéthyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite. En revanche, la position 5' du ribose est toujours protégée par un groupement diméthoxytrityle (DMT) acido-labile. Cette

méthode de protection de la position 5’ par un DMT a été mise au point par Khorana et al. en 1962 [155].

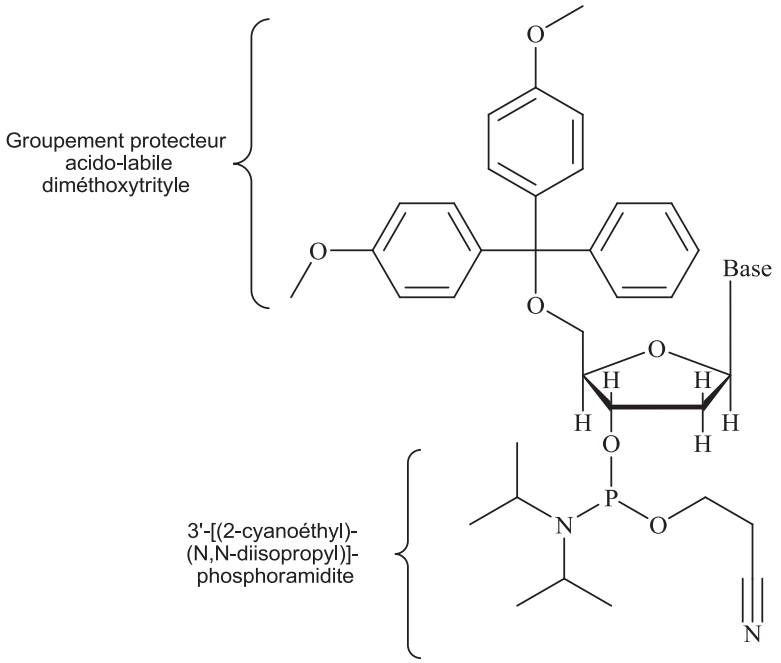


Figure I.C.1. : Monomère nucléotidique utilisé pour la synthèse dite aux « phosphoramidites »

C.1.b. Fonctionnement

La synthèse automatisée d’un ODN se déroule classiquement de l'extrémité 3’ vers extrémité 5’ de la chaîne [156]. Chaque nucléotide est relié par une liaison phosphotriester en 3’-5’. La synthèse automatisée prend place dans une colonne où sont placées des billes de verre (de taille de pores classiquement comprises entre 50 et 200 nm) de fonctionnalisation de surface variable. La succinyl-LCAA-CPG (succinyl long chain aminoalkyl controlled pore glass) peut être notamment fonctionnalisée par des nucléosides ou bien par des bras fonctionnels possédant un hydroxyle protégé qui permet d'initier l’élongation des chaînes. Il est à noter que des CPG modifiées par un nucléodithiol composé d’un radical dihydroxydithiane phosphoramidite ont été utilisé pour élaborer une molécule polythiol permettant l’ancrage sur surface d'or *via* la méthode des monocouches auto-assemblées (SAM).

La synthèse automatisée se déroule classiquement en quatre étapes (Figure I.C.2.)

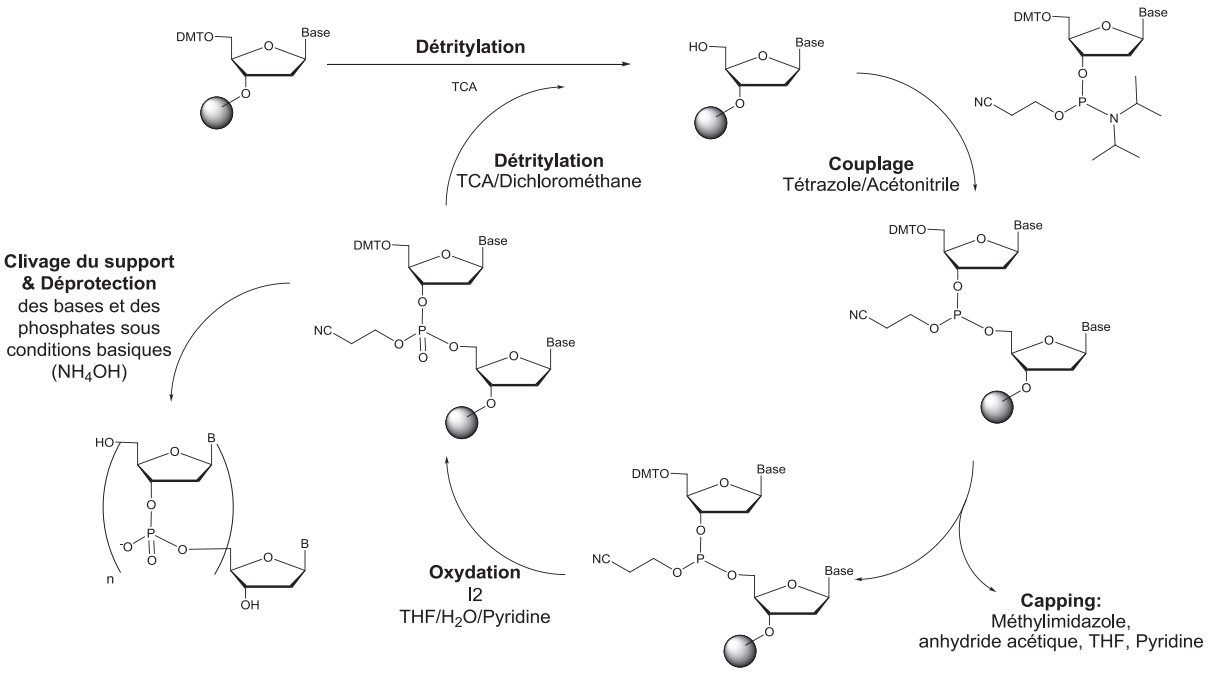


Figure I.C.2. : Représentation schématique du cycle de couplage de nucléoside phosphoramidite en synthèse supportée automatisée.

- L'étape zéro du programme consiste à éliminer le groupement diméthoxytrityl (DMT) qui protège la fonction hydroxyle terminal de l'amorce. Lorsqu'il s'agit d'un nucléoside c'est l'hydroxyle en 5' du ribose qui est déprotégé. Cette étape s'effectue par un passage dans la colonne d'une solution d'acide trichloracétique (3% TCA dans le dichlorométhane v/v). Le clivage du groupement DMT libère un cation trityl coloré rendant possible l'évaluation du rendement de couplage par UV visible (λ=498 nm). Chaque rendement est ainsi donné par rapport au rendement de couplage de la base précédente.
- L'étape 1 de chaque cycle est l'étape de couplage. La réaction est activée par le tétrazole (0,175 mL, 78,8 µmoles, d'une solution à 0,1 M dans l'acétonitrile) en équivolume avec le nucléoside phosphoramidite (0,175 mL, 17,5 µmoles, d'une solution à 0,1M dans l'acétonitrile). Ils sont introduits de façon simultanée dans la colonne pour former un nucléotide très réactif. Cette opération réalisée deux fois par couplage avec un temps d'attente de 15 secondes et 25 secondes à chaque ajout de mélange pour permettre la réaction. Les temps et les concentrations sont donnés pour des synthèses à l'échelle de 1 µmole.

- L'étape 2, appelée étape de « capping », permet de bloquer les fonctions hydroxyle n'ayant pas réagi lors de l'étape 1 du couplage. Elle est activée par un anhydride acétique (10% v/v dans un mélange pyridine/THF 1 : 8) en présence de 1-*N*-méthylimidazole (16% v/v dans le THF) permettant de former un réactif d'acétylation des hydroxyles libres.

- L'étape 3 correspond à une étape d'oxydation du phosphite trivalent, peu stable, en phosphate pentavalent, beaucoup plus stable. La réaction se déroule généralement en présence d'iode (0,75 mL, 15 µmoles, d'une solution à 0,02M dans un mélange THF/pyridine/eau).

- Enfin, l'étape 4 correspond à la déprotection de la fonction hydroxyle en 5' du dernier nucléotide couplé avec de l'acide trichloracétique (3% v/v dans le dichlorométhane). Cette étape constitue également la première étape d'un nouveau cycle d'incorporation.

En fin de synthèse, les oligonucléotides sont décrochés de leur support par immersion de la CPG dans une solution d'ammoniaque concentrée (NH_4OH 30% aqueuse) pendant une nuit à 60 °C. Cette étape de décrochage permet également la rupture des groupements protecteurs des fonctions amine exocycliques des bases nucléiques cytosines, adénines et guanines ainsi que l'élimination du groupement cyanoéthyl pour libérer les phosphate diesters. Après filtration de la CPG, l'ammoniaque est par la suite évaporée et le brut réactionnel est concentré pour être conservé au congélateur en attendant une purification par chromatographie liquide haute performance (CLHP).
À partir d'un programme classique, des modifications, portant sur les réactifs utilisés et leur concentration ou sur l'enchaînement des étapes du cycle de synthèse, ont été apportées afin d'élaborer des « linkers » à façon.

C.2 Synthèse des éléments ferrocène et alkylthiol

La chimie des alkyl thiol a été retenue pour le greffage sur surface d'or. Néanmoins, les tentatives d'adressage sur une puce de multidétection effectuées à ce jour sont peu souples, et les risques de « cross » contamination plot à plot sont élevés[108]. Il est donc nécessaire d'envisager une autre chimie pour l'adressage des surfaces : La chimie « click »

électrocatalysée précédemment décrite a été développée. Cette réaction peut être catalysée par une électroactivation du cuivre localement sur l'électrode. Elle présente de très bons rendements en milieu *quasi* aqueux. Dans le cadre de ce travail, il sera donc développé l'élaboration de deux entités chimiques:

- Un dérivé alkyl thiol fonctionnalisé par un groupement alcyne, afin de jouer le rôle d'élément d'ancrage sur surface d'or
- Un élément redox, le ferrocène, qui sera fonctionnalisé par une fonction azoture. Cette molécule sera greffée sur l'électrode par réaction « click » afin de déterminer les paramètres optimaux pour l'immobilisation ultérieure de biomolécules sur électrode d'or.

La chimie abordée dans cette partie sera l'étape déterminante pour la mise au point d'une stratégie d'immobilisation électroadressée de sondes oligonucléotidiques sur or.

C.2.a. Synthèse d'un élément ferrocène à terminaison azoture

Afin de mettre au point la réaction de « click » sur or, l'utilisation d'un marqueur redox simple est utilisée pour étudier la faisabilité de la réaction, et déterminer les paramètres optimaux de sa réalisation. En outre, le ferrocène est abondamment utilisé dans la littérature[111, 131-132, 157], ce qui nous permet d'avoir une importante base de données pour ses propriétés électrochimiques[158].

Le ferrocényléthylazide **6** est synthétisé en 6 étapes, avec un rendement global de 27 %.

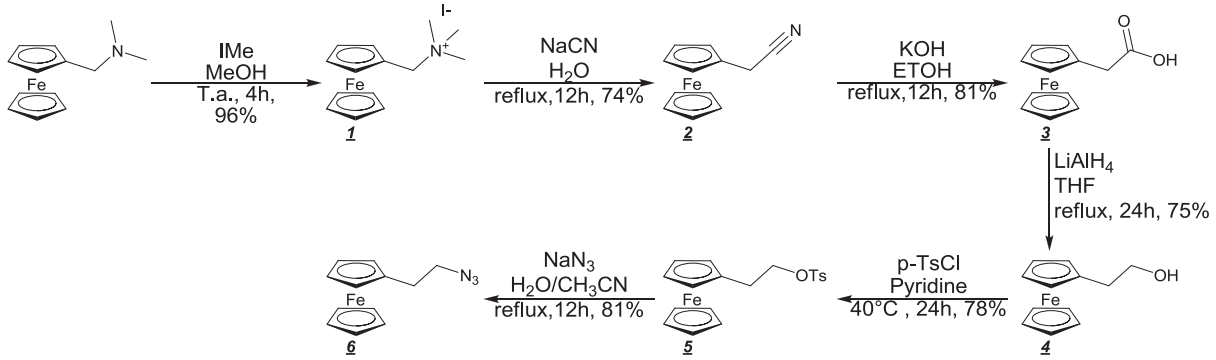


Figure I.C.3. : Voie de synthèse du ferrocényléthylazide ***6***

Cette molécule est synthétisée à partir du *N,N*-diméthylaminoferrocène commercial. L'amine tertiaire de ce composé a tout d'abord été méthylée de façon à obtenir l'ammonium

correspondant ***1*** constituant un bon groupe partant et favorisant une attaque nucléophile en α du ferrocène. Le cyanure de sodium a été utilisé comme nucléophile de façon à obtenir le ferrocénylacétonitrile ***2***. Le nitrile de cet élément est ensuite hydrolysé à la potasse alcoolique pour former l'acide carboxylique correspondant ***3***, puis réduit ensuite au $LiAlH_4$ de façon à obtenir l'alcool primaire ***4***. Après tosylation de cet alcool, conduisant au composé ***5***, le ferrocényléthylazide ***6*** est obtenu par l'attaque nucléophile de l'azoture de sodium.

C.2.b. Synthèse d'un élément d'ancrage Alkyl thiol sur surface d'or

De l'étude précédente, le DTPA (dithiolphosphoramidite) a été retenu pour sa stabilité sur surface d'or. En outre, ce composé commercial est compatible avec une voie de synthèse en phase solide, ce qui permet de simplifier radicalement la synthèse de l'élément d'accroche. Ainsi, un groupement DTPA a été incorporé par chimie supportée, obtenu par couplage de DTPA en solution sur une colonne CPG commerciale 1µmol fonctionnalisé par du DTPA (selon la méthode développée dans la partie C.1.b.)

La réalisation de l'élément d'ancrage est terminée par le couplage de l'héxynyl phosphoramidite à l'entité *bis*-DTPA obtenue. Le composé bis(DTPA)héxynyle ***7*** est ensuite décroché par action de l'ammoniaque à 30 %, et caractérisé par spectroscopie de masse ESI (SM (ESI-) : 829,0 ($[M^{3-} + 2H]^-$)).

Toutefois, à cause de la faible molarité de la colonne utilisée, il n'existe pas de méthode simple de quantification pour le composé ***7***. Des tentatives d'analyse par RMN ont échouée.

Il a donc été synthétisé un second dérivé bis(DTPA) au sein duquel est inséré une base thymine (Figure I.C.4.), selon un protocole expérimental similaire. Le composé bis(DTPA) thymine-héxynyle ***8*** est ainsi obtenu.

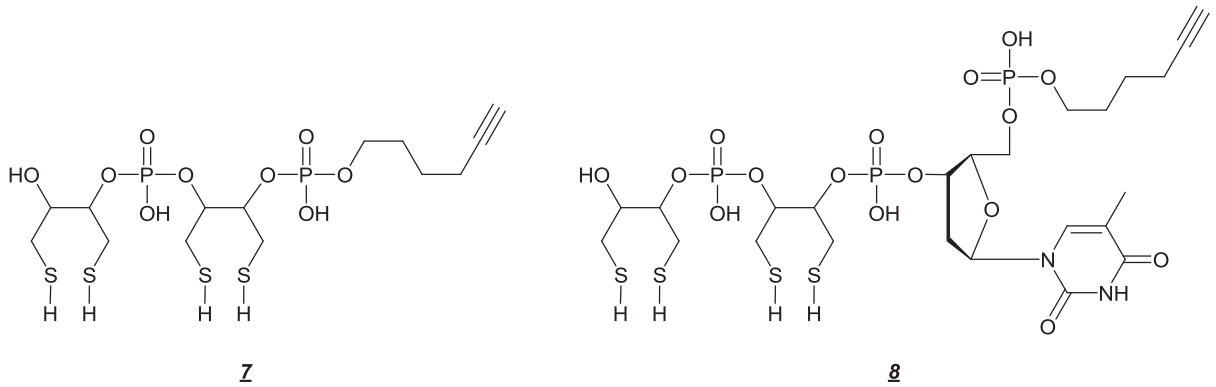


*Figure I.C.4. : Structure des dérivés bis(DTPA)héxynyle **7** et bis(DTPA) thymine-héxynyle **8***

Ce composé acquiert ainsi des propriétés d'absorbance grâce à la thymine, ce qui lui permet d'être dosé par spectrométrie UV-visible. En outre la chromatographie liquide haute performance (CLHP) du composé ***8*** directement décroché de la CPG ne montre qu'un seul pic de rétention. Il ne semble pas nécessaire d'ajouter une étape de purification avant utilisation de ces composés sur or (Figure I.C.5.). Après dosage du composé ***8***, un rendement global de 80 % pour la synthèse de ces deux composés a été attribué.

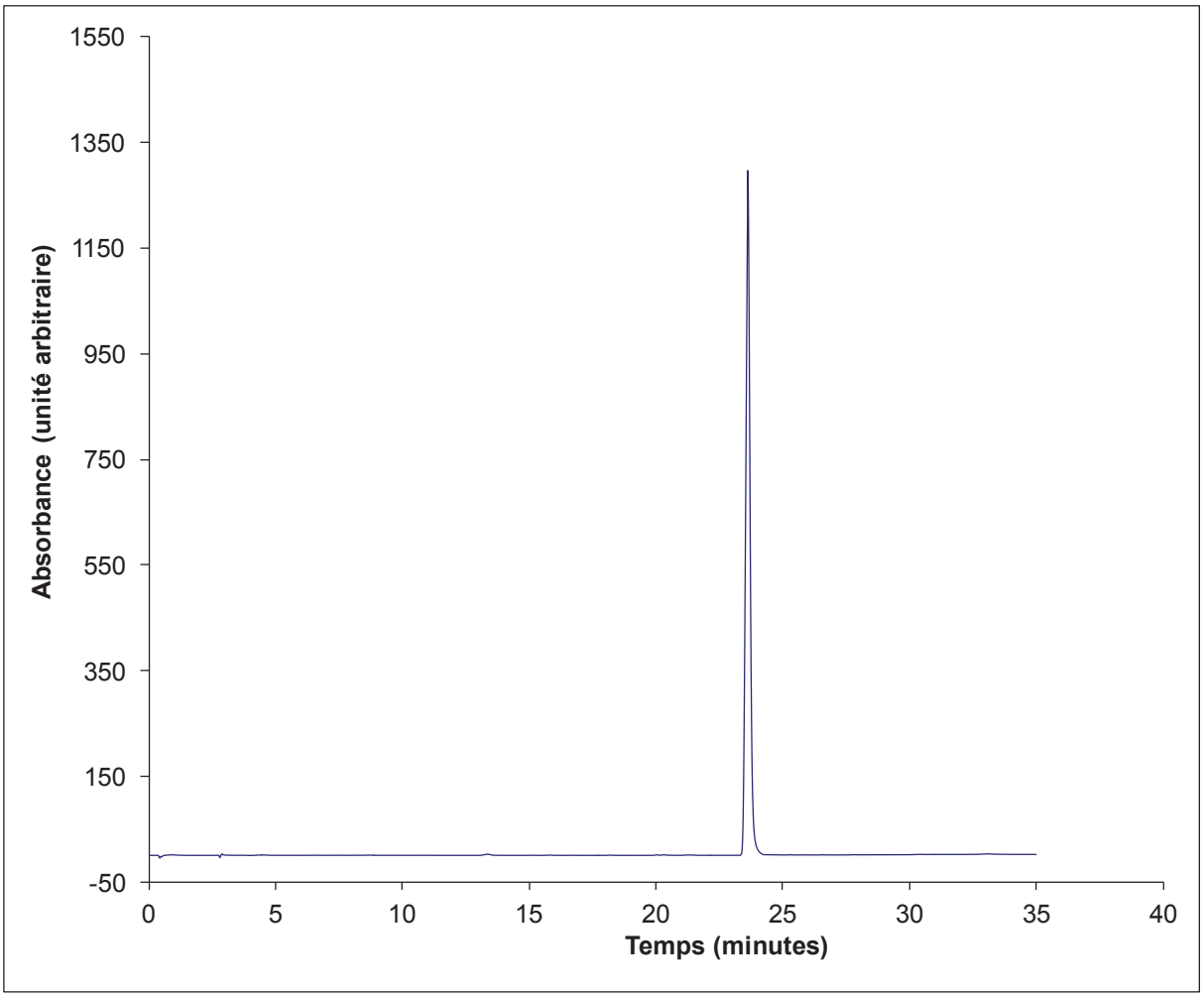


*Figure I.C.5. : Chromatogramme CLHP du bis(DTPA)thymine-héxynyle **8** décroché de la CPG. Colonne LiChrospher 100 RP18 5 µm, 60°C. Gradient en acétonitrile de 0 à 30% en 25 minutes dans du tampon TEAAc 50 mM pH=7*

D. Conclusion

La conception de microsystèmes permettant une détection multiplexée et sans-marquage de biomolécules est nécessaire pour le développement de méthodes de diagnostic fiables et rapides. Dans cette perspective, l'électrochimie se révèle être une technique de choix, celle-ci étant à la fois sensible et adaptée aux problématiques d'intégration et de miniaturisation posées par les microsystèmes de multidétection. Elle permet en outre de contrecarrer les problèmes de coûts d'équipements et de portabilité des appareils de détection.

En regard de la littérature, la stratégie d'adressage par la chimie « click » semble être très prometteuse et a été développée pour l'ancrage de biomolécules sur des électrodes d'or. La méthode des monocouches autoassemblées d'alkylthiols sur surface d'or est la méthode de choix pour fonctionnaliser des surfaces or. Elle a été préférée pour immobiliser l'amorce fonctionnelle permettant la chimie « click » sur support, car elle offre un rendement de greffage efficace. Cette amorce est constituée de quatre fonctions thiols afin de l'immobiliser de façon stable sur la surface des électrodes.

Deux molécules précurseurs de la chimie « click » électrocatalysée ont été synthétisées.
Une première entité chimique de petite taille, constituée de deux groupements dithiol phosphate et d'un groupement héxynyle a été synthétisée par une voie en phase solide, et caractérisée : Le composé bis(DTPA)héxynyle. Un élément ferrocène modifié par un groupement éthylazoture a été synthétisé et caractérisé.

Ces substances permettront de développer le greffage électroactivé d'un ferrocène sur surface or. Cette étude permettra de déterminer les conditions expérimentales pour l'immobilisation d'une biosonde modifiée par un groupement azoture en 3' et de groupement ferrocène en 5'.
Ainsi, la chimie d'adressage va pouvoir être mise au point avant de l'appliquer à l'immobilisation de biomolécules.

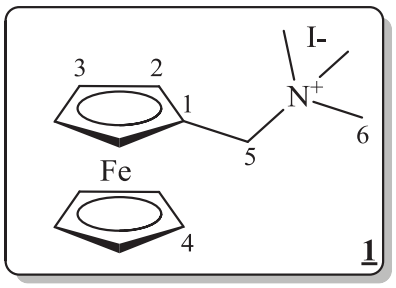
E. Partie expérimentale

Les réactifs nécéssaires à la chimie dite aux “phosphoramidites” et les solvant utilisés pour la synthèse automatisée ont été achetés Glen Research (Sterling, Virginia). La Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (TBTA), Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP), ainsi que tous les autres solvants et réactifs chimiques ont été obtenus chez Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). La Célite et le gel de silice ont été acquis auprès de Fluka (France).

E.1. Synthèse du ferrocène éthyle azide

E.1.a. Synthese du N,N,N-trimethyl-1-ferrocénylmethanaminium iodide (**1**)

2.5316 g (10.43 mmol) de N,N-dimethylaminomethylferrocène sont dissous avec 3.5 mL (512.2 mmol) d’iodure de méthyle dans 50 mL de méthanol, sous une atmosphère inerte d’argon. Après 3 heures d’agitation à temperature ambiante, la solution est concentrée sous vide, puis le résidu repris dans un minimum de méthanol et 400 mL d’éther diéthylique, afin de faire précipiter le composé. Après filtration sur büchner, le produit est rincé avec de l’éther diéthylique froid. 3.8502g (10.00 mmol, 96%) du composé **1** sont ainsi obtenus sous la forme d’une poudre couleur jaunâtre.



RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 3.32 (s, 9H, H_6), 4.31 (s, 5H, H_4), 4.34 (d, 2H, H_2), 4.59 (m, 2H, H_3), 4.92 (s, 2H, H_5 et $H_{5'}$).

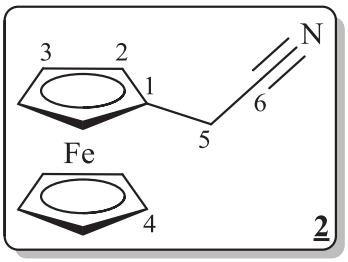
SM (ESI+) : 199,0 ($FcCH_2^+$) 257.9 ($[M + H]^+$).

Formule brute : $C_{14}H_{20}FeN^+$ masse calculée 258.1

masse trouvée 258.9.

E.1.b. Synthèse du 2-ferrocénylacétonitrile **2**

3,3215 g (66,43 mmol) de cyanure de sodium sont dissous dans 30 mL d'eau. 2,3793 g (6,18 mmol) du composé **1** sont ajoutés au milieu. Le ballon est alors surmonté d'un réfrigérant et le milieu est porté à reflux, sous agitation, pour la nuit. Le milieu est ensuite laissé revenir à T ambiante, le précipité noir obtenu est filtré sur fritté de porosité 3. Le milieu est ensuite extrait par trois fois 50 mL d'éther diéthylique. Les phases organiques sont rassemblées et lavées par 35 mL d'eau, puis évaporée à sec sous vide de pompe à palette. 1,0238 g (4,55 mmol, 74%) d'un solide cristallin marron clair est obtenu.



RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 3.42 (s, 2H, H_5 et $H_{5'}$), 4.18 (d, 2H, H_2), 4.24 (s, 5H, H_4), 4.26 (d, 2H, H_3).

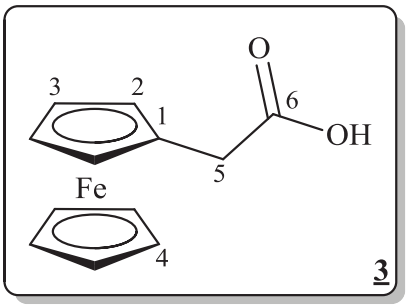
SM (ESI+) : 199,0 ($FcCH_2^+$) 224,9 ($[M + H]^+$)

Formule brute : $C_{12}H_{11}FeN$ masse calculée 225,1

masse trouvée 225,9.

E.1.c. Synthèse de l'acide 2-Ferrocénylacétique **3**

929,6 mg (4,12 mmol) du produit **2** sont dilués dans 9 mL d'éthanol et mélangés à 23 mL de potasse 2 M dans l'eau. Le mélange est porté à reflux pendant la nuit. Le milieu est ensuite concentré à sec, puis dilué dans 25 mL d'eau. Le milieu est extrait par deux fois 10 mL d'éther diéthylique. 23 mL d'une solution de HCl à 2 M (4,9 mL d'HCl 37% dans 25,1 mL d'eau) sont ajoutés goutte à goutte sous agitation dans la phase aqueuse. Le précipité ainsi formé a été filtré sur fritté et lavé à 3 reprises avec 12 mL d'eau froide. Les ajouts continus d'acide à 2M dans la phase aqueuse sont poursuivis jusqu'à disparition du trouble de celle-ci. Le second précipité obtenu est filtré, lavé avec de l'eau froide, puis rassemblé avec le précédent. 812,0 mg (3,34 mmol, 81 %) d'une poudre jaune sont obtenus.



RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 3.40 (s, 2H, H_5 et $H_{5'}$), 4.08 (s, 7H, H_3 et H_4), 4.05 (s, 2H, H_2).

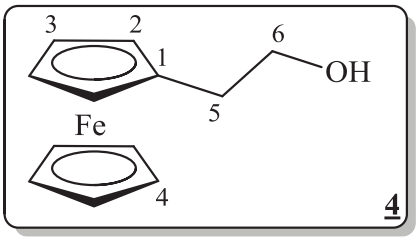
SM (ESI+) : 199,0 ($FcCH_2^+$), 243,0 ($[M + H]^+$)

Formule brute : $C_{12}H_{12}FeO_2$ masse calculée 244,0

masse trouvée 244,0

E.1.d. Synthèse du 2-Ferrocényléthanol **4**

A une suspension de 247,0 mg (6,5 mmol) de $LiAlH_4$ dans 20 mL de THF anhydre, dans un bain de glace à 0°C, est ajouté, goutte à goutte, 792,2 mg (3,25 mmol) du composé **3** dissous dans 15 mL de THF anhydre. Le mélange est ensuite laissé à revenir à température ambiante, puis porté à reflux pendant 24h. En fin de réaction, le milieu réactionnel est placé dans un bain de glace à 0°C, et 20 mL d'eau sont ajoutés goutte à goutte. Après filtration sur célite, le mélange est extrait trois fois avec 35 mL d'éther diéthylique. Les phases organiques sont rassemblées puis concentrées. 606,0 mg (2,42 mmol, 75%) d'un solide orange cristallin sont obtenus.



RMN ^{1}H : (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm)=2.68 (s, 2H, H_5 et $H_{5'}$), 4.05 (s, 9H, H_2, H_3 et H_4), 4.12 (s, 2H, H_6 et $H_{6'}$).

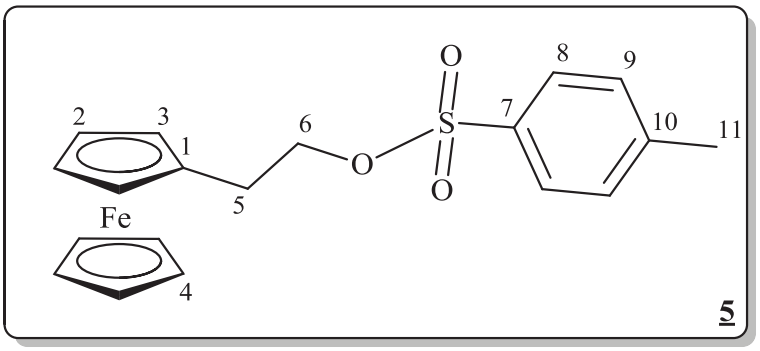
SM (ESI+) : 199,0 ($FcCH_2^+$), 213,0 ($FcCH_2CH_2^+$), 229,0 ($[M + H]^+$)

Formule brute : $C_{12}H_{14}FeO$ masse calculée 230,0

masse trouvée 230,0.

E.1.e. Synthèse du 2-Ferrocényléthan 4-méthylbenzènesulfonate **5**

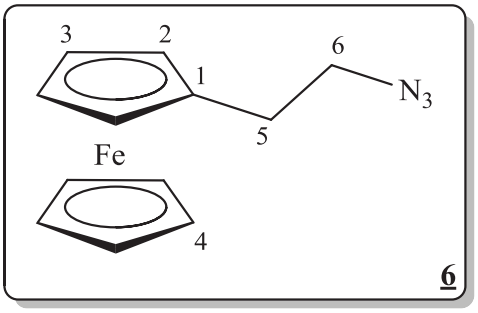
549,8 mg (1,69 mmol) de **4** et 600 µL (4,30 mmol) de TEA sont dilués dans 3,5 mL de dichlorométhane. Le mélange est plongé dans un bain de glace à 0°C et 988,1 mg (5,19 mmol) de *p*-TsCl sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation 24h à 40°C. Le milieu réactionnel est alors noir. En fin de réaction, le mélange est dilué dans 15 mL d'éther diéthylique et successivement lavé avec 10 mL d'eau, 5 mL d'une solution HCl à 0,4 M, 5 mL d'une solution aqueuse saturée de bicarbonate et 5 mL d'une solution aqueuse saturée de NaCl. La phase organique est ensuite concentrée à sec. Le résidu obtenu est purifié sur colonne montée dans un mélange cyclohéxane/triéthylamine 99/1 et élué par un gradient de 0 à 10 % d'acétate d'éthyle dans le cyclohéxane.
784,2 mg (2,05 mmol, 82%) d'un solide orange ont été récoltés.



RMN ^{1}H : (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 2.43 (s, 3H, H_{11}), 2.68 (t, 2H, H_5 et $H_{5'}$), 4.03 (d, 2H, H_2), 4.06 (s, 7H, H_3 et H_4), 4.12 (t, 2H, H_6 et $H_{6'}$), 7.32 (d, 2H, H_9), 7.76 (d, 2H, H_8).
SM (ESI+) : 213,0 ($FcCH_2CH_2^+$), 383,0 ($[M + H]^+$)
Formule brute : $C_{19}H_{20}FeO_3S$ masse calculée 384,1
masse trouvée 384,0.

E.1.f. Synthèse du 2-azidoéthyl ferrocène **6**

166,5 mg (0,43 mmol) du composé **5** et 292,8 mg (4,51 mmol) d'azoture de sodium sont dissous dans 2 mL d'eau et 2 mL d'acétonitrile. Le mélange est porté à reflux pendant une nuit. Le milieu réactionnel est ensuite refroidi à température ambiante et dilué dans 1 mL d'eau supplémentaire. Le mélange est extrait par 3 fois 5 mL d'éther diéthylique. La phase organique obtenue est lavée avec 2 mL d'eau, puis concentrée.
Le résidu est purifié sur gel de silice. La colonne est montée dans un mélange cyclohexane / triéthylamine 98:2. L'élution est faite dans un premier temps avec du cyclohéxane, permettant de récolter le produit **6**, puis dans un deuxième temps, l'élution est faite avec un mélange cyclohexane/ acétate d'éthyle 9:1, permettant de récupérer le réactif **5** qui n'a pas réagi. Les fractions contenant le produit **6** sont rassemblées et évaporées à sec à la pompe à palette.
88,5 mg (0,35 mmol, 81%) d'une huile marron/rouge-brique sont obtenus.



RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 2.62 (t, 2H, H_5 et $H_{5'}$), 3.36 (t, 2H, H_6 et $H_{6'}$), 4.10 (s, 4H, H_2 et H_3), 4.11 (s, 5H, H_4).
SM (ESI+) : 213,0 ($FcCH_2CH_2^+$), 254,0 ($[M + H]^+$)
Formule brute : $C_{12}H_{13}FeN_3$ masse calculée 255,1
masse trouvée 255,0.

E.2. Synthèse supportée des dérivés bis(DTPA)

Les synthèses automatisées *via* la chimie des phosphoramidites ont été réalisées sur un synthétiseur d'ADN/ARN Applied biosystems ABI 394 selon le programme décrit en annexe. L'ensemble des réactifs et solvants ont été chargés sur le synthétiseur et toutes les voies de synthèse ont été successivement amorcées *via* un programme de la machine.

Le dérivé bis (DTPA)héxynyle **7** est constitué de deux groupements 1,2-dithiane-4-ol-5-phosphate, et d'un groupement héxynyle. Une colonne DTPA-CPG (1µmol) a été utilisée comme support, et une incorporation successive d'un DTPA, avec un couplage de 6 min, puis de l'héxynyle phosphoramidite a été réalisée. Le composé est ensuite décroché de la CPG par un traitement à l'ammoniaque (30% massique) durant 12h à 60°C[159]. La phase aqueuse est ensuite séchée sous vide puis le produit recueilli et caractérisé par ESI-MS, puis directement utilisé pour les expériences d'électrochimie.

SM (ESI-) : 526,0 ($[M - H]^-$)

Formule brute : $C_{14}H_{23}O_9P_2S_4^-$ masse calculée 525,5

masse trouvée 525,0.

Pour estimer le rendement de synthèse du bis(DTPA)héxynyle, un composé similaire, le bis(DTPA)-thymidine-héxynyle a été synthétisé. Un protocole identique a été mené, avec l'insertion d'une thymidine phosphoramidite avant le groupement héxynyle. L'ajout de cette thymidine a permis de quantifié le bis(DTPA)héxynyle décroché de la CPG par spectrophotométrie UV. (quantification à 260 nm, ε_{260} = 8700 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$). Un rendement global de synthèse de 80% a été estimé de cette façon.

SM (ESI-) : 829,0 ($[M^{3-} + 2H]^-$)

Formule brute : $C_{24}H_{36}N_2O_{16}P_3S_4^-$ masse calculée 829,7

masse trouvée 829,0.

CHAPITRE II :ETUDE DE L'ELECTROFONCTIONNALISATION D'UNE SURFACE D'OR VIA LA CHIMIE DITE « CLICK »

A. Stratégie et mise au point de l'électrofonctionnalisation d'une surface d'or

Au cours de cette partie sera développée la méthode de la réaction de « click » électrocatalysée sur une électrode d'or. Toutefois, avant de s'employer à cette tâche, il est nécessaire de déterminer les conditions optimales du nettoyage de l'or, afin de s'assurer à la fois de la bonne conductivité de l'électrode et de la disponibilité de l'état de surface.

A.1. Activation de la surface d'or

Le nettoyage de l'électrode de travail se fait par une première étape de sonication de celle-ci dans une solution d'acétone. Elle est ensuite plongée dans une solution de piranha (H_2SO_4 / H_2O_2 70:30 v/v) durant une minute, rincée à l'eau puis positionnée sur la cellule de mesure. L'activation est réalisée en milieu basique[103]. Une série de balayages en potentiels jusqu'à une valeur fortement négative (-1,4V *vs ECS*) permet de produire de l'hydrogène à l'électrode par électrolyse de l'eau dans la soude (0,5 M). Cette activation maintient l'or sous forme réduite Au(0). La stabilisation du pic de réduction indique la fin du nettoyage de l'électrode (Figure II.A.1)

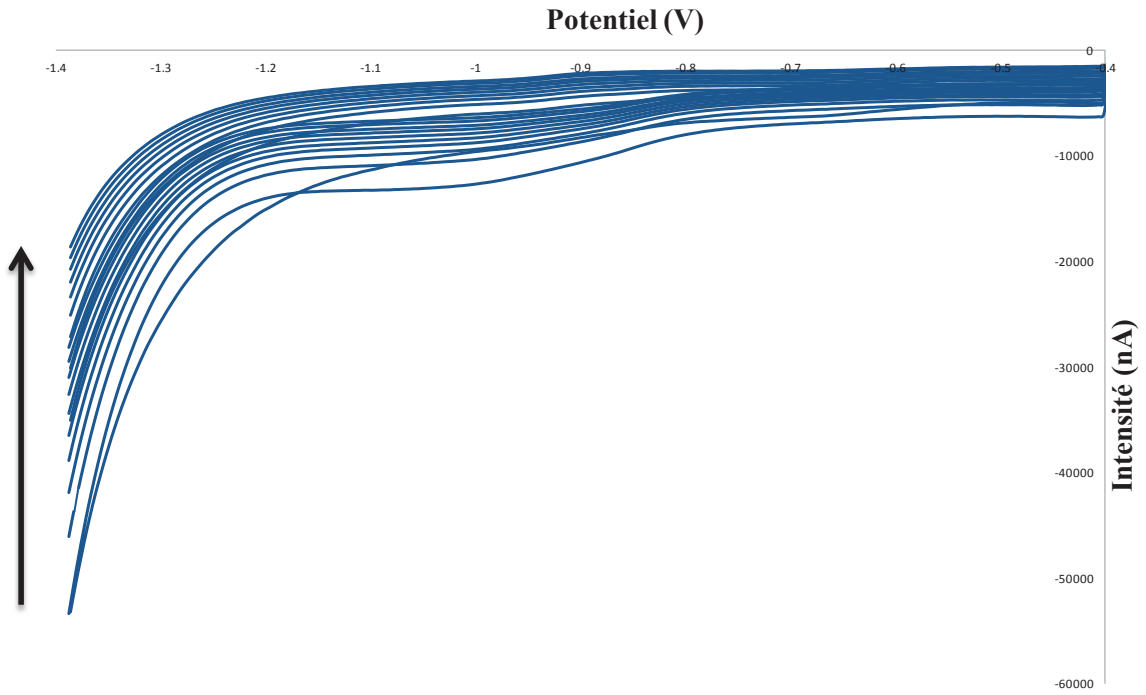


Figure II.A.1. : 10 cycles de voltampérométrie cyclique entre -400 mV et -1400 mV dans NaOH 0,5M. La pointe de la flèche indique le dernier cycle

Le contrôle des différentes étapes de ce nettoyage est mené par voltampérométrie cyclique (CV) dans une solution de ferri-ferrocyanure (10 mM dans l'électrolyte d'analyse PBE : solution tampon pH 6,4 constituée de phosphate de sodium à 20mM, et de perchlorate de sodium à 250 mM). L'électrode ainsi nettoyée donne un signal électrochimique correspondant à l'oxydation et à la réduction des couples mis en jeu. Dans le cas des électrodes incorrectement nettoyées, ce signal n'est pas enregistré, en raison des propriétés isolantes de la résine protectrice dont la composition chimique ne nous a pas été communiquée (Figure II.A.2.).

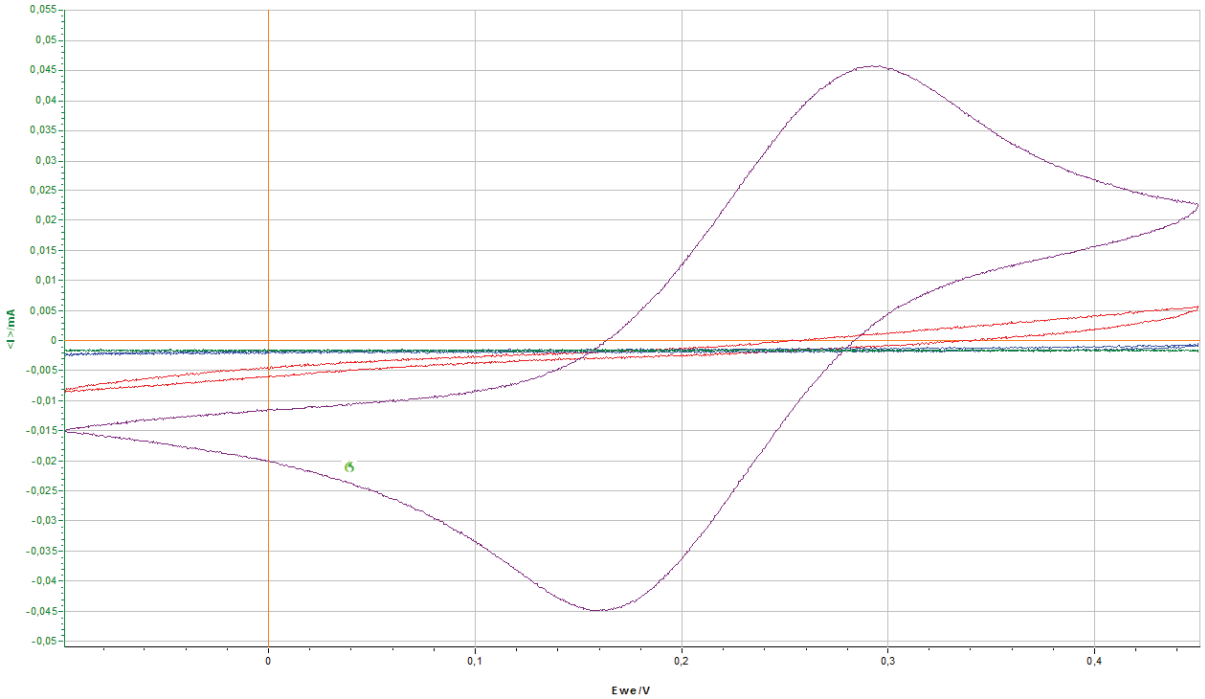


Figure II.A.2. : Analyse en voltampérométrie cyclique d'une solution de ferri-ferrocyanure 10 mM dans l'électrolyte d'analyse PBE.

-en bleu : électrode nettoyée par sonication dans l'acétone

-en vert : électrode nettoyée par une solution de piranha

-en rouge : électrode nettoyée par une solution de piranha puis par sonication dans l'acétone

-en violet : électrode nettoyée par sonication dans l'acétone, puis par une solution de piranha, et enfin activée en milieu basique

Il est clair que c'est l'étape de sonication dans l'acétone qui permet d'éliminer la résine protectrice de l'or. L'étape au piranha et à la soude permet de nettoyer et d'activer l'or.

Il existe aussi des méthodes d'activation en milieu acide[160] qui sont couramment utilisées pour l'immobilisation d'alkylthiols. Néanmoins, la résine protectrice est de type ECI : résine

photosensible thermodurcissable positive. Les agents alcalins se montrent bien plus performants quant à l'élimination de cette résine. La méthode basique est donc retenue, et présente une assez bonne reproductibilité de la réponse électrochimique de l'électrode.

A.2. Détermination du potentiel de réduction du cuivre (II)

Les propriétés électrochimiques sont grandement influencées par les environnements chimiques des groupements redox. En outre, dans le cas des métaux de transition, la géométrie spatiale de coordination est intrinsèque au degré d'oxydation du métal. Une modification de la conformation spatiale entraine nécessairement une modification des potentiels d'oxydoréduction de ces derniers. Il sera donc judicieux de convenir de la meilleure géométrie de coordination possible, afin de faciliter l'obtention de Cu(I) nécessaire à la réalisation de la chimie « click ».

A.2.a. Rappels sur les propriétés de coordination du cuivre

Le cuivre (Z=29) est un élément de transition appartenant au même groupe du tableau périodique que l'or et l'argent. Il fait partie de la première série des métaux de transition. Ses composés sont caractérisés par la présence de niveaux électroniques 3d incomplets. Ce métal a quatre états d'oxydation : Cu(0), Cu(I), Cu(II) et Cu(III) (plus rare) [161].
En solution, le cuivre se retrouve généralement à deux degrés d'oxydation : I et II. Le Cu(I) est diamagnétique, de configuration électronique (d^{10}). On le retrouve le plus souvent avec une géométrie linéaire dans sa configuration de coordination. Le Cu(II) est quant à lui paramagnétique, de configuration électronique (d^9). Il adopte plus généralement une géométrie carrée-plane dans sa configuration de coordination. Cependant, on découvre de plus en plus des complexes de Cu(II) ayant une coordinence cinq, correspondant à une pyramide à base carrée. Le Cu(II) forme aussi des complexes octaédriques et tétraédriques. Cependant, la géométrie octaédrique n'est pas la plus stable pour le Cu(II), la distorsion de cet octaèdre conduisant à un gain énergétique considérable. Cette distorsion se traduit par une levée de la dégénérescence, c'est l'effet Jahn-Teller : le Cu(II) a neuf électrons dans sa sous-couche d et la configuration électronique des complexes formés par celui-ci est $(t_2g)^6 (eg)^3$. Les orbitales eg étant dégénérées, la stabilisation des complexes formés se fait par la déformation de l'octaèdre, afin de lever la dégénérescence, menant à une configuration plus stable. On observe, de ce fait, un allongement des liaisons axiales Cu-L et le gain énergétique ΔE est

obtenu par abaissement de la symétrie (symétrie octaédrique vers une symétrie quadratique)[161].

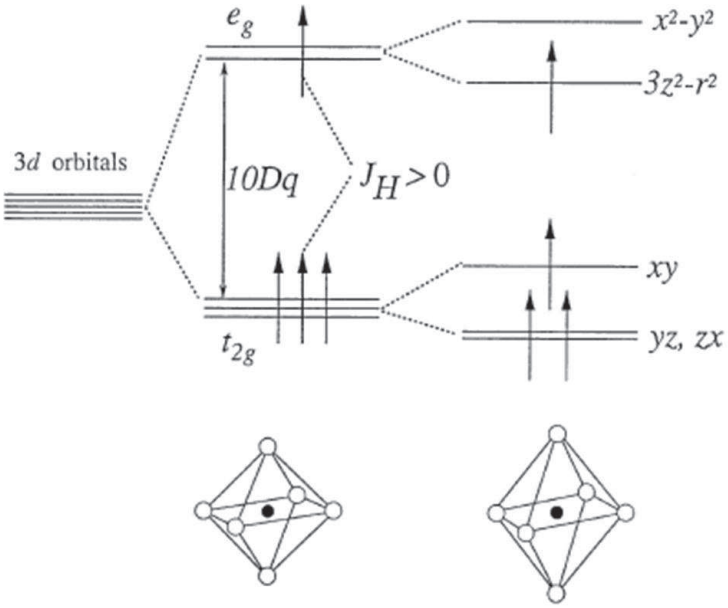


Figure II.A.3. : Illustration de la déformation du polyèdre de coordination par l'effet de Jahn-Teller

De nombreuses études ont été menées sur les propriétés électrochimiques d'un large nombre de complexes de cuivre (II) acycliques et macrocycliques, tous dérivés de bases de Schiff. Ces investigations ont révélé que les propriétés redox de ces complexes sont fortement influencées par les facteurs électroniques et structuraux[162-163]. Dans chacun des cas, la complexation du Cuivre II par une base de Schiff aboutit à une évolution des potentiels redox. L'équipe de Zolezzi et coll.[164] a pu notamment corréler l'évolution de la dérive de ces potentiels en fonction de l'électroattractivité des substituants situé en σ de la base de Schiff.

A.2.b. Détermination du potentiel optimal de réduction de Cu(II) en Cu(I)

Les travaux de Donnelly et coll.[165] décrivent de façon exhaustive la réduction de Cu(II) en Cu(I), en présence d'un ligand spécifique : le tris(benzyltriazolylméthyl)amine (TBTA). Le TBTA chélate un sel de Cu(II) sous la forme du cation $[Cu^{II}Cl\ (TBTA\text{-}k^4\text{-}N,N^3,N^{3'},N^{3''})]^+$. Ce cation peut être réduit pour donner du cuivre à l'état +I sous l'application d'un potentiel inférieure à 0 V *vs* Fc/Fc^+.

Dans ce travail, la détermination du potentiel optimal de réduction du cuivre (II) en présence de TBTA est effectuée par voltampérométrie cyclique dans une solution de sulfate de cuivre (10mM) et de TBTA (10 mM) dissous dans un mélange eau/DMSO 1:1, à 0,1M en NaCl. Une

vague rédox réversible est enregistrée lorsque l'expérience est conduite sur une électrode d'or "nue" de toute fonctionnalisation, avec une fenêtre d'analyse comprise entre -1V à 0,2V. Le potentiel de demi-vague observé est de l'ordre de -140 mV, avec un courant minimum enregistré à -260 mV (Figure II.A.4.).

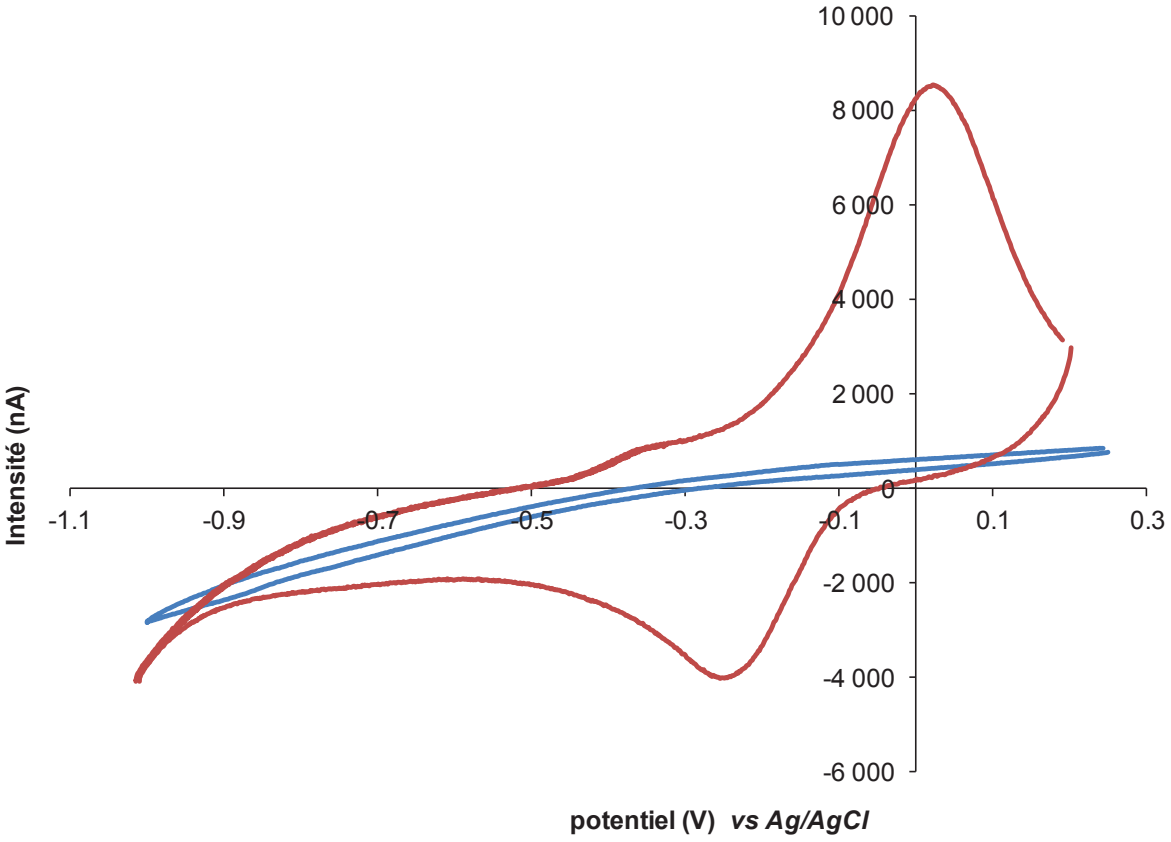


Figure II.A.4. : Voltampérogrammes cycliques (vitesse de balayage de 0,05 V.s^{-1}) enregistrés sur électrode d'or nue dans une solution eau/DMSO 1:1, à 0,1M en NaCl; la courbe rouge est tracée pour une solution de 10 mM en sulfate de cuivre et de TBTA; la courbe bleue est obtenue pour une solution de 10 mM de sulfate de cuivre

Cette vague rédox correspond à la réduction réversible du cuivre II en cuivre I en présence de TBTA. Cette observation est en accord avec la littérature pour une solution de cuivre II dans le DMSO [165]. L'utilisation du TBTA facilite donc la réduction de Cu(II) en Cu(I). Lors d'une étude parallèle décrite par Hong et coll. [166], un potentiel de demi-vague à été enregistré à +60 mV pour un composé similaire au complexe TBTA/Cu(II), présentant de meilleures propriétés d'hydrosolubilité.

Le voltampérogramme cyclique obtenu avec une couche de passivation de type SAM par du mercaptopropanol sur électrode d'or, présente une vague de réduction irréversible[149]. Ainsi, Lors de l'analyse en présence de thiols adsorbés à la surface, le potentiel négatif appliqué ne doit pas exéder -500 mV afin d'éviter toute détérioration de la couche de passivation *via* une réduction des thiols menant à la désorption de ces derniers. Par ailleurs, nous avons pu identifier des traces de Cuivre par spectroscopie XPS sur une électrode de travail après avoir appliqué un potentiel de -500 mV pendant 2 h en présence de $CuSO_4$ et de TBTA puis avoir effectué un lavage efficace de la surface (Figure II.A.5.). Les pics centrés à 932 eV observés sur les spectres bleus de la figure correspondent aux energies de liaisons des niveaux Cu $2p_{3/2}$ selon la littérature[167].

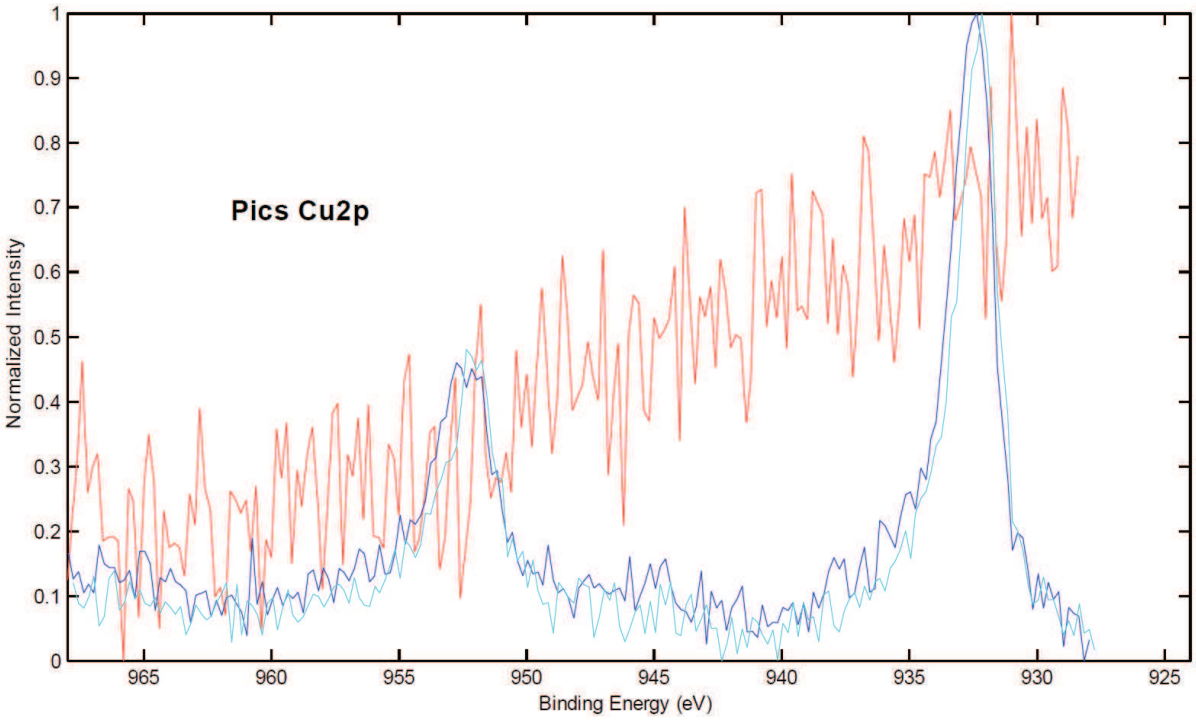


Figure II.A.5. : Spectres XPS haute résolution d'électrodes d'or

-En rouge : spectre d'une électrode d'or non traitée

- En nuance de bleu : Spectres obtenus lors de l'application durant 2h d'un potentiel de -500 mV dans une solution de 10 mM en KH_2PO_4 et Na_2HPO_4, 125 mM Na_2ClO_4, DMSO/H_2O (50:50 v/v), 10 mM $CuSO_4$ et 10 mM TBTA, puis lavage de l'électrode dans de l'eau

Il est donc supposé que l'application d'un potentiel aux alentours de -500 mV ne permet pas de maintenir une concentration suffisante de Cu(I) à l'électrode puisque du Cu(0) pourait être déposé sur l'électrode de travail. Cette quantité diminuante de Cu(I) est donc inefficace pour la catalyse de la réaction de "click".

Il sera donc retenu qu'un potentiel inférieur à -300 mV risquerait d'induire un dépôt de Cuivre métallique sur la surface d'or. Ce dépôt est non souhaité car il diminue la surface disponible pour l'immobilisation en masquant une partie de la surface de l'électrode d'or. En outre, la concentration en Cu(I) disponible diminue à la surface. Pour le reste de l'étude, un potentiel de -300 mV sera utilisé pour réaliser la réduction de Cu(II) en Cu(I) en présence de TBTA.

A.3. Procédure de l'électrofonctionnalisation d'une surface d'or par une entité ferrocène-azide

Une monocouche alkylthiol, constituée d'un mélange de mercaptopropanol et de bis (DTPA)héxynyle **7**, dont la synthèse a été décrite dans le chapitre I, est préparée sur électrode d'or par greffage successif des 2 composés. L'expérience se focalise sur la formation *in situ* de l'espèce active de Cu(I), par la réduction de sulfate de cuivre, pour catalyser la réaction de « click » avec le ferrocene ***6*** (Cf. chapitre I). Pour ce faire, un potentiel de -300 mV *vs Ag/AgCl* a été appliqué à l'électrode de travail afin de permettre la réduction de Cu(II) en présence de TBTA[149] (Figure II.A.6)

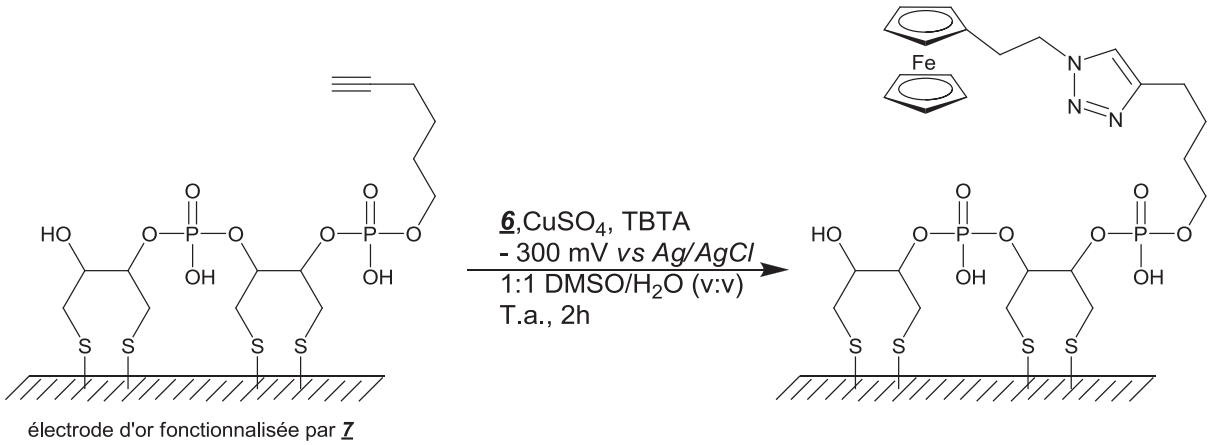


*Figure II.A.6. : Réaction de « click » réalisée sur électrode d'or fonctionnalisée par le bis(DTPA)héxynyle **7** avec l'azoture de ferrocène **6***

L'évolution du signal est enregistrée par voltampérométrie cyclique (Figure II.A.7.)

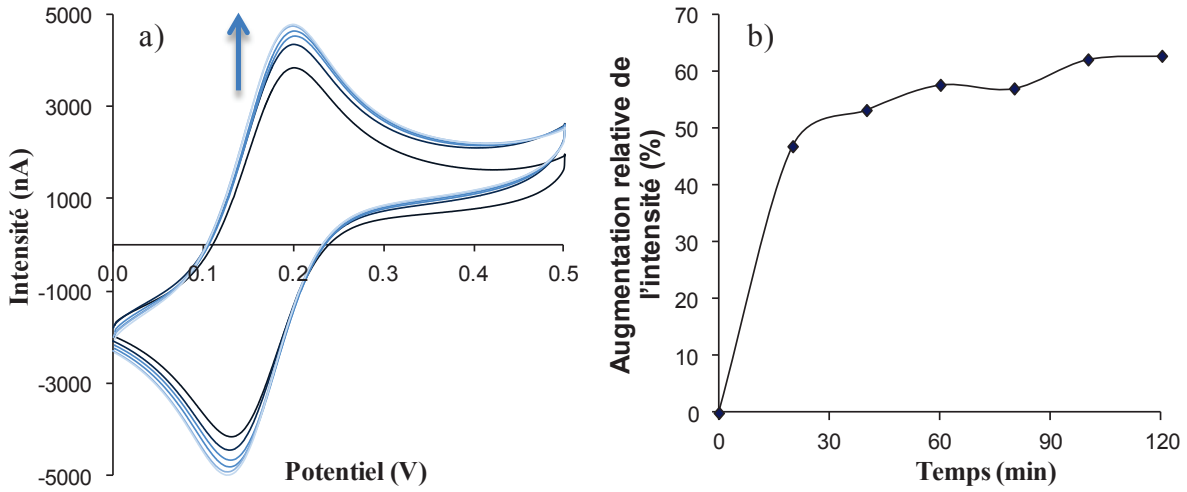


Figure II.A.7. : Cinétique de la réaction de « click », suivie par voltampérométrie cyclique (v = 0,05 V.s^{-1}) enregistrée dans un mélange DMSO/Tampon PBE 50 : 50 (v/v).

*a)Évolution du signal électrochimique de l'électrode fonctionnalisée par **7**, dans une solution de $CuSO_4$, TBTA et **6** à 10 µM*

b) Intensité du courant enregistrée à E_{pa} (potentiel d'oxydation) au cours du temps

La réponse électrochimique du ferrocène (E_{pa} = 0,20 V and E_{pc} = 0,16 V *vs Ag/AgCl*) s'accroît progressivement puis atteint un plateau. L'augmentation de l'intensité du signal est observée lorsque le potentiel appliqué est de -300 mV. Une fois le signal du ferrocène stabilisé, la réaction de « click » est arrêtée. L'électrode est soigneusement nettoyée avec successivement de l'eau, de l'éthanol, de l'acétone, et à nouveau de l'eau pour s'assurer de désorber toute trace de cuivre, de TBTA ou de ferrocène **6** de l'électrode d'or. L'électrode est ensuite plongée dans la solution tampon PBE. Il est alors procédé à la détection du ferrocène greffé sur la surface (Figure II.A.8.). Pour confirmer ce résultat, un premier contrôle est effectué en appliquant un potentiel de +250 mV *vs Ag/AgCl* sur une électrode d'or témoin dans les mêmes conditions de greffage que précédemment. Un seconde expérience témoin est menée sous un potentiel négatif, et les mêmes concentrations en réactifs, mais avec une électrode d'or fonctionnalisée par une monocouche de mercaptopropanol (absence du dérivé bis(DTPA)héxynyle sur la surface).

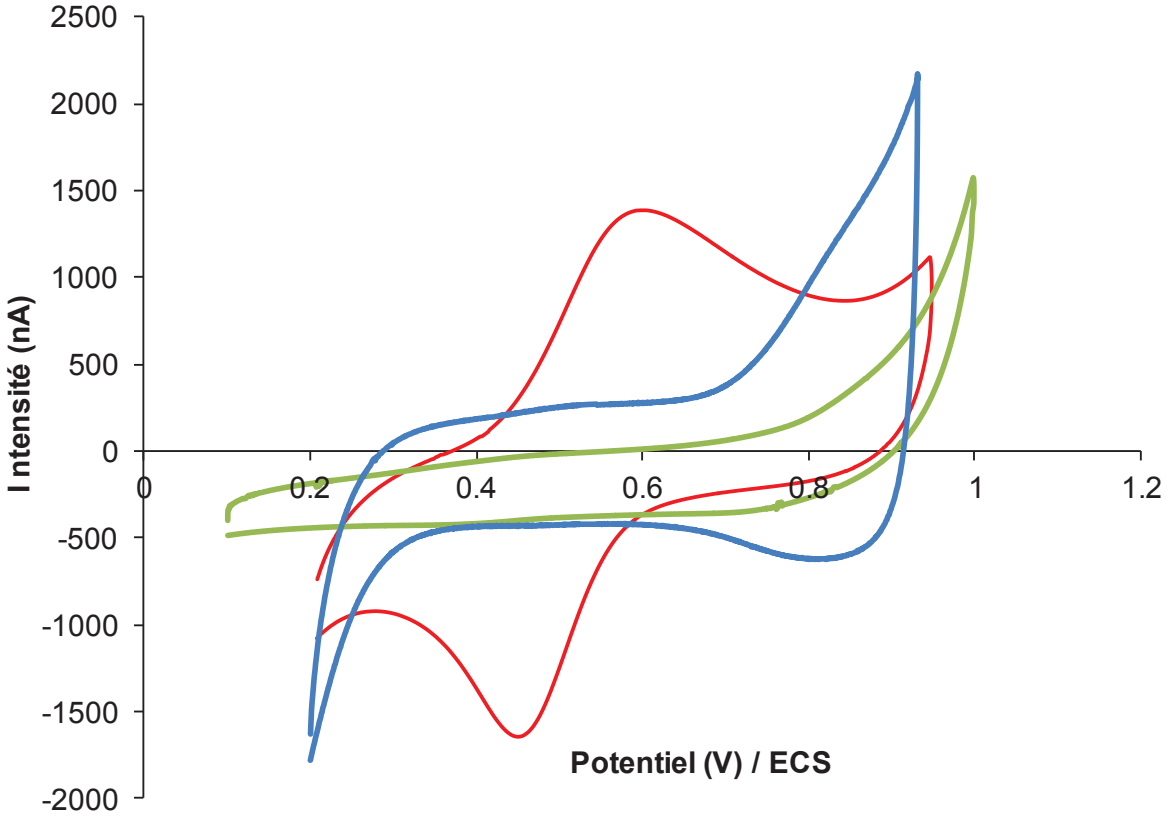


Figure II.A.8. : CV (v = 0,1 V.s^{-1}) enregistré sur une électrode d'or fonctionnalisée avec le dérivé bis(DTPA)héxynyle 7, après la réaction de « click »

-en rouge : avec un potentiel maintenu à -300 mV vs Ag/AgCl

-en bleu : avec un potentiel maintenu à + 250mV vs Ag/AgCl

-en vert : avec un potentiel maintenu à -300 mV vs Ag/AgCl, en absence de 7 sur électrode.

Les deux expériences témoins ne montrent aucune réponse électrochimique du ferrocène après la réaction de « click ».

Il est à noter que l'application du potentiel de +250 mV ne semble pas détériorer la monocouche de l'électrode. En effet, il est possible de réutiliser l'électrode pour réaliser la réaction de « click » électrocatalysée à -300 mV *vs Ag/AgCl* en présence des réactifs adéquats. Le ferrocène se greffe à l'électrode d'or et donne un signal équivalent à ce qui a été enregistré précédemment.

A.4. Détermination des propriétés et des constantes caractéristiques électrochimiques du système redox immobilisé sur électrode d'or

A.4.a. Taux de recouvrement de l'électrode et rendement de réaction

Afin d'établir le rendement de la réaction de « click » sur surface, la synthèse du monomère bis(DTPA) hexyl-1,2,3-triazol-3-éthyl ferrocène ***9*** a été effectuée en dehors de la cellule électrochimique. Le composé est synthétisé, purifié, puis greffé sur électrode d'or, afin de visualiser le signal maximal du ferrocène. Ce signal servira de référence pour la détermination d'un rendement de « click ». Le monomère ***9*** est obtenu par la réaction de cycloaddition CuAAC dans une solution contenant de sulfate de cuivre (2,5 mM) et du TBTA (1 mM) dans un mélange eau/DMSO (50 :50 , v/v), en utilisant de l'ascorbate de sodium (5mM) communément réducteur du Cu(II) en Cu(I)[168]. Le composé ***9*** ainsi formé est caractérisé par spectroscopie de masse ESI, puis est greffé directement sur la surface d'or (Cf. partie expérimentale). La surface recouverte par l'entité ferrocène est ainsi calculée par l'intégration de l'aire du pic d'oxydation obtenue par CV à une vitesse de balayage de 0,1 $V.s^{-1}$ ($I = dQ/dt$). La valeur résultante donne une valeur de charge Q (mC), permettant de calculer le taux de recouvrement Γ (mol cm^{-2}) en utilisant la loi de Faraday (voir équation I.5 en Annexe A). On obtient ainsi la relation[169] :

$$\Gamma = Q/(n\ F\ A) \qquad \text{Equation II.1}$$

Où n est le nombre d'électrons échangés par molécules redox, F est la constante de Faraday et A est la surface en cm². Les taux de recouvrement de ***9*** ont été calculés pour différents temps d'immobilisation de l'alkylthiol sur la surface d'or. Etonnamment, la fonctionnalisation est optimale pour un temps de réaction de 4 jours, le résultat obtenu après 5 jours de greffage se révelant être moins bon. Dans la littérature, le temps d'immobilisation sur or sont généralement de l'ordre de 16 h[30, 90]. Le temps de greffage anormalement long du composé ***9*** s'explique ici par la faible concentration utilisée. Dans l'étude, une concentration de 40 µM est utilisée, alors qu'une concentration classiquement supérieure à 500 µM est utilisée dans la littérature. La même concentration a été utilisée pour le greffage du composé ***7***.

De ces résultats, la valeur de $\Gamma = 1{,}27\ 10^{-9}$ mol.cm^{-2} est utilisée comme valeur maximale pour le calcul du rendement de « click ». Le rendement de greffage est fortement influencé par la concentration de l' azidoéthyl ferrocène ***6*** dans le milieu réactionnel (Figure II.A.9).

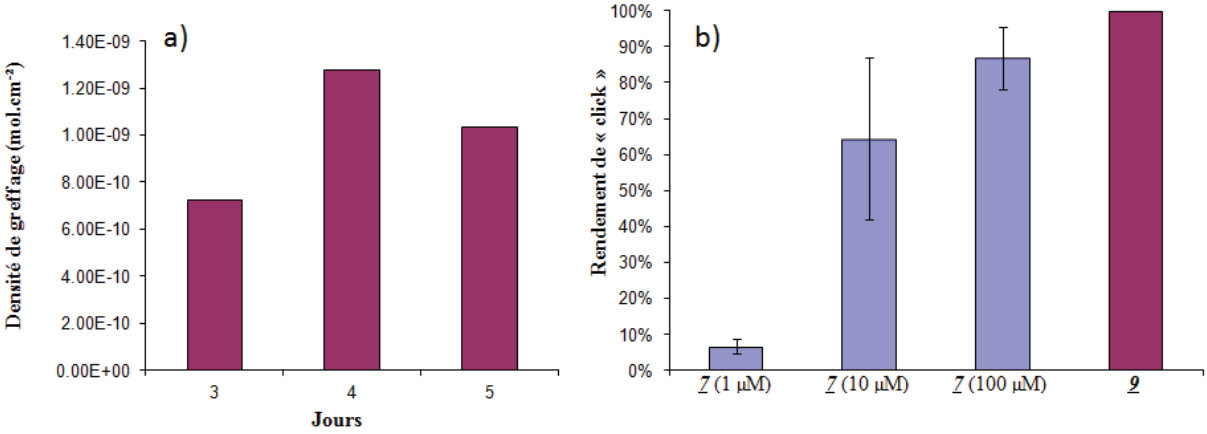


Figure II.A.9. :

*a) taux de recouvrement des électrodes d'or en fonction du temps de greffage de **9***

*b)Rendement de couplage de **7** et de **6** par réaction de « click » électrocatalysée en fonction de la concentration de **6** . Le greffage du dérivé thiol **7** est mené durant 4 jours sur la surface d'or. La valeur maximale de taux de recouvrement obtenue avec **9** est utilisé comme référence pour le calcul du rendement de « click ».*

Au cours des expériences, il a été établi que la variation de concentration de TBTA ou de sulfate de cuivre, n'impactait en rien le rendement global de la réaction. Comme on peut le voir sur la figure II.A.9. b), le rendement de « click » est fonction de la concentration en ferrocène. Des réponses très différentes ont été données par le système pour les 3 concentrations (1 µM, 10 µM et 100 µM) en ferrocène **6** dans la solution. Le meilleur rendement obtenu est de 94,7% pour une période d'immobilisation de 4 jours de l'alkylthiol **7**, suivi de la réaction de « click » avec une concentration de 100 µM en **6**.

A.4.b. Constantes électrochimiques de l'élément redox greffé

Les caractérisations électrochimiques de notre système ont été effectuées en utilisant un équipement standard. Les caractéristiques de l'élément greffé sur l'électrode d'or sont déterminées en utilisant une contre électrode de platine, et une électrode de référence au calomel (ECS). À partir des CV enregistrées après 1 heure de stabilisation, l'élément greffé atteint un potentiel de demi-vague $E_{1/2}$ de 0,5 V *vs ECS*, avec un potentiel de pic anodique E_{pa} égal à 0,57 V et cathodique E_{pc} égal à 0,43 V. ces valeurs sont en accord avec la littérature[170].

Les variations d'intensité enregistrées au potentiel E_{pa} en fonction de la vitesse de balayage ν ont été étudiées. Les modifications de signaux enregistrées sont intrinsèques à l'adsorption de l'espèce redox sur la surface de l'électrode de travail. Il s'agit d'une observation caractéristique des études électrochimiques en solution[170]. Une variation linéaire de l'intensité en fonction de la vitesse de balayage est synonyme d'une très forte adsorption de l'espèce redox. On notera qu'à l'inverse, si la variation d'intensité est linéaire avec la racine carrée de ν, alors l'espèce n'est pas soumise à un phénomène d'adsorption sur la surface. Ainsi, nous avons relevé différents I_{ox} à différentes ν que nous avons reportés sur le graphique suivant (Figure II.A.10)

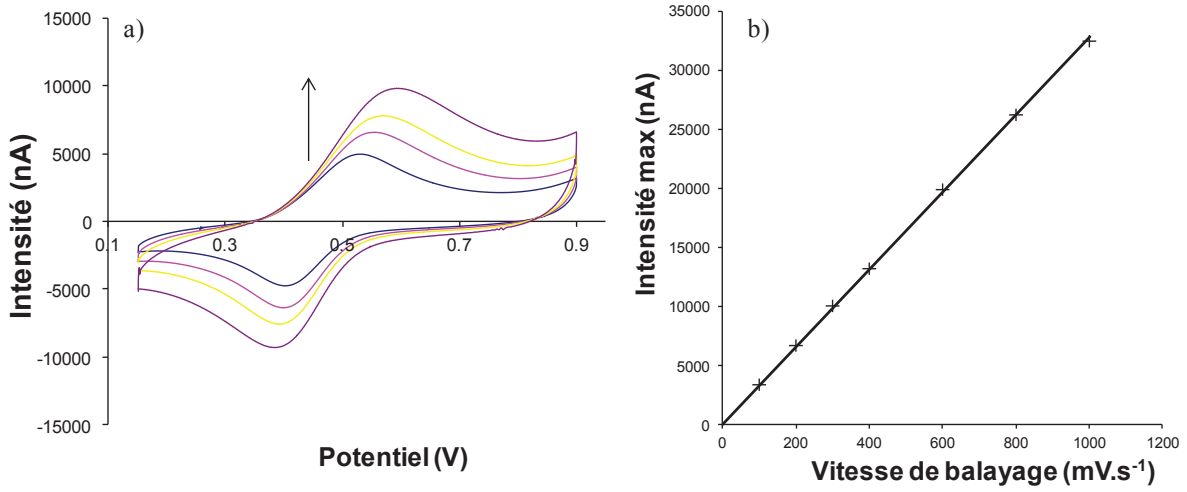


Figure II.A.10. :a) CV à différentes vitesses de balayage d'une électrode fonctionnalisée par ***9***

b) variations de l'intensité enregistrée à E_{pa} à différentes vitesses de balayage.

La droite obtenue par cette représentation graphique permet de démontrer l'attache covalente entre ***9*** et la surface d'or.

La constante de transfert électronique (k_{et}) est alors calculée selon la méthode décrite par Yu et coll.[171] et Chatelain et coll.[172]. Il s'agit d'une simplification de la méthode de calcul élaborée par Laviron[173]. Cette constante correspond à la constante de vitesse pour la réaction d'oxydoréduction se réalisant sur l'électrode (Cf : Annexe). D'un point de vue cinétique, il s'agit d'une réaction de premier ordre. Cette constante, caractéristique d'un élément redox donné, varie en fonction de son environnement chimique. Pour deux éléments redox identiques, immobilisés sur le même type de surface, et distants de celle-ci par une chaine alkyl de longueur similaire, les constantes de transfert électronique calculées seront alors du

même ordre de grandeur[158]. Selon le modèle de Laviron, il est possible d'écrire les relations suivantes :

$$E_{pa} = E_{1/2} - \frac{RT}{\alpha nF} \ln\left(\frac{\alpha nF\upsilon}{RTk_{et}}\right) \qquad \text{équation (II.1)}$$

$$E_{pc} = E_{1/2} - \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \ln\left(\frac{(1-\alpha)nF\upsilon}{RTk_{et}}\right) \qquad \text{équation (II.2)}$$

Avec les potentiels de pic anodique E_{pa} et cathodique E_{pc}, le potentiel de demi-vague $E_{1/2}$, le nombre d'électrons transférés n, et le coefficient de transfert de charge anodique α. R, F et T ont leur désignation habituelle. Il est alors possible de réécrire ces deux équations selon la forme suivante :

$$E_{1/2} - E_{pa} = \frac{RT}{\alpha nF} \ln\left(\frac{\alpha nF}{RTk_{et}}\right) + \frac{RT}{\alpha nF} \ln \upsilon \qquad \text{équation (II.3)}$$

$$E_{1/2} - E_{pc} = \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \ln\left(\frac{(1-\alpha)nF}{RTk_{et}}\right) + \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \ln \upsilon \qquad \text{équation (II.4)}$$

A haute vitesse de balayage (lorsque $E_{1/2}$-E_p > 100 mV), il est ainsi obtenu une relation linéaire entre la vitesse de balayage ν et les différences de potentiel $E_{1/2}$ - E_{pa} et $E_{1/2}$ - E_{pc} (de type . $E_{1/2}$-E_p = A + B ln ν). Il devient donc possible, par résolution graphique, de remonter à k_{et} (Figure II.A.11).

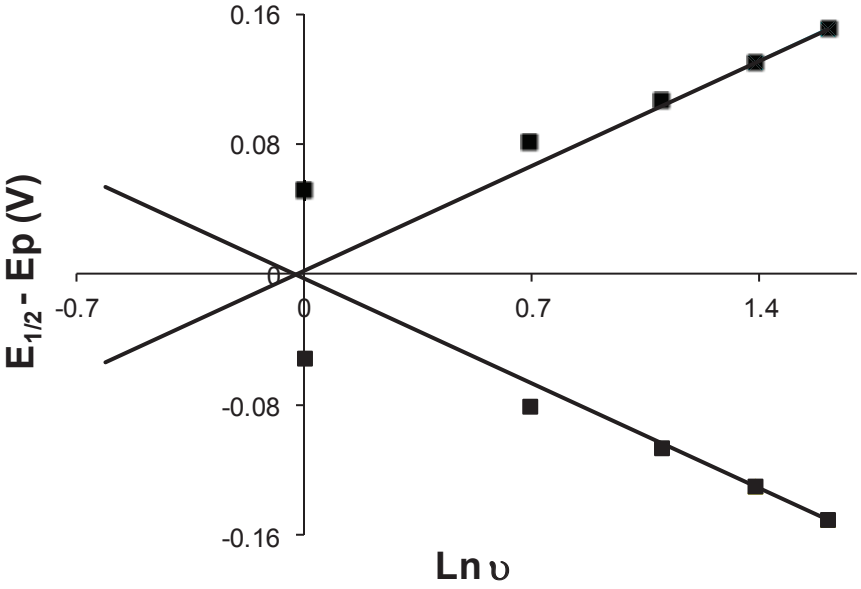


Figure II.A.11. : Représentation graphique de la variation de $E_{1/2} - E_p$ en fonction de ln ν

Selon les approximations de Laviron, le coefficient de transfert de charge anodique α a été estimé à 0,5 dans le tampon d'analyse. Il est alors relevé la valeur de ln ν correspondant à l'intersection des droites avec l'axe des abscisses. Cette valeur est ensuite injectée dans l'équation II.4, où $E_{1/2}$ - E_{pc} est alors égal à 0, et la résolution de cette équation permet d'obtenir la valeur de k_{et}.

Dans notre étude, celle-ci est de 20 s^{-1}, ce qui est comparable aux valeurs rapportées dans la littérature, pour un dérivé ferrocène ayant un « linker » de longueur similaire entre le groupe redox et la partie alkylthiol[174]. Une valeur identique a été trouvée pour les électrodes fonctionnalisées par ***6*** lors de l'électrocatalyse de la réaction de « click ».

A.5. Caractérisation par XPS et par électrochimie de la surface fonctionnalisée par l'élément redox

La caractérisation physique des éléments greffés sur électrode a été menée par spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (X-ray photoelectron spectrometry : XPS). Il est ainsi possible de déterminer la composition élémentaire des surfaces fonctionnalisées. Cette technique a été utilisée pour observer les modifications de surface après les différentes étapes de fonctionnalisation pour caractériser les électrodes fonctionnalisées par le couplage électrocatalysé de ***7*** et ***6*** ainsi que les électrodes où le composé ***9*** a été immobilisé.

L'étude s'est donc focalisée sur le pourcentage atomique des atomes de soufre, phosphore, fer et azote, puisqu'il s'agit des éléments absents (ou presque) sur la surface d'or à l'état initial (Tableau II.1.).

Substrat	Elément						
	C 285 eV	O 532,2 eV	Au 84 eV	N 400 eV	P 133,3 eV	S 162,5 eV	Fe 707,6 eV
Or	51,3	9,9	38,0	0,8	-	T	-
7	37,8	10,4	47,3	1,1	1,0	2,4	-
9	51,2	15,0	27,6	2,9	0,8	1,0	1,5
7+***6***	39,1	12,6	42,4	3,3	0,6	2,0	-

T : Traces

*Tableau II.1. : Ratios atomiques apparents (en % atomique) de la surface d'un substrat or nu et d'électrodes fonctionnalisées par **7**, **9** et **7+6**.*

La première analyse, conduite sur une surface d'or exempte de toute fonctionnalisation, ne révèle pas la présence de phosphore. Des traces insignifiantes de soufre, très proches de la limite de détection de l'instrument (en dessous de 0,5 % atomique), ont été détectées. Après le greffage de ***7*** sur la surface d'or, un pourcentage atomique pertinent de ces éléments a été observé (1% et 2,4% pour le phosphore et le soufre respectivement), confirmant la présence de ***7*** sur l'électrode. Dans le cas des électrodes fonctionnalisées avec ***9***, un pourcentage atomique d'azote (2,9%) a été déterminé, avec la présence de phosphore (0,8%) et de soufre (1 %). Le spectre haute résolution centré sur l'énergie de liaison de N1s des électrodes greffées par ***9*** et ***7***+***6*** montre un pic centré à 400,0 eV, caractéristique du signal provenant d'un groupement triazole[33, 175-176] (Figure II.A.12.). Ce pic n'est pas observé sur l'électrode uniquement greffée par ***7*** ainsi que sur l'électrode d'or nu.

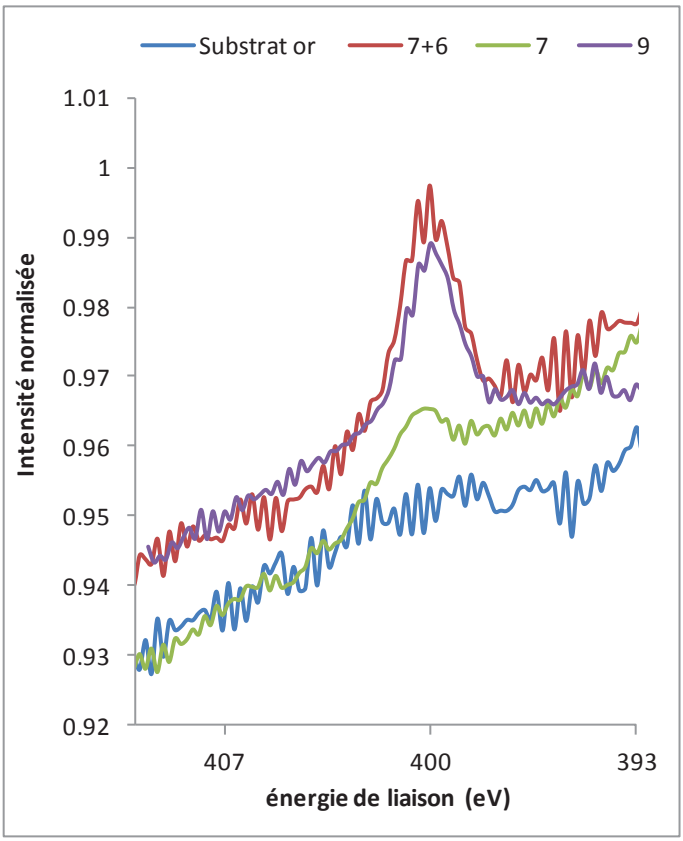


*Figure II.a.12. : spectre XPS haute résolution des énergies de liaison centrées sur 400eV (N1s) du substrat or non fonctionnalisé, et des électrodes fonctionnalisées par **7**,**9** et **7**+**6**.*

En outre, dans le cas particulier du greffage de ***9*** sur la surface, le signal de Fe2p2/3 a pu être observé pour une énergie de liaison de 707,6 eV. L'observation de ce signal est due à la présence du groupement ferrocène. Malheureusement, à cause de la limite de détection de

l'appareillage, ce signal n'a pu être détecté dans le cas de l'électrofonctionnalisation de ***7***+***6***. Cependant, pour cette même électrode, un pourcentage significatif d'azote apparait (valeur moyenne de 3,3 % at.). Le même pic N1s centré sur 400eV est observable sur ces électrodes (Figure II.A.12.)

A.6. Etude de la stabilité de stockage des électrodes fonctionnalisées.

La stabilité du bis(DTPA) ancré sur surface a été étudiée dans la solution d'électrolyte d'analyse. Les électrodes d'or fonctionnalisées sont récupérées, et plongées dans la solution de tampon phosphate. Des CV sont enregistrées sur une période de 24 jours, et l'intensité mesurée à E_{pa} est rapportée sur la figure II.A.13.

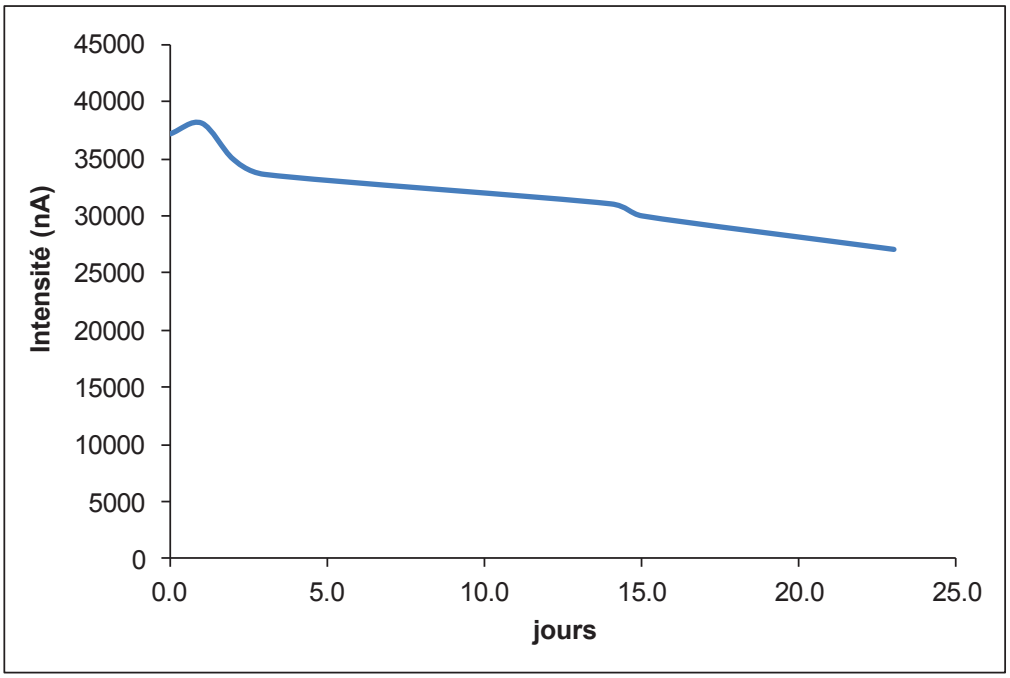


*Figure II.A.13. : Etude de la stabilité en solution de tampon PBE d'une électrode fonctionnalisée par **9**. Report des intensités de courant enregistrées par CV à E_{pa} en 24 jours.*

La solution tampon est changée tous les 2-3 jours, immédiatement avant l'analyse par CV. Le signal enregistré montre une perte de 20 % sur cette période.

Phares et coll. ont rapporté une étude de stabilité dans des conditions similaires avec une sonde monothiol oligonucléotidique[177]. Lorsque l'électrode fonctionnalisée par cette sonde est stockée durant 24 jours dans une solution tampon aqueuse, elle montre une perte de signal d'environ 70%. D'autres travaux confirment le manque de stabilité des monocouches auto

assemblées par l'accroche d'une seule fonction thiol, et démontrent la dégradation de cette dernière à température ambiante[90, 178], sous oxygène atmosphérique[179], et stockage en solution tampon phosphate ou sérum[180].

A la lumière de ces résultats, les systèmes développés dans ce chapitre basés sur l'ancrage des dérivés bis (DTPA)héxynyle prouvent une augmentation significative de la stabilité de ces systèmes en solution, par rapport aux autres systèmes basés sur l'immobilisation d'un monothiol sur or. Le système ici développé est donc plus robuste, tout en offrant la possibilité de travailler dans une large gamme de potentiels, compatible avec la réalisation de l'électroactivation de la « click » en surface, sur une période supérieure à 20 jours.

B. Méthode d'immobilisation de nanoparticules rhodamine sur surface d'or

B.1. Fonctionnalisation des nanoparticules pour l'immobilisation

B.1.a. Immobilisation des nanoparticules sur CPG

La synthèse automatisée sur support est basée sur l'utilisation d'un support solide de type particulaire, confiné dans une colonne de synthèse par deux filtres situés aux deux extrémités de la colonne. La porosité des filtres utilisés est supérieure à 10 microns afin de permettre le passage des réactifs dans la colonne de synthèse avec un débit approprié sans exercer une trop forte pression. Le support classiquement utilisé est un matériau particulaire de verre à porosité contrôlée (CPG). Les objets sont de taille très hétérogène entre 30 µm et 150 µm, mais la taille des pores est parfaitement contrôlée, généralement entre 30 et 200 nm en fonction des CPG utilisées. Afin de pouvoir utiliser des nanoparticules en synthèse automatisée, il est alors nécessaire d'ancrer ces dernières sur le support CPG. Elles vont ainsi rester emprisonnées dans la colonne de synthèse. De Crozals[181] a mis au point un tel protocole, dans le but de synthétiser des oligonucléotides sur nanoparticules accrochées sur un support CPG[182]. Il a ainsi contribué à cette étude en fournissant des nanoparticules fluorescentes (désignées par le terme *NP* dans cette étude, diamètre ~50 nm) à cœur rhodamine B et fonctionnalisées en surface par des azotures.

B.1.b. Fonctionnalisation des nanoparticules.

La fonctionnalisation des *NP* est donc réalisée par synthèse automatisée, en employant la chimie des phosphoramidites décrite dans le 1er chapitre. Le schéma de synthèse est représenté sur la figure II.B.1.

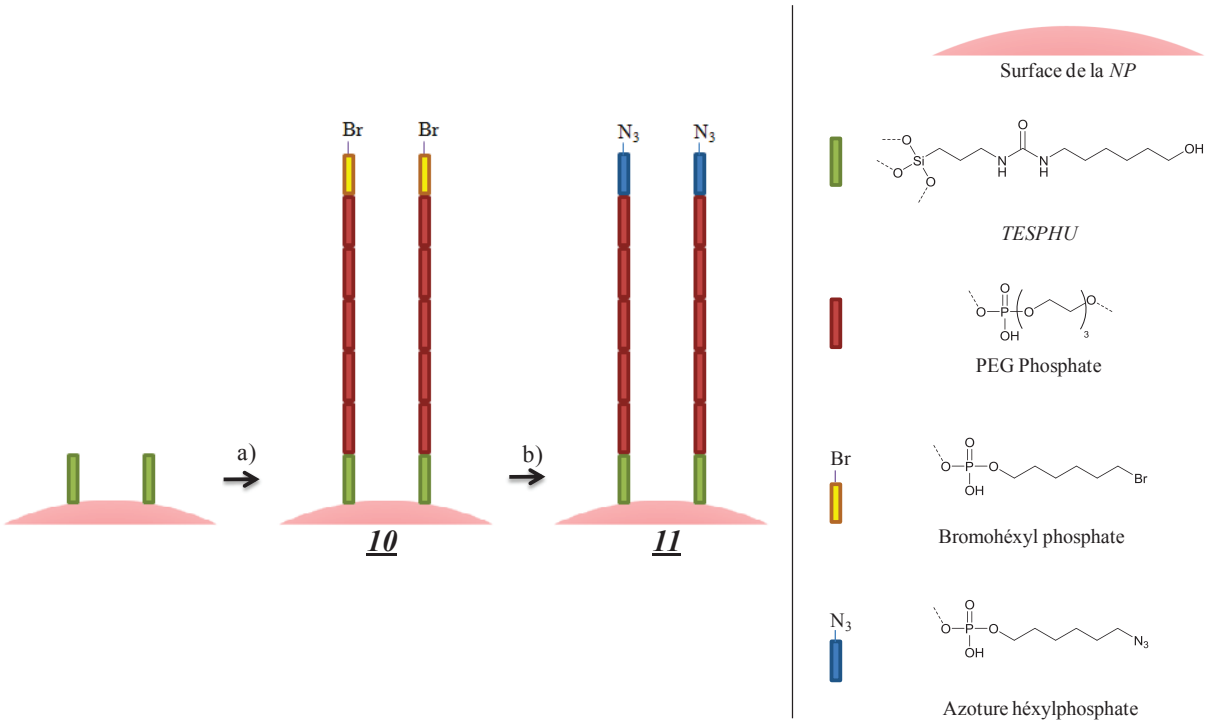


Figure II.B.1. : Etapes de synthèse des NP azoture

a) fonctionnalisation des NP par 5 PEG phosphoramidites et le bromohexyle phosphoramidite

b) substitution du bromure par l'azoture de sodium

La structure de la chaine qui sera couplée aux nanoparticules est toutefois soumise à deux contraintes. En premier lieu, la chaîne ajoutée doit présenter des propriétés hydrophiles, afin de permettre la dispersion des nanoparticules dans l'eau et réduire l'affinité de ces dernières avec la surface de l'or. En second lieu, la ramification doit être suffisamment longue pour s'assurer de la disponibilité du groupement azoture pour la réaction de « click » sur la surface. Il est donc décidé que la ramification sera constituée de 5 triéthylèneglycol-phosphates (PEG-phosphate), terminée par la fonction azoture d'hexyl phosphate. La synthèse est donc réalisée à partir de leur analogue phosphoramidite, excepté pour l'azoture, qui sera remplacé par son

précurseur halogéné, le bromohexyl phosphoramidite, pour éviter toute réaction de couplage non désirée avec l'azoture.

La taille des pores de la CPG (300nm de diamètre) permet de réaliser la synthèse des *NP* azotures en utilisant un programme standard pour le couplage d'ODN sur colonne de 1 µmol.

Le couplage des différents synthons phosphoramidite peut être suivi par quantification des diméthoxytrityles libérés après chaque couplage. Le couplage des 5 unités PEG-phosphoramidite est réalisé avec un rendement global de 69 % [181]. La synthèse automatisée est terminée après le cycle de couplage du bromohexylphosphoramidite, donnant la *NP* ***10***. La CPG est récupérée et la substitution de l'halogène est immédiatement opérée avec l'azoture de sodium dans le DMF anhydre[159], donnant les *NP* ***11***, qui sont ensuite décrochées dans une solution aqueuse de DBU (0,5 M).

Les *NP* ***11*** sont observées par microscopie électronique en transmission (TEM). Les photographies obtenues sont représentées dans la figure II.B.2.

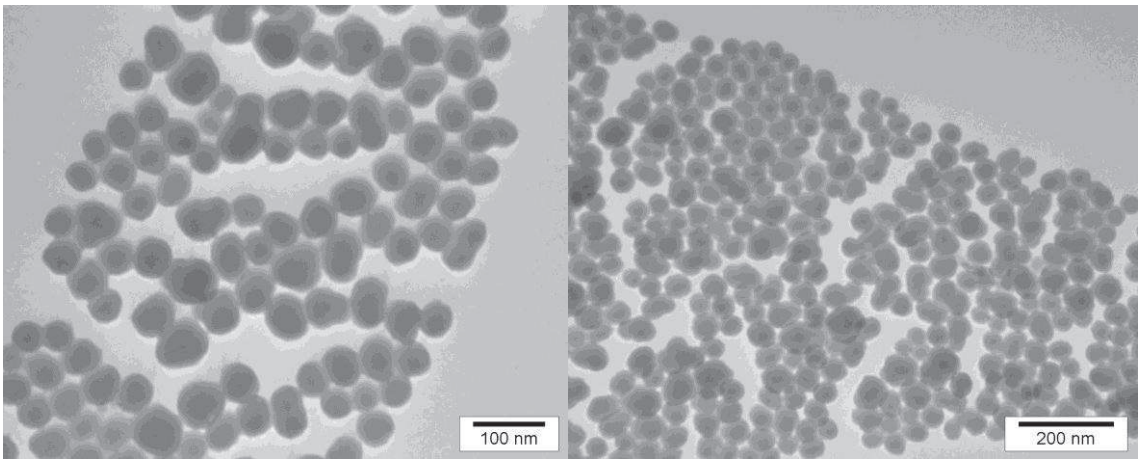


Figure II.B.2. : photographies TEM des NP-azoture décrochées.

Leur taille est estimée à 51,25 ± 5,43 nm (moyenne sur 120 mesures d'images TEM avec le logiciel ImageJ)

Le potentiel Zeta des nanoparticules est ensuite mesuré (Figure II.B.3).

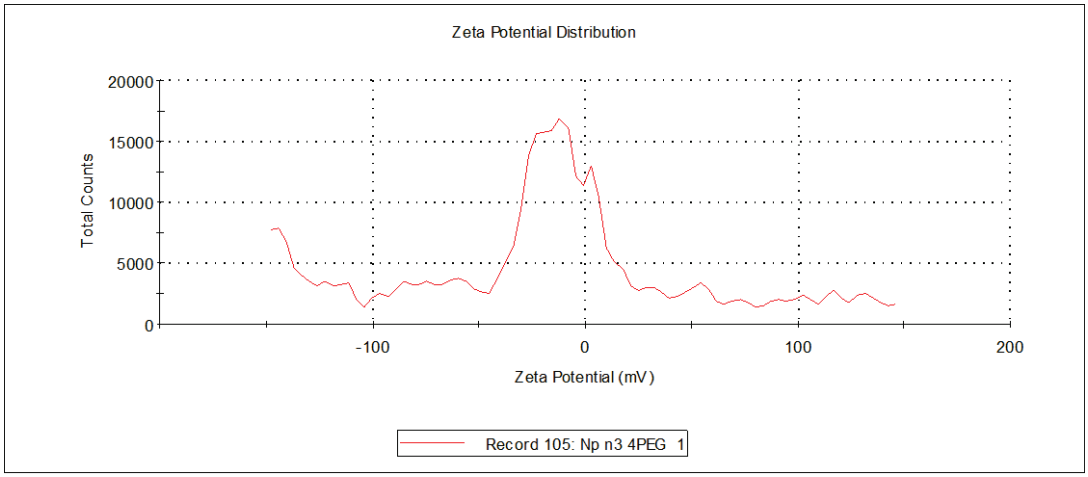


Figure II.B.3. : Distribution du potentiel Zeta des NP fonctionnalisées (PEG-phosphate)$_5$-azoture d'hexyl phosphate.

La faible concentration en nanoparticules de l'échantillon d'analyse est vraisemblablement à l'origine de l'allure de la courbe obtenue. Le potentiel Zeta est estimé à -18,9 mV, témoignant d'une charge globale de surface négative de la nanoparticule en solution.

L'analyse de la surface des nanoparticules ***10*** et ***11*** est réalisée par TOF-SIMS. Les *NP* ***10*** montrent un pic caractéristique du bromure m/z = 81 (Br^-), qui disparait dans le cas des *NP* ***11***, confirmant la fonctionnalisation attendue de la surface.

Enfin, l'absorbance UV-visible des nanoparticules est mesurée, à partir d'une solution fille diluée 25 fois. Cette valeur est comparée à la droite d'étalonnage faite avec une solution de référence de *NP* précédemment établie, puisque les nouvelles modifications n'ont aucun effet sur le coefficient d'extinction molaire. La concentration de la solution mère calculée est de $8{,}5.10^{13} \pm 8{,}10^{12}$ NP.mL^{-1}.

B.2. Immobilisation des nanoparticules fluorescentes sur surface d'or

L'immobilisation des *NP* ***11*** est envisagée de façon similaire à ce qui a été réalisé pour l'immobilisation du composé ferrocène ***6***. Néanmoins, dans ce cas précis, l'évolution de la réaction ne peut être suivie par CV puisqu'aucun groupe redox n'est présent sur la surface. Le contrôle ne sera réalisé qu'après greffage, par fluorescence de désexcitation de la rhodamine.

Ainsi, une électrode modifiée par la monocouche bis(DTPA)héxynyle ***7*** + mercaptopropanol est d'abord traitée par un tampon phosphate dans lequel sont dissous de l'albumine sérique

bovine (BSA ; 1% massique) et du Tween (0,1% massique)[183]. En effet, à partir du potentiel Zeta déterminé précédemment, la charge électrique de la particule est globalement négative (-18,9 mV). La BSA permet de supprimer les interactions non spécifiques des particules sur le support, sans affecter la réduction du cuivre à la surface.

Après rinçage de l'électrode, la réaction de « click » électrocatalysée est donc menée selon le protocole décrit en première partie, en présence de $CuSO_4$ et TBTA à -300 mV *vs Ag/AgCl*. Un test négatif de cette expérience est mené avec les mêmes conditions opératoires, néanmoins un potentiel positif de +250 mV *vs Ag/AgCl* est appliqué.

Ces deux expériences sont ensuite observées en microscopie optique en fluorescence afin de visualiser la présence des *NP* à cœur rhodamine sur la surface d'or.

B.3. Analyse par microscopie à fluorescence de la surface d'or fonctionnalisée par microscopie

L'immobilisation des nanoparticules fluorescentes par la réaction de « click » est observée en microscopie à fluorescence. Le greffage des nanoparticules étant achevé, l'électrode est passé au bain à ultrasons dans une solution aqueuse de Tween (1% massique), afin d'éliminer toute particule n'ayant pas réagi, seulement adsorbée sur l'or. Enfin, la rhodamine des nanoparticules est excitée à 550 nm et l'on observe la réponse de l'échantillon à 605 nm. Le centre des électrodes est alors observé au microscope (Figure II.B.4).

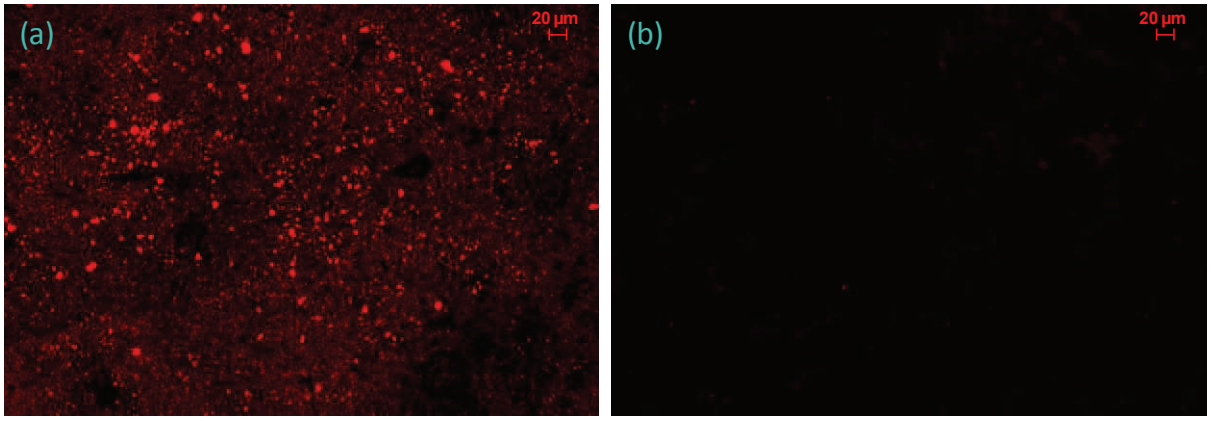


Figure II.B.4. : Électrodes d'or observées par fluorescence au microscope optique après la réaction de « click » avec les nanoparticules.

Réaction de « click » électrocatalysée à un potentiel de : (a) -300 mV (b) +250 mV

La figure II.B.4.a montre le centre des électrodes fonctionnalisées par application du potentiel à -300 mV *vs Ag/AgCl*. La fluorescence des particules est observable à 605 nm et permet de révéler la présence des nanoparticules sur la surface. Ces dernières ont été greffées de façon homogène sur la surface. A l'inverse, sur la figure II.B.4.b, la zone est « éteinte », aucun signal n'est observable à 605 nm. Comme attendu, l'ancrage des nanoparticules ne s'est pas effectué sur les électrodes soumises à un potentiel de +250 mV *vs Ag/AgCl*.
Cette manipulation permet de confirmer visuellement la présence de nanoparticules greffées sur l'électrode d'or. La réaction de « click » électrocatalisée se montre donc efficace avec ces entités et un électroadressage est envisageable par application d'un potentiel négatif.

C. Méthode d'immobilisation des protéines *via* un dérivé biotinylé

C.1. Reconnaissance Biotine/streptavidine

C.1.a. La biotine

La biotine[184] (ou vitamine H) est constituée d'un noyau imidazolidone et d'un cycle tétrahydrothiophène porteur d'une chaîne latérale à cinq atomes de carbone. Elle possède trois centres de chiralité, déterminants pour la reconnaissance avec la streptavidine. Sa structure est représentée dans la figure II.C.1.

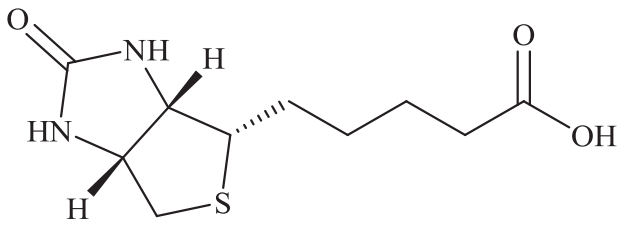


Figure II.C.1. : Structure de la biotine

Une des premières fonctions étudiées de la biotine est son implication dans le métabolisme des acides gras insaturés, des acides aminés (et notamment la synthèse de l'aspartate de sodium) et des sucres. Elle est le cofacteur des carboxylases qui catalysent l'addition d'un groupe CO_2 à différents substrats[185-187]. La biotine joue un rôle clef dans le métabolisme des protéines, des graisses et des glucides. La biotine se fixe avec une très grande affinité à l'avidine (Ka 10^{15} M), glycoprotéine que l'on trouve dans le blanc d'œuf. Cette affinité ne

baisse pas de façon significative quand le groupement carboxylique de la biotine est fonctionnalisé [188]. L'affinité entre la biotine et l'avidine et son homologue bactérien, la streptavidine (Ka=10^{13} M) est considérée comme l'affinité protéine-ligand naturelle la plus forte. Ce fait est à la base de l'ingénierie développée autour du système streptavidine/biotine depuis une trentaine d'années[188].

C.1.b. La Streptavidine

La streptavidine[189] est l'équivalent bactérien de l'avidine[190]. La streptavidine est produite naturellement par Streptomyces avidinii. Comme l'avidine, il s'agit d'une protéine homotétramérique tétravalente à quatre unités biotine. La masse molaire de la streptavidine est d'environ 60 000 Da et son point isoélectrique est au pH 6,4. Contrairement à l'avidine, elle n'est pas glycosylée et ne possède pas de pont disulfure. Le gène de la streptavidine a été cloné et séquencé en 1986 [191]. La séquence protéique correspondante est constituée d'un peptide signal de 24 acides aminés clivé lors de sa sécrétion, suivi d'une séquence de 159 résidus appelée streptavidine mature. Le peptide signal porte les signaux d'adressage de sécrétion, mais il inhibe également la fixation de la biotine. Une fois sécrétée, la protéine est clivée aux extrémités pour générer des unités streptavidine dont la longueur n'est pas homogène (de 125 à 127 acides aminés).

C.1.c. Reconnaissance Streptavidine/biotine

L'affinité streptavidine/biotine occupe une place remarquable dans le classement d'affinité entre des combinaisons protéine-ligand : Cette reconnaissance spécifique est, à titre d'exemple, 100 fois plus importante que la reconnaissance anticorps-antigène (Ka de l'ordre de 10^7-10^{11} M). Les études cristallographiques en présence de biotine ou de peptides[192], ont permis de visualiser le complexe Biotine/streptavidine.

Le modèle de reconnaissance biologique a connu un très fort développement grâce à la grande stabilité de la streptavidine et le large nombre de possibilité de modification chimique du motif carboxylate de la biotine, sans altérer les propriétés de reconnaissance.

Les applications de ce système touchent des domaines variés : le criblage de principes actifs, la mise au point de systèmes d'analyse, et la catalyse énantiosélective par des métallœnzymes artificielles[193-196].

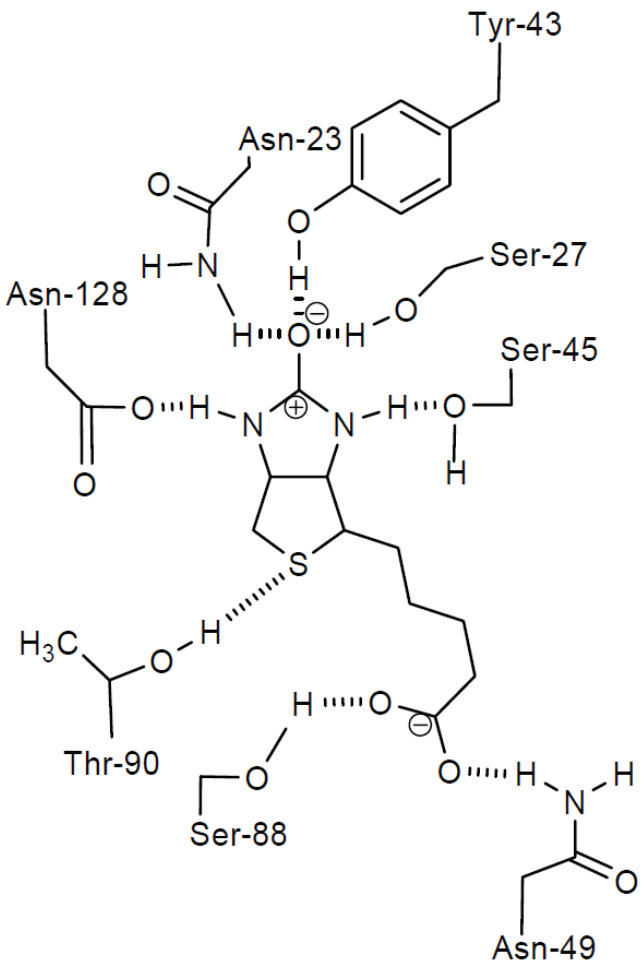


Figure II.C.2. : Représentation du site de reconnaissance entre la streptavidine et la biotine

C.2. Stratégie de « click » du dérivé biotinylé sur la surface d'or

Dans la perspective de pouvoir immobiliser la protéine streptavidine sur une surface d'or, une stratégie similaire à ce qui a été vu précédemment a été mise en place. La réaction de « click » électrocatalysée sera menée en présence d'un composé biotinylé commercial présentant un groupement azoture : le conjugué azoture-PEG3-Biotine (Figure II.C.3).

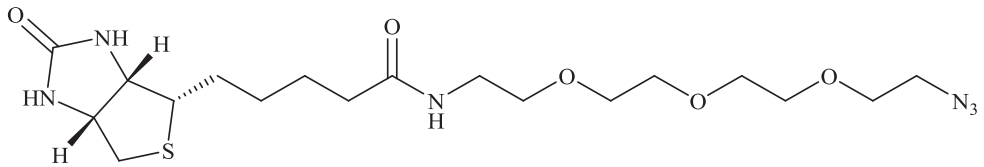


Figure II.C.3 : représentation du composé azoture-PEG3-Biotine

L'expérience est menée avec un protocole similaire, à partir d'une électrode fonctionnalisée par la monocouche alkylthiol (7 + mercaptopropanol) et la formation *in situ* de l'espèce Cu(I) à partir de $CuSO_4$ en présence de TBTA. La réaction est donc électrocatalysée par chronocoulométrie à -300 mV *vs Ag/AgCl*. (Figure II.C.4.)

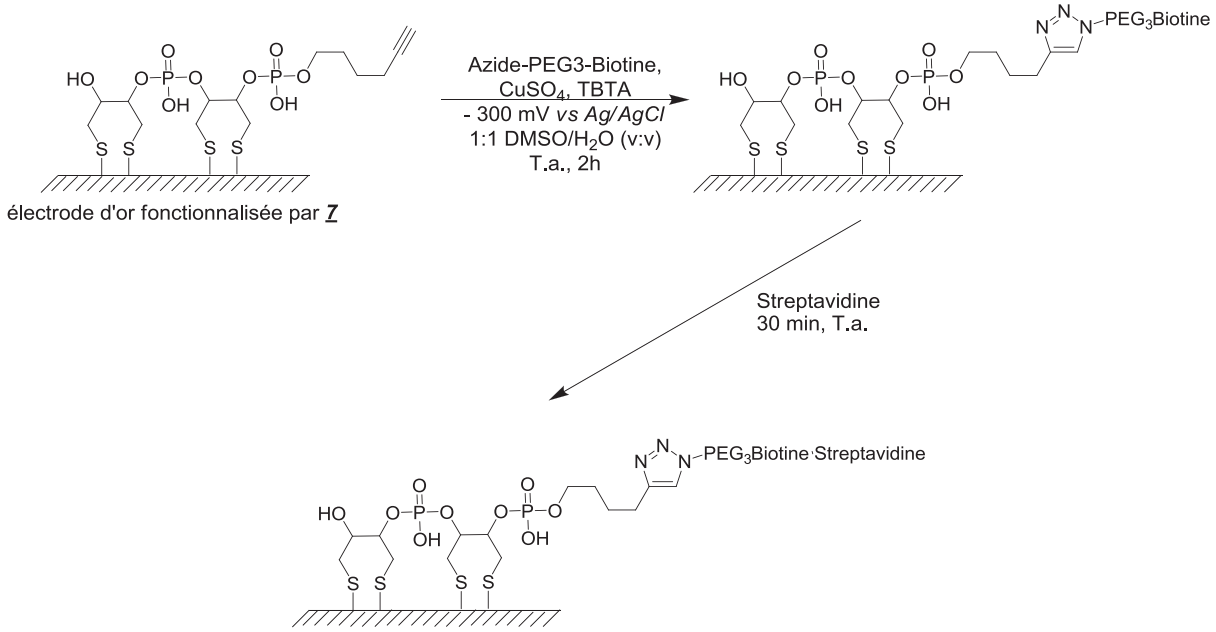


Figure II.C.4. : Stratégie de greffage de biotine sur or, suivi de la reconnaissance de la streptavidine

Une fois encore, afin de s'assurer du contrôle de cette réaction, un test négatif est effectué par application d'un potentiel de +300 mV. La biotine est immobilisée sur surface d'or si, et uniquement si, le potentiel adéquat a été appliqué. Elle permet alors l'ancrage de la streptavidine sur l'électrode. La reconnaissance biotine/streptavidine est suivie par une autre méthode électrochimique : la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE). Le principe de cette méthode de mesure est décrit en annexe.

C.3. Caractérisation électrochimique de la surface

C.3.a. Caractérisation par impédance des surfaces fonctionnalisées par la biotine et la streptavidine

Ce travail a été mené en collaboration avec Nadir MEINI, étudiant en thèse à l'ISA, qui a effectué toutes les mesures d'impédance de cette étude.

Les analyses par SIE sont effectuées dans un tampon d'analyse qui sera qualifié par l'appellation tampon d'impédance PBS. Ce tampon aqueux est constitué de 10 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$, 10 mM de phosphate de sodium, 2,7 mM de chlorure de potassium et 137 mM de chlorure de sodium, à un pH de 7,4.

L'électrode d'or initiale n'ayant subi aucun traitement est d'abord caractérisée par impédance avant toute autre étape de fonctionnalisation. Le diagramme de Nyquist correspondant est dressé sur la figure II.C.5. La courbe montre un demi-cercle très mal défini (R_{ct} faible) associé à la droite de Warburg. Cette droite, qui dérive de l'impédance de Warburg, correspond à une phase constante de diffusion d'élément caractérisée par un angle de 45° sur la représentation de Nyquist. Il s'agit de la plus simple situation de diffusion possible, où les échanges largement majoritaires avec l'électrode se font sur une distance (linéaire) avec seulement les électrolytes de la solution. Ce demi-cercle caractérise le transfert électronique, et le transfert de masse décrit les éléments de diffusion de Warburg. Une valeur de R_{ct} égale à 1,03 kOhm.cm^{-2} est calculée avec un écart type relatif de 1% (Figure II.C.5.)

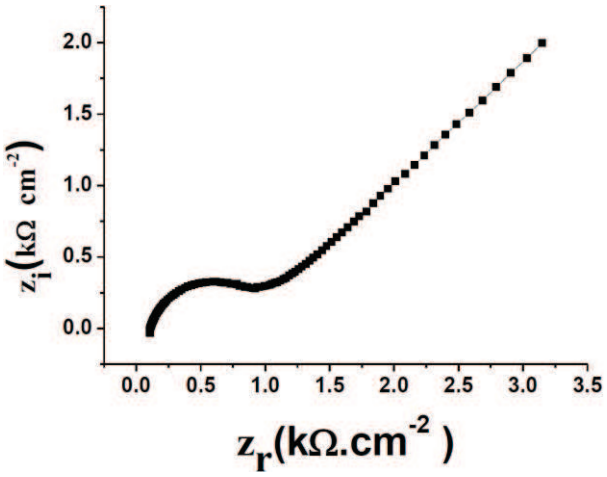


Figure II.C.5. : Diagramme de Nyquist d'un substrat or non traité. Tampon PBS.

Après fonctionnalisation par le greffage chimique du bis(DTPA)héxynyle 7, le diamètre du demi-cercle du diagramme Nyquist augmente clairement (Figure II.C.6.b.) et la droite de Warburg précédente (Figure II.C.5.) n'est plus observée. La valeur de R_{ct} est alors propulsée à 32,2 kOhm.cm^{-2} montrant une baisse significative du transfert électronique due à la densité des monocouches alkylthiol immobilisées sur la surface. (Figure II.C.6.)

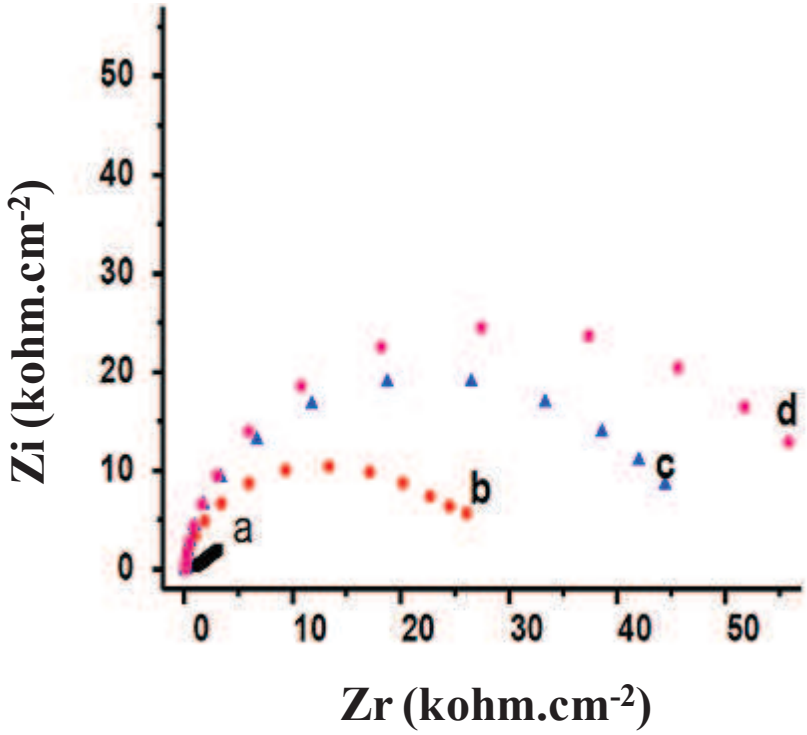


Figure II.C.6. : Diagramme de Nyquist d'une électrode d'or

a) non fonctionnalisée

b) fonctionnalisée par le bis(DTPA)héxynyle 7 et le mercaptopropanol

c) après la réaction de « click » avec l'azoture-PEG3-Biotine

d) après incubation de la streptavidine

Le diagramme de Nyquist enregistré après la réaction de « click » électrocatalysée sur surface d'or est montré sur la Figure II.C.6.c. . On observe une augmentation considérable de la résistance de transfert de charges : 47,0 kOhm.cm^{-2}, soit 49 % de croissance. La prise d'épaisseur de la monocouche témoigne ainsi du succès de la réaction de « click ».

Enfin, après incubation de la streptavidine (1 mg.mL^{-1}) et formation du complexe de reconnaissance sur la surface de l'électrode, le diamètre du demi-cercle du diagramme Nyquist continue d'augmenter, offrant une résistance de transfert de charges augmentée de 30 %, soit R_{ct} = 61,1 kOhm.cm^{-2} (Figure II.C.6.d). Cette observation témoigne de l'accroissement de l'épaisseur de la couche, confirmant ainsi la formation d'un complexe streptavidine/biotine sur la surface. Toutefois l'évolution de la résistance observée n'est pas à la hauteur de l'augmentation de la couche de surface, la taille de la streptavidine étant de l'ordre de 50 Å. Cette observation peut être potentiellement liée aux propriétés conductrices de cette protéine[197].

C.3.b. Caractérisation par SIE de l'immobilisation de HSA

Après immobilisation de la streptavidine sur la surface d'or, il est décidé de continuer la construction supramoléculaire par addition d'une dernière couche formée par de l'albumine sérique humaine (HSA) biotinylée. Cette construction se fait par incubation de 100µL d'une solution de HSA, comprise dans une gamme de concentration allant de 10^{-8} à 10^{-4} mg.mL^{-1} dans un tampon phosphate à pH égal 7,4. L'impédance est effectuée dans le tampon d'analyse PBS et les différentes réponses du système sont reportées en fonction de la concentration de HSA (Figure II.C.7.).

La variation de résistance de transfert de charges ΔR_{ct} est définie comme $\Delta R_{ct} = R_{cto} - R_{ct}$, où R_{cto} représente la valeur de la résistance de transfert de charges après interaction avec la streptavidine, et R_{ct} étant la valeur prise après l'immobilisation de la HSA. La variation de la valeur absolue de ΔR_{ct} s'accroît linéairement avec l'augmentation de la concentration de HSA, de 10^{-8} mg.mL^{-1} à 10^{-5} mg.mL^{-1} (Figure II.C.8.). Les données expérimentales correspondent à l'équation de droite R_{ct} = 1,17 + 4,309 log [HSA]. La limite du seuil de détection de ce système est de 10 pg.mL^{-1}. La saturation de la surface est obtenue avec des concentrations supérieures à 100 ng.mL^{-1}.

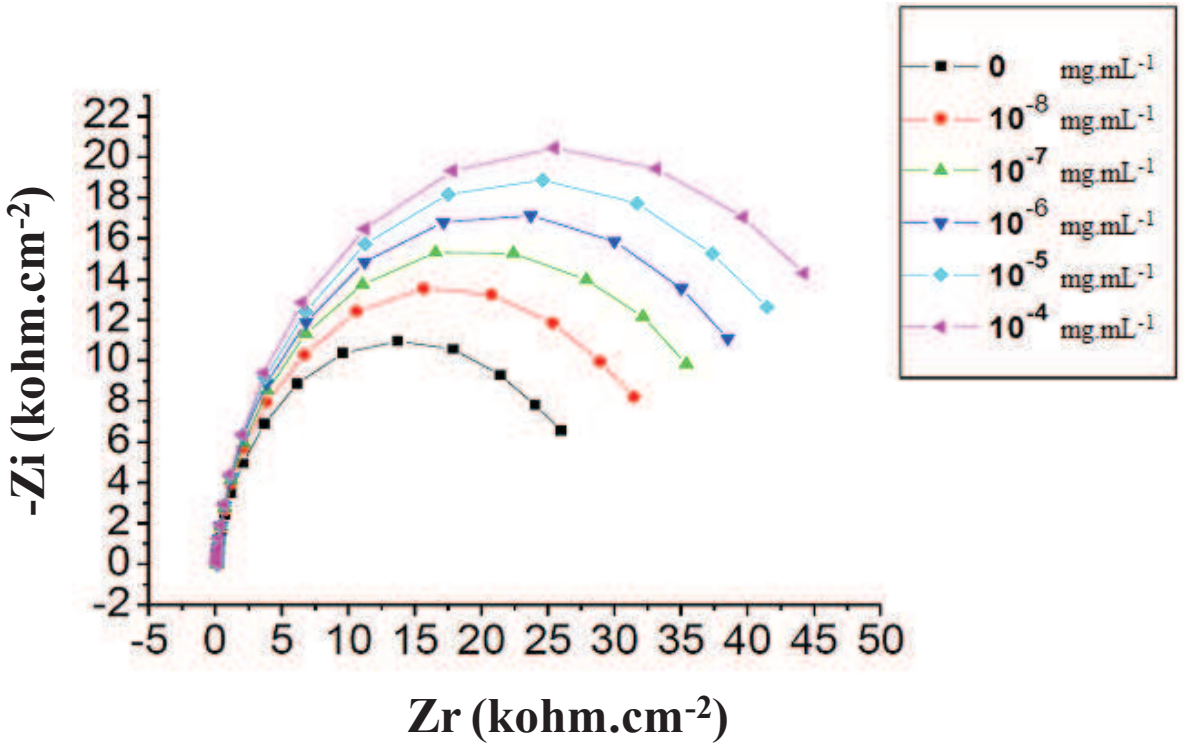


Figure II.C.7. : Diagramme Nyquist enregistré à différentes concentrations en HSA (en mg.mL^{-1})

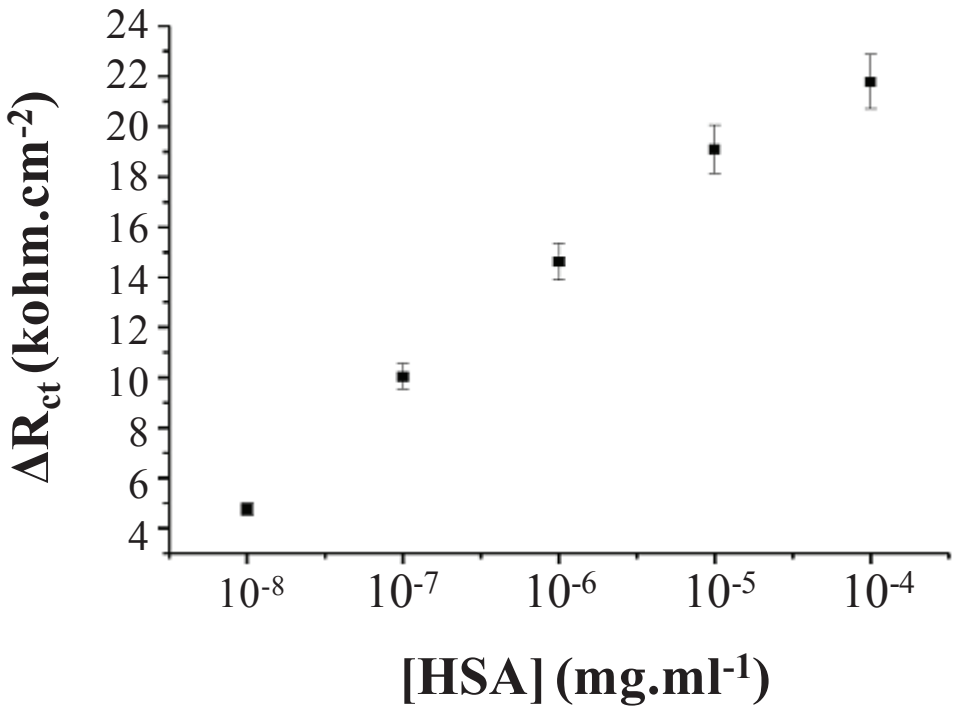


Figure II.C.8. : Droite d'étalonnage de la variation de la résistance de transfert de charges en fonction du logarithme de la concentration en HSA.

C.4. Etude en microscopie à fluorescence de la surface d'or fonctionnalisée par la biotine *via* des nanoparticules Rhodamine recouverte de streptavidine.

L'approche d'électroadressage *via* cette méthode est mis en évidence par l'immobilisation de nanoparticules fluorescentes fonctionnalisées par la streptavidine. Après l'étape d'immobilisation de l'azide-PEG3-biotine sur surface d'or, cette dernière est mise en contact avec 100 µL d'un mélange de BSA et de Tween (100 mM $NaPO_4$, 1% massique de BSA et 0,1% massique de tween), une demi-heure à température ambiante pour éviter tout phénomène d'adsorption non spécifique sur or[183]. L'électrode est ensuite lavée à l'eau distillée, et les nanoparticules sont déposées sur électrode afin de former le complexe biotine/streptavidine sur la surface. La rhodamine est excitée par une longueur d'onde d'excitation adéquate et la réponse de désexcitation des nanoparticules est observée par microscopie optique. Les échantillons sont observés sur la bordure de la surface fonctionnalisée des électrodes d'or afin de vérifier l'efficacité de la réaction de « click » par électrocatalyse (Figure II.C.9).

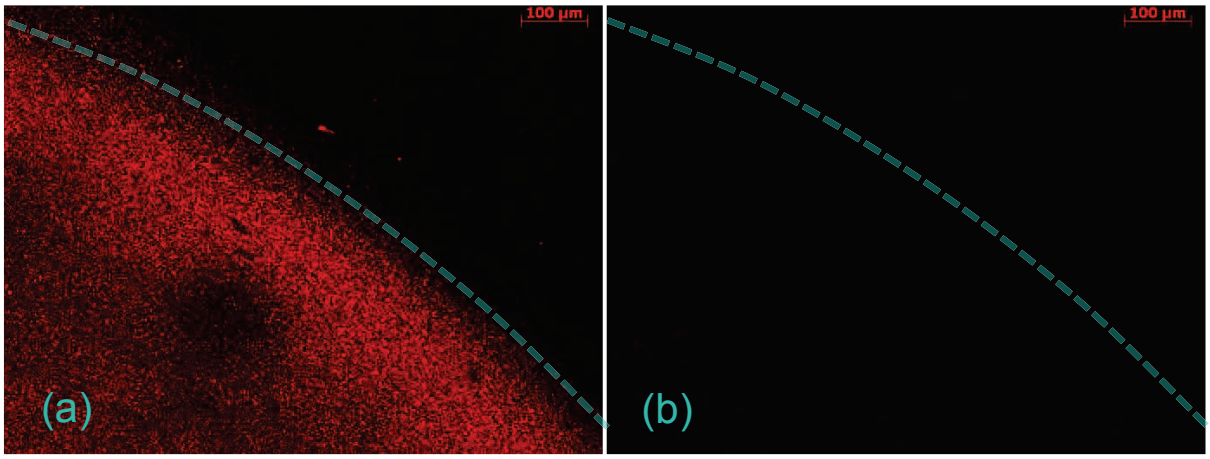


Figure II.C.9 : électrodes d'or observées par fluorescence au microscope optique après la réaction de « click » et reconnaissance des nanoparticules fluorescentes de streptavidine. La réaction de « click » est électrocatalysée à un potentiel de : (a) -300 mV (b) +300 mV.

Deux régions distinctes sont clairement visibles sur la figure II.C.9.a. : La première où l'on peut voir la fluorescence des nanoparticules rhodamine-streptavidine immobilisées sur les électrodes fonctionnalisées par la biotine et la zone « éteinte » en dehors du cercle de fonctionnalisation de l'électrode d'or. L'expérience témoin, où un potentiel de + 300 mV est appliqué lors de la réaction de « click » de la biotine, est représentée par les clichés de microscopie optique de la figure II.C.9.b. Après application de la longueur d'onde d'excitation de la rhodamine, on ne constate aucune zone éclairée par fluorescence de désexcitation. Ces résultats sont donc en accord avec les observations qui ont été effectuées par l'analyse de la surface en impédance électrochimique. Ce résultat visuel est donc, une fois encore, très encourageant pour la mise en place d'un système électroadressable.

D. Conclusion

Les études de réalisation de l'électrocatalyse de la réaction « click » sur électrode d'or ont été menées dans ce chapitre. Le greffage par la formation d'un 1,2,3-triazole entre un alcyne immobilisé sur la surface et un dérivé azoture peut être contrôlé par application d'un potentiel négatif pour générer *in situ* une espèce Cu(I) active pour la catalyse. Un potentiel optimal a été identifié, en utilisant du sulfate de cuivre et un ligand TBTA propice à la réduction de ce dernier en Cu(I). Les paramètres déterminés se montrent efficaces sans qu'un électrodépôt de cuivre métallique sur la surface d'or ne soit observée.

L'approche de la réaction de « click » électrocatalysée a permis la fonctionnalisation sélective de nos électrodes d'or avec de bons rendements. Il a été démontré que la réaction de « click » se réalise sur la surface si, et seulement si, un potentiel spécifique de -300 mV *vs Ag/AgCl* est appliqué.

Ces résultats ont été démontrés dans un premier temps par l'immobilisation sur la surface d'une espèce rédox active : Le 2-azidoéthyl ferrocène **6**. L'avancement de la réaction a été suivie par cyclovoltampérométrie cyclique. La caractérisation par XPS de la surface de l'électrode a apporté la confirmation de cette immobilisation.

Dans un second temps, l'efficacité de la réaction a été mise en évidence par l'immobilisation de nanoparticules fluorescentes modifiées en surface par des fonctions azoture. Le greffage de ces particules a été observé par microscopie optique de fluorescence. Il a été ainsi acquis une preuve visuelle de cette chimie électrocatalysée.

Nous avons enfin démontré par spectroscopie d'impédance que la réaction de « click » électroassistée est efficace pour l'immobilisation de la streptavidine, sous sa forme naturelle, ou ancrée sur nanoparticule. Une couche intermédiaire de streptavidine permet d'immobiliser par la suite des entités biotinylées supplémentaires, tel qu'il a été démontré pour l'immobilisation de l'albumine sérique humaine sur nos supports.

En outre, l'alkylthiol utilisé dans cette étude, le bis(DTPA)héxynyle, se révèle être un élément d'ancrage sur or compatible avec l'application d'un vaste domaine de potentiels (-0,5 V à +0,9V *vs ECS*), avec des conditions de stabilité supérieures aux monothiols plus classiques. Le stockage des électrodes sous tampon à température ambiante peut dépasser une période de 20 jours sans qu'il ne soit observé de variations notables d'intensité du signal. Ce composé s'annonce donc très prometteur pour la réalisation de biocapteurs robustes pour la détection multiplexée de cibles pour un diagnostic médical efficace.

Un système performant d'immobilisation sur or par un mécanisme électroassisté a ainsi été mis au point avec un certain nombre de dérivés de différentes taille et composition chimique. Il reste encore à démontrer la fiabilité de ce système pour l'élaboration d'un biocapteur spécifique et sensible.

E. Partie expérimentale

E.1. Activation de la surface d'or

Les solutions aqueuses ont été préparées à partir d'eau déionisée par un système Milli-Q (Millipore, Bedford, MA). Sauf indication contraire, toutes les analyses ont été conduites dans une solution d'électrolyte d'analyse (PBE). Il s'agit d'un tampon phosphate (20 mM) de pH = 6,4, avec du perchlorate de sodium pour électrolyte (250 mM). Les solutions sont désoxygénées par un flux d'Argon avant utilisation. Les mesures électrochimiques sont réalisées avec un compartiment conventionnel à 3 électrodes, de volume interne compris entre 1,5 mL à 5 mL (Verre Equipements, Collonges au Mont d'Or, France), fermé hermétiquement d'un côté avec une électrode laminaire d'or (7 mm² de surface) utilisée comme électrode de travail et, de l'autre côté, fermée avec une électrode laminaire de platine (38,5 mm² de surface) utilisée comme contre électrode (Figure E.1.).

Figure E.. :Cliché de la céllule d'analyse électrochimique

Une électrode au calomel saturée au chlorure de potassium (ECS) de Radiometer Analytical (Villeurbanne, France) a été utilisée comme référence. Ce système est connecté à un potentiostat Bio-Logic VMP2 (Bio-Logic Science Instruments, Pont de Claix, France). Les résultats sont enregistrés avec le logiciel EC-Lab fourni par Bio-Logic Science Instruments.

L'activation de la surface d'or est réalisée dans le système d'analyse dans lequel sont introduits 5 mL d'une solution de soude à 0,5M. Au besoin, l'électrode de platine et préalablement nettoyée à l'acide sulfurique concentré puis rincée à l'eau distillée et finalement séchée. Après l'application d'un potentiel de départ de 0 mV, une série de 10 cycles en voltampérométrie cyclique a été effectuée entre -400 mV est -1400 mV. Le potentiel de fin du programme est de -1400 mV.

E.2. Réduction de l'élément d'ancrage et greffage

Avant tout greffage sur surface d'or, il est nécessaire de réduire les alkylthiols. Cette réduction est effectuée en utilisant 1 µL de chlorhydride de tris(2-carboxyéthyl) phosphine (TCEP/HCl, 160 mM dans l'eau) et 5 µL de bis(DTPA)héxynyle **7** (0,8 mM dans l'eau)[198]. Après 2h de réduction, le milieu réactionnel est repris dans du tampon dit de greffage (tampon phosphate 100 mM, pH =8) de manière à obtenir 96 µL d'une solution constituée de **7** (40 µM) et de TCEP/HCl (1,6 mM) au tampon contrôlé par le tampon de greffage, selon un protocole décrit par Ricci et coll.[199]. Cette solution est directement appliquée sur l'électrode d'or fraîchement activée, et rincée à l'eau. L'immobilisation se déroule sur une période allant de 3 à 5 jours, selon l'étude envisagée. Au terme de cette période, l'électrode est rincée avec de l'eau distillée, et le système est plongé 1h dans 60 µL d'une solution de mercaptopropanol (1mM).

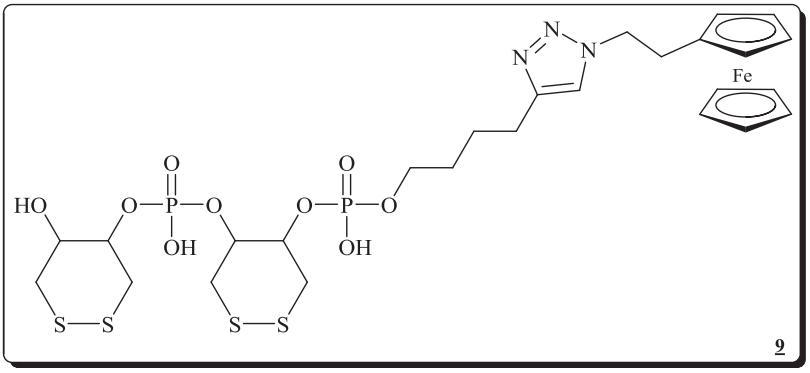
E.3. Méthode d'activation électrochimique de la chimie « click »

L'électrode fraîchement greffée par élément d'ancrage **7** est utilisée immédiatement afin de réaliser la réaction de « click » avec l'azidoéthyl ferrocène ***6***. La procédure est similaire à ce qui a été décrit par les équipes de Devaraj[33] et Canete[149]. L'électrode modifiée est rincée puis incubée dans 4 mL d'une solution de 10 µM de TBTA, 10 µM de $CuSO_4$ et 1,10 ou 100 µM de ***6*** dans un mélange DMSO/PBE (50 :50 v/v). La réaction de « click » est menée sous un potentiel de -300 mV *vs Ag/AgCl*. Une CV est enregistrée toutes les 15 minutes, avec une vitesse de balayage égale à 0,05 $V.s^{-1}$, afin de suivre l'évolution de la réaction. Celle-ci s'achève lorsque l'intensité atteint un plateau, généralement acquis au bout de 2h de réaction. L'électrode est ensuite abondamment rincée afin d'enlever toute trace d'éléments adsorbés sur la surface.

E.4. Méthode d'analyse électrochimique

Avant analyse par voltampérométrie cyclique, l'électrode greffée est nettoyée avec de l'eau puis avec une solution d'électrolyte d'analyse. Les mesures électrochimiques sont effectuées dans 5 mL de PBE. Les CV sont enregistrées dans une gamme de potentiel allant de 0,1 V à 0,95 V *vs ECS.* La variation de cette gamme est adaptée aux besoins de l'analyse. Pour chaque mesure, trois cycles successifs sont effectués pour s'assurer de la stabilisation du signal, et seul le troisième cycle est gardé comme résultat. Pour la détermination de la constante de transfert électronique k_{et}, la vitesse de balayage a été menée de 0,05 $V.s^{-1}$ à 5 $V.s^{-1}$.

E.5. Synthèse du bis(DTPA) hexyl-1,2,3-triazol-3-éthyl ferrocène **9**



Après la réaction de la DTPA-CPG avec le DTPA et l'héxynyle phosphoramidite (Chapire I, partie E.2) le bis (DTPA)héxynyle-CPG a été introduit dans 2mL d'un mélange eau/DMSO (50:50) auquel a été dissous de l'ascorbate de sodium (5mM), TBTA (1mM), sulfate de cuivre (2,5 mM) et du composé **6** (1,5 mM). Le milieu réactionnel est laissé à 60°C, sous agitation, pour 2 jours. Le composé formé est ensuite clivé de la CPG par traitement dans l'ammoniaque (35% massique) à température ambiante, durant une nuit[159]. Après évaporation à sec, le résidu est caractérisé par spectroscopie de masse. Un ε_{260} de 2176 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ a été calculé pour la courbe d'étalonage de **6** dans l'eau. Nous avons postulé que cette valeur était identique à celle du composé **9**. Un rendement global de 93 % a été déterminé en mesurant l'absorbance de l'entité **9** à 260 nm.

SM (ESI-) : 780,0 ($[M - H]^-$)

Formule brute : $C_{26}H_{36}FeN_3O_9P_2S_4^-$ masse calculée 780,6

masse trouvée 780,0

E.6. Caractérisation des surfaces d'or fonctionnalisées par X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)

Les mesures ont été effectuées sur un appareil PHI Quantera SXM (Physical Electronics, Chanhassen, USA) équipé avec une source monochromatique X utilisant la raie Kα de l'Aluminium d'énergie 1486,6 eV et opérant à 15 kV pour un courant de 4 mA. Les photoélectrons sont collectés à 180 ° par un analyseur hémisphérique. Le diamètre de l'aire analysée est de 200 µm et l'angle de détection par rapport à la surface de l'échantillon analysé est de 45°. Les échantillons ont été analysés avec un double rayon de neutralisation de charge, et les spectres sont calibrés à partir de l'énergie de liaison C-C C1s à 285 eV. Les concentrations atomiques sont déterminées en utilisant des facteurs de sensibilité fournis par le fabricant. Les déviations standards sont calculées à partir des mesures sur trois différentes aires.

E.7. Fonctionnalisation des nanoparticules rhodamine

E.7.a Réactifs & Appareillages

Le 6-aminohexyl-1-ol, 3-(triéthoxysilyl) propyl isocyanate, 3-aminopropyl-triéthoxysilane (APTES), *O*-benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium hexafluorophosphate (HBTU), diméthylaminopyridine (DMAP) et le 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undéc-7-ène sont disponibles chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). La CPG (300nm de taille moyenne des pores) est achetée chez Fluka. Les nanoparticules de silice fluorescentes (rhodamine B, *NP* de diamètre ~50 nm) sont acquises auprès de Nano-H (Lyon, France). La concentration de la solution mère de *NP* est de $9{,}3.10^{13} \pm 9{,}10^{12}$ NP.mL^{-1}. Cette concentration de référence est calculée en dosant dans un premier temps la quantité de silicium dans la solution (5,0 ± 0,5 g.L^{-1} en silicium) par Spectrométrie par torche à plasma (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy ; ICP-AES), puis en prenant le diamètre moyen des particules (50nm) et leur masse volumique (valeur estimée de 1,75 g.cm^{-3}) pour le calcul. En effet, les solutions colloïdales inorganiques/organiques (i.e. les particules de silice comportant des molécules organiques comme l'APTES, ou la rhodamine encapsulée dans le cœur des objets) ont des masses volumiques inférieures à la silice (1,96 g.cm^{-3})[200] .
Les spectres RMN ^{1}H sont réalisés sur un Bruker DRX-300 dans du chloroforme deutéré.

Les clichés obtenus par microscopie électronique en transmission (Transmission electron microscopy TEM) sont obtenus sur un Philips CM120 opérant à 120 kV. Les particules de *NP* sont examinées après le dépôt de 5 µL de solution sur une grille de cuivre recouverte de formvar (Electron Microscopy Sciences) et évaporées à sec.
Les mesures par diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering DLS) sont effectuées sur un appareil Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments) pour déterminer le rayon hydrodynamique et l'indice de polydispersité (polydispersity index PdI) des *NP*. Le même appareillage permet de déterminer le potentiel Zeta.

La spectrométrie de masse des ions secondaires à temps de vol (Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry ; TOF-SIMS) est menée sur un instrument TOF-SIMS Trift III de Physical Electronics (Minneapolis, USA). Cet appareil est équipé d'un sas d'introduction et d'une chambre d'analyse couplée avec un analyseur de type TOF. L'analyse est conduite sous ultravide ($1{,}33.10^{-7}$ à $1{,}33.10^{-9}$ Pa). La source d'ionisation est un canon à ions primaires en mode pulsé (Au_n^+) de 22 keV d'énergie. Le bombardement de l'échantillon se fait par balayage du faisceau d'ions sur une surface de 300 µm x 300 µm. Les données sont analysées en utilisant le logiciel WinCadence. La calibration du spectre de masse est effectuée sur les ions secondaires hydrocarbonés. Chaque échantillon est passé sur indium.

E.7.b Modification des nanoparticules rhodamine par un azoture.

L'immobilisation sur CPG des *NP* préalablement hydroxylées en surface est réalisée par Gabriel De Crozals selon le protocole qui a été déjà publié[181].

35 mg de CPG fonctionnalisée par les *NP* sont introduits dans une colonne de synthèse, afin de fonctionnaliser les *NP* par synthèse automatisée sur support (Cf. Chapitre I). On réalise ainsi l'incorporation successive de 5 résidus PEG phosphoramidite sur les fonctions hydroxyle libres des nanoparticules, puis la synthèse automatisée est achevée par l'incorporation du bromohexyle phosphoramidite terminal. Les *NP* ***10*** sont ainsi obtenues. Une partie de la CPG ainsi fonctionnalisée est conservée, pour décrocher les nanoparticules et les analyser plus tard par TOF-SIMS.

La substitution de l'halogénure terminal est réalisée dans 2 mL de DMF anhydre, dans lesquels sont préalablement dissous l'azoture de sodium (100mM) et l'iodure de sodium (100 mM). La substitution est réalisée en 2 h à 65 °C[159] obtenant ainsi des *NP* ***11***. Celles-ci sont décrochées en agitant le support dans 600 µL d'un mélange Eau/ACN (50 :50 v/v) à 0,5 M de DBU, à 30 °C durant 1 heure. Le surnageant fluorescent est ensuite prélevé puis dilué dans de l'eau stérile pH 7. La solution est centrifugée sur un filtre 0,45 µM Amicon Filter, pour séparer les nanoparticules de la CPG, puis centrifugée sur filtre 30K Amicon ultra Filter pour éliminer la DBU et l'ACN. Après une série de trois centrifugations, la solution de *NP* azotures est ensuite stockée à 4°C, en évitant tout contact avec la lumière.

L'analyse de la surface des nanoparticules obtenues lors de ces deux étapes se fait par TOF-SIMS en mode positif et négatif. Pour la *NP* ***10***, les pics de la silice, des phosphates et du bromure sont majoritairement détectés : m/z = 16 (O^-) ; m/z = 13 (CH^-) ; m/z = 28 (Si^+) ; m/z = 63 (PO_2^-) ; m/z = 81 (Br^-). Pour les *NP* ***11***, les pics de la silice, des phosphates sont majoritairement détectés : m/z = 30 (CH_4N) ; m/z = 28 (Si^+) ; m/z = 63 (PO_2^-). Le pic du bromure m/z = 81 n'est plus observé

E.8. Immobilisation électrochimique des nanoparticules sur surface d'or

Après immobilisation du dérivé bis(DTPA)héxynyle **7** sur électrode d'or en 4 jours (Cf. partie II.E.2) et avant de procéder à la réaction électrocatalysée, l'électrode est incubée dans 100 µL d'une solution à 100mM en phosphate de sodium, 1% massique de BSA et 0,1% massique de Tween durant 20 minutes à température ambiante. L'électrode est rincée, puis les *NP* ***11*** sont

greffées sur l'électrode *via* le protocole de la réaction de « click » décrit précédemment (Cf. partie II.E.3). Il a été choisi de travailler dans une mixture DMSO/PBE (50 : 50, v/v) contenant 10 µM de TBTA, 10 µM de $CuSO_4$ et les *NP* 12 sont ajoutées à une concentration de $2{,}8.10^{13}$ $NP.mL^{-1}$. La réduction du cuivre se fait par chronocoulométrie, à -300mV *vs. Ag/AgCl* durant 3h. Le test négatif est quant à lui conduit sur une seconde électrode, en suivant scrupuleusement le même protocole, à l'exception du potentiel appliqué qui est alors égal à +250 mV *vs. Ag/AgCl*.

E.9. Observation des nanoparticules par microscopie optique de fluorescence

Les images de microscopie optique de fluorescence sont prises sur un appareil Zeiss Axioplan 2 Imaging, équipé de lentilles de grossissement ×10 et ×40 et d'une caméra monochromatique. Les échantillons sont observés d'abord sous lumière transmise, puis par fluorescence. La rhodamine est excitée par la lampe UV-Visible munie d'un filtre à bande passante passe-bande de 550 (±25) nm et la fluorescence de désexcitation de l'échantillon est collectée par un filtre à bande passante de 605 (±70) nm.
Après la réaction de « click », les électrodes sont abondamment rincées à l'eau distillée, puis passées au bain à ultrasons dans une solution aqueuse de Tween 1% massique (2 fois 5 min, V ~ 5mL). L'électrode est ensuite abondamment rincée à l'eau distillée, puis à l'éthanol et l'acétone, et enfin séchée sous flux d'azote.

E.10. Méthode d'immobilisation de la biotine

E.10.a. réactifs

Le conjugué Azide-PEG3-biotine est obtenu auprès de Jena Sciences (Saint-Martin-d'Hères, France). La streptavidine et l'albumine sérique bovine (BSA) sont achetées chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Les nanoparticules de silice à cœur rhodamine fonctionnalisées par la streptavidine[181] ont été achetées chez Nano-H (Saint Quentin Fallavier, France). La protéine d'albumine sérique humaine biotinylée (HSA) est procurée auprès de Abcam (Paris, France).

E.10.b. immobilisation du composé Azide-PEG3-biotine

Après immobilisation du dérivé bis(DTPA)héxynyle 7 sur électrode d'or pendant 4 jours (Cf. partie II.E.2), l'Azide-PEG3-biotine est greffée sur l'électrode *via* le protocole de la réaction de « click » décrit précédemment (Cf. partie II.E.3). Il a été choisi de travailler dans une mixture DMSO/eau (50 : 50, v/v) contenant 10 µM de TBTA, 10 µM de $CuSO_4$ et 10µM d'Azide-PEG3-biotine. La réduction du cuivre se fait par chronocoulométrie, à -300mV *vs. Ag/AgCl* durant 3h. Le test négatif est quant à lui conduit dans des conditions similaires, excepté le potentiel qui est alors égal à +300 mV *vs. Ag/AgCl*. Les mesures par spectrométrie d'impédance électrochimique (SIE) sont conduites à la fin de cette réaction.

E.11. Reconnaissance Streptavidine-biotine sur surface d'or, suivie par spectrométrie d'impédance et microscopie optique de fluorescence

E.11.a. Suivie de la reconnaissance par SIE.

Une fois la réaction de « click » complétée, l'électrode ainsi fonctionnalisée est rincée à l'eau, puis incubée dans 100 µL d'une solution de streptavidine à (1 $mg.mL^{-1}$) dans un tampon phosphate (10 mM $NaPO_4$, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7,4) durant 30 minutes à température ambiante. La SIE est utilisée pour suivre l'évolution de la résistance de transfert de charges après la formation du complexe biotine/streptavidine. Les mesures sont effectuées en utilisant un appareil Voltalab 80, model PGZ 402 assisté du programme Voltamaster 4. Toutes les mesures électrochimiques d'impédance sont conduites à température ambiante dans

un tampon d'analyse qui sera désigné par PBS. Ce tampon aqueux est constitué de 10 mM de $Fe(CN)_6^{3-/4-}$, 10 mM de phosphate de sodium, 2,7 mM de chlorure de potassium, et 137 mM de chlorure de sodium, à pH 7,4. Les mesures sont menées avec une gamme de fréquences allant de 10^5 Hz à 10^{-1} Hz, avec l'application d'un potentiel de -200 mV *vs Pt* utilisant une modulation de voltage de 10mV. Le diagramme de Nyquist est modulé selon un circuit simplifié de Randles, en utilisant le programme Zplot/Zview (Scribner Associate Inc, Southern Pines, NC, USA).

Le même protocole est conduit après reconnaissance de la protéine d'albumine sérique humaine biotinylée, avec une gamme de concentrations comprises entre 10^{-8} et 10^{-4} mg.mL^{-1}. Dans un premier temps, les étapes citées précédemment pour l'immobilisation de la streptavidine sont reproduites à l'identique, l'électrode est ensuite récupérée et incubée avec 100 µL de concentration voulue en HSA une demi-heure à température ambiante. L'évolution de l'impédance en fonction de la concentration HSA est alors suivie, selon le protocole de spectrométrique d'impédance décrit plus haut.

E.11.b reconnaissance biotine/streptavidine sur nanoparticules fluorescentes

Cette étude est faite comme contrôle de l'électroadressage. Après 3h avec de réaction de « click » avec l'azide-PEG3-biotine, l'électrode est rincée à l'eau distillée, puis séchée sous flux d'azote. Un premier traitement de la surface est effectué pour éviter toute adsorption non spécifique, en incubant l'électrode dans 100 µL d'une solution à 100mM en phosphate, 1% massique de BSA et 0,1% massique de Tween durant 20 minutes à température ambiante. L'électrode est rincée à l'eau, puis 100 µL d'une solution de streptavidine fonctionnalisée sur nanoparticules de silice ($0{,}15.10^{10}$ NP.mL^{-1}) sont mis en réaction durant 30 minutes, à température ambiante. Les électrodes sont ensuite abondamment rincées à l'eau distillée, puis séchées sous flux d'azote. Les échantillons sont observés avec les mêmes configurations d'appareillage que pour le cas des nanoparticules « clickées » sur surface (Cf. partie II.E.9.)

CHAPITRE III : SYNTHESE D'OLIGONUCLEOTIDES MODIFIES PAR DES FERROCENES OU UNE CYANINE 5 POUR LA FONCTIONNALISATION DE SURFACE

A. Etude bibliographique sur les oligonucléotides de structure tige-boucle

La structure tige-boucle (« stem-loop ») ou encore épingle à cheveux (« hairpin ») de l'ADN résulte d'un repliement intramoléculaire guidé par l'appariement de bases complémentaires au sein de la même séquence. Les deux régions formant cette partie hybridée en double hélice, appelée la tige, sont reliées entre elles par le reste de la séquence, appelée la boucle.
Cette structure existe de façon naturelle, notamment au sein des acides ribonucléiques (ARN) et plus particulièrement dans le cas des ARN de transfert (ARNt).

A.1. Amorce d'une amplification enzymatique et outil de détection en solution par fluorescence

A.1.a. Les structures tige-boucle pour l'amorce d'une amplification enzymatique

La structure tige-boucle est couramment utilisée dans le domaine de la biologie moléculaire comme amorce pour l'amplification enzymatique des acides nucléiques. La technique d'amplification la plus communément employée est la PCR (Polymerase Chain Reaction). Cette technique permet d'amplifier un fragment ADN spécifique de longueur définie à partir d'un échantillon complexe en faible quantité. Une amplification de l'ordre du million de copies est obtenue en quelques heures, ce qui permet une détection facile par des techniques standards de fluorescence ou d'électrochimie. La PCR est basée sur une répétition de cycles de réplication d'une matrice double brin d'ADN accélérée par transition de température. Chaque réaction met en œuvre deux « primers », séquences d'amorce de la réplication, qui définissent en la bordant, la séquence à amplifier. Les produits d'un cycle deviennent les substrats du cycle suivant, octroyant à l'amplification des propriétés de réplication exponentielle.

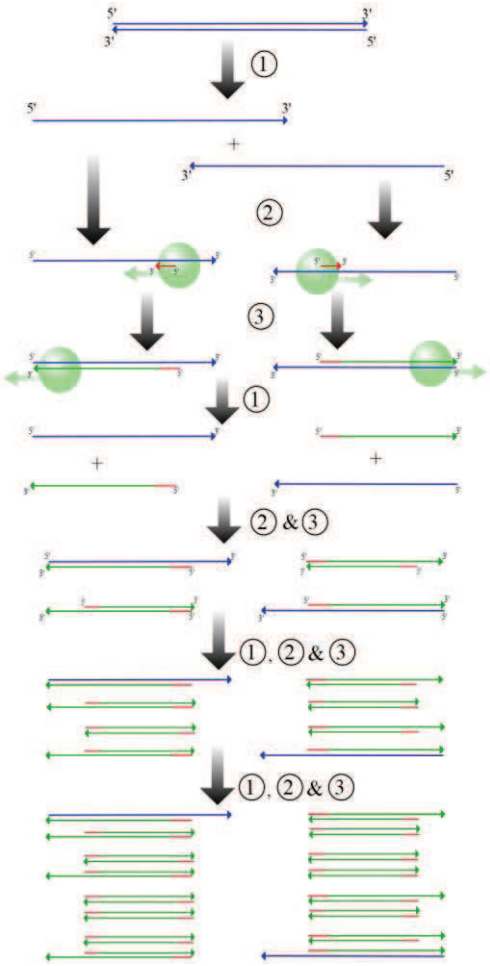


Figure III.A.1. Schéma de la réplication d'ADN par PCR.

1) Dénaturation des doubles brins à 95°C

2) Hybridation des amorces sur les cibles à 45-60°C

3) Synthèse des brins complémentaires par la polymérase à 72 °C

Une PCR se déroule généralement trois étapes :

- une étape de dénaturation des doubles brins d'ADN par augmentation de la température
- une étape d'initiation ou d'hybridation durant laquelle la température diminue pour permettre l'appariement des « primers », sens et anti-sens.
- Une étape d'élongation des brins complémentaires par la polymérase. Le brin est fabriqué à partir des désoxyribonucléotides triphosphates libres, présents dans le milieu réactionnel. À l'issue de ces trois étapes, un nouveau cycle d'amplification peut commencer.

Imaginé par Mullis en 1985 (prix Nobel en 1993), la technique a connu un essor considérable à partir de la commercialisation, dans les années 90, d'une ADN polymérase résistante à des températures élevées : la Taq polymérase.

L'utilisation d'amorces ayant une structure tige-boucle apporte à cette technique une sélectivité, une efficacité et une spécificité supplémentaires[201-203]. En raison des équilibres thermodynamiques, l'« hairpin » ne s'ouvre pour former un duplex amorce / cible que si la séquence de la boucle est parfaitement complémentaire à celle de la cible, limitant les interactions non spécifiques lors de l'initialisation de la duplication de la séquence voulue. Cette spécificité a depuis été exploitée dans le but de faire de la détection de cibles ADN en solution par fluorescence aboutissant au concept de « beacon » moléculaire.

A.1.b. Détection en solution par fluorescence à l'aide des « beacons » moléculaires.

Le concept de « Beacon » moléculaire a été développé par le groupe de Tyagi et Kramer sur le principe d'ouverture et de fermeture des structures tige-boucle[11, 204-205]. Leurs travaux ont consisté à modifier les séquences par un fluorophore à l'extrémité 5' et un suppresseur de fluorescence « quencher » à leur extrémité 3'. À la fermeture de la structure tige-boucle, le « quencher » situé au voisinage du groupe fluorophore empêche toute émission de fluorescence. En présence de la séquence complémentaire de la boucle, le « beacon » s'ouvre, éloignant le fluorophore du « quencher », permettant par la même occasion l'émission de fluorescence.

Figure III.A.2 : Structure du « beacon » moléculaire développé par Tyagi et Kramer[205].

La structure du « « beacon » est soumise à un contrôle thermodynamique. Il existe un équilibre entre la forme ouverte et la forme fermée du « beacon ». Son utilisation dans le cadre d'une PCR nécessite que la structure « « hairpin » » soit plus stable que le duplex formé entre la cible et la boucle de la structure.
Durant l'étape 2 du cycle PCR, lorsque la température est inférieure à 60°C, les amorces s'hybrident à la cible tout comme les « beacons ». Il y a, alors, émission de fluorescence. Celle-ci peut être enregistrée et permet de déterminer la quantité de cibles présentes dans la solution. Lors du passage à l'étape suivante, la température remonte afin de permettre l'action

de la Taq polymérase. Le « beacon » n'est plus lié à la cible et se referme provoquant l'extinction du signal.

Figure I.A.3. : Émission de fluorescence des « beacons » moléculaires en fonction de la température en présence de la cible complémentaire (en bleu) ou non (en rouge) durant les cycles PCR[205]

A.2. Sonde de capture et de détection

L'utilisation de sondes moléculaires fixées sur un support permet d'éliminer plus facilement les contaminants non spécifiques des solutions et d'augmenter la sensibilité de détection des systèmes[206-208]. Horejsh et coll. ont décrit une structure de sondes dont la tige portant le « quencher » est modifiée par une base nucléique biotinylée pour être immobilisée sur particules[207]. Ces dernières sont fonctionnalisées soit par des streptavidines, soit par des biotines. Dans le premier cas, les molécules ont été reliées aux particules par un pont biotine/streptavidine tandis que dans le second cas, elles ont été reliées par un double pont biotine/streptavidine/biotine Figure III.A.4.

Figure III.A.4. : Immobilisation des « beacons » moléculaires sur particules via une interaction biotine/streptavidine. Application à la détection d'ADN par fluorescence[207].

L'utilisation d'un double pont permet de diminuer le bruit de fond et d'augmenter aussi la sensibilité lorsque la mesure de fluorescence est réalisée sur les microsphères en solution.
Ce système admet un seuil de sensibilité de l'ordre du femtomolaire.

Toujours dans une optique de réduction du bruit de fond, certains auteurs ont utilisé le support lui-même comme « quencher ». Les structures « beacons » modifiées uniquement par un fluorophore ou greffées sur des quantum dots [209] (nanoparticules luminescentes) ont été notamment immobilisées sur or. Ce dernier à la propriété de diminuer, voire d'empêcher l'émission de la fluorescence de certains fluorophores tels que la fluorescéine ou certaines rhodamines[27, 210-211].

Les structures tige-boucle de sondes permettant une émission « on/off » de fluorescence ont ainsi montré leur intérêt dans de nombreuses applications. Elles ont également été étudiées

pour le développement de capteurs. Heeger (prix Nobel de chimie en 2000) et ses collaborateurs ont développé une structure comparable au « beacon » pouvant détecter des séquences d'acides nucléiques par des méthodes électrochimiques[27]. Une séquence tige-boucle a été modifiée en 5' par un bras permettant le couplage d'un ferrocène ester activé. En outre, un bras alkylthiol en position 3' permet son greffage sur or. À la fermeture de la structure tige-boucle, le ferrocène est localisé à proximité de la surface d'or, ce qui permet un excellent transfert électronique à l'électrode, conduisant à un signal électrochimique de forte amplitude. Lorsque le « beacon » s'hybride avec la séquence complémentaire de la boucle, celui-ci s'ouvre, éloignant de la surface le ferrocène. Le transfert électronique étant défavorisé, l'amplitude du signal électrochimique décroît. (Figure III.A.5.)

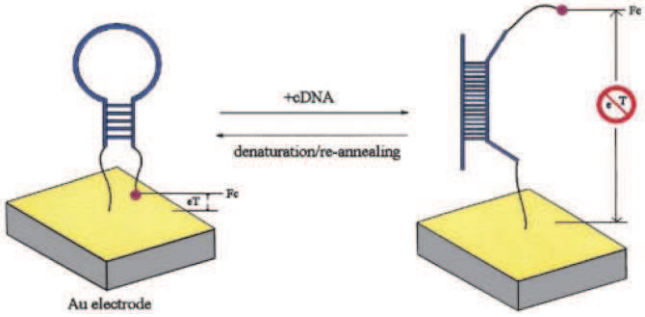


Figure III.A.5. Système de détection « ON/OFF » présentant une structure tige-boucle proposé par Heeger et Coll.[27]. Lorsque le « Beacon » est fermé, le transfert d'électrons peut s'effectuer entre ferrocène et électrode. À son ouverture, le ferrocène s'éloigne de l'électrode entraînant une chute du signal électrochimique.

Les travaux montrent une relation de proportionnalité entre la diminution du signal et la concentration de cibles introduites dans le milieu. Ce système permet d'envisager la réalisation de puces ADN bas-coût. Contrairement à la détection par fluorescence, la détection électrochimique se fait avec des appareils moins onéreux, plus petits, et transportables.

L'avantage principal de l'électrochimie et de pouvoir réaliser une détection directe de la réaction de reconnaissance sonde-cible en temps réel. Cette technique, s'étant montrée très sensible, pourrait permettre, à terme, une détection des cibles dans des échantillons sans une étape d'amplification préalable[199, 212-213].

B. Méthodes d'incorporation de ferrocènes dans les ODN

B.1. Incorporation de ferrocènes par modification des bases nucléiques

La méthode la plus répandue pour la modification d'un oligonucléotide par des ferrocènes est l'incorporation de ces derniers sur les bases azotées des nucléosides. Ces modifications interviennent principalement sur la position 3 [214] et la position 5 des bases pyrimidines [215-222] ainsi que sur la position 1 de la guanine [218] et la position 8 de l'adénine[219, 223].
Mukumoto et coll. ont proposé un système de marquage en position 3 de la thymine et en position 1 de la guanine de fragments d'ADN, ainsi que la position 3 de l'uracile de fragments ARN [218]. Un ferrocène carbodiimide réagit sur l'amide intracyclique de la base, formant un lien covalent (Figure III.B.1). La réponse électrochimique des ferrocènes peut-être visualisée après hybridation avec un ODN sonde complémentaire préalablement greffé sur une électrode de travail en or *via* la méthode des monocouches auto assemblées de thiols (SAM). Une simple différence de longueur de chaîne entre deux molécules redox peut permettre d'obtenir deux signaux électrochimiques très distincts. Les potentiels redox des ferrocènes sont impactés par la nature de leur substituants.

Figure III.B.1. Marquage de fragments ARN par réaction de couplage d'un ferrocène carbodiimide sur les uraciles[218]

Toutefois, l'inconvénient de ce système est de déstabiliser la formation de la double hélice lors de l'hybridation. Les ferrocènes sont situés sur une position participant à la formation des paires de bases.

B.2. Incorporation de ferrocènes sur la position 2' des ribonucléosides

Une alternative consiste à modifier non pas la base mais la position 2' du ribose[224-225]. Les ribonucléosides Adénosine et Cytidine sont modifiés de façon à être incorporés ensuite dans une chaîne ODN synthétisée sur support solide, *via* la chimie dite aux phosphoramidites (Figure III.B.2)

Figure III.B.2. : Stratégie de synthèse du Synthon Riboadénosine phosphoramidite modifié par un ferrocène proposé par Yu et Coll.[224-225].

Néanmoins un faible rendement de couplage du ferrocène est observé. La raison est que la réaction ne s'effectue pas exclusivement sur la position 2' du ribonucléoside. Le dérivé ferrocène peut aussi se coupler à la position 3'. Le composé secondaire ne peut être utilisé pour la synthèse automatisée.

B.3. Incorporation de ferrocènes à l'extrémité 5' ou 3' d'un oligonucléotide

La méthode de modification d'oligonucléotides la plus couramment utilisée reste le couplage du ferrocène ester activé sur un oligonucléotide synthétique modifié à une extrémité par un bras aminé (Figure III.B.3). L'ester activé est obtenu *in situ* par réaction d'un ferrocène acide carboxylique avec le *N*-hydroxysuccinimide (NHS)[22, 110, 226-227] en présence de 1-éthyl-3[(3-diméthylamino)propyl]carbodiimide (EDC)[217]. Le couplage d'un oligonucléotide est réalisé en solution, avec des rendements de l'ordre de 70 %, ce qui nécessite des étapes de purification des conjugués par CLHP.

Figure III.B.3. Préparation de ferrocène ester activé et couplage en 5' d'un oligonucléotide modifié par un bras aminé.

Par ailleurs, Anne et Demaille ont démontré que l'impact du ferrocène positionné à l'extrémité d'une chaîne ODN sur la stabilité du duplex est faible[31]. La différence de température de fusion des duplexes formés avec les ODN modifiés et non modifiés est de 1°C pour un 20mère.

Une autre piste a été exploitée par Korri-Youssoufi et Makrouf[144-145]. La méthode qui a été développée consiste à synthétiser un monomère pyrrole ferrocène ester activé. Ce monomère est déposé sur une surface conductrice par électropolymérisation du pyrrole. L'ester activé du ferrocène permet, par la suite, le couplage d'un oligonucléotide amino modifié en 5' (Figure III.B.4)

Figure III.B.4. Méthode d'incorporation d'un ferrocène proposée par Korri-Youssoufi et Makrouf[144 145]

Cette méthode, néanmoins, ne permet pas de coupler plusieurs ferrocènes. Dans l'optique de développer un système électrochimique sensible, il est important de multiplier les molécules redox pour l'amplification du signal électrochimique.

Dans ce but, les travaux de Chatelain[172, 228] sont basés sur la synthèse de monomères ferrocényl phosphoramidite pouvant être incorporés au cours d'une synthèse automatisée sur support solide d'un ODN[229].
L'Incorporation de cette molécule redox au sein de sondes de détection de structure tige-boucle permet d'associer les spécificités de reconnaissance des cibles, à un gain de signal dû à l'augmentation du nombre de marqueurs redox sur la sonde. Le choix du positionnement des ferrocènes au sein de la structure tige-boucle s'est avéré essentiel pour le maintien des performances de la sonde.

C. Synthèse d'un monomère ferrocényl phosphoramidite et optimisation de son incorporation dans un ODN par synthèse automatisée sur support solide

C.1. Synthèse du monomère ferrocényl phosphoramidite ***13***

Le composé 1-(3-*O*-diméthoxytritylpropyl)-1'-[3'-*O*-(2-cyanoéthyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidityl)propyl] ferrocène ***13*** est synthétisé, dans cette étude, en deux étapes à partir du 1,1'-bis(3-hydroxypropyl)ferrocène.
Le 1,1'-bis(3-hydroxypropyl)ferrocène nécessite trois étapes de synthèse, à partir du produit commercial 1,1'-bisformylferrocène (Figure II.C.1).
Une réaction de Wittig-Horner est effectuée entre ferrocène bisformylé et le diéthyl phosphonoacétate (Figure II.C.1.i).

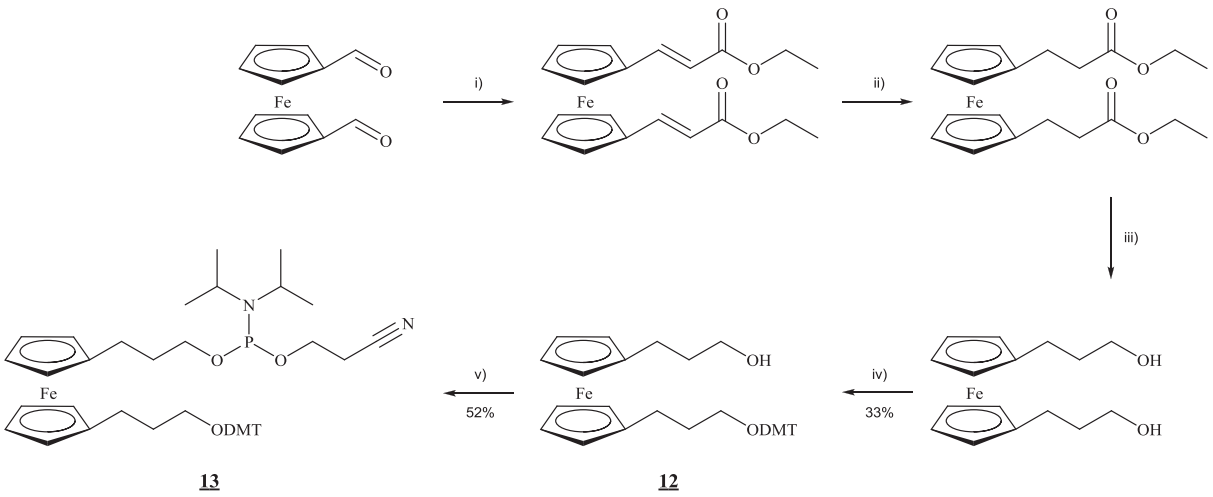


Figure III.C.1. : Synthèse du 1-(3-O-diméthoxytritylpropyl)-1'-[3'-O-(2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylphorphoramidityl)propyl] ferrocène ***13***

i) diéthyl phosphonoacétate, Na, EtOH, 0°C, 1h ; ii) H_2/Pd/C, acétate d'éthyle, t.a., 24h;iii) $LiAlH_4$, diéthyléther, 1h ; DMTr-Cl, DIPEA, DMAP, pyridine anhydre, t.a., 4h30 ;v) chloro(diisopropylamino)-β-cyanoéthoxyphosphine, DIPEA, acétonitrile anhydre, t.a., 1h.

La réduction des liaisons éthyléniques du 1,1'-bis[(2-éthyloxycarbonyl)éthylényl]ferrocène est réalisée par hydrogénation catalytique du palladium sur charbon pour conduire au 1,1'-bis[(2-éthyloxycarbonyl)éthyl]ferrocène (Figure II.C.1.ii). La réduction de l'ester est ensuite menée dans le tétrahydruroaluminate de lithium pour donner le 1,1'-bis(3-hydroxypropyl)ferrocène (Figure III.C.1.iii).
Ce composé, constituant notre réactif de départ, a été fourni par la société EZUS, basée à l'université Lyon 1, Villeurbanne.

L'objectif étant d'incorporer le ferrocène aux sondes *via* la synthèse automatisée des oligonucléotides, un des hydroxyles du composé 1,1'-bis(3-hydroxypropyl)ferrocène est protégé par un groupement 4,4'-diméthoxytrityle (DMTr-Cl), pour conduire au 1-[3-*O*-diméthoxytrithylpropyl]-1'-[3'-hydroxypropyl] ferrocène (***12***). Le composé obtenu est ensuite phosphitylé sur l'hydroxyle à l'aide de la chloro(diisopropylamino)-β-cyanoéthoxyphosphine en présence de DIPEA dans l'acétonitrile anhydre pour aboutir au composé ***13***. Le composé ***13*** a donc été obtenu en deux étapes, avec un rendement global de 19 %. Il est à noter que le composé bis-propanol n'ayant pas réagi peut être réutilisé, et la formation de l'espèce di-protégée, étant grandement responsable de la chute du rendement de l'étape iv), peut être

déprotégée dans des conditions faiblement acides pour régénérer l'espèce bis-propanol. Ces optimisations ne sont pas prises en compte pour le calcul du rendement global de la synthèse.

Le produit ***13*** est enfin caractérisé par RMN du proton et du phosphore. (Cf. partie expérimentale).
Le monomère ferrocène ainsi obtenu est repris dans l'acétonitrile anhydre avant d'être utilisé pour la synthèse des sondes. Son couplage est réalisé selon le cycle d'incorporation optimisé mis au point par Chatelain et Coll.[172].

C.2. Incorporation du monomère ferrocène

La synthèse d'un ODN modifié par des ferrocènes aboutit à un brut de synthèse comportant un certain nombre d'avortons. Pour faciliter la tâche de la séparation sur CLHP, les monomères ferrocènes doivent être introduits en début de synthèse. Les avortons contenant les monomères ferrocènes peuvent être facilement évincés par une simple centrifugation sur un filtre 30k.

La synthèse des sondes est réalisée sur une colonne commerciale dT-CPG. En effet, le nucléotide précédant le ferrocène influe sur la qualité de synthèse. La base T a de plus faibles répercussions sur le rendement global de synthèse.
L'incorporation du ferrocène sera réalisée selon un cycle de synthèse classique (Cf. Chapitre I), auquel seront néanmoins appliqués deux paramètres afin d'optimiser les rendements de couplage du monomère : le temps de couplage ne devra pas excéder 15 s, en raison de l'instabilité du ferrocène phosphoramidite en présence de l'activateur, et la concentration de la solution de synthon ferrocène, quant à elle, doit être de 0,1 M[230]. Le cycle de synthèse des sondes modifiées est disponible en annexe.

D. Synthèse de sondes ODN modifiées par des ferrocènes et des groupes fluorophores

D.1. Synthèse automatisée d'oligonucléotides de structure tige-boucle

D.1.a. Détermination d'une structure fonctionnelle

Le choix de la séquence de la sonde de détection joue un rôle capital dans l'efficacité du système. Ceci est d'autant plus vrai dans le cas de sondes en épingle à cheveux, puisqu'alors leur séquence influe sur leur stabilité thermodynamique et leur capacité à s'ouvrir en présence d'une cible complémentaire.

Les études de Tyagi[231] et Kramer[207] décrivent les caractéristiques d'un « Beacon » moléculaire performant. Leurs observations sont spécifiques à des structures « hairpin » modifiées par un fluorophore à une extrémité et un « quencher » à l'autre extrémité. Le raisonnement peut être également appliqué à d'autres « hairpins » modifiés, sous réserve de tenir compte des contraintes liées à la présence des modificateurs sur la structure.
Ces deux auteurs ont déterminé des « principes » pour établir les meilleures séquences des sondes de détection utilisables en PCR. La température de fusion des duplexes doit être comprise entre de 55°C et 70°C, l'hybridation des « primers » se déroulant à des températures généralement comprises entre 45 °C et 60°C. Cette propriété permet de favoriser l'hybridation de l'« hairpin » avec sa cible complémentaire durant cette dernière étape, produisant un signal fluorescent. Ce système permet de suivre en temps réel à chaque cycle le processus d'amplification des séquences.
Dans cette étude, les expériences seront menées à température ambiante. Le duplex doit être plus favorable que la forme « hairpin ». Cette structure doit être déplacée vers la forme duplex à 20°C, en présence de la cible. La séquence de la boucle de l' « hairpin » doit comprendre entre 12 et 20 nucléotides de façon à conserver une bonne sélectivité.
Les tiges de l'épingle à cheveux doivent comprendre entre 5 et 7 nucléotides, incluant plus de 50 % de bases C et G pour stabiliser suffisamment la structure « hairpin ». La température de fusion de l'épingle à cheveux doit être suffisamment élevée pour limiter les structures secondaires. Il est à noter que la température de fusion des tiges seules ne correspond absolument pas à la température de fusion de la structure « hairpin ». La présence de la boucle apporte une stabilité supplémentaire aux duplex formés par les deux courts fragments complémentaires de la tige.

D.1.b. Séquences retenues pour la suite des études

Il a été choisi une séquence décrite dans la littérature pour détecter le gène du virus Influenza pour constituer la boucle de la structure « hairpin ». La séquence tige-boucle étudiée par Chatelain et coll.[172] dans des travaux antérieurs a été optimisée dans le cadre de ce travail. Le choix de cette sonde optimisée dite de seconde génération sera explicité en fin de chapitre. Les séquences sont développées dans le tableau III.D.1. .

La première séquence, désignée sous le terme In, possède dans la tige six paires de bases non complémentaires de la cible. La deuxième séquence, notée In', présente une paire de bases supplémentaires dans sa tige, avec une base complémentaire de la cible, pour favoriser l'ouverture de l' « hairpin ».

La séquence In présente une boucle de 14 nucléotides complémentaires avec la cible, alors que la séquence In' possède une boucle de 19 bases complémentaires avec la cible.

Les températures de fusion (T_m) des structures potentielles et des duplex correspondants sont évaluées à l'aide d'un logiciel développé par la société IDT.

Nom	*Séquence*	*T_m « hairpin » (°C)*	*T_m duplex (°C)*
In	5' CGA TCG GAA GAC GTC CAA AAC GAT CG 3'	60,4	51,5
In'	5' CTG CTA GGG AGA AGA CGT CCA AAA ACT AGC AG 3'	56,7	61,6

Tableau III.D.1 Calcul des T_m théoriques des deux sondes « hairpins »

[Na^+] 250 mM ; [oligonucléotide] 1 µM.

Les séquences complémentaires des tiges sont soulignées.

Les séquences complémentaires de la cible sont surlignées

D.2.Synthèse des ODN modifiés par des ferrocènes en 3’

La tige du cotés 3’ est un point stratégique, puisqu’il s’agit d'un point d’articulation au niveau de la structure et se trouve au contact d'une zone d'hybridation en position fermée, ce qui offre la distance la plus courte entre le ferrocène et la surface d'or. En effet, sous la forme simple brin, les deux tiges sont hybridées réduisant les degrés de liberté des modifications ferrocényles, les contraignant à demeurer dans une région très proche de la surface (Figure III.D.1). Cette contrainte environnementale permettra d'obtenir un signal maximal en électrochimie.

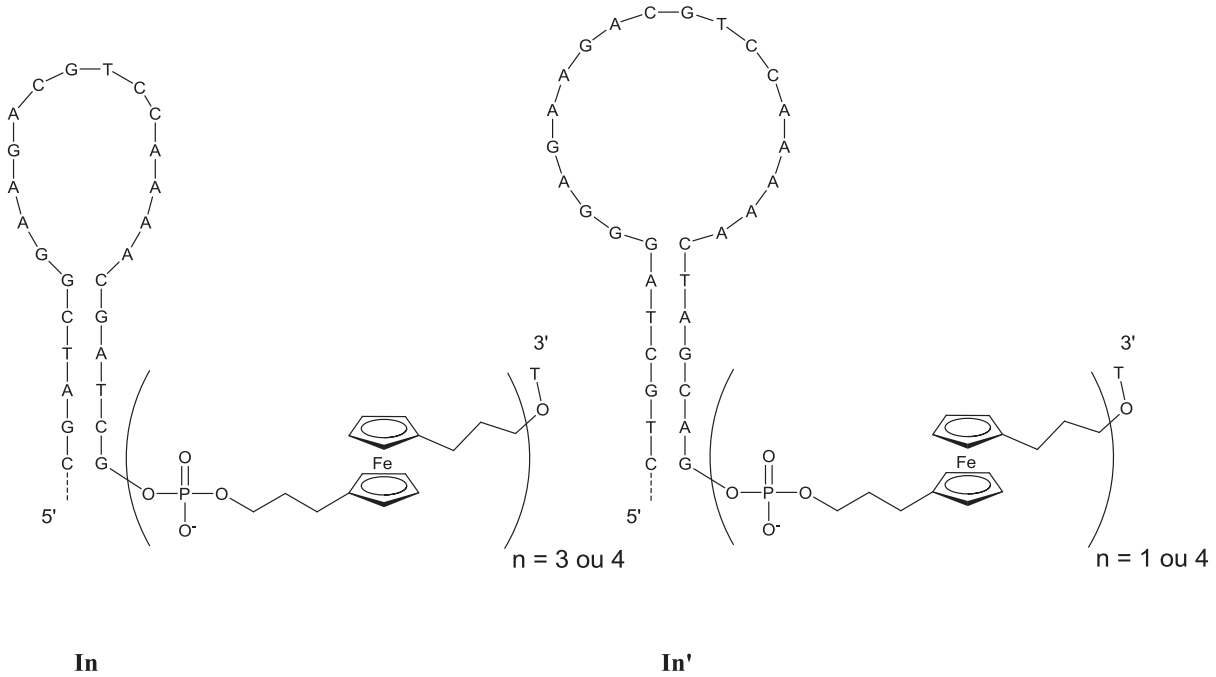


Figure III.D.1. : Schéma du monomère ferrocène incorporé dans la séquence, et structure des « hairpin » modifiés synthétisés

Une série de cinq « hairpins » modifiés par les groupements ferrocène ont été synthétisés (Tableau III.D.2) pour les séquences de détection du virus influenza (In et In’).

Nom de l' « hairpin » modifié	*Séquence*	*Nombre de ferrocènes en 3'*	*Type de modification en 5'*
$(DTPA)_2In3Fc$	In	3	alkylthiol
$(DTPA)_2In4Fc$	In	4	alkylthiol
$N_3In'1Fc$	In'	1	Azoture d'hexyle
$N_3In'4Fc$	In'	4	Azoture d'hexyle
$Tb(N_3)_3In'4Fc$	In'	4	Azoture d'hexyle

Tableau III.D.2. : Nomenclature des « hairpin » modifiés synthétisés pour l'étude

Ces structures possèdent des ferrocènes sur leur tige. Le premier synthon à incorporer est donc un monomère ferrocényl, ce qui est réalisé à l'aide d'une CPG fonctionnalisée par une thymine.

Deux campagnes de synthèse ont été effectuées pour l'obtention de ces cinq sondes. La première a permis de synthétiser les « hairpins » modifiés par le bis(DTPA) phosphate. Avec un programme de synthèse automatisée utilisant une concentration ferrocène de 0,1 M et une CPG de taille de pores de 500 Å (Cf. programme d'incorporation en annexe). La deuxième a permis de synthétiser les « hairpins » modifiés par les groupements azoture, selon les mêmes conditions opératoires que pour l'incorporation des monomères ferrocène.

Les incorporations ont été réalisées selon les considérations de la partie C avec un temps de couplage de 15s après le passage de la solution de monomère ferrocène dans le tétrazole.

D.3. Modification des ODN par le Bis(DTPA) phosphate pour le greffage sur or

La méthode SAM est couramment employée pour la mise au point de systèmes de diagnostic[214], fournissant une large base de données pour d'éventuelles comparaisons avec les sondes développées dans ce travail . Les travaux de Liepold et coll.[100] dans ce domaine ont démontré un gain de stabilité du greffage sur or de dérivés porteurs de plusieurs thiols, il a été décidé de modifier la sonde tige-boucle par 2 DTPA successifs, ce qui correspond à l'incorporation de 4 thiols.

Par ailleurs le greffage des ODN modifiés par des ferrocènes sur les électrodes apparaît comme une bonne stratégie pour obtenir des signaux intenses, reproductibles et sensibles aux variations d'environnement chimique.

Notre stratégie a consisté à développer une méthode de greffage de sonde ferrocène au plus près de l'électrode, pour faciliter la visualisation de la variation du signal électrochimique lié aux changements de conformation (Figure III.D.2).

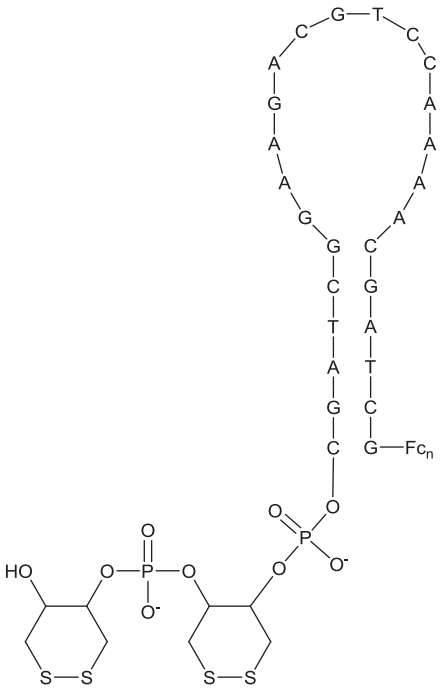


Figure III.D.2. : Structures des sondes $(DTPA)_2$In3Fc et $(DTPA)_2$In4Fc

Les fonctions thiol sont incorporées en position 5' (fin de synthèse) des sondes de séquence In ($(DTPA)_2$In3Fc et $(DTPA)_2$In4Fc). Le monomère DTPA a été couplé aux sondes de détection sur le synthétiseur selon un protocole similaire à ce qui a été décrit dans le chapitre I. Le temps de couplage du composé DTPA est de six minutes. Chacune des deux sondes sont modifiées par deux monomères DTPA situés en position 5' terminale. Les sondes synthétisées sont ensuite décrochées par action d'une solution d'ammoniaque à 30 % massique dans l'eau chauffée à 60°C durant 12h. La purification des oligonucléotides est effectuée par collecte des différentes fractions obtenues après séparation en CLHP (Figure III.D.4.). Enfin, Les sondes synthétisées sont caractérisées par spectroscopie de masse MALDI-TOF (Tableau III.D.3). Les conditions opératoires sont détaillées en partie expérimentale.

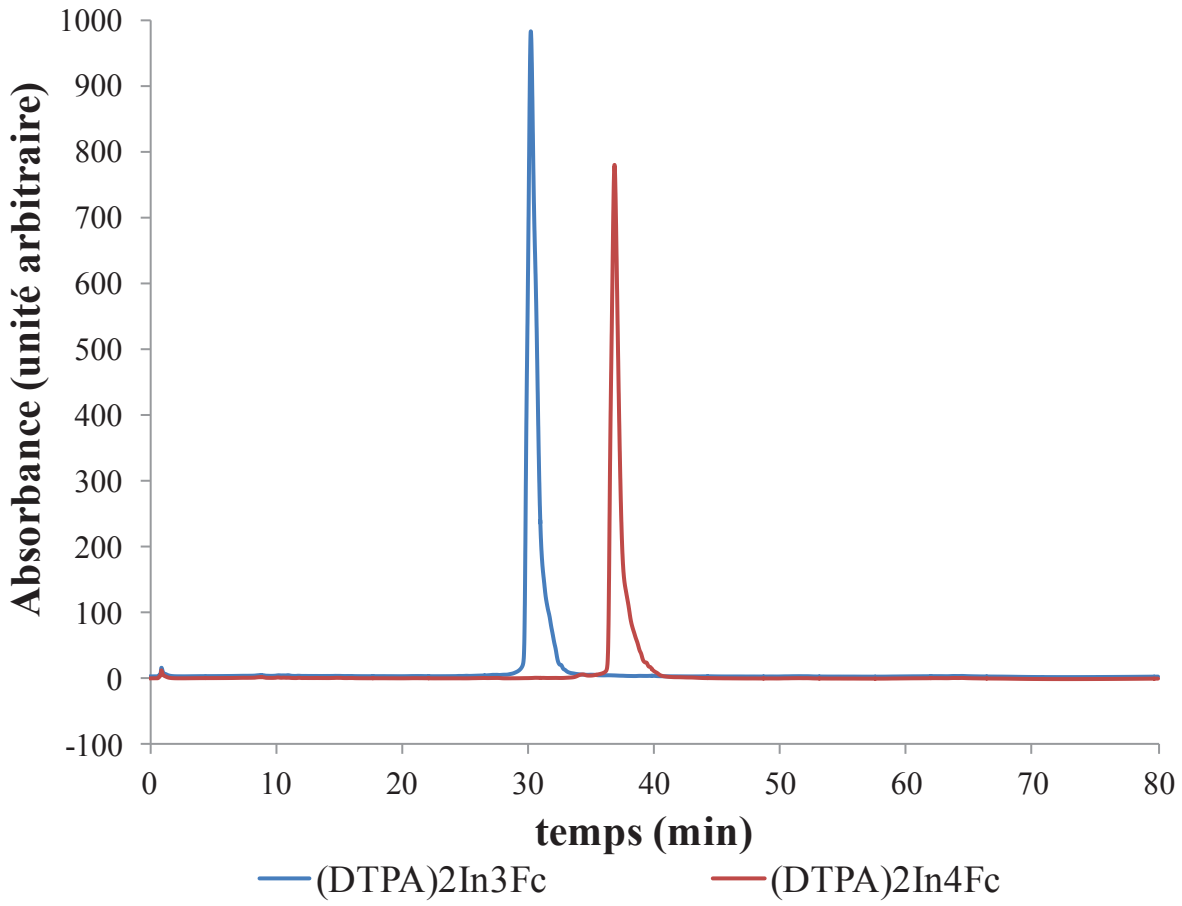


Figure III.D.4. : Profils CLHP des sondes $(DTPA)_2In3Fc$ et $(DTPA)_2In4Fc$ purifiées .Colonne DeltaPak C18 15µm. Gradient en acétonitrile de 5% à 15% en 10 min, puis 37,5% en 45 min, et enfin 50 % en 5 minutes, dans un tampon TEAAc 0,05 M, pH=7.

Sonde	*Masse attendue (m/z, g.mol^{-1})*	*Masse obtenue (m/z, g.mol^{-1})*	*Quantité obtenue après purification par CLHP (nmol)*
$(DTPA)_2In3Fc$	9823,29	9826,9	71
$(DTPA)_2In4Fc$	10187,49	10185,2	61

Tableau III.D.3. : Caractérisation par MALDI-TOF et quantité obtenue pour chacune des sondes après purification CLHP.

D.4. Modification des ODN par des groupements azoture

La méthode développée dans le chapitre II pour la mise au point d'une réaction de « click » électroactivée s'est avérée performante pour l'immobilisation de molécules biologiques sur surface d'or. La suite de l'étude visera à confirmer que cette méthode d'immobilisation est tout aussi efficace pour l'immobilisation directe de sondes oligonucléotidiques.
Pour atteindre ce but, les sondes N_3In'1Fc, N_3In'4Fc et Tb(N_3)$_3$In'4Fc ont été synthétisées.
Pour des raisons de stabilité thermodynamique (développées dans la partie suivante), la séquence In' a été retenue pour l'élaboration de ces sondes ODN modifiées par un azoture.
Pour pouvoir effectuer l'immobilisation des sondes azoture sur or, nous avons décidé de réutiliser l'élément d'ancrage bis(DTPA)héxynyle 7.
Les trois sondes ont été réalisées, chacune dans un but précis.

- La sonde N_3In'1Fc ne possède qu'un seul ferrocène : il nous fallait, en effet, une première sonde facile à synthétiser avec de bons rendements, afin de pouvoir optimiser les conditions opératoires pour l'immobilisation de sondes par la réaction de « click » électrocatalysée.
- La sonde N_3In'4Fc a été synthétisée pour pouvoir comparer les propriétés de détection électrochimique avec son équivalent (DTPA)$_2$In4Fc, que l'on espère plus sensible à cause de ses 4 groupements redox.
- Enfin, la structure de la sonde Tb(N_3)$_3$In'4Fc présente un plus grand nombre d'extrémités réactive en position 5'. Cette modification est réalisée dans l'optique d'améliorer les rendements d'immobilisation des sondes sur la surface or.

La structure des sondes est détaillée dans la figure III.D.5. .

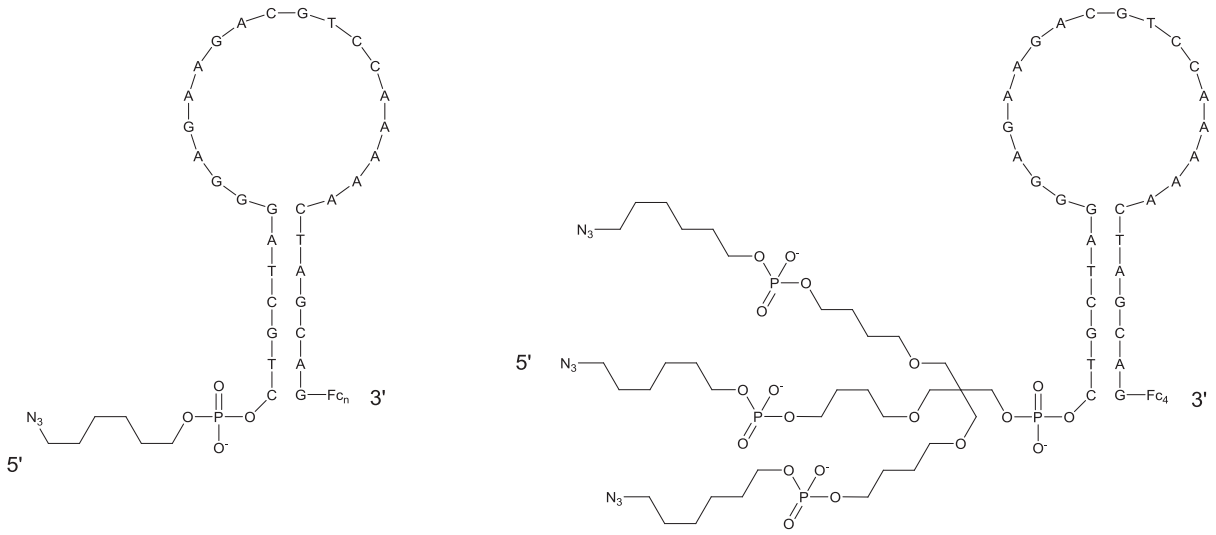


Figure III.D.5. : Structure des sondes N_3In'1Fc, N_3In'4Fc et Tb(N_3)$_3$In'4Fc.

De façon identique à ce qui a été décrit au sujet de l'immobilisation des nanoparticules sur électrode (Cf. Chapitre II), la modification azoture est réalisée par le couplage de la sonde avec un dérivé bromohexyle phosphoramidite en position 5' (en fin de synthèse). Les conditions de couplage de ce réactif sont identiques à celles d'une base classique. Dans le cas de la sonde Tb(N_3)$_3$In'4Fc, un synthon Trebler phosphoramidite est incorporé avant l'ajout du bromohexyle phosphoramidite. Ce synthon Trebler, représenté dans la figure III.D.5., permet de créer trois ramifications en position 5'. Ce composé commercial est couplé sur la sonde en fin de synthèse en utilisant le 4,5-dicyanoimidazole à 3% dans l'acétonitrile comme activateur, celui-ci étant plus réactif que le tétrazole, avec un temps de couplage de 15 minutes.

En fin de synthèse, la CPG est récupérée, et la substitution de l'halogène est immédiatement opérée par réaction avec de l'azoture de sodium (2 mL de solution d'azoture de sodium à 100mM et l'iodure de sodium à 100 mM dans le DMF anhydre [159]). La substitution est réalisée en 2 h à 65 °C. Les sondes synthétisées sont ensuite décrochées par action de l'ammoniaque à 30 % massique à 60°C durant 12h. Les oligonucléotides sont purifiés par collecte des différentes fractions après séparation en CLHP (Figure III.D.6.). Enfin, Les sondes synthétisées sont caractérisées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Tableau III.D.4). La quantité finale de sonde N_3In'4Fc est anormalement faible. Ceci est lié à un problème de synthèse n'ayant pas pu être identifié.

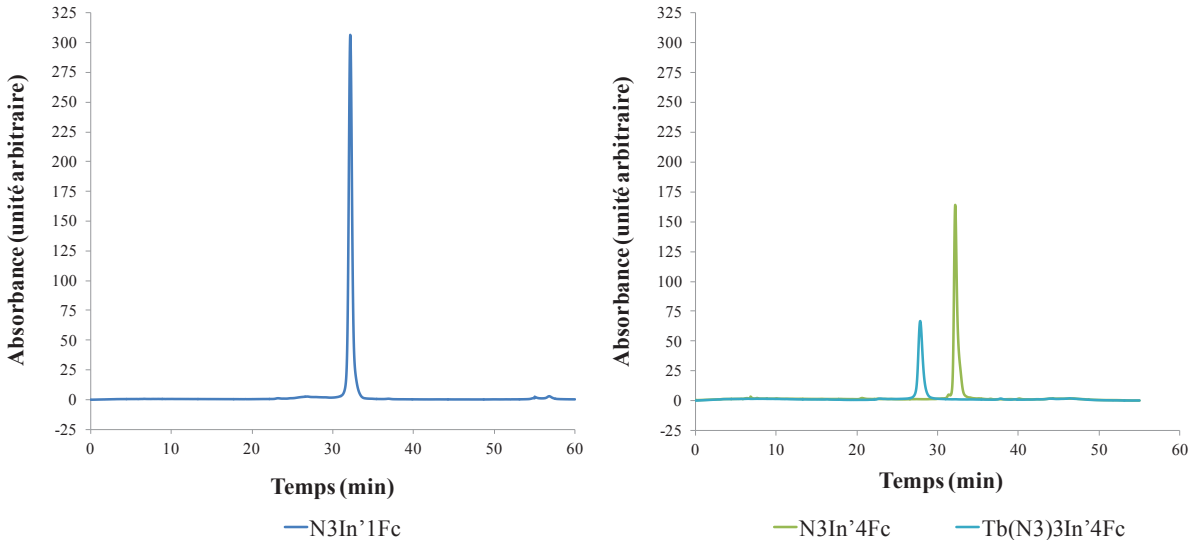


Figure III.D.6. : Profils CLHP des sondes N_3In'1Fc, N_3In'4Fc et Tb(N_3)$_3$In'4Fc purifiées. Colonne DeltaPak C18 15µm. Gradients d'élution donnés en partie expérimentale (tampon TEAAc 0,05 M, pH=7).

Sonde	*Masse attendue (m/z, g.mol^{-1})*	*Masse obtenue (m/z, g.mol^{-1})*	*Quantité obtenue après purification par CLHP (nmol)*
N_3In'1Fc	10773,8	10771,0	53
N_3In'4Fc	11866,4	11864,1	5
Tb(N_3)$_3$In'4Fc	12646,4	12641,9	18

Tableau III.D.3. : Caractérisation par MALDI-TOF et quantité obtenue pour chacune des sondes après purification CLHP.

D.5. Synthèse d'ODN modifiés par une cyanine 5 et une terminaison azoture

Afin d'étudier la réaction de « click » électroactivée avec un oligonucléotide sur électrode d'or, nous avons souhaité développer un ODN fluorescent pour pouvoir apporter une confirmation visuelle du greffage. Dans notre étude, nous avons donc voulu réaliser une expérience avec un élément fluorescent. Afin d'éviter un effet de « Quenching » avec la surface d'or, nous avons envisagé de distancer le fluorophore de la surface par une courte chaine oligonucléotidique. Ainsi, un oligonucléotide poly-thymidine, porteur en 5' d'un

groupement azoture et en 3' d'une cyanine 5 a été synthétisé. La structure de cet élément est représentée dans la figure III.D.7.

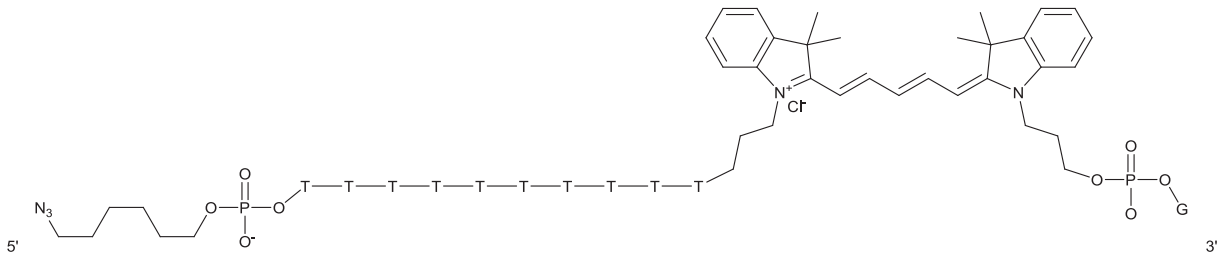


*Figure III.D.7 Structure de l'oligonucléotide dG-Cy5-dT$_{10}$-N$_3$ (**14**)*

L'oligonucléotide fluorescent dG-Cy5-dT$_{10}$-N$_3$ (***14***) est synthétisé selon un protocole similaire à ce qui a été vu précédemment. La synthèse est réalisée sur une colonne CPG dG 500Å . Le synthon Cy5 phosphoramidite est incorporé sur le premier cycle de synthèse, avec un temps de couplage de trois minutes. Il s'ensuit 10 cycles d'incorporation des bases T, puis la synthèse automatisée est terminée par l'incorporation du bromohexyle phosphoramidite. La substitution de l'halogène est réalisée sur la CPG dans les mêmes conditions établies que précédemment (2 mL DMF anhydre, NaN_3 100mM, NaI 100 mM, 2h, 65°C). La CPG fonctionnalisée est ensuite plongée dans une solution aqueuse d'ammoniaque (NH_4OH 30%/H_2O) durant 2h à température ambiante pour décrocher l'oligonucléotide. Les conditions de décrochage sont plus douces et plus rapides pour éviter la dégradation de la Cy5. Néanmoins, ces conditions ne sont pas optimisées, il semble évident qu'une partie des oligonucléotides reste accrochée sur la CPG. L'oligonucléotide est ensuite purifié par CLHP avec la colonne DeltaPak C18 15µm. Les différentes fractions obtenues sont récoltées, et l'oligonucléotide ***14*** est caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

SM MALDI-TOF : 4043,9

Formule brute : $C_{147}H_{192}N_{30}O_{81}P_{12}$ masse calculée 4044,9

masse trouvée 4043,9.

E. Analyse thermodynamique des sondes tige-boucle synthétisées

En raison de faibles variations de signal à l'hybridation rencontrées en électrochimie pour l'hybridation des sondes $(DTPA)_2$In3Fc et $(DTPA)_2$In4Fc (Chapitre IV), il a été décidé de procéder à l'analyse thermodynamique de ces dernières. Celle-ci se base sur la température de

fusion des sondes seules et des sondes hybridées avec leur cible respective. Il est donc nécessaire dans un premier temps de définir cette notion de stabilité thermodynamique.

La température de fusion, ou T_m (melting température) est, d'un point de vue thermodynamique, la donnée la plus utilisée pour caractériser les propriétés d'hybridation d'un fragment d'acide nucléique avec son brin complémentaire. Sa valeur, utilisée de façon standard, reflète la stabilité des structures en double brins.

L'estimation d'autres paramètres thermodynamiques caractéristiques de l'équilibre entre les formes hybridées et non hybridées tels que l'enthalpie ($\Delta H°$), l'entropie ($\Delta S°$) et l'énergie libre de Gibbs ($\Delta G°$) découle du tracé de la courbe de fusion du duplex concerné. Dans le cas de structures tige-boucle, deux valeurs de T_m doivent être mesurées pour étudier le système, à savoir celle de la structure mono brin repliée et celle du duplex formé en présence de la séquence complémentaire de la boucle.

Le T_m correspond à la température pour laquelle la moitié des brins est sous forme dissociée (ou dénaturée) tandis que l'autre moitié des brins est sous forme de duplex. Plus le duplex est stable et plus la valeur de T_m est élevée. Le $\Delta G°$, à une température donnée, définit et caractérise la barrière énergétique permettant la dissociation du duplex. Plus sa valeur est faible (en négatif) et plus la structure est stable.

La valeur des deux paramètres T_m et $\Delta G°$ augmente en valeur absolue avec la concentration en brins dans la solution. En effet, la formation du duplex peut-être décrite par deux étapes qui contrôlent la cinétique : une étape d'initiation contrôlée par la rencontre des deux brins et une étape de propagation contrôlée par la longueur de la chaîne. Dans le cas des duplex relativement courts (<40 mères), c'est le processus d'initiation qui contrôle l'équilibre, rendant le T_m et $\Delta G°$ dépendant de la concentration en brins. En outre, la concentration en cations monovalents et bivalents influe sur les valeurs de T_m et $\Delta G°$. En effet, les cations diminuent les répulsions électrostatiques entre les deux brins en neutralisant la charge présente sur les phosphates, favorisant ainsi la formation des structures appariées.

Dans le cas particulier des structures tige-boucle, une faible concentration en sels (inférieure à 0,1 M) favorise les espèces à plus faible densité de charges et donc la structure « hairpin ». De plus, le T_m d'une structure tige-boucle n'est pas dépendant de la concentration.

Dans le cadre de la synthèse des « hairpins » modifiés par des ferrocènes et des alkylthiols, l'influence des modifications apportées aux oligonucléotides a été étudiée.

E.1. Analyse de la stabilité thermodynamique des sondes tige-boucle synthétisées

Les analyses des courbes de fusion et la détermination des paramètres thermodynamiques (T_m, $\Delta H°$, $\Delta S°$ et $\Delta G°_{298}$) ont été effectuées pour les structures tige-boucle modifiées par des ferrocènes, seules dans le milieu et en présence de leurs cibles complémentaires.
La valeur $\Delta G°_{298}$ est donnée dans cette étude pour la température de 25°C (298°K), correspondant la température de travail lors des tests en électrochimie.

Cette partie se focalise sur l'influence des ferrocènes, et autres modificateurs, sur la stabilité de la structure « hairpin » et permet de vérifier que ces sondes modifiées peuvent être utilisées pour réaliser la détection spécifique d'acides nucléiques. Pour cela il est important de confirmer que la structure tige-boucle fermée est favorisée par rapport à d'autres structures secondaires.

- Etude des T_m

Les expériences de dénaturation des sondes « hairpin » sont effectuées dans un tampon NaCl 250 mM et phosphate 25 mM (pH 6,4) pour une concentration en sonde de 1 µM. Les valeurs obtenues après avoir dérivé la courbe de fusion (nécessaire à la détermination de A_U et A_L) sont rassemblées dans le tableau III.E.1.

	T_m « hairpin » (°C)	*Ecart type*
$(DTPA)_2$In3Fc	51,0	0,7
$(DTPA)_2$In4Fc	52,1	0,6

Tableau III.E.1. : Valeurs des T_m des « hairpins » modifiés par des ferrocènes et le bis(DTPA)phosphate. [hairpin]=1µM, tampon NaCl 250 mM et phosphate 25 mM (pH 6,4)

Les valeurs moyennes données sont déterminées à l'aide d'un minimum de trois mesures indépendantes prises pendant la montée en température.
Ces résultats montrent que la présence des modifications amène très peu de contraintes pour un ferrocène supplémentaire dans la structure tige-boucle.

La variation de la concentration des « hairpins » dans la solution d'analyse n'a pas d'impact sur la valeur du T_m, montrant clairement que la structuration des sondes se déroule bien de façon intramoléculaire.
Néanmoins les Tm obtenus expérimentalement sont notablement plus faibles que ceux obtenus par la méthode théorique (voir Tableau III.D.1). Les modifications présentent en 5' et 3' de la séquence influent sur la stabilité du repliement.

- Étude des paramètres thermodynamiques

Le tracé du logarithme de la constante d'équilibre en fonction de la température (équation III.7.) relatif aux montées en température de la solution contenant les « hairpins » modifiés conduits aux valeurs de ΔH°, ΔS° et $\Delta G°_{298}$ présentés dans le tableau III.E.2. :

	ΔH° (kcal.mol^{-1})	*$\Delta S°_{298}$ (kcal.K^{-1}.mol^{-1})*	*$\Delta G°_{298}$(kcal.mol^{-1})*
$(DTPA)_2$In3Fc	-30,25 (3,41)	-0,104 (0,011)	-2,49 (0,28)
$(DTPA)_2$In4Fc	-29,27 (3,21)	-0,103 (0,007)	-2,53 (0,33)

Tableau III.E.2. : Valeur des paramètres thermodynamiques des « hairpins » modifiés. [hairpin] = 1 µM, tampon NaCl 250 mM et phosphate 25 mM (pH 6,42)

En raison des écart-types enregistrés, les valeurs de ΔH°, ΔS° et $\Delta G°_{298}$ pour les deux sondes modifiées sont quasi équivalentes.

E.2. Analyse de la stabilité des duplex formés entre la structure « hairpin » et sa cible complémentaire

- Etudes des T_m

Lors de la reconnaissance de la cible complémentaire, dans le cas des sondes $(DTPA)_2$In3Fc et $(DTPA)_2$In4Fc, seule la boucle de la structure « hairpin » s'hybride.
Les paramètres thermodynamiques de la formation du duplex sont évalués dans des conditions opératoires similaires à ce qui a été fait précédemment (sonde seule). Les mesures sont effectuées pour une concentration respective de 1 µM en sonde et cible, dans un tampon

NaCl 250 mM et phosphate 25 mM (pH 6,42). Les valeurs calculées sont reportées dans le tableau III.E.3.

	T_m duplex (°C)	*Ecart type*
$(DTPA)_2$In3Fc	48,9	0,7
$(DTPA)_2$In4Fc	49,2	0,9

Tableau III.E.3. : Valeurs des T_m des duplex boucle-cible
[ODN]=1µM, tampon NaCl 250 mM et phosphate 25 mM (pH 6,42)

Il est à noter que les moyennes retenues pour chaque valeur ont été obtenues à partir d'au moins trois expériences indépendantes.
On notera aussi que les valeurs de T_m enregistrées sont légèrement inférieures à celles enregistrées pour la formation de la structure tige-boucle.
Cela signifie que la structure tige-boucle et le duplex formé avec la cible complémentaire présente une stabilité thermodynamique très proche. Le T_m seul ne suffit pas à la détermination de l'espèce prédominante. Il est donc nécessaire de compléter ces informations avec les autres paramètres thermodynamiques.

- Étude des paramètres thermodynamiques

Le tracé du logarithme de la constante d'équilibre en fonction de la température (équation III.7.) relatif aux montées en température de la solution contenant la sonde et la cible conduit aux valeurs de $\Delta H°$, $\Delta S°$ et $\Delta G°_{298}$ présentés dans le tableau III.E.4. :

	$\Delta H°$ (kcal.mol^{-1})	*$T\,\Delta S°$ (kcal.K^{-1}.mol^{-1})*	*$\Delta G°_{298}$(kcal.mol^{-1})*
$(DTPA)_2$In3Fc	-58,06 (0,71)	- 0,168 (0,005)	-12,92 (0,38)
$(DTPA)_2$In4Fc	-60,12 (0,98)	-0,171 (0,007)	-13,05 (0,22)

Tableau III.E.4. : Valeur des paramètres thermodynamiques des duplex boucle-cible.
[hairpin] = 1 µM, tampon NaCl 250 mM et phosphate 25 mM (pH 6,42)

Toutefois, contrairement au peu de différence de T_m noté entre les structures tige-boucle et duplex, on constate une nette augmentation en valeur absolue du $\Delta H°$ (aux environs de 30 $kcal.mol^{-1}$) et du $\Delta G°_{298}$ (~10 $kcal.mol^{-1}$) pour la formation du duplex sonde-cible par rapport à la formation de la structure tige-boucle.

Nous pouvons déduire de ces valeurs thermodynamiques que la formation du duplex sonde-cible est avantagée par rapport à la formation de la structure tige-boucle. L'augmentation de l'enthalpie est en faveur de la formation du duplex.
Toutefois, du fait que ces deux types de conformation (duplex et tige-boucle) présentent des T_m du même ordre de grandeur, les deux conformations peuvent être en compétition dans le milieu. Dans le cas du développement d'un test d'hybridation, les risques d'ouverture partielle de l'«hairpin» en présence de la cible ne sont pas négligeables. C'est pourquoi, dans le cadre de cette étude, nous avons imaginé une structure de seconde génération, la séquence In', plus appropriée d'un point de vue thermodynamique à la bonne ouverture/fermeture de l'«hairpin». Malheureusement, par manque de temps, la valeur thermodynamique des sondes de séquence In' n'a pu être déterminée expérimentalement afin de vérifier nos suppositions.

F. Conclusion

La synthèse d'un monomère ferrocényle pouvant être incorporé dans un oligonucléotide *via* la chimie dite aux phosphoramidites a été mise au point. Les travaux précédents sur l'optimisation de leur intégration aux sondes par synthèse supportée a permis d'envisager des incorporations successives de ce dernier au sein de nos sondes ODN de détection électrochimique.

La structure « hairpin » ou tige-boucle a été retenue dans le cadre de cette étude. Cinq sondes basées sur cette structure ont été synthétisées. Ces sondes ont été modifiées en 3' par les monomères ferrocène précédemment synthétisés et deux familles de bras ont été incorporées sur l'extrémité 5' :

- Les bras alkylthiol, permettant l'immobilisation directe des sondes sur électrode d'or par formation des monocouches SAM précédemment décrites dans l'étude. Cette famille de modifications repose sur l'intégration du DTPA ayant prouvé son efficacité pour la stabilité du système d'analyse dans le chapitre précédent
- Les bras azoture, qui permettent l'immobilisation des sondes sur électrode d'or par la réaction de « click » électroactivée précédemment décrite. La variation du nombre d'azoture en position 5' pourra être étudiée en électrochimie à la fois pour contrôler les variations de rendement de chimie « click », mais aussi les apports éventuels de stabilité.

Les caractéristiques thermodynamiques des sondes de la famille alkylthiol ont été déterminées. Cette étude s'est portée sur les mesures de température de fusion (Tm) servant à étudier la stabilité des formes « hairpins » et duplex en solution. Les informations recueillies ont permis d'optimiser la séquence des sondes de capture de la famille azoture. En effet, les écarts des températures de fusion des deux structures ne s'avérant pas suffisants, la séquence des sondes de la famille azoture a été optimisée.
La longueur de la séquence de la boucle a été augmentée afin de stabiliser le duplex. Une paire de base supplémentaire a été rajoutée dans la tige pour maintenir une bonne stabilité de la structure repliée en tige-boucle.

Enfin, un oligonucléotide fluorescent, pouvant être immobilisé sur surface d'or fonctionnalisée par la chimie « click » électrocatalysée, a été élaboré. Cet oligonucléotide

permettra une confirmation visuelle de la réaction à la surface par observation au microscope optique de fluorescence.

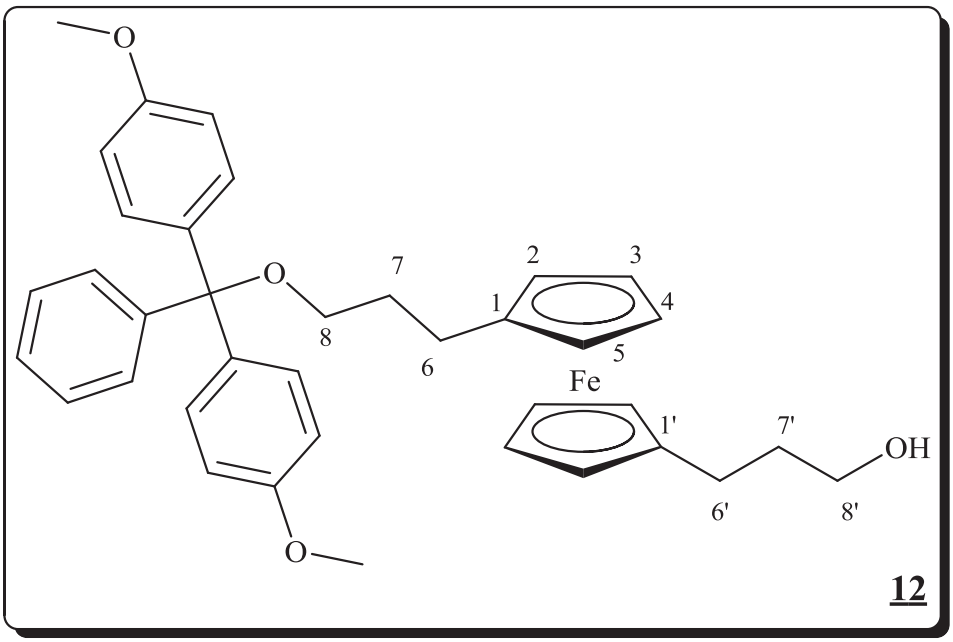
G. Partie expérimentale

G.1. Synthèse du ferrocène Phosphoramidite

Les réactifs ainsi que les solvants nécessaires à la synthèse des ferrocènes ***12*** et ***13*** sont achetés chez Sigma-Aldrich. La pyridine et l'acétonitrile ont été utilisés sous forme anhydre en qualité pour analyse. La DIPEA et la DMAP ont été utilisées à une pureté supérieure à 99 %. Les purifications par chromatographie sont effectuées sur gel de silice de granulométrie comprise entre 63 et 200 µm à l'aide de solvants de qualité pour analyse. Les CCM sont réalisées avec du gel de silice 60 F254 déposé sur des feuilles d'aluminium.

G.1.a. Synthèse du 1-[3-*O*-diméthoxytritylpropyl]-1'-[3'-hydroxypropyl] ferrocène (***12***)

683,1 mg (2,25 mmol) de bis(propanol) ferrocène et 49,4 mg (0,41 mmol) de DMAP sont introduits dans un ballon de 25 mL puis coévaporés deux fois avec 5 mL de pyridine anhydre. Le résidu est repris dans 4,5 mL de pyridine. 785 µL (4,75 mmol) de DIPEA sont alors ajoutés. 768,5 mg (2,27 mmol) de chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle sont ensuite ajoutés au milieu réactionnel, dilué au préalable dans 3 mL de pyridine anhydre. Le milieu réactionnel est laissé sous argon durant 4h30, sous agitation et à température ambiante. L'avancement de la réaction est suivi par CCM (éluant : dichlorométhane/méthanol/triéthylamine, 89 : 10 : 1 ; révélation UV et après pulvérisation d'acide sulfurique 1% v/v dans l'éthanol).
10 mL de méthanol sont ensuite ajoutés et l'ensemble est agité pendant 15 min.
En fin de réaction, le milieu est concentré puis dilué dans 75 mL de dichlorométhane. La phase organique est lavée par 3 fois 40 mL d'une solution aqueuse saturée de $NaHCO_3$ puis par 3 fois 40 mL d'eau.
La phase organique est concentrée sous vide. Le résidu est purifié sur gel de silice (colonne de 10 cm de hauteur, 3cm de diamètre) montée dans un mélange cyclohexane/triéthylamine (99 :1 v/v). Pour cette purification, un gradient d'élution en acétate d'éthyle dans le cyclohexane est nécessaire : 2 à 4%, puis 20 à 40 % et enfin 80 à 100 %.
448,3mg (33 %) du composé ***12*** sont isolés sous forme d'une huile brunâtre.



RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 1,63-1,85 (m, 4H, H_7 et $H_{7'}$) , 2,39-2,53 (m, 4H, H_6 et $H_{6'}$), 3,12 (t, ^{3}J=6,3 Hz, 2H, H_8),3,54 (t, ^{3}J=6,4Hz, 2H, $H_{8'}$), 3,77 (s,6 H, CH_3O), 3,98 (m, 8H, H_{2-5} et $H_{2'-5'}$), 6,82-7,70 (m, 12H, $H_{aromatique}$)

SM (ESI+) : 604,0 ([M+H$^+$])

Formule brute : $C_{37}H_{40}FeO_4$ masse calculée 604,6

masse trouvée 603,0.

G.1.b Synthèse de 1-(3-*O*-diméthoxytritylpropyl)-1'-[3'-*O*-(2-cyanoéthyl-*N,N*-diisopropylphorphoramidityl)propyl] ferrocène ***13***

310,7 mg (0,514 mmol) du composé ***12*** sont introduits dans un ballon de 10 mL, coévaporés trois fois avec 2 mL d'acétonitrile anhydre, puis remis sous atmosphère d'argon.

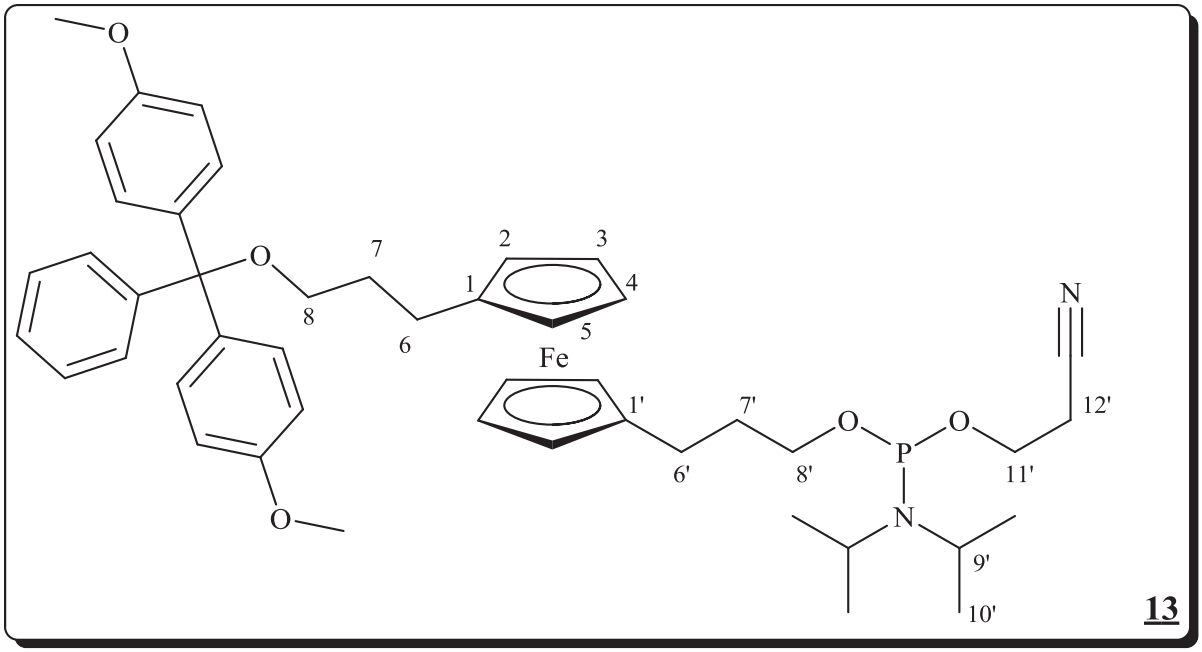
Le résidu est repris dans 2,5 mL d'acétonitrile anhydre.

170 µL de DIPEA et 150 µL de chloro(diisopropylamino)-β-cyanoéthoxyphosphine sont alors ajoutés et le milieu réactionnel est agité pendant 1 h sous argon et à température ambiante, puis le milieu est évaporé à sec sous évaporateur rotatif.

Le résidu est repris dans 1 mL de cyclohexane/acétate d'éthyle 50 :50 v/v, de façon à augmenter la solubilité du produit dans le cyclohexane, et immédiatement purifié sur gel de silice dans une colonne (5 cm de hauteur de silice, 3 cm de diamètre) montée dans un mélange cyclohexane/triéthylamine (98 :2 v/v). La purification est menée en moins de 20 minutes dans un gradient d'élution en acétate d'éthyle dans le cyclohexane de 10% à 50 %.

Le produit est concentré à sec sous pompe à palette, puis ramené à P_{atm} sous argon.

214 mg (0,266 mmol, 52 %) du produit ***13*** est obtenu sous la forme d'une huile jaune. Le produit est repris dans l'acétonitrile anhydre et coévaporé trois fois avant d'être utilisé sur le synthétiseur d'oligonucléotides.



RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 1,19 (dd,12H, H_{10}), 1,81 (m, 4H, H_7 et $H_{7'}$) , 2,39 (m, 4H, H_6 et $H_{6'}$), 2,62 (t,2H, $H_{12'}$), 3,13 (t, 2H, H_8),3,59 (m, 4H, $H_{8'}$ et $H_{11'}$), 3,77 (m,8 H, CH_3O et $H_{9'}$), 3,98 (m, 8H, H_{2-5} et $H_{2'-5'}$), 6,82-7,70 (m, 12H, $H_{aromatique}$)

RMN ^{31}P (300 MHz, $CDCl_3$) = 147,5 (P)

SM (ESI+) : 804,0 ([M+H$^+$])

Formule brute : $C_{37}H_{40}FeO_4$ masse calculée 804,6

masse trouvée 803,0.

G.2. Synthèse des oligonucléotides

G.2.a protocoles généraux

Les ODN décrits ont été synthétisés sur un synthétiseur d'oligonucléotides ADN/ARN Applied Biosystems 394. Les monomères phosphoramidites (dA, dG, dC et dT ; Ultra MILD Deprotection), les CPG (dT-CPG 500 et dG-CPG 500 ; 1 µmol) et les produits nécessaires à la synthèse d'ODN ont été fournis par Glen Research.

L'ensemble des réactifs et solvants est chargé sur le synthétiseur et les voies de chaque réactif dans l'appareil sont amorcées *via* un programme de la machine. Il est fait de même avec le ferrocène ***13*** et les autres synthons phosphoramidites.
En fin de synthèse, les colonnes sont lavées par de l'acétonitrile anhydre et séchées à l'argon.
Sauf indication contraire, l'étape de décrochage et de déprotection des bases est accomplie. Celle-ci est menée en plongeant les supports dans 1 mL d'ammoniaque concentrée (30% NH_4OH / H_2O) pendant une nuit à 60°C[159]. Après synthèse, la sonde fluorescente ***14*** est uniquement décrochée dans une solution d'ammoniaque pendant 2 h à température ambiante,Cette exception est due à la sensibilité du groupement Cy5 en milieu basique. Le mélange est ensuite filtré sur coton pour séparer les CPG du filtrat. Le filtrat est alors concentré au SpeedVac évaporant ainsi l'eau et ammoniaque. Les résidus sont redilués dans de l'eau milliQ et la solution est filtrée par centrifugation sur un filtre 0,45 µM Amicon Filter pour éliminer la CPG résiduelle. Le solide restant est lavé, puis le filtrat est centrifugé sur filtre 3K Amicon ultra Filter pour éliminer les petits avortons de synthèse. Après une série de trois centrifugations, les oligomères sont récupérés et analysés par CLHP.

G.2.b. Substitution par l'azoture des oligonucléotides

Dans le cadre de la synthèse des sondes ***14***, N_3In'1Fc, N_3In'4Fc et Tb(N_3)$_3$In'4Fc, l'oligonucléotide halogéné intermédiaire, encore accroché à la CPG, est plongé dans 2 mL de DMF anhydre, dans lequel sont préalablement dissous l'azoture de sodium (100mM) et l'iodure de sodium (100 mM). La substitution est réalisée en 2 h à 65 °C. L'étape de décrochage de la CPG et de déprotection des bases est ensuite réalisée.

G.3. Caractérisation et purification des oligonucléotides

G.3.a. Caractérisation et purification par CLHP.

Deux tampons ont été utilisés pour réaliser des gradients :

- Tampon A : Eau/TEAAc 0,05 M
- Tampon B : Acétonitrile/eau 50 :50 (v/v) 0,05M TEAAc

Avant utilisation, les tampons sont filtrés sur filtre 0,22 µM GV Millipore

Les séparations sont effectuées sur une machine Agilent Technologies 1200 Series équipée d'un détecteur à barrettes de diodes. Les purifications CLHP sont réalisées sur colonne DeltaPak C18 15µm, 300 Å, 300 × 7,8 mm à un débit de 2 $mL.min^{-1}$.

- Pour les sondes $(DTPA)_2$In3Fc, $(DTPA)_2$In4Fc et ***14***, la séparation est menée par un gradient en tampon B de 10% à 30 % en 10 min, puis jusqu'à 75% en 45 min, et enfin 100% dans le tampon A en 5 min.
- Pour la sonde N_3In'1Fc, la séparation est menée par un gradient en tampon B de 10% à 20 % en 10 min, puis 60% en 15 min, puis 80% en 20 min et enfin 100% en 5 min dans le tampon A.
- Pour les sondes N_3In'4Fc et $Tb(N_3)_3$In'4Fc, la séparation est menée par un gradient en tampon B de 10% à 20 % en 10 min, puis 60% en 15 min, puis 80% en 15 min et enfin 100% en 5 min dans le tampon A.

Les différents pics des produits élués en CLHP sont collectés grâce au suivi en temps réel de l'élution par UV à 260 nm. Les solutions sont individuellement concentrées à sec au SpeedVac puis coévaporées au moins trois fois par de l'eau milliQ pour éliminer les sels de TEAAc avant l'analyse par spectrométrie de masse.

G.3.b. Caractérisation par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les analyses en spectrométrie de masse MALDI-TOF sont effectuées en grande majorité par Frédéric DELOLME au Centre Commun de Microanalyses des protéines, à l'IBCP de Lyon sur un appareil Voyager DE-PRO (Applied Biosystems, 2002).

Une matrice 2',4',6'-Trihydroxyacetophenone mono hydrate (THAP)/citrate d'ammonium est utilisée pour cristalliser les échantillons avant analyse.

G.4 Quantification des oligonucléotides

Les expériences de dénaturation thermique et de calcul de concentration ont été réalisées avec un spectrophotomètre UV-Visible Varian Cary 100 Bio (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) possédant un système de thermostat de type Pelletier. Une sonde trempant dans une cuve

de référence contenant uniquement la solution tampon permet de contrôler la température (pour les courbes de dénaturation). Des cuves UV en quartz de 1 cm de trajet optique sont utilisées pour les mesures. Les cuves ont été fermées par un bouchon étanche de façon à éviter les phénomènes d'évaporation des solutions.

Les concentrations des solutions d'ODN modifiées sont calculées à partir de la loi de Beer-Lambert. La valeur du coefficient d'extinction molaire de l'échantillon est déterminée pour une mesure à 260 nm à température ambiante (Il sera désigné par le terme ε_{260}).
L'ε_{260} est déterminé pour chaque sonde modifiée. Cette valeur est considérée comme étant la somme de l'ε_{260} de la séquence ADN non modifiée à 260 nm et à 20°C (calculé par le logiciel OligoAnalyzer 3.1) et de l'ε_{260} des ferrocènes (ou de la Cy5) modifiant la sonde.
Les mesures de concentration des solutions des sondes modifiées sont effectuées dans l'eau milliQ en l'absence de tampon.
L' ε_{260} du ferrocène est calculé au préalable en mesurant l'absorbance à 260 nm de solutions de différentes concentrations en ***13*** dans le dichlométhane comme décrit par Navarro et Coll.[201].
L' ε_{260} de la Cy5 est communiqué par le fabriquant.
La valeur des ε_{260} des autres groupements terminaux présents (DTPA phosphate, Trebler phosphate et Hexylazoture phosphate) est considérée comme négligeable, et donc ne contribue pas à la valeur de l' ε_{260} des sondes.
Les ε_{260} calculés pour chaque sonde sont reportés dans la table ci-dessous (Table III.G.1)

Sonde	*ε_{260} ODN ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)*	*ε_{260} ferrocène et cyanine 5*	*Nombre de modifications*	*ε_{260} sonde modifiée ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)*
$(DTPA)_2$In3Fc	269800	(***13***) 3514	3	280342
$(DTPA)_2$In4Fc	269800	(***13***) 3514	4	283856
14	102900	(Cy5) 10000	1	112900
N_3In'1Fc	325000	(***13***) 3514	1	328514
N_3In'4Fc	325000	(***13***) 3514	4	339056
$Tb(N_3)_3$In'4Fc	325000	(***13***) 3514	4	339056

Table III.G.1 : ε_{260} des oligonucléotides modifiés synthétisés (20°C ; 260 nm)

G.5. Séquences des cibles ADN

Les cibles complémentaires des sondes « hairpins » Influenza correspondent aux séquences complémentaires de la boucle de chaque structure auxquelles 10 nucléotides dT sont ajoutés en 3' et 5' (Table III.G.2). Une cible complémentaire de la structure VHB est utilisée comme cible non complémentaire de la structure Influenza.

Cible complémentaire Influenza	5' TTT TTT TTT TAG TTT TTG GAC GTC TTC TCC TTT TTT TTT T 3'
Cible complémentaire VHB	5' TTT TTA TTGAGATTCCCGAGATTGATT TTT 3'

G.6. Protocole de mesure des courbes de fusion des oligonucléotides

G.6.a préparation des échantillons

L'analyse thermodynamique des « hairpins » modifiés est effectuée pour une concentration de ce dernier de 1 µM dans une solution tampon phosphate 25 mM Na_2HPO_4/KH_2PO_4, 250 mM de NaCl (pH = 6,4).

L'analyse thermodynamique des duplex des sondes oligonucléotidiques modifiées avec leur cible complémentaire est effectuée pour une concentration en sonde et en cible de 1 µM dans une solution tampon phosphate 25 mM Na_2HPO_4/KH_2PO_4, 250 mM NaCl, pH 6,4.

G.6.b. Mesures et calculs effectués sur la courbe de fusion

Un gradient de hausse de températures de 0,2°C par minute de 15 °C à 85 °C, puis de descente de 85°C à 15 °C à la même vitesse, est utilisé.

L'absorbance est mesurée à 260 nm en continu durant les montées et descentes de température des échantillons et de la référence.

Pour chaque échantillon analysé, le gradient de température est appliqué à plusieurs reprises.

Les calculs de température de fusion (T_m) et des paramètres thermodynamiques sont réalisés par le logiciel fournis par le vendeur. Ils ont été effectués sur l'ensemble des montées en température, à l'exception de la première. En effet, le rôle de la première montée est de dénaturer tous les oligonucléotides de l'échantillon, assurant ainsi de former correctement l'ensemble des structures considérées lors de la première descente de température.

CHAPITRE IV : CARACTERISATION DES SURFACES FONCTIONNALISEES PAR FLUORESCENCE ET ELECTROCHIMIE : DEVELOPPEMENT D'UN TEST D'HYBRIDATION

A. Immobilisation d'un oligonucléotide fluorescent sur surface d'or

A.1. Stratégie de « click » sur la surface d'or des oligonucléotides

Une stratégie similaire à ce qui a été réalisé dans le chapitre II a été mise en place pour l'immobilisation de l'oligonucléotide fluorescent. L'électrode d'or est dans un premier temps fonctionnalisée par la monocouche alkylthiol constituée de Bis(DTPA) héxynyle 7 et de mercaptopropanol. En second lieu, l'immobilisation de l'oligonucléotide est réalisée par la réaction de « click » électrocatalysée précédemment décrite entre l'azoture de l'ODN ***14*** sur l'héxynyle du composé 7 (Figure IV.A.1.). Cette cycloaddition s'accomplit en présence de sulfate de cuivre et de TBTA.

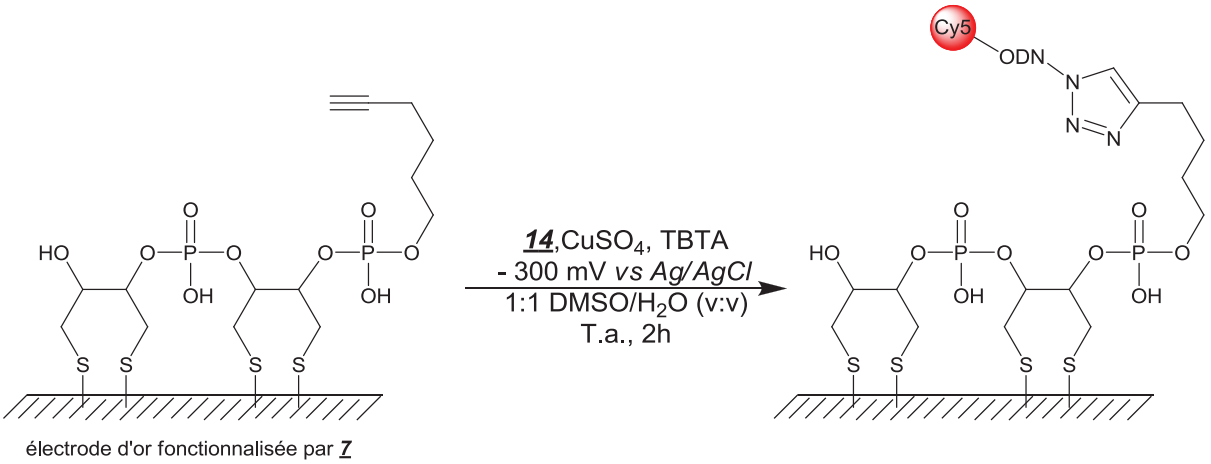


*Figure IV.A.1. Stratégie de greffage de l'ODN **14** sur or.*

Comme ce qui a été décrit dans le chapitre II, la formation *in situ* de l'espèce active Cu(I) est générée par application d'un potentiel de -300 mV *vs Ag/AgCl* durant 2 heures.
Il est à noter qu'un second groupe d'électrodes est utilisé pour réaliser le test négatif de cette réaction de « click » sur surface. Ces électrodes subissent le même traitement, à l'exception du potentiel appliqué qui est de +300 mV *vs Ag/AgCl*

A.2. Etude de la fluorescence de la surface d'or fonctionnalisée par microscope optique

L'immobilisation de l'ODN fluorescent par la réaction de « click » électroactivée a été suivie par microscopie optique. La Cy5 est excitée à une longueur d'onde d'excitation adéquate et la réponse de désexcitation de celle-ci est observée. Les échantillons sont observés sur la

bordure de la surface fonctionnalisée des électrodes d'or afin de vérifier l'efficacité de la réaction de « click » électrocatalysée des oligonucléotides (Figure IV.A.2.).

Sur les deux photographies présentées, deux régions se distinguent : La partie de gauche est située à l'extérieur de la cellule électrochimique, tandis que la partie de droite correspond à l'électrode d'or.

Seule l'électrode fonctionnalisée (Figure IV.A.2.a.) émet une réponse de fluorescence.

L'effet de « quenching » de la surface d'or[210-211, 232] n'intervient pas en raison de l'éloignement du fluorophore de la surface dû à la chaine d'ADN.

L'expérience témoin du second groupe d'électrodes n'ayant pas été électrocatalysées au potentiel de -300 mV mais de +300mV *vs Ag/AgCl*, ne montre aucune fluorescence sur la surface (Figure IV.B.2.b.). Cette observation permet de confirmer que la fluorescence n'est pas induite par le tampon ou autre solution utilisée lors de la réaction de « click ».

Ces résultats sont en accord avec ce qui a été observé dans le chapitre II, et démontre encore la sélectivité de la réaction à la surface. Celle-ci ne prend place qu'à la condition exclusive de l'application du potentiel adéquat sur la surface, pour la formation *in situ* de l'espèce active Cu(I).

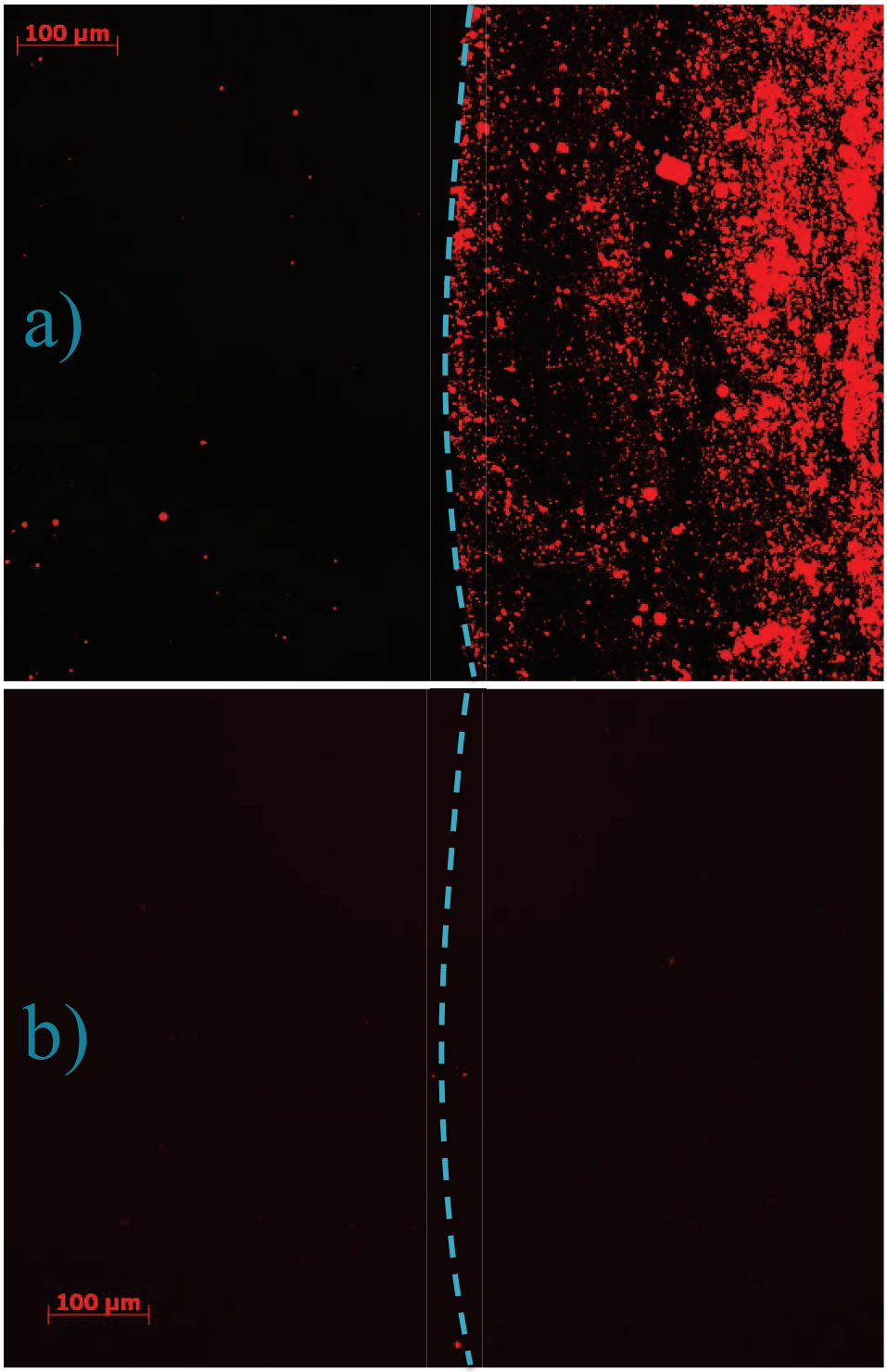


Figure IV.A.2. : Électrodes d'or observées au microscope à fluorescence après la réaction de « click » des ODN fluorescents. La réaction de « click » est électrocatalysée à un potentiel de : (a) -300 mV (b) +300 mV.

B. Greffage d'ODN modifiés par des ferrocènes sur surface d'or

B.1. Greffage des ODN alkylthiol sur la surface d'or

Le greffage d'oligonucléotides *via* la chimie des thiols est réalisé selon le protocole développé pour l'immobilisation du composé bis(DTPA)héxynyle dans le chapitre II. Cette méthode demande un nettoyage de la surface d'or en milieu basique, tel qu'il a été précédemment décrit. Les sondes modifiées par un alkylthiol sont préalablement réduites dans une solution de TCEP, HCl (Cf. partie expérimentale). Ricci et coll.[199] font mention de l'utilisation de ce réactif de façon à limiter la formation des ponts disulfure dans la solution de greffage. Cette phosphine, soluble dans l'eau, est un agent réducteur qui réduit les ponts disulfure en thiols. Ce réducteur s'oxyde pour donner l'oxyde de phosphine comme décrit dans la figure IV.B.1.[198] .

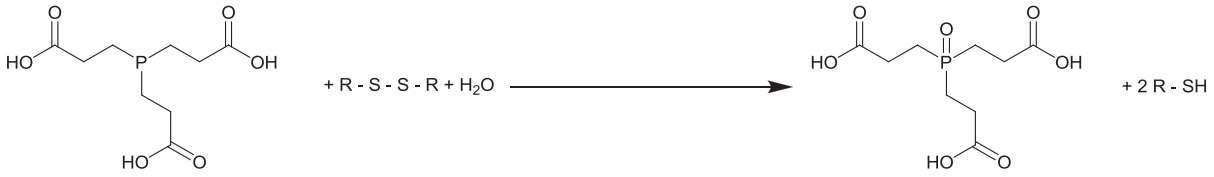


Figure IV.B.1. : Schéma réactionnel de la réduction des ponts disulfure par la TCEP

Cette phosphine est stable en milieu aqueux et peut également réagir avec l'oxygène qui pourrait encore être présent dans le milieu après dégazage par le flux d'argon. La réaction d'oxydation de la phosphine étant irréversible, il convient donc de dégazer correctement la solution.

Après la réduction des ponts disulfure des ODN alkylthiol, le greffage de ces derniers est réalisé sur une électrode d'or fraîchement activée en milieu basique (Cf. Chapitre I), 4 jours en milieu tamponné afin de favoriser la réaction des thiolates sur l'or (Figure IV.B.2.). Ce long temps de réaction est nécessaire pour assurer le greffage des 4 thiols de la sonde sur l'or et maintenir ainsi une bonne stabilité de la couche sensible du capteur.

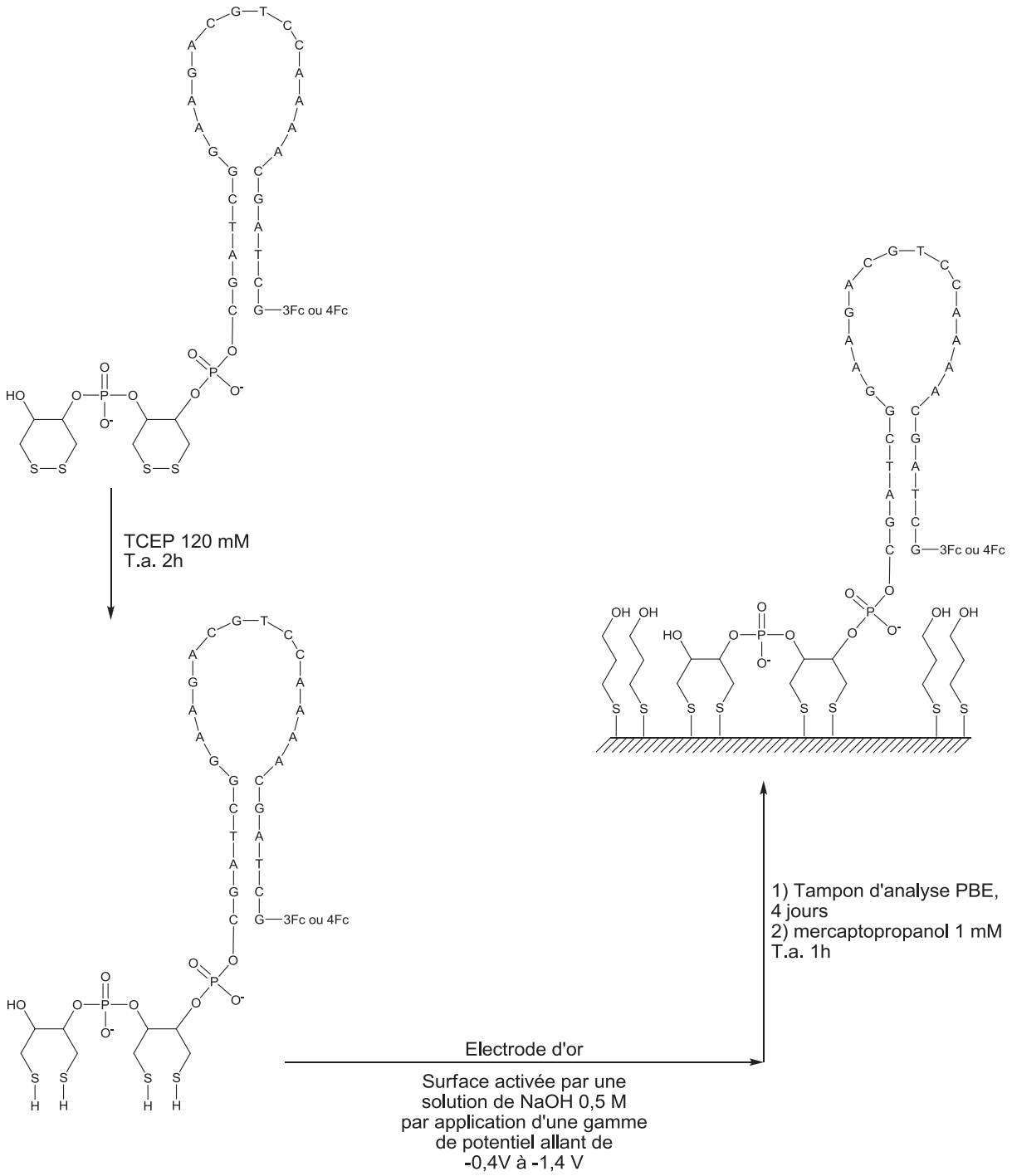


Figure IV.B.2. Stratégie d'immobilisation des sondes $(DTPA)_2In3Fc$ et $(DTPA)_2In4Fc$

B.2. Fonctionnalisation des ODNs azoture *via* la chimie « Click » sur surface d'or

L'immobilisation des sondes azoture est réalisée de façon similaire à ce qui a été rapporté dans le chapitre II. Le couplage de ces dernières est effectué par réaction de « click » électrocatalysée sur une électrode modifiée par une monocouche bis(DTPA)héxynyle 7 + mercaptopropanol. La cycloaddition est réalisée en présence de $CuSO_4$ (10µM) et TBTA (10µM) à -300 mV *vs Ag/AgCl*.

Bien que la réaction de « click » soit optimisée pour une plus forte concentration, il est choisi de réaliser le couplage avec une concentration de 1µM en sondes ODN. Les quantités fabriquées ne permettent pas malheureusement de travailler avec des concentrations plus élevées.

B.3. Caractérisation électrochimique des sondes immobilisées

B.3.a. Caractérisation des sondes $(DTPA)_2$In3Fc et $(DTPA)_2$In4Fc après immobilisation sur électrode

L'analyse en voltampérométrie cyclique des électrodes fraîchement fonctionnalisées confirme le greffage des sondes. Des signaux bien définis présentant un pic d'oxydation et de réduction centré sur le potentiel $E_{1/2}$ du ferrocène (~0,55 V *vs ECS*) sont observés pour les deux systèmes (Figure IV.B.3.)

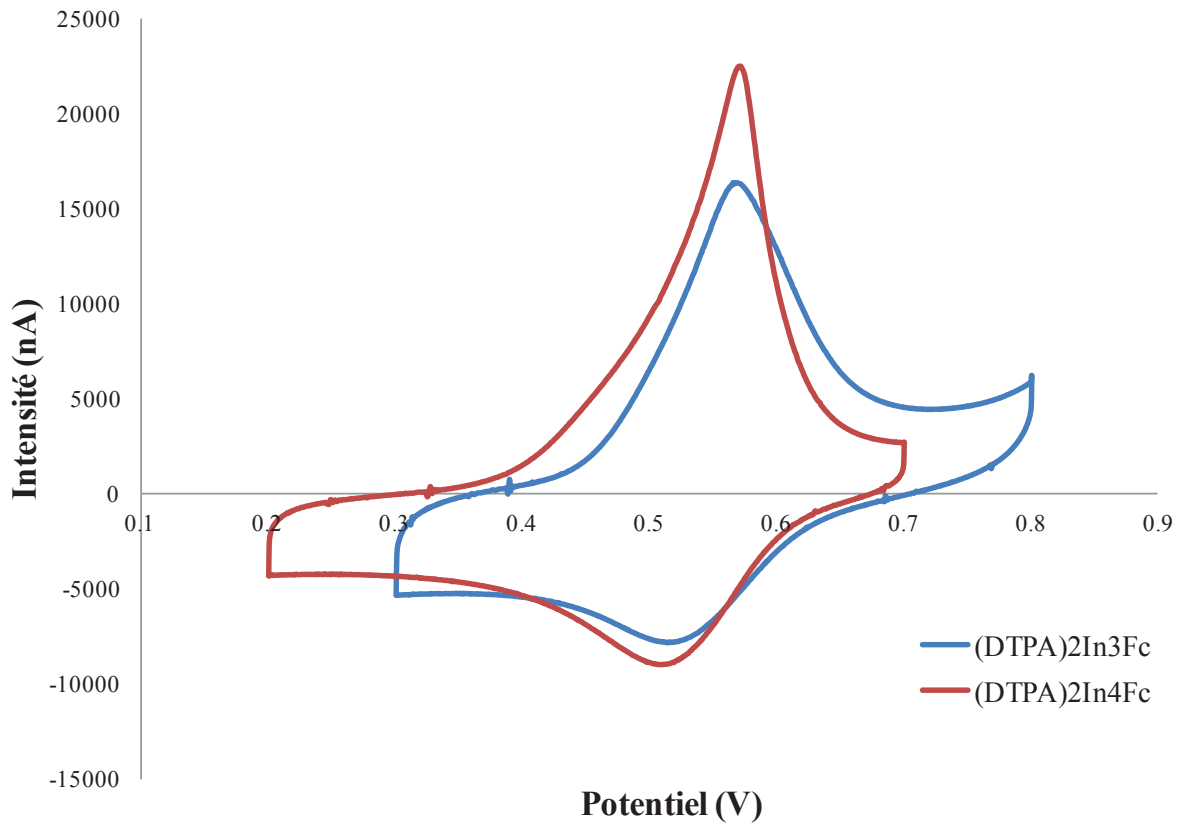


Figure IV.B.3. : Voltampérogrammes des sondes $(DTPA)_2In3Fc$ et $(DTPA)_2In4Fc$ après 4 jours de greffage. Les mesures en voltampérométrie cyclique sont effectuées 1h après l'immersion du système en solution tampon d'analyse PBE, à v = 50 mV.s^{-1}.

Sondes	E_{pc} (V)	E_{pa} (V)	$E_{1/2}$ (V)	ΔE (V)	k_{et} (s^{-1})
$(DTPA)_2In3Fc$	*0,52*	*0,57*	*0,55*	*0,05*	*6,1*
$(DTPA)_2In4Fc$	*0,53*	*0,58*	*0,55*	*0,05*	*6,3*

Tableau IV.B.1. : Potentiels de demi-vague $E_{1/2}$, ΔE et k_{et} des sondes $(DTPA)_2In3Fc$ et $(DTPA)_2In4Fc$ issus des CV en solution tampon d'analyse PBE

Les signaux varient en fonction du temps, jusqu'à obtenir une stabilité, au bout de quelques heures. Néanmoins, les intensités des pics d'oxydation sont plus importantes que les intensités des pics de réduction. La vague de réduction est plus large et moins bien définie que la vague d'oxydation. Toutefois, La réponse électrochimique du système reste stable et n'évolue pas sur le nombre de cycles. Cette dissymétrie peut être le résultat d'un léger encombrement des ferrocènes dans les sondes malgré leur proximité avec l'électrode. Les ΔE très proches, d'une valeur de 0,05 V, ont pu être enregistrés pour les deux sondes. Ces valeurs sont proches de la

valeur théorique de 0,06 V caractéristique d'un système réversible. On peut noter que la sonde $(DTPA)_2In4Fc$, présentant un ferrocène de plus que son analogue donne une réponse de plus grande intensité. Le calcul de l'aire du pic d'oxydation effectué pour les deux sondes a permis de mesurer le taux de recouvrement moyen des électrodes par les sondes (Γ en mol cm^{-2}, Cf. Équation II.1) de $1{,}6.10^{-10} \pm 5{,}1.10^{-11}$ $mol.cm^{-2}$ pour la sonde $(DTPA)_2In3Fc$ et taux de recouvrement moyen de $1{,}4.10^{-10} \pm 4{,}6.10^{-11}$ $mol.cm^{-2}$ pour la sonde $(DTPA)_2In4Fc$, soit une quantité moyenne de sondes par surface correspondant à une de $9{,}5.10^{13} \pm 3{,}1.10^{13}$ $molécules.cm^{-2}$ et de $8{,}5.10^{13} \pm 2{,}8.10^{13}$$molécules.cm^{-2}$ pour les sondes $(DTPA)_2In3Fc$ et $(DTPA)_2In4Fc$ respectivement.

La variation de l'intensité I_{ox} en fonction de la vitesse de balayage ν permet d'observer les phénomènes d'adsorption ou d'immobilisation à la surface de l'électrode. Une variation linéaire de l'intensité en fonction de la vitesse de balayage est attendue, décrivant ainsi ces phénomènes, comme décrit dans le chapitre II. L'étude a été réalisée pour les deux sondes à des vitesses de balayage allant de 25 à 500 $mV.s^{-1}$. Le tracé de l'intensité obtenue en fonction ν donne bien, pour chaque sonde, une relation de linéarité entre ces deux paramètres, avec des coefficients de corrélation linéaire supérieurs 0,99. Cette mesure confirme bien le greffage des sondes sur la surface des électrodes (Figure IV.B.4.)

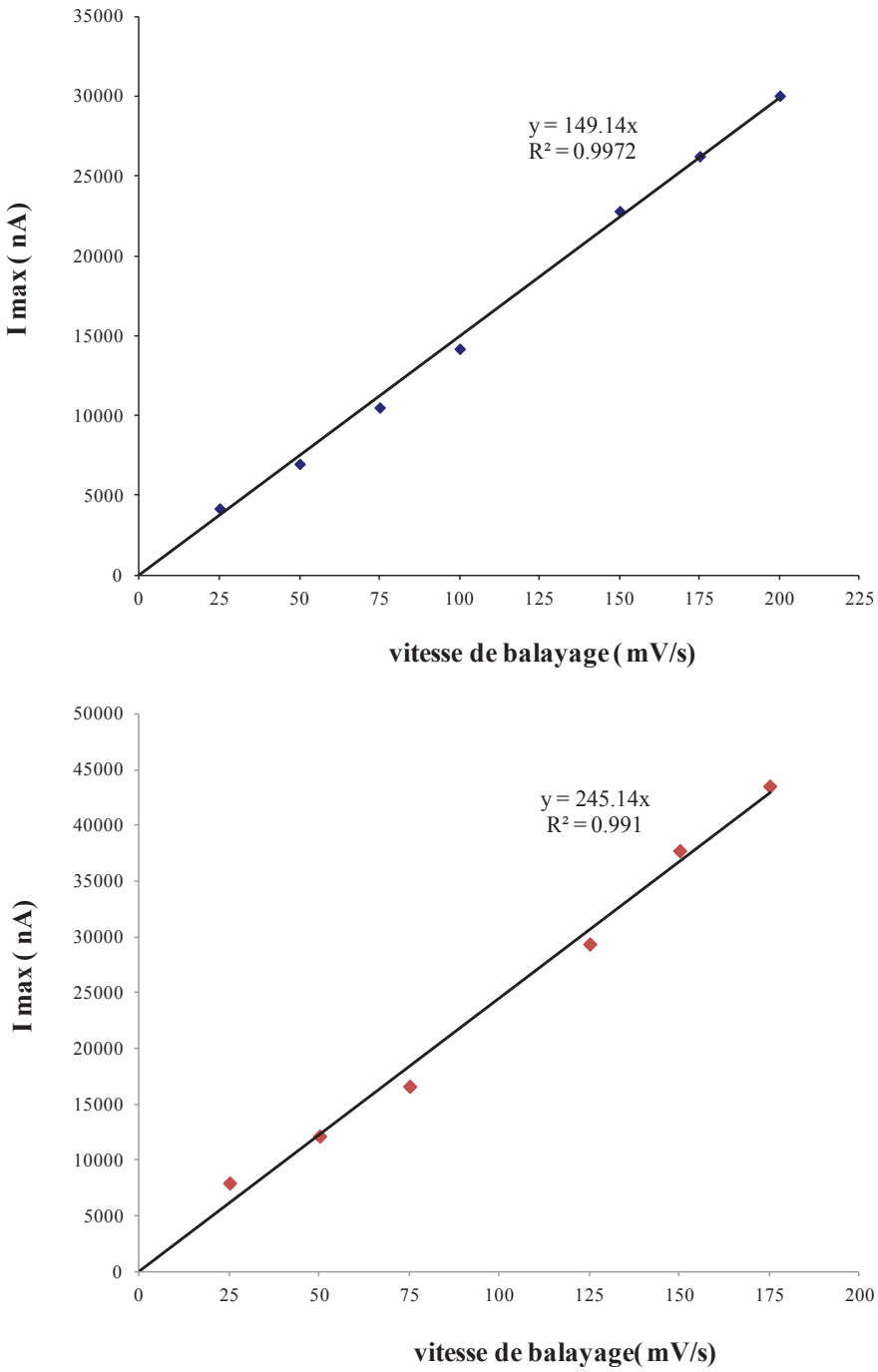


Figure IV.B.4. : Évolution de l'intensité de la vague d'oxydation I_{ox} en fonction de la vitesse de balayage v. Les mesures sont effectuées pour les sondes $(DTPA)_2In3Fc$ (en bleu) et $(DTPA)_2In4Fc$ (en rouge), 1h après immersion des électrodes dans le tampon d'analyse PBE

En outre, selon la méthode décrite dans le chapitre II.A., nous avons pu déterminer le coefficient de transfert électronique k_{et} des sondes en reportant $E_{1/2} - E_p$ en fonction du logarithme de v. La valeur de k_{et} pour chaque sonde est rapportée Tableau IV.B.1.

B.3.b. Caractérisation des sondes N_3In'1Fc, N_3In'4Fc et Tb(N_3)$_3$In'4Fc après immobilisation sur électrode

Les sondes N_3In'1Fc, N_3In'4Fc et Tb(N_3)$_3$In'4Fc immobilisées sur électrode selon la procédure décrite précédemment, sont analysées par CV. Après la réaction de « click » électroactivée, les cellules d'analyse électrochimique sont remplies dans du tampon d'analyse PBE. La couche sensible formée sur la surface de l'électrode est laissée à stabiliser durant 12h. Après cette période d'attente, l'analyse en voltampérométrie cyclique des électrodes fonctionnalisées confirme l'immobilisation des sondes. Des signaux bien définis présentent des pics d'oxydation et de réduction caractéristiques du ferrocène (Figure IV.B.5. et Tableau IV.B.2.)

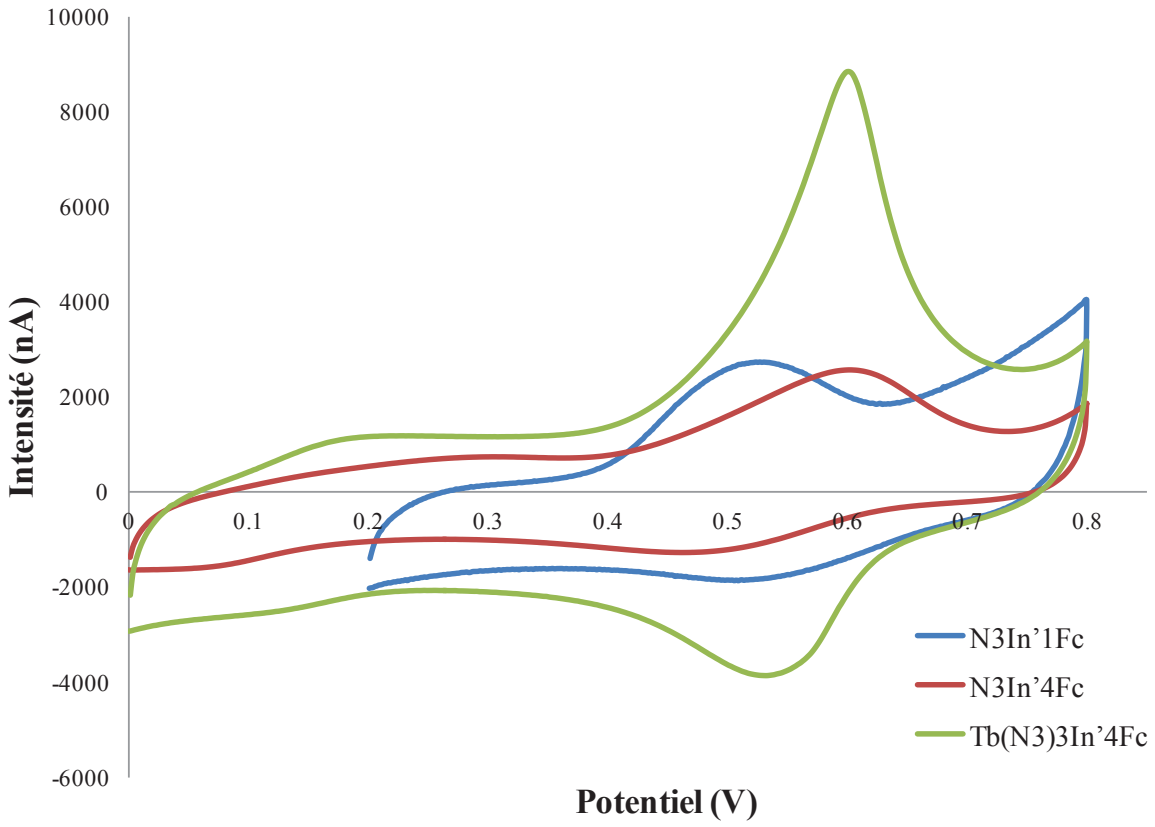


Figure IV.B.5. : Voltampérogrammes des sondes N_3In'1Fc, N_3In'4Fc et Tb(N_3)$_3$In'4Fc après la réaction de « click » électrocatalysée. Les mesures en CV sont réalisées 12h après immobilisation des sondes et l'immersion de l'électrode en solution tampon d'analyse PBE

Sondes	E_{pc} (mV)	E_{pa} (mV)	$E_{1/2}$ (mV)	ΔE (mV)	k_{et} (s^{-1})
N_3In'1Fc	*0,49*	*0,52*	*0,51*	*0,03*	*5,5*
N_3In'4Fc	*0,46*	*0,60*	*0,53*	*0,14*	*5,8*
Tb(N_3)$_3$In'4Fc	*0,54*	*0,60*	*0,57*	*0,06*	*5,2*

Tableau IV.B.2. : Potentiels de demi-vague $E_{1/2}$, ΔE et k_{et} des sondes N_3In'1Fc, N_3In'4Fc et Tb(N_3)$_3$In'4Fc déterminés à partir des CV en solution tampon d'analyse PBE

Une fois encore, les signaux enregistrés par CV dérivent légèrement puis se stabilisent au bout de quelques heures. Les ΔE mesurés sont compris entre 0,03 et 0,14 V pour les trois sondes. Les sondes N_3In'1Fc et Tb(N_3)$_3$In'4Fc, dont les valeurs de ΔE sont inférieures à 0,06V constituent des systèmes réversibles. La sonde N_3In'4Fc présente quant à elle un plus grand ΔE, constituant un système *quasi-réversible*. Le calcul de l'aire sous le pic d'oxydation permet de déterminer le taux de recouvrement moyen des électrodes d'or par les sondes. Les valeurs sont reportées dans le tableau IV.B.3.

Les taux de recouvrement trouvés sont inférieurs à ceux qui ont été déterminés pour les sondes alkylthiols. Néanmoins, ces valeurs pourraient être optimisées en utilisant une concentration plus importante de sonde lors de la réaction de « click » électrocatalysée. Il est à noter que la plus faible valeur est enregistrée pour la sonde N_3In'4Fc. Il est possible d'imaginer que la densité de sonde étant inférieure aux autres cas de l'étude, les sondes N_3In'4Fc présente bien moins d'encombrement sur la surface. La diminution des contraintes laissant plus de place pour la rotation des sondes, leur adsorption sur l'électrode pourrait être à l'origine d'un certain nombre de populations de différentes conformations sur la surface, expliquant l'augmentation du ΔE. Néanmoins, cette expérience de greffage n'a été effectuée qu'une seule fois. Il serait bon de reproduire ces résultats sur plusieurs électrodes afin de pouvoir valider nos conclusions sur le plus faible taux de greffage de la sonde N_3In'4Fc ainsi que sur son encombrement.

Sondes	Γ (mol cm^{-2})	Ecart type	Molécules par cm²	Ecart type
$N_3In'1Fc$	$7,8.10^{-11}$	$1,4.10^{-11}$	$4,7.10^{13}$	$8,6.10^{12}$
$N_3In'4Fc$	$3,0.10^{-11}$	$1,4.10^{-11}$	$1,8.10^{13}$	$8,7.10^{12}$
$Tb(N_3)_3In'4Fc$	$6,3.10^{-11}$	$1,7.10^{-11}$	$3,8.10^{13}$	$1,0.10^{13}$

Tableau IV.B.3. : Potentiels de demi-vague $E_{1/2}$, ΔE et k_{et} des sondes $N_3In'1Fc$, $N_3In'4Fc$ et $Tb(N_3)_3In'4Fc$ déterminés à partir des CV en solution tampon d'analyse PBE

Par la suite, la variation d'intensité I_{ox} a été étudiée pour les trois sondes. Les vitesses de balayage ν utilisées entre 25 et 500 mV.s^{-1} permettent de tracer la relation linéaire de l'intensité en fonction ν, avec des coefficients de corrélation satisfaisant, confirmant l'immobilisation des sondes sur la surface des électrodes (Figure IV.B.6.)

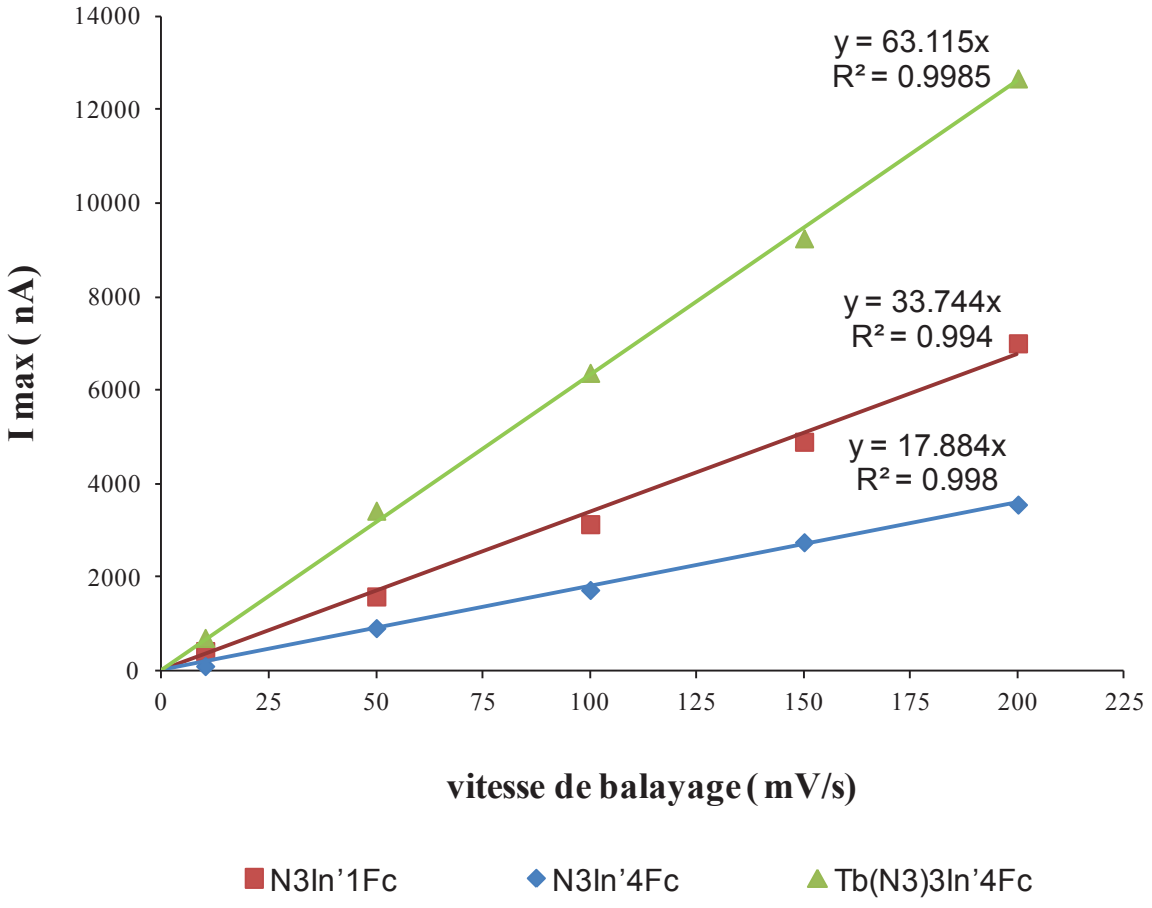


Figure IV.B.6. : Évolution de l'intensité de la vague d'oxydation I_{ox} en fonction de la vitesse de balayage v. Les mesures sont effectuées pour les sondes, 12h après l'immersion des électrodes dans le tampon d'analyse PBE suite à la réaction de « click » électrocatalysée.

Par ailleurs, l'étude de la variation $E_{1/2} - E_p$ en fonction du logarithme de ν (menée entre $1V.s^{-1}$ et $5V.s^{-1}$ en raison des écarts plus faibles de ΔE) a permis de calculer les valeurs de k_{et} des différentes sondes (Tableau IV.B.2). Ces valeurs sont très proches de celles calculées précédemment pour les sondes alkylthiol. Cette observation signifie que les échanges entre les deux familles de sondes et la surface de l'électrode se réalisent selon une cinétique assez semblable. Les modifications sur la partie 3' de la sonde ont donc des répercussions relativement faibles sur les signaux électrochimiques enregistrés.

C. Détection électrochimique d'ADN après immobilisation des sondes sur surface d'or

C.1. Suivi des variations de la réponse électrochimique des électrodes fonctionnalisées par des sondes (DTPA)2In3Fc et (DTPA)2In4Fc après ajout d'une cible

Après le greffage des sondes, le suivi de la réaction d'hybridation est effectué par voltampérométrie cyclique (CV). La CV est la meilleure méthode pour visualiser les changements de structure. La localisation du ferrocène proche de la surface lorsque la sonde est sous forme tige-boucle correspond à un maximum du signal. Le marqueur est en effet écarté de la surface lors de l'hybridation.

Les électrodes ont été immergées dans de l'eau milliQ une minute à 70 °C, afin de dénaturer les sondes greffées, puis lavées à l'eau et enfin séchées par un flux d'argon, avant d'être immergées dans la solution tampon d'analyse PBE. Le système est laissé à évoluer à température ambiante afin de permettre la structuration de la tige-boucle. La cible non complémentaire HBV (20 nM) et de l'ADN de sperme de saumon (50µg.mL^{-1}) sont rajoutés dans le milieu de détection, afin de passer dans un milieu complexe. La présence d'acides nucléiques de séquences non complémentaires dans le milieu diminue la dérive du signal en supprimant l'adsorption non spécifique des cibles sur l'électrode durant le test hybridation. La stabilisation du système est suivie par CV durant 3h avant que la cinétique d'hybridation ne débute.

Les tests de détection sont réalisés avec une concentration en cible de 100 pM dans un volume de 5 mL. Pour des questions de temps, les concentrations plus faibles n'ont pu être étudiées pour cette famille de sondes, il est néanmoins envisageable de travailler avec des concentrations inférieures. La cinétique d'hybridation commence d'abord par l'insertion de la cible non-complémentaire HBV (100 pM) à laquelle correspond une très légère augmentation (moins de 1%) de l'intensité du pic d'oxydation au cours du temps (Figure IV.C.1).

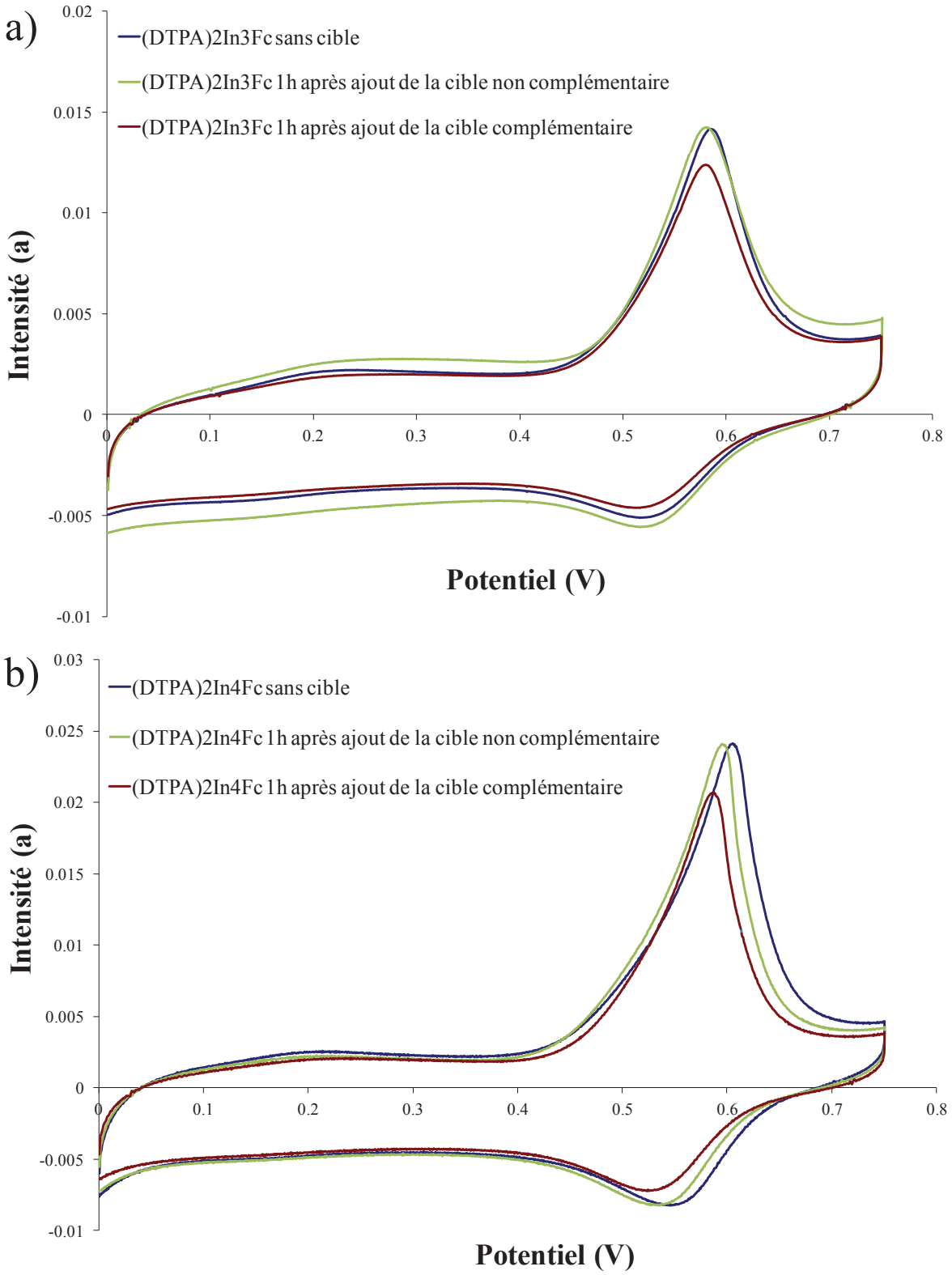


Figure IV.C.1. : Analyses en CV de la réponse des sondes $(DTPA)_2In3Fc$ (en a) et $(DTPA)_2In4Fc$ (en b) greffées sur une électrode d'or, avant et après ajout d'une cible. Mesures réalisées dans 5 mL de tampon d'analyse PBE, en présence de la cible non complémentaire HBV (20 nM) et d'ADN de sperme de saumon (50µg.mL^{-1}), 1 h après ajout de la cible non-complémentaire (vert) et de la cible complémentaire (100 pM en rouge).

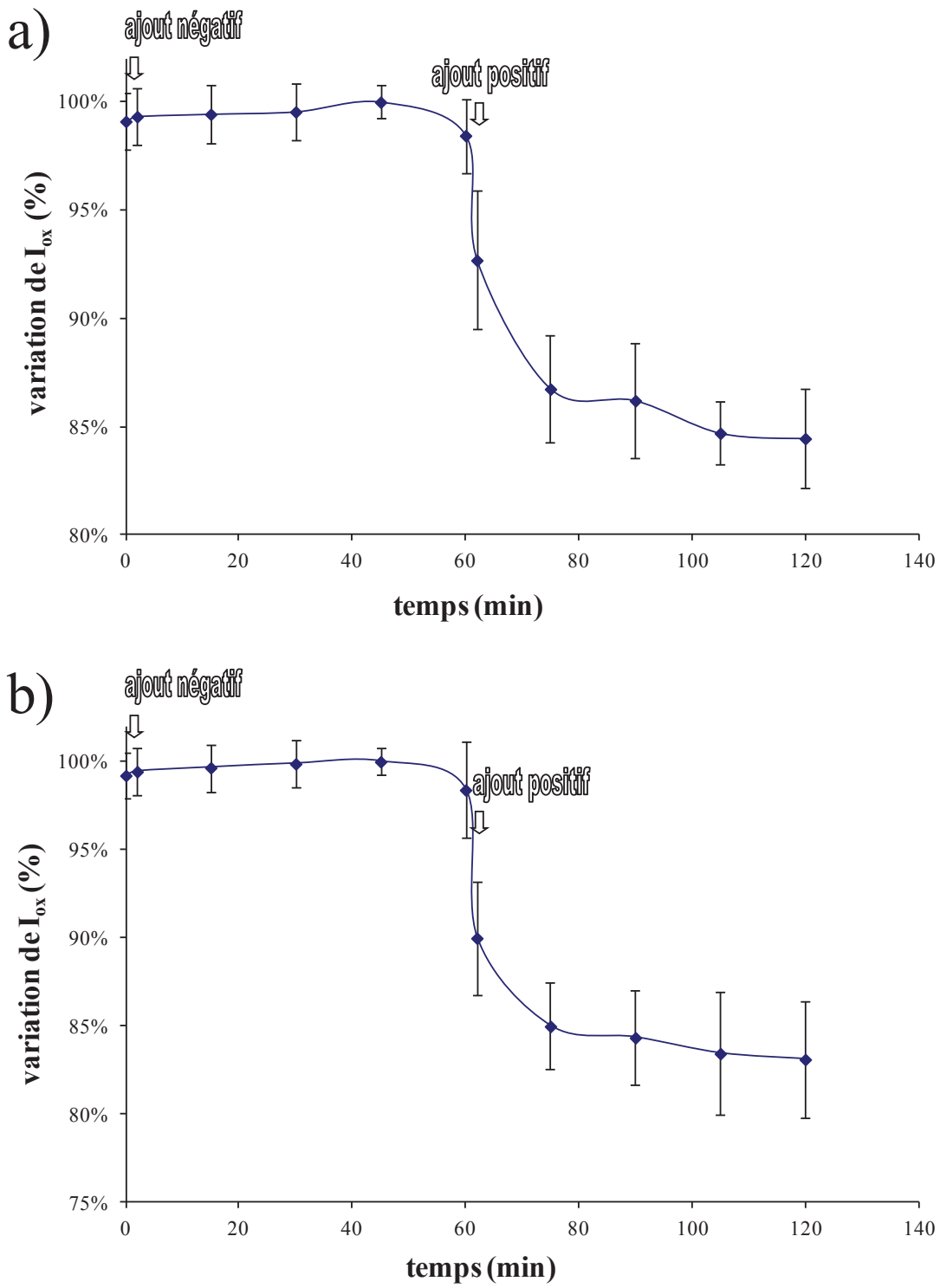


Figure IV.C.2. : Suivi de la variation de I_{ox} en fonction du temps, après ajout des cibles à 100 pM dans 5 mL de tampon d'analyse PBE dans lequel sont dissous la cible non complémentaire HBV (20 nM) et de l'ADN de sperme de saumon (50µg.mL^{-1}).
Suivi du signal donné par la sonde $(DTPA)_2In3Fc$ (en a) et $(DTPA)_2In4Fc$ (en b). Les données présentées sont les valeurs moyennes de 3 expériences.

L'ajout de la cible complémentaire conduit à une diminution de I_{ox}. Le suivi cinétique de l'intensité du pic d'oxydation montre un écrasement de l'intensité jusqu'à un minimum observé 1h après l'ajout de la cible Influenza (Figure IV.C.2.).

On peut remarquer que les signaux obtenus après ajout de la cible non complémentaire HBV sont relativement stables, avant l'écrasement du signal provoqué par l'ajout de la cible complémentaire Influenza. Le signal se stabilise jusqu'à l'obtention d'un minimum, 1 heure après l'ajout de la cible complémentaire. Les performances obtenues sont comparables au système développé par Fan et Coll. [27]. Au vu d'une variation d'intensité de l'ordre de 15 %, il est raisonnable de penser que l'on pourrait descendre la concentration détectable en cible.
Une augmentation considérable de la sensibilité du système étudié serait obtenue par utilisation de la voltampérométrie par pulses différentiels (DPV), ou de la voltampérométrie à ondes carrées (Square wave voltammetry), méthodes de mesure plus classiquement utilisées dans la littérature. Il est important de noter que la voltampérométrie cyclique permet d'observer le phénomène d'hybridation de façon plus fine. Les changements de structure de la sonde entrainent des modifications d'intensités et de potentiels qui sont uniquement visualisables par cette technique de mesure. La variation d'intensité dans ce travail est obtenue à une sensibilité jugée suffisante, la mesure par DPV sera retenue lors de la miniaturisation du système.

C.2. Suivi de la réponse électrochimique des électrodes fonctionnalisées par les sondes N3In'1Fc, N3In'4Fc et Tb(N3)3In'4Fc après ajout d'une cible

Selon un protocole expérimental similaire à ce qui a été fait pour les sondes de la famille alkylthiol, la réaction d'hybridation est à son tour observée par CV pour les sondes fonctionnalisées par des azotures. L'analyse se déroule dans un volume de 1 à 1,5 mL de tampon d'analyse PBE, en présence de la cible non complémentaire HBV (20 nM) et d'ADN de sperme de saumon (50µg.mL^{-1}). Les tests de détection ont été réalisés avec des concentrations en cible allant de 100 pM à 100 fM. La cinétique d'hybridation commence par l'ajout de cible HBV, avant l'introduction de la cible Influenza (Figure IV.C.3). Chacune de ces expériences a été répétée au minimum 3 fois.

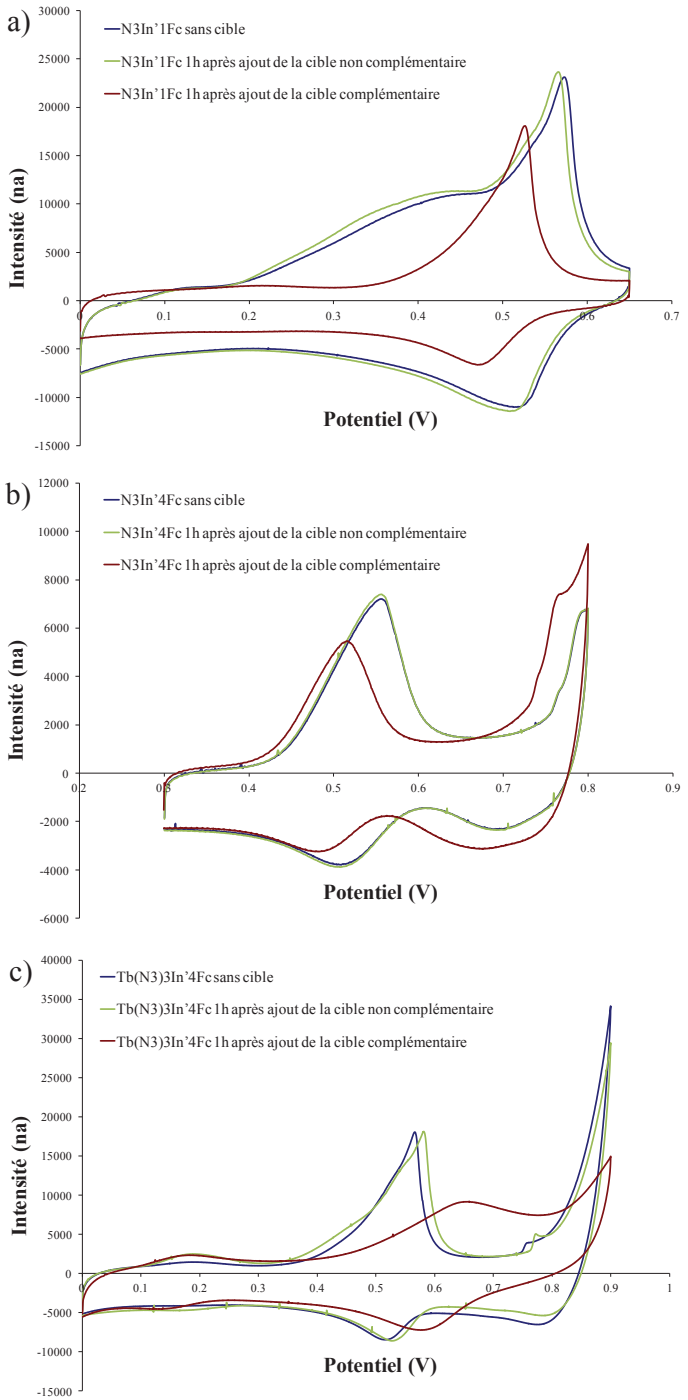


Figure IV.C.3. : Analyses en CV de la réponse des sondes $N_3In'1Fc$ (en a), $N_3In'4Fc$ (en b) et $Tb(N_3)_3In'4Fc$ (en c) greffées sur une électrode d'or, avant et après ajout d'une cible. Mesures réalisées dans 5 mL de tampon d'analyse PBE, en présence de la cible non complémentaire HBV (20 nM) et d'ADN de sperme de saumon (50µg.mL^{-1}), 1 h après ajout de la cible non-complémentaire (vert) et de la cible complémentaire (rouge) à 100 pM.

Dans chacun des cas, Il a été observé une légère augmentation de l'intensité sur une période d'une heure après l'ajout de la cible HBV. Lors de l'injection de la cible Influenza, l'intensité du pic d'oxydation s'écrase, jusqu'à l'obtention d'un minimum une heure après l'introduction de la cible complémentaire. La variation du signal observée entre une concentration en cible de 100 pM et de 10 pM étant du même ordre de grandeur, nous avons décidé de travailler en descendant de deux fois le logarithme de la concentration. Le phénomène d'hybridation est encore observable à cette concentration, bien que les variations de signaux soient plus faibles. Le suivi cinétique de I_{ox} est représenté dans la figure IV.C.4. pour la sonde N_3In'1Fc, la figure IV.C.5. pour la sonde N_3In'4Fc et la figure IV.C.6. pour la sonde Tb$(N_3)_3$In'4Fc. L'étude d'hybridation se déroule en observant l'évolution du signal après l'ajout de la cible non complémentaire puis, au bout d'une heure, la cible complémentaire est introduite, et l'écrasement du signal est enregistré sur une période supplémentaire d'une heure. Les expériences sont conduites avec des concentrations en cibles de 100 pM, 10 pM et 100 fM. Les variations d'intensité enregistrées montrent que le système est capable de détecter la cible d'intérêt à un seuil de 100 fM. Les variations d'intensité étudiées ne semblent pas proportionnelles à la concentration en cible introduite, pour chacune des sondes étudiées. Néanmoins, une diminution du signal de 20% à 40 % est observée 1 heure après l'ajout de la cible complémentaire. La modification supplémentaire du lien d'ancrage de la cible Tb$(N_3)_3$In'4Fc ne semble pas apporter de modification de comportement des sondes, vis-à-vis de la sensibilité de détection de la cible complémentaire. Contrairement a ce qui était attendu, le même comportement a été observé quel que soit le nombre de ferrocènes présents sur les sondes.

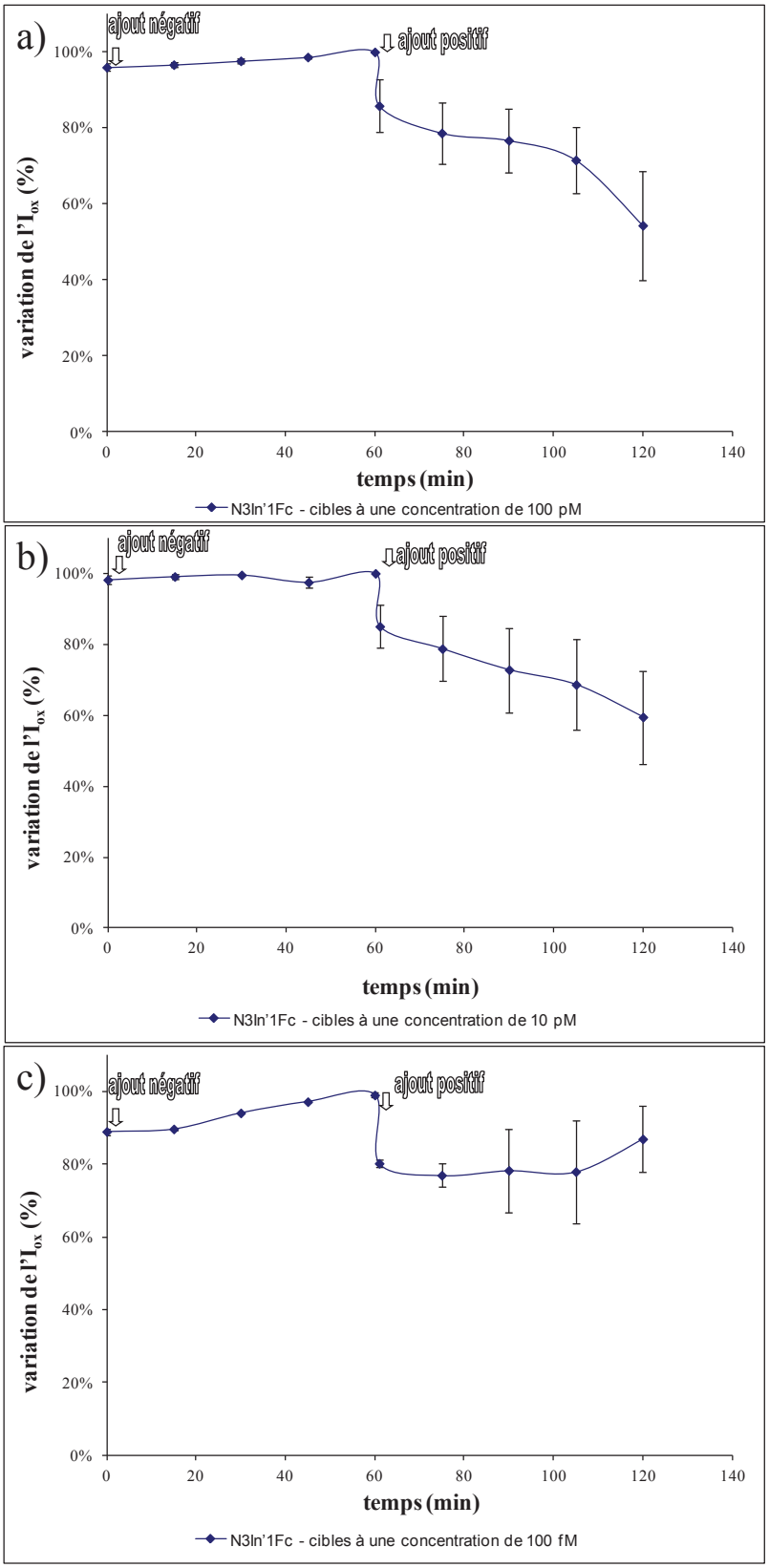


Figure IV.C.4. : Suivi de la variation de l'I_{ox} en fonction du temps pour la sonde $N_3In'1Fc$, après ajout des cibles à 100 pM (a), 10 pM (b) et 100 fM (c) dans 5 mL de tampon d'analyse PBE dans lequel sont dissous la cible non complémentaire HBV (20 nM) et de l'ADN de sperme de saumon (50µg.mL^{-1}).

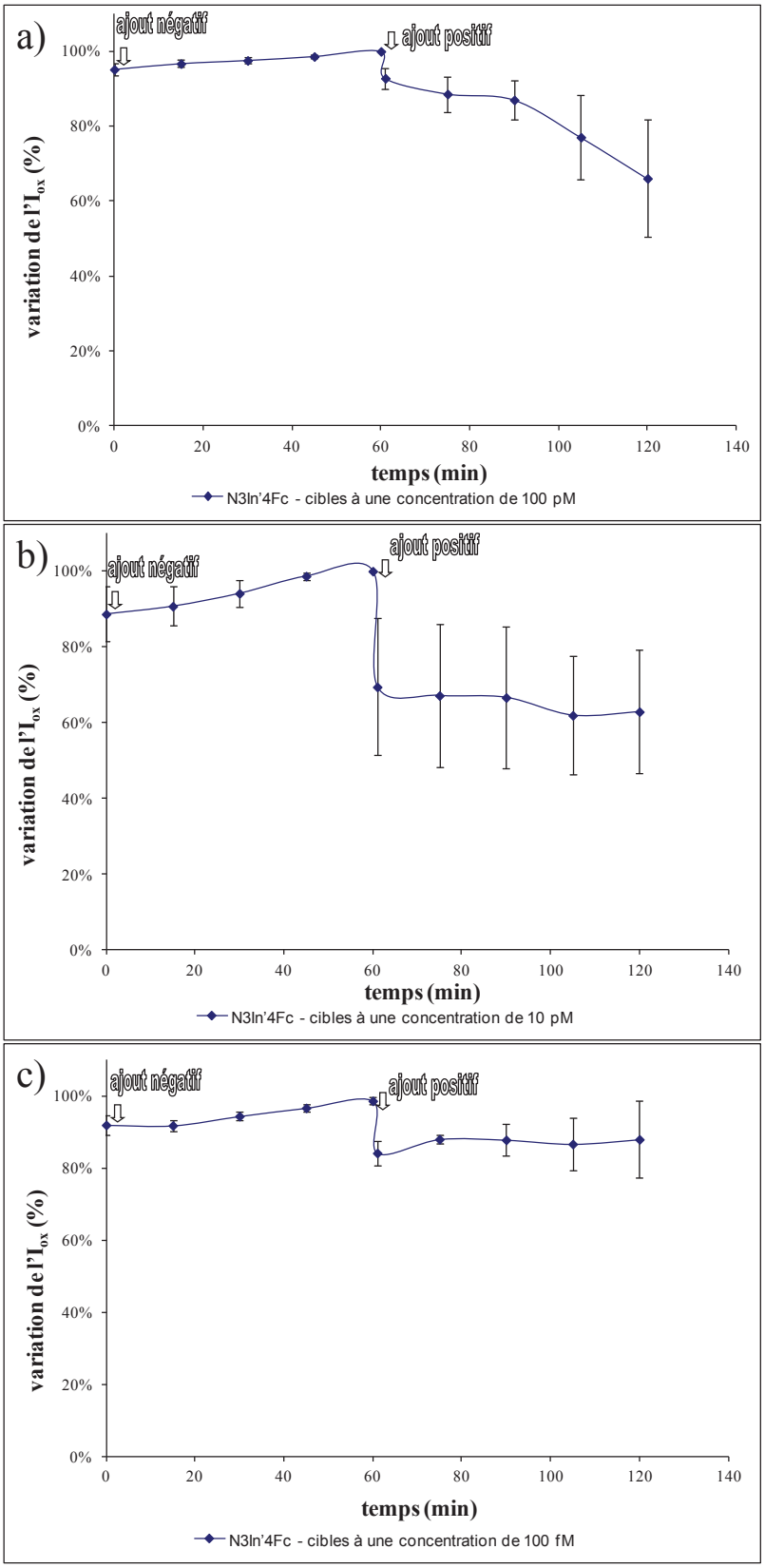


Figure IV.C.5. : Suivi de la variation de l'I_{ox} en fonction du temps pour la sonde N_3In'4Fc, après ajout des cibles à 100 pM (a), 10 pM (b) et 100 fM (c) dans 5 mL de tampon d'analyse PBE dans lequel sont dissous la cible non complémentaire HBV (20 nM) et de l'ADN de sperme de saumon (50µg.mL^{-1}).

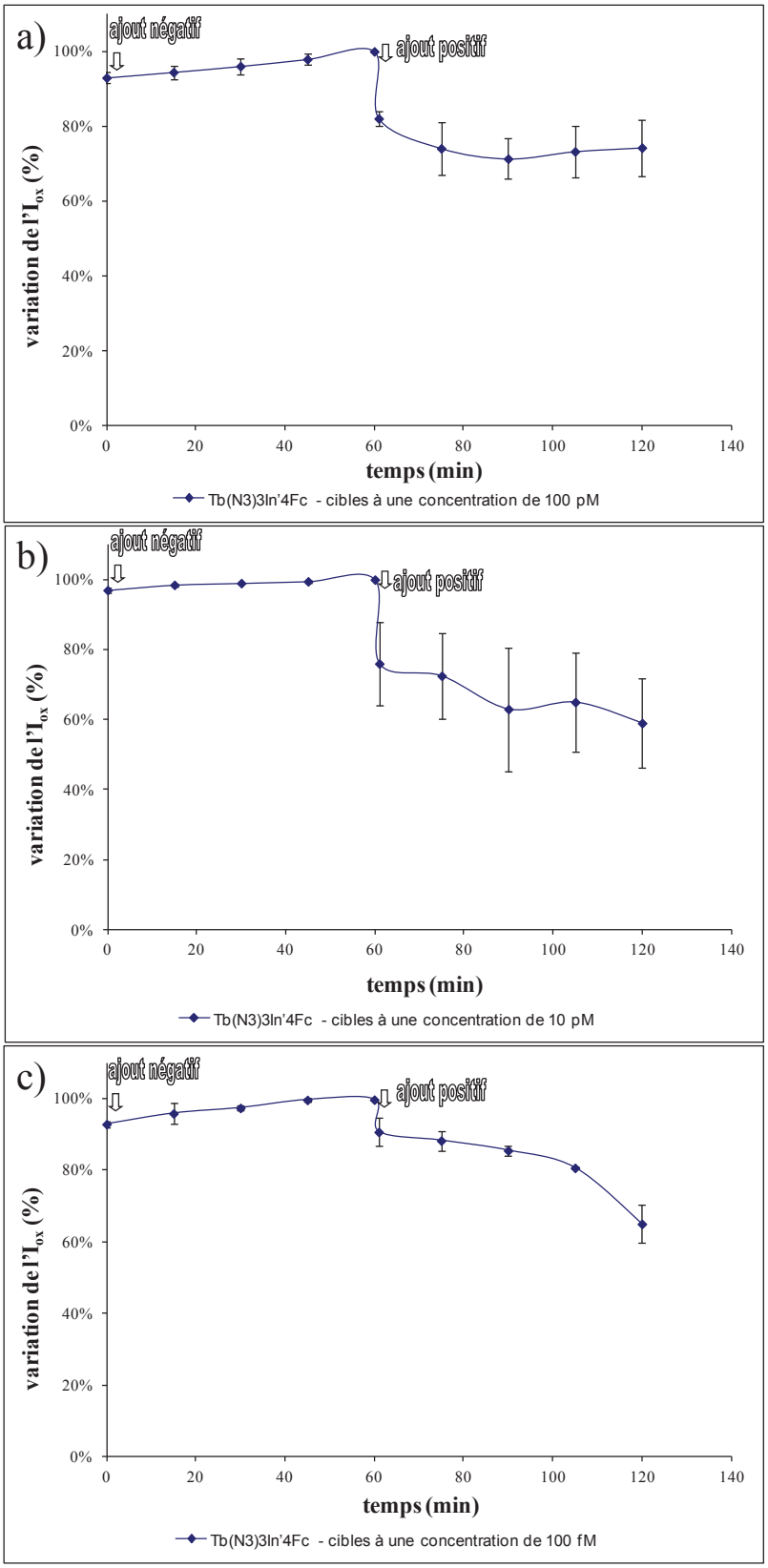


Figure IV.C.6. : Suivi de la variation de l'I_{ox} en fonction du temps pour la sonde $Tb(N_3)_3In'4Fc$, après ajout des cibles à 100 pM (a), 10 pM (b) et 100 fM (c) dans 5 mL de tampon d'analyse PBE dans lequel sont dissous la cible non complémentaire HBV (20 nM) et de l'ADN de sperme de saumon (50µg.mL^{-1}).

C.3. Etude de la stabilité des électrodes fonctionnalisées au cours des analyses électrochimiques

C.3.a. stabilité des électrodes fonctionnalisées par les sondes $(DTPA)_2In3Fc$ et $(DTPA)_2In4Fc$

La stabilité des sondes immobilisées sur la surface a été étudiée dans la solution tampon d'analyse PBE. Le signal donné par CV avant chaque cinétique d'hybridation est enregistré et l'intensité du pic d'oxydation I_{ox} est relevée. Les variations d'intensité sont observées sur une période de 24 jours, permettant le tracé du graphique de la figure IV.C.7.

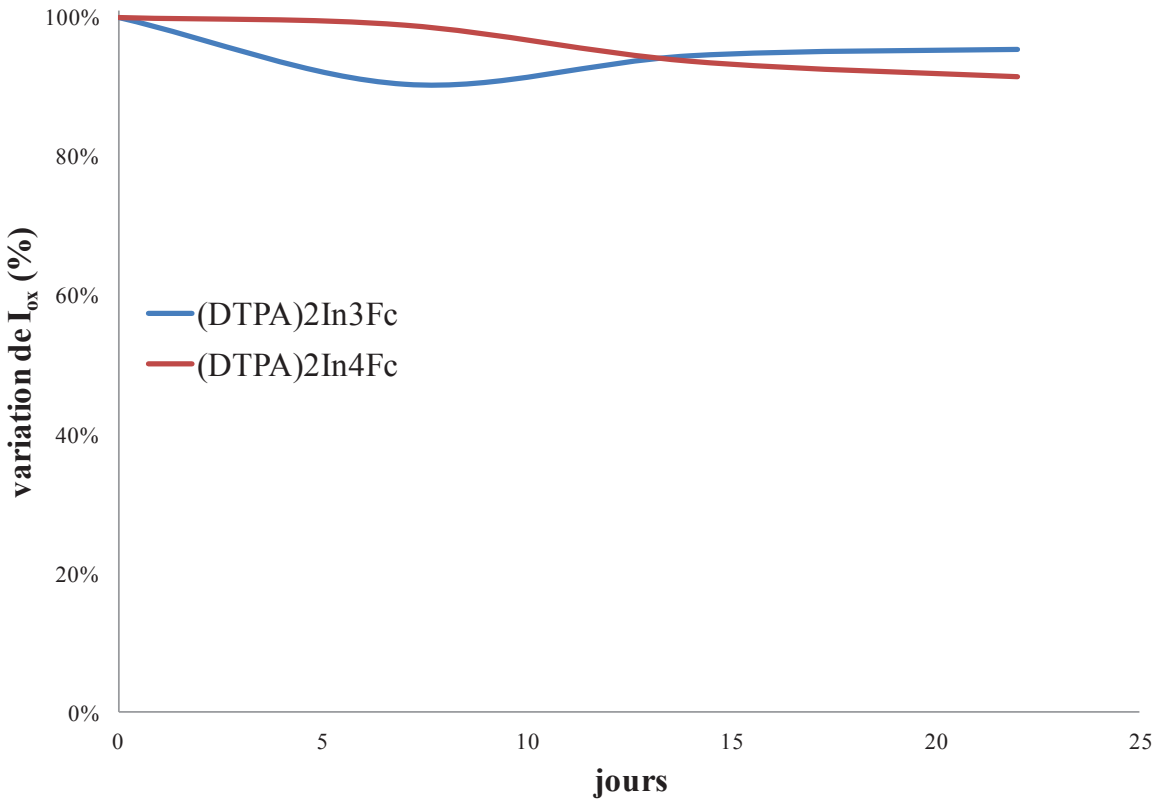


Figure IV.C.7. : Etude de stabilité en solution de tampon d'analyse PBE des électrodes fonctionnalisées par$(DTPA)_2In3Fc$ (en bleu) et par $(DTPA)_2In4Fc$ (en rouge). Report de la variation d'intensité du pic d'oxydation en 24 jours.

Le système est stocké à 3°C entre deux expériences d'hybridation. La solution tampon est renouvelée avant chaque expérience, puis une analyse par CV est effectuée. Le signal enregistré baisse d'environ 10 % sur cette période. Chacune des électrodes a subi au minimum

6 expériences d'hybridation durant ce temps de suivi. Les deux sondes ont un comportement similaire lors de cette étude.

Les tests d'hybridation sont agressifs pour les sondes, car ils demandent un grand nombre de CV dans la journée pour suivre l'évolution du signal. Le système se montre donc robuste pour une succession d'expériences de reconnaissance d'ADN sur une période dépassant les 20 jours de stockage.

C.3.b. stabilité des électrodes fonctionnalisées par les sondes N_3In'1Fc, N_3In'4Fc et Tb(N_3)$_3$In'4Fc

Par analogie à ce qui a été fait précédemment, la stabilité des sondes N_3In'1Fc, N_3In'4Fc et Tb(N_3)$_3$In'4Fc a également été étudiée, selon le même protocole opératoire (Figure IV.C.8.)

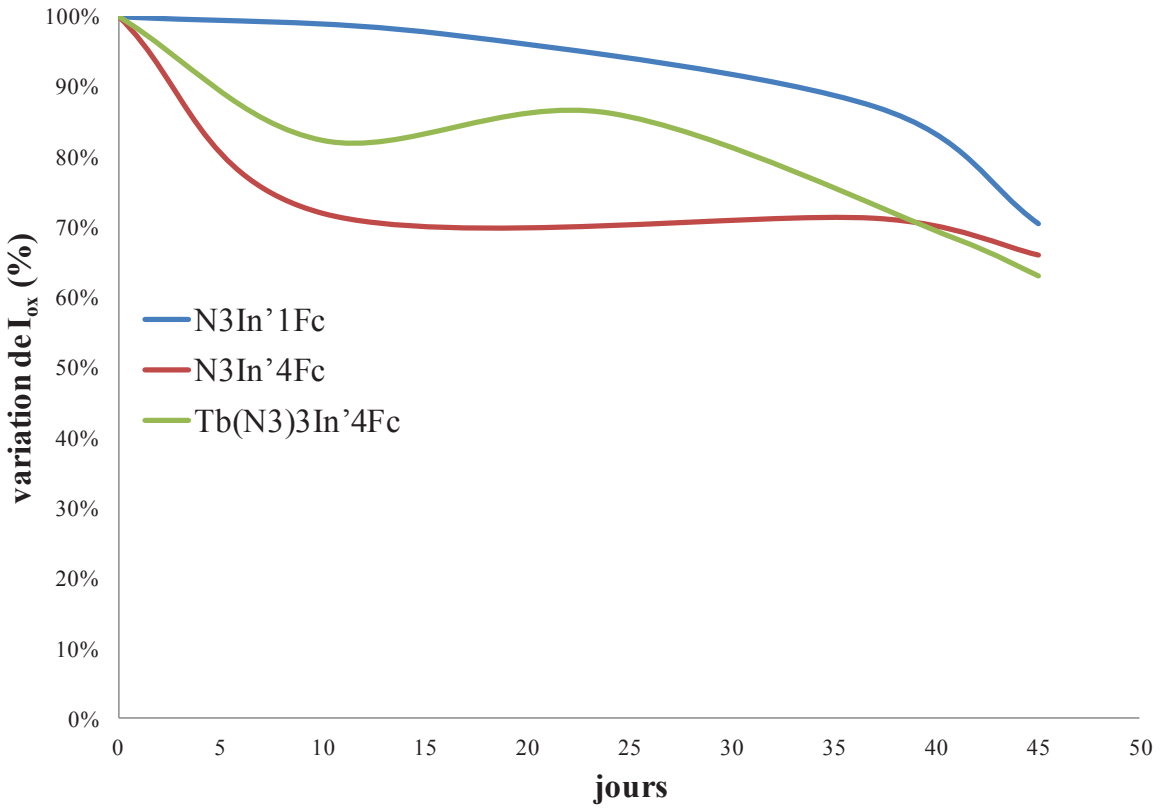


Figure IV.C.8. : Etude de stabilité en solution de tampon d'analyse PBE des électrodes fonctionnalisées par N_3In'1Fc (en bleu), N_3In'4Fc (en rouge) et par Tb(N_3)$_3$In'4Fc (en vert). Report de la variation d'intensité du pic d'oxydation en 45 jours.

Chacune des électrodes a subi au minimum 9 expériences d'hybridation durant le temps de suivi. En raison d'une variation de courant plus importante, l'étude a été menée sur une période de 45 jours. En effet, si le comportement des sondes N_3In'1Fc et Tb(N_3)$_3$In'4Fc sont relativement similaires à ce qui a été décrit précédemment, la sonde N_3In'4Fc connait quant à elle une plus grande perte d'intensité. En effet, dans les 10 premier jours, une perte de 30 % est enregistrée, puis le signal semble se stabiliser, sans que des variations notoires d'intensité ne soient observées sur les 35 jours suivants. La densité de greffage de cette sonde est environ 3 fois inférieures à celles des sondes N_3In'1Fc et Tb(N_3)$_3$In'4Fc. La même réflexion peut être menée si l'on compare les stabilités des électrodes modifiées par les sondes DTPA et celles modifiées par le dérivé DTPA-héxynyle suivi par les sondes *via* la chimie « click ». Une plus faible densité de greffage semble impacter la stabilité de la couche sensible du capteur. Une couche plus dense de sondes sur l'électrode permet de mieux résister aux différentes attaques chimiques entrainant la coupure de liens Au-S (mécanisme de réduction ou d'oxydation des thiols dans les tampons.).

Contrairement à ce qui était attendu, la sonde Tb(N_3)$_3$In'4Fc qui présente un plus grand nombre de liens Au-S avec la surface (si tous les azotures ont réagi avec la surface) ne se montre pas plus stable que ses analogues N_3In'1Fc et N_3In'4Fc. Ce résultat semble signifier que, dans le cas de la réaction de « click » électrocatalysée avec la surface, un plus grand nombre de groupements azoture n'affecte ni le rendement de couplage sur la surface (la densité de greffage étant similaire à celle de la sonde N_3In'1Fc), ni la stabilité de la sonde sur la surface. Les conditions optimales pour ces deux paramètres sont déjà obtenues par la modification des ODN par une seule fonction azoture.

D. Conclusion

L'utilisation d'une chaîne alkylthiol basée sur le motif DTPA a permis d'envisager le greffage de diverses sondes ODN sur électrode d'or, selon différents procédés.

Il a été montré en premier lieu qu'il était possible de réaliser la réaction de « click » électrocatalysée à partir de l'élément d'ancrage bis(DTPA) héxynyle ***7***. La réaction a permis l'immobilisation sur électrode d'or de la sonde oligonucléotidique fluorescente ***14***, ce qui a pu être observé par microscopie optique de fluorescence. Cette preuve visuelle a permis de confirmer qu'il était possible d'utiliser la réaction de « click » électrocatalysée pour l'immobilisation d'oligonucléotides sur or.
En second lieu, nous avons effectué le greffage des sondes « hairpin » $(DTPA)_2$In3Fc et $(DTPA)_2$In4Fc modifiées par une chaîne alkylthiol selon un protocole de déprotection des thiols et une méthode de greffage similaire à ce qui a été effectué pour le bis(DTPA) héxynyle. Il a été ainsi démontré que le greffage se déroulait favorablement dans un tampon phosphate 100 mM (pH =8) en présence de tris(2-carboxyéthyl)phosphine/HCl (TCEP/HCl).
L'immobilisation a été suivie par voltampérométrie cyclique grâce à la présence des ferrocènes. L'intensité du signal s'est montrée proportionnelle au nombre de ferrocènes constituant la sonde immobilisée. Ceci a permis de valider notre stratégie initiale envisagée pour la position des ferrocènes sur la tige des structures « hairpin »

En troisième lieu, l'immobilisation des sondes modifiées par des azotures N_3In'1Fc, N_3In'4Fc et Tb$(N_3)_3$In'4Fc a pu être réalisée par couplage de ces dernières par réaction de « click » électrocatalysée, sur des électrodes d'or fonctionnalisées par le bis(DTPA) héxynyle. La réaction est effectuée dans des conditions similaires à ce qui a été étudié précédemment et la confirmation de l'immobilisation est donnée par CV, grâce à la présence des groupements ferrocényle en 3'. En regard des densités obtenues, nous pensons que le greffage de la sonde N_3In'4Fc n'a pas fonctionné correctement et le manque de matériel ne nous a pas permis de répéter cette expérience d'immobilisation. Néanmoins, à densité de greffage équivalente, entre les sondes N_3In'1Fc et Tb$(N_3)_3$In'4Fc, nous avons bien pu constater une augmentation de l'intensité de la réponse par CV par rapport au nombre de groupes ferrocényle, d'un facteur 4 environ.

Nous avons pu effectuer des expériences d'hybridation pour les deux familles de sondes «hairpin». La variation du signal fourni par les sondes en présence d'une cible ADN a été suivie par CV. L'ajout de cible non complémentaire contribue à la stabilisation du signal et n'altère pas notablement la valeur de l'intensité du pic d'oxydation I_{ox}. À la différence, l'ajout de la cible complémentaire tend à faire diminuer de manière significative I_{ox}, avec une variation minimale de cette valeur de 15%. Les voltammogrammes observés illustrent clairement l'impact de la réaction d'hybridation et du changement de structure de la sonde sur la réponse électrochimique du système.
Le suivi de ce paramètre en CV a permis de déterminer les limites de sensibilité des systèmes. Une sensibilité minimale de l'ordre de 100 fM a été déterminée.

Enfin la stabilité des électrodes soumises à de nombreuses analyses CV en tampon durant les tests d'hybridation a été étudiée sur plusieurs jours. Les analyses CV ont été menées sur un domaine de potentiels de -0,1 V à +0,9V *vs ECS* à température ambiante intercalées par des périodes de stockage en tampon. Ce suivi révèle une faible dimunition de l'intensité du signal au cours du temps sur une période de 20 à 40 jours, selon les familles de sondes. Ces variations d'intensité du signal n'ont pas impacté les capacités de détection du système.

E. Partie expérimentale

E.1. Immobilisation de l'ODN modifié par la Cy5 sur surface d'or, et observation par microscopie optique de fluorescence

E.1.a. Immobilisation de l'ODN fluorescent sur or.

Après immobilisation du dérivé bis(DTPA) héxynyle ***7*** sur électrode d'or pendant 4 jours (Cf. partie II.E.2), l'ODN ***14*** est greffé sur l'électrode *via* le protocole de la réaction de « click » décrit précédemment (Cf. partie II.E.3). Il a été choisi de travailler dans un mélange DMSO/eau (50 : 50, v/v) contenant 10 µM de TBTA, 10 µM de $CuSO_4$ et 10µM de l'ODN ***14***. La réduction du cuivre se fait par chronocoulométrie, à -300mV *vs. Ag/AgCl* durant 2h. Le test contrôle négatif est, quant à lui, conduit dans des conditions similaires, excepté le potentiel qui est alors égal à +300 mV *vs. Ag/AgCl*.

E.1.b. Observation par microscopie optique à fluorescence.

Les images de microscopie optique de fluorescence sont prises sur un appareil Zeiss Axioplan 2 Imaging, équipé de lentilles de grossissement ×10 et d'une caméra monochromatique. Les échantillons sont observés d'abord sous lumière transmise, puis par fluorescence. La rhodamine est excitée par la lampe UV-Visible munie d'un filtre passe-bande de 550 (±25) nm et la fluorescence de désexcitation de l'échantillon est collectée par un filtre passe-bande de 605 (±70) nm.

Après la réaction de « click », les électrodes sont abondamment rincées à l'eau distillée, puis à l'éthanol et l'acétone, et enfin séchée sous flux d'azote, avant d'être observée sur le microscope.

E.2. Réduction des sondes ODN alkylthiol et préparation du greffage

La solution de 1 mM de 3-mercapto-1-propanol est préparée à partir du produit pur provenant de la société Sigma-Aldrich.

5 µL (1 nmol) de l'ODN sonde à déprotéger est mis à réduire avec 1 µL de chlorhydride de tris(2-carboxyéthyl) phosphine (160 mM dans l'eau)[198] durant 2h. le milieu réactionnel est repris dans un tampon phosphate (100 mM Na_2HPO_4/ KH_2PO_4, pH =8) de sorte à obtenir 96 µL d'une solution constituée de l'ODN alkylthiol réduit (10 µM) et de TCEP/HCl (1,6 mM) [199]. Cette solution est dégazée par un flux d'argon, pour éliminer toute trace d'oxygène, puis directement appliquée durant 72h sur l'électrode d'or activée préalablement rincée à l'eau distillée, selon le protocole d'activation basique décrit dans le chapitre II.

Au terme de cette période de greffage, l'électrode est rincée avec de l'eau distillée, puis plongée 1h dans 60 µL d'une solution de mercaptopropanol (1mM) pour l'étape de passivation de la surface. Après cette étape, l'électrode est lavée abondamment à l'eau distillée, puis plongée dans la solution d'analyse PBE préalablement dégazée par un flux d'argon (Volume compris entre 3 et 5 mL, selon la cellule utilisée).

E.3. Immobilisation des sondes ODN azoture modifiées par des ferrocènes

Après immobilisation du dérivé bis(DTPA) héxynyle 7 sur électrode d'or pendant 4 jours (Cf. partie II.E.2), l'Azide-PEG3-biotine est greffée sur l'électrode *via* le protocole de la réaction de « click » décrit précédemment (Cf. partie II.E.3). La cycloaddition électrocatalysée est réalisée dans une mixture DMSO/eau (50 : 50, v/v) contenant 10 µM de TBTA, 10 µM de $CuSO_4$ et 1 µM de sondes ODN azoture modifiées par des ferrocènes.

E.4. Méthode électrochimique d'analyse

Pour l'ensemble des analyses électrochimiques, les mesures sont effectuées dans le tampon d'analyse PBE, 1h après l'immobilisation des sondes ODN sur le support.
Les mesures sont réalisées par voltampérométrie cyclique à 50 $mV.s^{-1}$, dans une fenêtre de potentiel adapté à la sonde, compris dans une gamme allant de -500 mV à 900 mV *vs ECS*.

Le suivi de l'intensité en fonction de la vitesse de balayage est effectué en CV pour des vitesses ν comprises entre 50 $mV.s^{-1}$ et 5 $V.s^{-1}$. Les mesures sont effectuées en augmentant progressivement la vitesse de balayage. Trois cycles sont généralement enregistrés, seul le dernier sert à déterminer l'intensité au pic d'oxydation (I_{ox}).

CONCLUSION GENERALE

Dans le cadre de ce travail de thèse, une stratégie d'adressage de biomolécules sur électrode d'or a été développée afin de concevoir un système de multidétection par des voies électrochimiques offrant la possibilité d'une détection directe et sans marquage des biomolécules, à partir d'un milieu complexe.
Cette stratégie d'adressage est basée sur la chimie dite « click » entre un alcyne et un azoture. L'originalité de notre stratégie de greffage réside dans la catalyse de cette réaction par une activation électrochimique. La fonction réactive alcyne est greffée sur l'or par la méthode des monocouches auto-assemblées d'alkylthiols et la réaction à lieu sous l'action d'un potentiel négatif qui permet de maintenir la forme active du catalyseur cuivre en solution, localisé près de l'électrode.

Dans le premier chapitre, les précurseurs de la chimie « click » électrocatalysée ont été synthétisés. L'élément porteur de la fonction alcyne est un dérivé polythiol de petite taille: Le bis(DTPA)héxynyle. Ses groupements dithiolphosphate permettent une immobilisation efficace de ce dernier sur la surface d'or pour réaliser par la suite l'immobilisation de diverses entités par cycloaddition. Ce premier chapitre décrit aussi la synthèse d'un dérivé ferrocène modifié par un groupement éthylazoture. Ce composé a permis de déterminer les paramètres optimaux pour la réalisation de la chimie « click » électrocatalysée.

Le deuxième chapitre décrit la mise au point de la réaction de « click » électroactivée. Cette étude plus approfondie a débuté par la détermination d'un potentiel efficace pour la réaction, en présence du ligand TBTA, qui facilite la réduction du cuivre II en cuivre I.
Cette réaction électroassistée a permis l'immobilisation du dérivé ferrocène sur électrode d'or avec un rendement satisfaisant (~95%). Le potentiel négatif de -300 mV *vs Ag/AgCl* est nécessaire pour générer *in situ* l'espèce Cu(I) et nous avons démontré que la réaction de « click » ne se réalise que si ce potentiel est appliqué. Cette étude a pu être confirmée par une analyse XPS des surfaces fonctionnalisées.
Nous avons également pu employer cette chimie pour l'immobilisation de nanoparticules fluorescentes, en observant la réalisation du greffage, contrôlé par l'application du potentiel adéquat, par microscopie optique de fluorescence, donnant ainsi une preuve visuelle de la réalisation de la chimie « click » électrocatalysée.

Enfin, nous avons également démontré que l'emploi de cette chimie est compatible avec l'immobilisation de la biotine, puis de la streptavidine, permettant d'adresser par la suite des

entités protéiques telle que l'albumine sérique humaine. Cette étude a pu être confirmée en suivant l'évolution de la construction des divers édifices moléculaires en surface par spectroscopie d'impédance. Ce travail a été mené en collaboration avec Nadir Meini et Nicole Jaffrézic-Renault.

Nous avons ensuite développé dans le troisième chapitre la synthèse des sondes oligonucléotidiques permettant de concevoir un système d'analyses multiples et sans marquage, à partir d'un milieu complexe comme un échantillon biologique, par des voies électrochimiques.

En premier lieu, un monomère ferrocényle pouvant être incorporé dans un oligonucléotide *via* la chimie dite « aux phosphoramidites » a été synthétisé. Les travaux antérieurs du laboratoire ont permis de cibler efficacement et rapidement l'optimisation de son couplage en synthèse supportée aux séquences oligonucléotidiques, afin de permettre de multiples incorporations. Des sondes porteuses de trois ou quatre ferrocènes à une extrémité ont été synthétisées avec un bon rendement d'incorporation du synthon ferrocène.

Les sondes de capture envisagées présentent une structure tige-boucle bien adaptée à la méthode de mesure par électrochimie. Le principe des tests diagnostiques exploitant ces structures a été initialement décrit Heeger et coll. .Afin d'étudier la réaction d'immobilisation des sondes par la chimie « click » électroassistée, deux familles de sondes ont été synthétisées et comparées.

La première famille, dite « famille alkylthiol », a permis l'immobilisation directe des sondes sur surface d'or par la formation de monocouches auto-assemblées d'alkylthiols.

La seconde famille dite « famille azoture » a été synthétisée afin de permettre l'immobilisation *via* la chimie « click ».

Nous avons étudié les propriétés physico-chimiques des différentes sondes issues des deux familles. Les caractéristiques thermodynamiques déterminées pour les sondes de la famille alkylthiol ont permis d'optimiser la séquence des sondes de la famille azoture afin de permettre un test d'hybridation robuste et sensible.

Un oligonucléotide fluorescent et modifié par un groupement azoture a également été synthétisé, afin de donner une confirmation visuelle de l'immobilisation de ce dernier sur or, *via* la fonctionnalisation de l'électrode de travail par chimie « click » électroassistée. Cette étude a été menée ci-après.

Enfin, dans le chapitre IV, nous avons pu démontrer que la méthode de chimie « click » électrocatalysée fonctionnait également pour l'immobilisation de diverses sondes ODN.
Nous avons montré que la stratégie d'immobilisation utilisant l'élément d'ancrage bis(DTPA)héxynyle était efficace dans le cas de l'oligonucléotide fluorescent azoture. L'immobilisation a pu être confirmée visuellement par microscopie optique de fluorescence.
Nous avons ensuite effectué le greffage des sondes « hairpins » issues de la famille alkylthiol selon les procédés classiques décrits dans la littérature. L'intensité des signaux enregistrés par voltampérométrie cyclique a permis de calculer des densités de greffage satisfaisantes, validant nos suppositions quant à la stratégie initialement envisagée pour la position des marqueurs redox à l'extrémité 5' de la structure tige-boucle.
Par la suite, l'immobilisation des sondes de la famille azoture a pu être réalisée par la réaction de cycloaddition dipolaire électrocatalysée, *via* le couplage de ces dernières avec le bis(DTPA)héxynyle préalablement greffé sur les surfaces d'or. La réaction a pu être suivie par voltampérométrie cyclique.

Les expériences d'hybridation pour les deux familles de sondes ont été réalisées et les variations du signal ont été enregistrées par voltampérométrie cyclique. Pour chaque sonde testée, l'ajout d'un brin d'ADN non complémentaire ne contribue pas à l'évolution du signal, tandis que l'ajout de la cible complémentaire provoque une baisse significative de l'intensité du pic d'oxydation, avec un écrasement minimal du signal de 15%.
Le système conçu s'avère donc efficace et l'analyse relativement rapide (~1h). Les sondes de la famille alkylthiol offrent une limite de détection des électrodes greffées de l'ordre de 100 pM, alors que les sondes de la famille azoture atteignent un domaine de sensibilité de l'ordre de 100 fM. Une hypothèse qui pourrait expliquer le gain de sensibilité notable obtenu avec la seconde famille de sondes serait l'amélioration du « design » de leur structure tige-boucle effectuée après l'étude de leurs propriétés thermodynamiques.

Finalement, nous avons pu établir que les sondes synthétisées permettent de concevoir des systèmes robustes, présentant une grande stabilité du signal enregistré au cours du temps. En effet, en travaillant à température ambiante, en milieu tamponné, les sondes présentent une faible perte de signal sur une période pouvant aller jusqu'à 40 jours. De plus, les sondes permettent de travailler sur un domaine de potentiels de -0,3 V à +0,9V *vs ECS* sans qu'aucun

impact sur le signal n'ait été observé, ce qui pourrait permettre de travailler avec d'autres marqueurs redox.

Les perspectives pour ces travaux sont multiples. Il serait nécessaire en premier lieu de déterminer expérimentalement et avec exactitude les caractéristiques thermodynamiques des sondes de la famille azoture afin de vérifier nos suppositions basées sur les valeurs théoriques. Il serait également intéressant de compléter les tests d'hybridation menés avec les sondes de la famille azoture. Par manque de temps, le travail présenté dans le cadre de cette thèse sur la sensibilité de notre test d'hybridation n'est pas assez abouti et requerrait des expériences supplémentaires à des concentrations variables en cibles. Enfin, deux perspectives importantes sont à prendre en compte pour ce travail. Le travail effectué ici a été réalisé sur un système avec une macro-électrode immergée dans une cellule électrochimique de format classique. Il serait intéressant, en premier lieu, de miniaturiser le système d'analyse afin de valider nos résultats obtenus dans un format macroscopique. Cette miniaturisation permettrait en second lieu de concevoir un système multiplexé, afin de démontrer l'efficacité de la stratégie d'adressage établie dans ce travail. Dans cette perspective, l'élaboration d'un microsystème à plusieurs électrodes de travail devra être envisagée.

ANNEXES

Annexe B. Principe de détermination d'une transition entre deux brins complémentaires par spectroscopie UV.

Plusieurs méthodes sont rapportées dans la littérature pour accéder aux paramètres thermodynamiques caractérisant les brins d'ADN. Celles-ci sont plus ou moins adaptées selon les modifications apportées aux oligonucléotides. Les mesures par calorimétrie, par fluorescence[206, 237] et par spectrométrie UV [154, 238-239] sont principalement utilisées.

Les bases nucléiques sont des chromophores dont les spectres d'absorbance en UV sont caractéristiques. Leur longueur d'onde maximale d'absorption (λ_{max}) est comprise entre 250 et 270 nm en fonction de la base considérée. Le spectre d'absorbance d'un oligonucléotide fournit généralement un λ_{max} autour de 260 nm, correspondant à la moyenne des λ_{max} de chacune des bases nucléiques.
La détermination des paramètres thermodynamiques par spectrophotométrie UV consiste à faire varier de façon linéaire la température d'une solution contenant des échantillons analysés en fonction du temps. L'absorbance d'un échantillon est comparée à celle d'une solution de référence (souvent le tampon seul) et est suivie pour une ou plusieurs longueurs d'onde, classiquement 260 nm pour les oligonucléotides.

L'enregistrement des spectrophotomètres exploite l'effet hyperchrome du désappariement des bases. Au début de l'analyse, en montée de température, les brins sont hybridés sous forme d'une double hélice et les bases nucléiques sont empilées au sein de la structure. Les interactions de type π-stacking ainsi engendrées diminuent la capacité d'absorbance des oligonucléotides. Ainsi, le coefficient d'extinction molaire d'une base dans une structure empilée est plus faible que celle du nucléoside correspondant.
En résumé, un brin d'ADN dans une solution de concentration fixe, à une longueur d'onde donnée, possède une absorbance qui varie en fonction de la température : lorsque la température augmente et dépasse le T_m, les brins se déshybrident et, à cause de l'effet du désappariement des bases, l'absorbance des oligonucléotides augmente.
Il est donc possible en faisant varier la température linéairement de visualiser la formation, ou la dissociation, d'un duplex ou d'une structure repliée. La conformation moléculaire est directement reliée à la température du milieu (Figure An.13.)

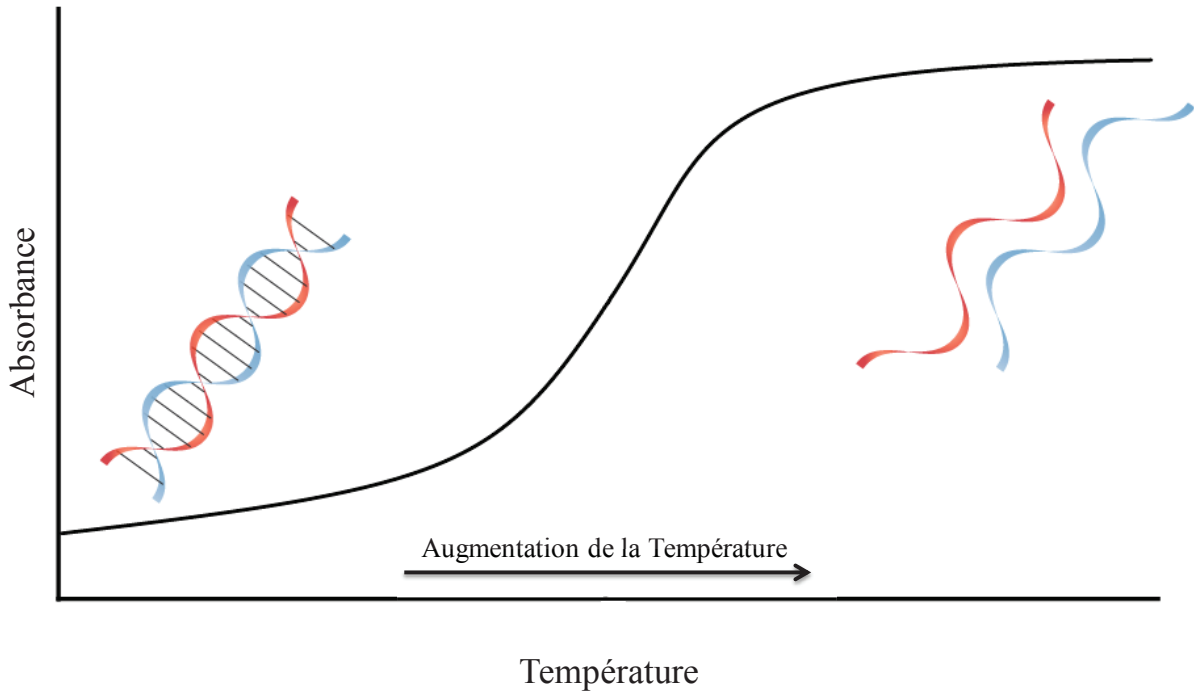


Figure An.13. Courbe de fusion d'un duplexe ADN

Les méthodes de détermination des paramètres thermodynamiques fondamentaux suivent le postulat de départ de la théorie de Van't Hoff, puisque le phénomène observé est un système en équilibre quelque soit la température. Cet équilibre est supposé simple : une seule étape sans intermédiaire réactionnel. L'enthalpie est décrite comme paramètre indépendant de la température. Seule la séquence des deux brins complémentaires influe sur sa valeur. Plus sa valeur est élevée et plus le duplex est favorisé par rapport aux deux brins dissociés. Un ΔH° faible en valeur absolue implique un système plus réversible et donc plus instable.
Les expériences doivent être réalisées avec une quantité équivalente de chaque espèce (stœchiométrie 1/1), ce afin de ne pas faire intervenir les effets de molarité.

1. Détermination du T_m

Pour la détermination du T_m , est introduit la notion α(T) : l'évolution de la fraction du duplex en fonction de la température.
α(T) est décrit par l'équation suivante :

$$\alpha(T) = \frac{A_u - A(T)}{A_u - A_L} \qquad \text{Equation (III.1)}$$

Où A_L correspond à l'absorbance obtenue à basse température et pour laquelle 100 % du duplex est formé, A_u l'absorbance à haute température pour laquelle les deux brins du duplex sont entièrement dissociés et A(T) la valeur de l'absorbance à une température donnée.
Dans ces conditions, $\alpha(T)$ décrit la fraction des populations présentes : pour $\alpha(T)=0$ seule la population des oligonucléotides dissociés existe et pour $\alpha(T)=1$ seule la population des duplex est présente. Ainsi, α est de 0,5 lorsque la température atteinte est égale au T_m
Les valeurs T_L et T_u correspondent aux températures relatives aux absorbances A_L et A_u. Ces températures sont déterminées par la dérivée de la courbe de dissociation du duplex. Ces températures correspondent à des minimums locaux de la dérivée première. Le report de ces points sur la courbe de dissociation permet d'obtenir les valeurs d'absorbance correspondantes.

Le T_m d'un duplex peut également être obtenu en considérant le maximum local de la dérivée première de la courbe de fusion ou l'intersection de la dérivée seconde avec l'axe des abscisses. Cette méthode dérivée de la méthode des tangentes (recherche d'un point d'inflexion) est la plus fréquemment utilisée (Figure An.14.).

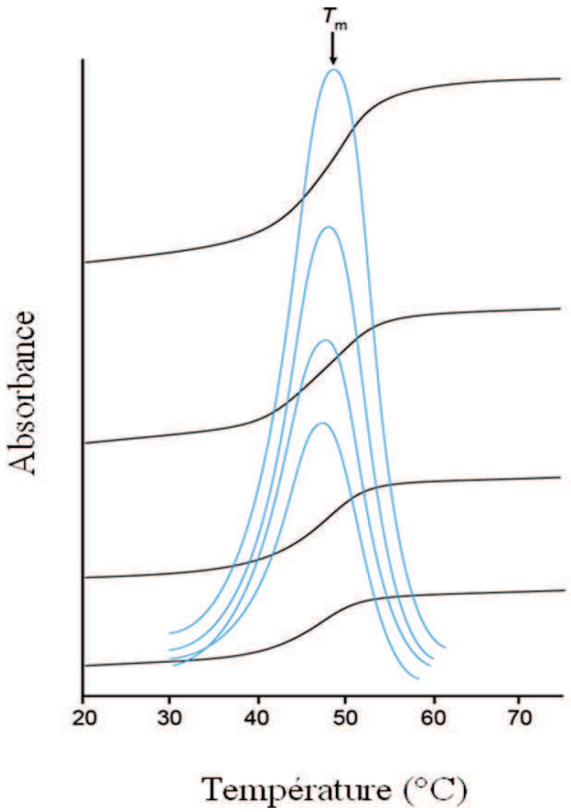


Figure An.14. : Courbes de fusion de quatre différents duplex ADN et représentation de leur dérivée première

2. : Détermination des paramètres ΔH°, ΔS° et ΔG°

Une fois les α(T) et T_m évalués, il est possible de calculer les paramètres ΔH°, ΔS° et ΔG° à partir de la loi de Van't Hoff (équation III.2) et de la définition de $\Delta G°_T$ (équation III.3) :

$$\Delta G°_T = RT \, Ln \, (K(T)) \qquad \text{Equation III.2}$$

$$\Delta G°_T = \Delta H° - T \, \Delta S° \qquad \text{Equation III.3}$$

Où R et T ont leur définition habituelle, et K(T) la constante d'équilibre de la formation du duplex à une température T donnée.

En considérant n espèces A ne pouvant s'auto-assembler, réalisant la formation d'un duplex selon l'équilibre $A_1+A_2+A_3+\ldots+A_n \leftrightarrow A_1A_2A_3\ldots A_n$, il est possible d'écrire l'équation suivante :

$$K = \frac{[A_1A_2A_3\ldots A_n]}{[A_1][A_2][A_3]\ldots[A_n]}$$

$$= \frac{\alpha}{(C_T/n)^{n-1}(1-\alpha)^n} \qquad \text{Equation III.4}$$

Où C_T la concentration totale en espèce A, en considérant que toutes les espèces sont présentes en concentration équivalente correspondant à C_T/n.

À la température T_m, cette équation se simplifie par :

$$K = \frac{1/2}{(C_T/n)^{n-1}(1/2)^n} = \frac{1}{(C_T/2n)^{n-1}} \qquad \text{Equation III.5}$$

Par regroupement des équations 2,3 et 5, Marky et Breslauer[240] ont décrit une méthode de détermination des paramètres thermodynamiques en faisant varier la concentration totale en oligonucléotides.

Pour n espèces présentes dans le milieu, on obtient :

$$\frac{1}{T_m} = \frac{(n-1)\,R}{\Delta H°}\,Ln(C_T) + \frac{\Delta S°-(n-1)\,R.Ln(2n)}{\Delta H°} \qquad \text{Equation III.6}$$

Après le tracé de la droite $1/T_m = f(Ln(C_T))$, le coefficient directeur permet d'accéder au ΔH°, tandis que l'ordonnée à l'origine permet d'accéder à ΔS°. Ce calcul est largement utilisé pour la caractérisation de duplex de petites tailles (<12 mères).
Pour des duplex de plus grandes longueurs, Puglisi et Coll.[238, 241] réutilisent les équations de base 2 et 3 permettant de donner ΔH° et ΔS° en fonction de Ln(K) et de la température :

$$Ln(K(T)) = \frac{-\Delta H°}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S°}{R} \qquad \text{Equation III.7}$$

Le tracé de la tangente aux environs du T_m permet d'accéder aux ΔH° et ΔS° à partir du coefficient directeur de la droite et l'ordonnée à l'origine.
L'équation III.4 donnant la valeur de K(T) en fonction de α(T) évolue en fonction du nombre d'espèces présentes dans le milieu. Dans le cadre d'un duplex, n=2, tandis que dans le cadre d'un « hairpin »,n=1

3. cas particulier des « hairpins » (n=1)

L'utilisation des équations III.6 et 7 permet de définir les paramètres thermodynamiques pour un duplex, soit n =2. Toutefois dans le cadre des structures tige-boucle (n =1) , l'équation III.6 devient :

$$1/T_m = \Delta S°/ \Delta H° \qquad \text{Equation III.8}$$

Et d'une manière générale :

$$K = \alpha / (1-\alpha) \qquad \text{Equation III.9}$$

Ces deux égalités montrent que dans le cas d'assemblages mono moléculaires de type « hairpin », le T_m n'est plus fonction de la concentration en ADN mais uniquement fonction de la concentration en sels[242] . Seule la méthode utilisant l'équation III.7 peut alors être utilisée. Hannoush et Damha ont confirmé expérimentalement cette dépendance du T_m vis-à-vis de la concentration en faisant l'étude de la stabilité des différents « hairpins » ARN[243] . De plus, Ramsing et Coll. ont montré que si le T_m était fonction de la concentration en sels, le ΔH° ne l'était pas[244] . Dans le cas des structures « hairpins » étudiées, ils ont observé l'absence d'évolution du ΔH° pour une concentration en NaCl de 0,1 à 1 M ou pour une concentration en $MgCl_2$ de 0,5 à 8 mM, ce qui correspond à une concentration de ces deux sels couramment

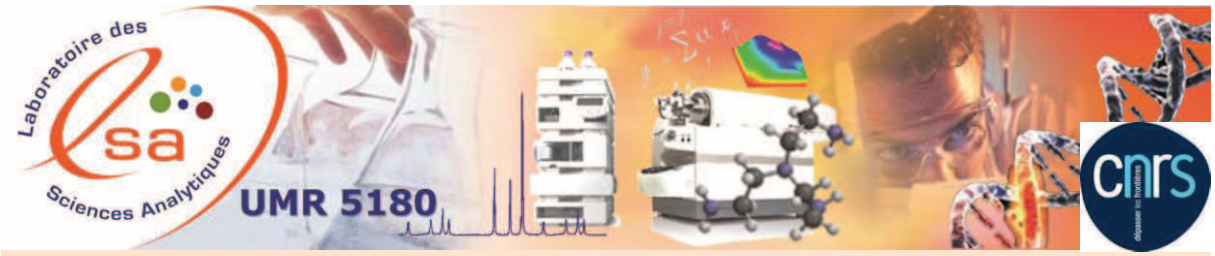
utilisés en biologie et en analyse thermodynamique des oligonucléotides. Cette observation corrèle le fait que le $\Delta H°$ est uniquement dépendant de la séquence de la structure et décrit l'état d'équilibre entre deux formes.

Annexe C. Programme de synthèse automatisée sur support solide classique.

	function	number	time	active
1	Begin	106		
2	18 to Waste	64	3	
3	18 to Column	42	15	AGCT5678
4	Reverse Flush	2	10	AGCT5678
5	Block Flush	1	4	AGCT5678
6	Phosp Prep	101	3	
7	Column 1 On	140		
8	Block Vent	111	2	AGCT5678
9	Tet to Waste	58	1.7	
10	purge base	201	1.7	6
11	B+Tet to Column	33	3.5	AGCT5 78
12	Wait	103	15	AGCT5 78
13	Tet to Column	34	1	AGCT5 78
14	B+Tet to Column	33	3.5	AGCT5 78
15	Push to Column	43		
16	Column 1 Off	141		
17	Column 2 On	142		
18	18 to Waste	64	4	
19	Block to Flush	1	3	AGCT5678
20	Block Vent	111	2	AGCT5678
21	Tet to Waste	58	1.7	
22	B+Tet to Column	33	3.5	AGCT5678
23	Wait	103	15	AGCT5678
24	Tet to Column	34	1	AGCT5678
25	B+Tet to Column	33	3.5	AGCT5678
26	Push to Column	43		
27	Column 2 Off	143		
28	Column 3 On	144		
29	18 to Waste	64	4	
30	Block Flush	1	3	AGCT5678
31	Block Vent	111	2	AGCT5678
32	Tet to Waste	58	1.7	
33	B+Tet to Column	33	3.5	AGCT5678
34	Wait	103	15	AGCT5678
35	Tet to Column	34	1	AGCT5678
36	B+Tet to Column	33	3.5	AGCT5678
37	Push to Column	43		
38	Column 3 Off	145		
39	Column 4 On	146		
40	18 to Waste	64	4	
41	Block Flush	1	3	AGCT5678
42	Block Vent	111	2	AGCT5678
43	Tet to Waste	58	1.7	
44	B+Tet to Column	33	3.5	AGCT5678
45	Wait	103	15	AGCT5678
46	Tet to Column	34	1	AGCT5678
47	B+Tet to Column	33	3.5	AGCT5678
48	Push to Column	43		
49	Column 4 off	147		
50	Wait	103	25	AGCT
51	Wait	103	15	5 8
52	Wait	103	360	7

	function	number	time	active
53	18 to Waste	64	4	AGCT
54	18 to Column	42	15	AGCT5 78
55	Cap prep	102	3	
56	18 to Waste	64	4	
57	Reverse Flush	2	8	AGCT5678
58	Block Flush	1	3	AGCT5678
59	Cap to Column	39	15	AGCT5678
60	Wait	103	5	AGCT5678
61	18 to Waste	64	4	
62	18 to Column	42	10	AGCT5678
63	Reverse Flush	2	8	AGCT5678
64	Block Flush	1	3	AGCT5678
65	15 to column	41	10	AGCT5678
66	18 to Waste	64	4	
67	Block Flush	1	3	AGCT5678
68	Wait	103	15	AGCT5678
69	18 to Column	42	2	AGCT5678
70	Block Flush	1	2	AGCT5678
71	Wait	103	10	AGCT5678
72	18 to Column	42	15	AGCT5 78
73	Flush to Wast	4	6	AGCT5678
74	18 to Column	42	15	AGCT5678
75	Reverse Flush	2	8	AGCT5678
76	Block Flush	1	3	AGCT5678
77	Start Detrityl	105		
78	18 to Waste	64	4	
79	18 to Column	42	10	AGCT5678
80	Reverse Flush	2	8	AGCT5678
81	Block Flush	1	3	AGCT5678
82	If Monitoring	167		
83	19 to column	44	35	AGCT5678
84	14 to column	40	5	AGCT5678
85	Monitor Trityl	135		
86	14 to column	40	65	AGCT5678
87	Monitor noise	136		
88	14 to column	40	10	AGCT5678
89	Stop Monitor	137		
90	Tritvl Flush	3	8	AGCT5678
91	18 to Column	42	10	AGCT5678
92	Reverse Flush	2	8	AGCT5678
93	if not Monitor	168		
94	14 to column	40	6	AGCT5678
95	Tritvl Flush	3	5	AGCT5678
96	14 to column	40	6	AGCT5678
97	Wait	103	5	AGCT5678
98	Tritvl Flush	3	5	AGCT5678
99	14 to column	40	6	AGCT5678
100	Wait	103	5	AGCT5678
101	Tritvl Flush	3	5	AGCT5678
102	14 to column	40	6	AGCT5678
103	Wait	103	5	AGCT5678
104	Tritvl Flush	3	5	AGCT5678
105	18 to Column	42	10	AGCT5678
106	Tritvl Flush	3	8	AGCT5678
107	End Monitorin	169		
108	18 to Column	42	8	AGCT5678
109	Reverse Flush	2	8	AGCT5678
110	Block Flush	1	4	AGCT5678
111	End	107		

Annexe D. Communication Poster International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 2010



Multi-ferrocene modified stem-loop structure as a probe for sensitive detection and single-mismatch discrimination of DNA

Carole Chaix,[1]* Grégory Chatelain,[1] Salomé Ansanay-Alex,[1] Micaël Ripert,[1] Carole Farre[1]

1Université de Lyon, Université Lyon 1, UMR 5180, Laboratoire des Sciences Analytiques, Bât. CPE – 43, Bd du 11 Nov. 1918, Villeurbanne, 69622 Cedex, France.

** Correspondence to: carole.chaix-bauvais@univ-lyon1.fr*

Introduction

One strategy to develop an electrochemical device for DNA detection is to label the probe which hybridizes the target with a redox compound like ferrocene (Fc). This molecule acts as an electrochemical marker, affording a sharp redox response which is highly sensitive to the ionic and steric environment. A few years ago, we focused on developing multi-ferrocenyl hairpin probes which, after grafting on a gold electrode microsystem, would be expected to offer significant improvement of both detection limit and sensitivity for mismatch discrimination.

Synthesis

A ferrocene bispropanol phosphoramidite synthon has been synthesized (Fig. 1). This compound allows incorporation of ferrocene moieties at any position of an oligonucleotide sequence, directly during DNA solid-phase synthesis. The modification of hairpin oligonucleotides by ferrocenes during automated DNA solid-phase synthesis has proved to be a good method for the easy incorporation of numerous electrochemical markers in the sequence.

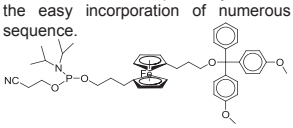


Fig. 1. The ferrocene bispropanol phosphoramidite synthon

- A. E. Navarro, N. Spinelli, C. Moustrou, C. Chaix, B. Mandrand, H.Brisset, Nucleic Acids Res. 2004, 32, (17), 5310-5319
- G. Chatelain, C. Chaix, H. Brisset, C. Moustrou, F. Fages, B. Mandrand, Sensors & Actuators, 2008, B 132, 439-442

DNA detection biodevice

A 4-ferrocenyl hairpin has been synthesized probe modified with a C6-thiol arm at the 3'-end for grafting on a gold electrode microsystem.

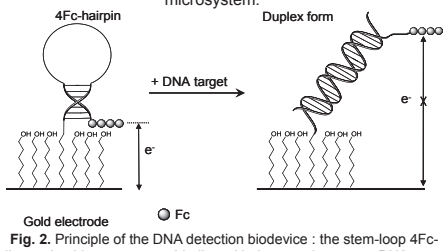


Fig. 2. Principle of the DNA detection biodevice : the stem-loop 4Fc-oligonucleotide opens upon binding with the complementary DNA strand

G. Chatelain, H. Brisset, C. Chaix, New J. Chemistry, 2009, 33, 1139-1147

Differential Pulse Voltammetry (DPV)

The hybridization kinetics have been monitored by DPV after the addition of the target DNA.

The current (I) variation of the DPV signal was measured. The signal was normalized with the following equation :

$NI_{DPV} = (I-I_0) / I_0$

Where I_0 is the current at t_0, just before target addition

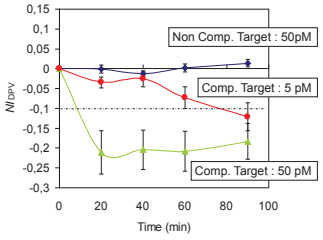


Fig. 3. Differential pulse voltammograms of one working electrode of the biochip at different concentrations of non complementary and complementary targets

Detection limit

The system's detection limit was estimated at **3.5 pM** (0.07 fmol in 20 µL). Furthermore, the dynamic range of detection revealed to be significant. We observed that the current variation by DPV was logarithmically related to the target concentration within the **3.5 pM to 5 nM range,** spanning a response region of at least 3 orders of magnitude.

Single-mismatch discrimination

LCT : 5'-TTTTTTTTTTTTTTTAGTTTTTGGACGTCTTCTCCTTTTTTTTTTTTTT-3'
LMT : 5'-TTTTTTTTTTTTTTTAGTTTTTGGTCGTCTTCTCCTTTTTTTTTTTTTT-3'

A single mismatch was also clearly discriminated at 500 pM target DNA. A significant difference in signal variation was observed at 90 min between the fully complementary target DNA and the single-mismatched DNA. Signal decreases of 28% and 7% (below the detection threshold) respectively were observed.

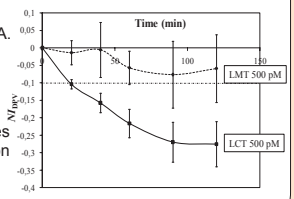
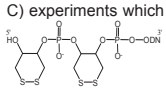


Fig. 4. Electrochemical response of the biochip upon hybridization with a single-mismatch target DNA

Time of life

Lastly, the robustness of the microsystem has been improved by grafting on the gold electrodes a multi-Fc stem-loop probe modified at the 5' end by two DTPA (dithiol phosphoramidite commercialized by GlenResearch). We confirmed an increase of stabilization of the system, in regard to the simple sulphur bonds used on standard grafting procedures. The same current intensity was recorded by DPV after the successive hybridization/annealing (in water at 60° C) experiments which were achieved over a period of 24 day.

DTPA-ODN



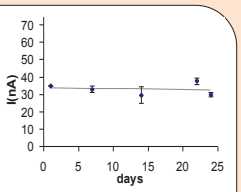


Fig. 5. maximum intensity after biochip regeneration

Conclusion

In conclusion, our systems are dedicated to the real-time and reagentless detection of DNA. It can reach pico-molar sensitivity while discriminating single-mismatch with good efficiency. Moreover, it can also be regenerated with a significant recovery of the electrochemical response over a 24 days period.

We are grateful for support from bioMerieux.

Etude d'une stratégie d'électroadressage par chimie "Click" sur électrode d'or

Micaël Ripert[1], Carole Farre[1], Grégory Chatelain[1,2], Carole Chaix[1]

[1]Université Lyon 1, UMR 5280, Laboratoire des Sciences Analytiques, Bât. CPE – 43, Bd du 11 Nov. 1918, Villeurbanne, 69622 Cedex, France

[2]Laboratoire de Chimie et Physicochimie des Actinides, Institut de Chimie Séparative de Marcoule (UMR 5257 ICSM) , Bagnols Sur Ceze, 17171 - 30207 Cedex, France

e-mail : Micael.ripert@etu.univ-lyon1.fr

Introduction

La détection de biomolécules, multiplexée et sans marquage, est un défi qui réside dans le choix d'une méthode d'adressage compatible avec la stabilité des biosondes. En outre, les techniques d'analyse des biomolécules doivent se démontrer à la fois sensibles et peu onéreuses. Si l'électrochimie est une technique d'analyse reconnue pour ces deux qualités en milieu biologique, notamment dans le cas des puces à ADN, elle se révèle aussi être une stratégie viable pour la conception des biocapteurs, dans le cas d'un électroadressage.

La chimie « click » de type Huisgen est une cycloaddition dipolaire de type [1+3] catalysée par le Cuivre (I). Cette Chimie possède l'avantage de fonctionner en milieu aqueux, dans des conditions douces, compatibles avec les milieux biologiques. Cette réaction peut être également contrôlée par l'application d'un potentiel, en présence du catalyseur adéquat. Au cours de notre étude nous avons utilisé cette technique pour coupler un marqueur redox de type ferrocène à une entité chimique de petite taille greffée sur électrode d'or par électroactivation. Cette approche nous servira de modèle pour l'étude de l'adressage de biosondes sur un capteur de multidétection.

Synthon Bis DTPA Hexynyle

Une entité constituée de deux groupements dithiol phosphate et d'un groupement hexynyle a été synthétisée en phase solide, à partir d'un réactif dithiol phosphoramidite (DTPA). Ce synthon, après réduction du pont disulfure par la tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), est capable de se greffer de façon stable sur une électrode d'or.

G. Chatelain, H. Brisset, C. Chaix, New Journal of Chemistry, 33, 2009, 1139-1147.
G. Chatelain, C. Chaix, H. Brisset, et al., Sensors and Actuators B: Chemical, 132, 2008, 439-442.
P. Liepold, T. Kratzmüller, N. Persike, et al., Anal Bioanal Chem, 391, 2008,1759-1772

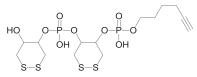


Fig. 1 Structure du Synthon Bis DTPA Hexynyle

Synthèse du marqueur Rédox à clicker

Dans l'optique de notre étude, nous avons synthétisé un ferrocène modifié par un groupement azoture, selon la voie de synthèse représentée ci-contre. Ce dernier est un marqueur redox de choix, dont la signature en voltamétrie cyclique est caractéristique, avec une vague d'oxydo-réduction centrée à 0,5 V / ECS.

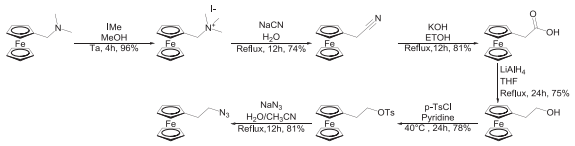


Fig. 2 Voie de synthèse du Ferrocène modifié par l'azoture

Réaction de « Click »

La réaction de « click » est conduite dans une solution 50:50 eau/DMSO, 10 µM en sulfate de Cuivre et 10 µM en Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (TBTA). Après ajout du ferrocène modifié, un potentiel de -300 mV est appliqué à l'électrode d'or fonctionnalisée par le synthon d'accroche Bis DTPA Hexynyle durant 2 heures. La réaction de « click » est suivie par voltamétrie cyclique toutes les 20 minutes.

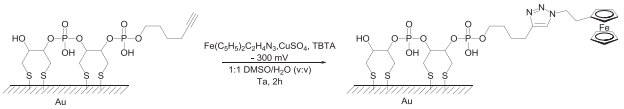


Fig. 3 Réaction de « click » du ferrocène modifié par l'azoture sur le bras hexynyle

N. K. Devaraj, C. E. D. Chidsey, J. P. Collman, et al., J. Am. Chem. Soc., 128, 2006, 1794-1795
S. J. P. Canête, Lai R. Y. et al., Chem. Commun., 46, 2010, 3941–3943

Après réaction, l'électrode est rincée et replacée en tampon d'analyse. Nous avons pu observer la signature du groupement Rédox. Lorsque l'expérience est renouvelée avec l'application d'un potentiel positif, les conditions ne permettent pas de réaliser la cycloaddition sur l'électrode d'or.

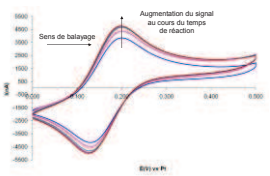


Fig. 4 Evolution du signal au cours de la réaction de « click »

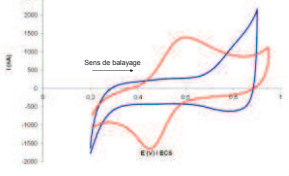


Fig. 5 en rouge : voltamogramme après 2h à -300 mV
en bleu : voltamogramme après 2h à 250 mV

Caractérisation Electrochimique

Les systèmes obtenus sont caractérisés par analyse électrochimique, nous avons vérifié que le dérivé ferrocène est bien greffé sur l'électrode d'or, et non pas adsorbé. Une fois la « click » réalisée, une loi linéaire caractéristique de notre greffage est observée en fonction des différentes vitesses de balayage. Par ailleurs, nous avons déterminé un recouvrement de surface moyen de $1{,}40.10^{13}$ molécules par cm^2, ainsi qu'un coefficient de transfert de charge moyen de $2{,}1\ s^{-1}$ suivant la méthode décrite par Yu. Les valeurs calculées sont comparables aux valeurs décrites dans la littérature, pour une longueur de la chaîne alkyle équivalente.

H.Z. Yu, C.Y. Luo, C.G. Sankar, Anal. Chem. 2003, 75, 3902-3907
E.LAVIRON, J. Electroanal. Chem.1979 , 101,19-28
Eckermann, D.J. Feld, J.A. Shaw, T.J. Meade, Coordination Chemistry Reviews 2008, doi:10.1016/j.ccr.2009.12.023

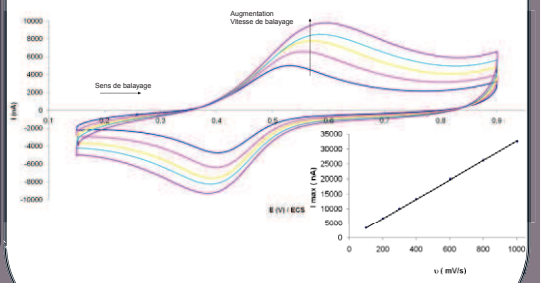


Fig. 6 Evolution du signal en fonction de la vitesse de balayage υ et sa représentation linéaire

Conclusion

Le travail effectué nous a permis de dresser les conditions optimales pour un électroadressage sur une surface d'or. Le modèle mis au point dans cette étude nous permettra d'électroadresser des biosondes modifiées par un groupement azoture et un marqueur rédox ferrocène.

Néanmoins, pour des raisons d'optimisation de solubilisation des espèces en tampon aqueux, et en vue d'optimiser la réaction de « click », il sera nécessaire d'étudier d'autres catalyseurs de la réaction, ainsi que d'autres entités ferrocène / azoture afin de vérifier l'impact de la longueur de la chaine alkyle.

Application de la chimie « Click » pour l'électroadressage sur électrode d'or pour une détection sans marquage et multiplexée de biomolécules

Micaël Ripert1, Carole Farre1, Nadir Meini1, Nicole Jaffrezic-Renault1, Carole Chaix1
1Université Lyon 1, UMR 5280, Institut des Sciences Analytiques, Bât. CPE – 43, Bd du 11 Nov. 1918, Villeurbanne, 69622 Cedex, France
E-mail : Micael.ripert@etu.univ-lyon1.fr

Introduction

La détection de biomolécules, multiplexée et sans marquage, est un défi qui réside dans le choix d'une méthode d'adressage compatible avec la stabilité des biosondes. En outre, les techniques d'analyse des biomolécules doivent se démontrer à la fois sensibles et peu onéreuses. Si l'électrochimie est une technique d'analyse reconnue pour ces deux qualités en milieu biologique, notamment dans le cas des puces à ADN, elle se révèle aussi être une stratégie viable pour la conception des biocapteurs, dans le cas d'un électroadressage. La chimie « click » de type Huisgen est une cycloaddition dipolaire de type [1+3] catalysée par le Cuivre (I) [1, 2]. Cette Chimie possède l'avantage de fonctionner en milieu aqueux, dans des conditions douces, compatibles avec les milieux biologiques. Cette réaction peut être également contrôlée par l'application d'un potentiel, en présence du catalyseur adéquat. Au cours de notre étude nous avons utilisé cette technique pour coupler un marqueur redox de type ferrocène sur électrode d'or par activation électrochimique.

1.Devaraj, N. K.; Dinolfo, P. H.; Chidsey, C. E. D.; Collman, J. P., Journal of the American Chemical Society 2006, 128, (6), 1794-1795.
2.Canete, S. J. P.; Lai, R. Y., Chemical Communications 2010, 46, (22), 3941-3943.

Bis(DTPA)hexynyle

Une entité constituée de deux groupements dithiol phosphate et d'un groupement hexynyle a été synthétisée en phase solide, à partir d'un réactif dithiol phosphoramidite (DTPA). Ce synthon, après réduction du pont disulfure par la tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), est capable de se greffer de façon stable sur une électrode d'or [3].

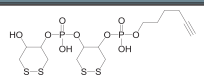


Fig. 1 Structure du Synthon Bis(DTPA)hexynyle

Synthèse du marqueur Rédox à « clicker »

Dans l'optique de notre étude, nous avons synthétisé un ferrocène modifié par un groupement azoture, selon la voie de synthèse représentée ci-contre [4]. Ce dernier est un marqueur redox de choix, dont la signature en voltamétrie cyclique est caractéristique, avec une vague d'oxydo-réduction centrée à 0,5 V / ECS.

3.Liepold, P.; Kratzmüller, et al., Analytical and Bioanalytical Chemistry 2008, 391, (5), 1759-1772.
4.Chatelain, G.; Meyer, A.; Morvan, F.; Vasseur, J.-J.; Chaix, C., New Journal of Chemistry 2011, 35, (4), 893-901.

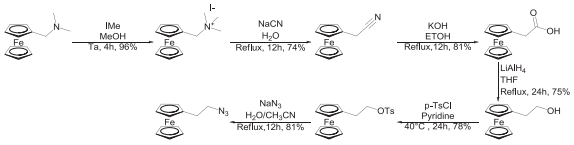


Fig. 2 Voie de synthèse du Ferrocène modifié par l'azoture

Réaction de « Click »

La réaction de « click » est conduite dans une solution 50:50 eau/DMSO, 10 µM en sulfate de Cuivre et 10 µM en Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (TBTA). Après ajout du ferrocène modifié, un potentiel de -300 mV est appliqué à l'électrode d'or fonctionnalisée par le synthon d'accroche Bis(DTPA)hexynyle durant 2 heures. La réaction de « click » est suivie par voltamétrie cyclique toutes les 15 minutes.

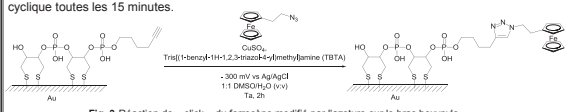


Fig. 3 Réaction de « click » du ferrocène modifié par l'azoture sur le bras hexynyle

Après réaction, l'électrode est rincée et replacée en tampon d'analyse. Nous avons pu observer la signature du groupement Rédox. Lorsque l'expérience est renouvelée avec l'application d'un potentiel positif, les conditions ne permettent pas de réaliser la cycloaddition sur l'électrode d'or.

5.Yu, H.-Z.; Luo, C.-Y.; Sankar, C. G.; Sen, D.,Analytical Chemistry 2003, 75, (15), 3902-3907.
6. Laviron, E., Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry 1979, 101, (1), 19-28.
7. Smalley, J. F.; Finklea, H. O.; Chidsey, C. et al., Journal of the American Chemical Society 2003, 125, (7), 2004-2013.

Caractérisation Electrochimique

Les systèmes obtenus sont caractérisés par analyse électrochimique, nous avons vérifié que le dérivé ferrocène est bien greffé sur l'électrode d'or, et non pas adsorbé. Une fois la « click » réalisée, une variation linéaire de l'intensité maximale enregistrée en fonction de la vitesse de balayage est observée. Par ailleurs, nous avons déterminé un recouvrement de surface moyen de $1{,}40.10^{13}$ molécules par cm^2, ainsi qu'un coefficient de transfert de charge moyen de $20\ s^{-1}$ suivant la méthode décrite par Yu et al [5, 6]. Les valeurs calculées sont comparables aux valeurs décrites dans la littérature, pour une longueur de la chaîne alkyle équivalente [7].

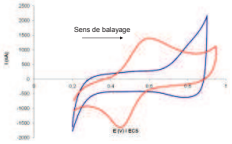


Fig. 4 en rouge : voltamogramme après 2h à -300 mV
en bleu : voltamogramme après 2h à 250 mV

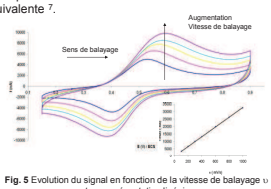


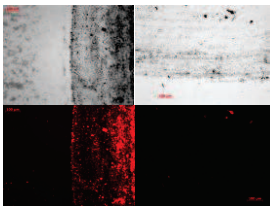
Fig. 5 Evolution du signal en fonction de la vitesse de balayage υ et sa représentation linéaire

Greffage d'un oligonucléotide fluorescent par activation électrochimique

Nous avons synthétisé l'oligonucléotide (ODN) dG-Cy5-dT10-N_3 en utilisant un protocole similaire au Bis(DTPA)hexynyle, à partir d'une dG-CPG. La Cy5 phosphoramidite est incorporée au premier cycle de synthèse, suivie par 10 cycles de thymine phosphoramidite, et un dernier cycle avec le bromo-hexyl phosphoramidite. Cet ODN-bromohexyl est alors converti en un ODN-hexylazoture en étant traité par une solution d'azoture de sodium (100 mM) et d'iodure de sodium (100 mM) dans le DMF. La CPG-oligonucleotide est alors traitée par une solution d'ammoniaque aqueuse à a 0,1 % massique durant 6h, donnant l'oligonucléotide déprotégé. La G-Cy5-TTT TTT TTT T-N_3 est alors purifiée par HPLC et caractérisée par MALDI-ToF. La réaction de click précédemment décrite est alors conduite sur surface d'or fonctionnalisée par le Bis(DTPA)hexynyle et observée par microscopie optique de fluorescence (figure 6).

Microscopie optique par réflexion en lumière blanche de l'or fonctionnalisé par l'ODN fluorescent.

Microscopie optique par réflexion en lumière blanche de l'or fonctionnalisé par le Bis(DTPA)hexynyle.



Microscopie optique de réflexion en fluorescence de la surface fonctionnalisée par l'ODN fluorescent .

Microscopie optique de réflexion en fluorescence de la surface fonctionnalisée par le Bis(DTPA)hexynyle

Fig. 6 Photographies prises à la bordure du plot fonctionalisé, par microscopie optique en lumière blanche et en fluorescence d'une surface d'or fonctionnalisée par l'ODN fluorescent (à gauche) et de son contrôle (à droite).

Greffage d'un dérivé Biotinylé par activation électrochimique

Avec la collaboration de Nicole Jaffrezic-Renault et de Nadir Meini, nous avons pu greffer un dérivé biotinylé, l'azoture-Tris(PEG) biotine, sur une surface d'or fonctionnalisée par le Bis(DTPA)hexynyle. La réaction de reconnaissance avec la streptavidine a été étudiée, après une période d'incubation de 30 min . Nous avons pu suivre par spectroscopie d'impédance l'évolution de la chimie click en surface et la formation du complexe biotine-streptavidine. L'augmentation du signal enregistré montre que l'on a bien une modification de l'état de surface. Sans l'application du potentiel adéquat pour la réaction de click, aucune modification du signal n'est observé.

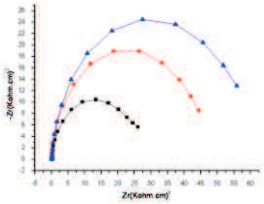


Fig.7 Diagrammes de Nyquyst de la surface d'or au cours de la réaction de click à -300 mV
•En noir : fonctionnalisée par le Bis(DTPA)hexynyle
•En rouge : Après 3 h de réaction
•En Bleu : Après ajout de la streptavidine

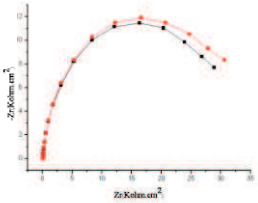


Fig.8 Diagrammes de Nyquyst de la surface d'or au cours de la réaction de click à +250 mV
•En noir : fonctionnalisée par le Bis(DTPA)hexynyle
•En rouge : Après 3 h de réaction

Le travail effectué nous a permis de dresser les conditions optimales pour un électroadressage sur une surface d'or. Nous avons pu mettre au point un système efficace permettant le greffage par activation électrochimique de groupements Rédox, de composés fluorescents et de dérivés Biotinylés.
Ce travail nous permettra le développement de l'électroadressage de sondes pour la conception de systèmes multiplexés, dédiés à la détection de molécules biologiques.

Electrochimica Acta 59 (2012) 57–63

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Electrochimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/electacta

A "four-ferrocene" modified stem-loop structure as a probe for sensitive detection and single-base mismatch discrimination of DNA

Grégory Chatelain, Micaël Ripert, Carole Farre, Salomé Ansanay-Alex, Carole Chaix*

Université de Lyon, Université Lyon 1, UMR 5280, Institut des Sciences Analytiques, Bât. CPE 43, Bd du 11 Novembre 1918, Villeurbanne, 69622 Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 July 2011
Received in revised form
26 September 2011
Accepted 10 October 2011
Available online 18 October 2011

Keywords:
Genosensor
DNA
Stem-loop structure
Ferrocene
Electrochemical transduction

ABSTRACT

We report the use of a four-ferrocene modified oligonucleotide as a probe for DNA detection with a gold electrode microsystem. This oligonucleotide is synthesized by automated solid-phase synthesis with four successive ferrocene moieties at the 5′-end and a C6-thiol modifier group at the 3′-end. The grafting of this 4Fc-DNA probe on a gold electrode microsystem results in the appearance of the ferrocene redox couple in cyclic voltammetry. The probe sequence is a stem-loop structure that folds efficiently on the electrode, thus optimizing electron transfer. Such architecture serves as sensor for DNA detection which is based on hybridization. The resulting disposable voltammetric sensor allowed direct, reagentless DNA detection in a small volume (20 μL). Electrochemical response upon hybridization with complementary short sequence (30-base length) and long sequence (50-base length) strands was observed by differential pulse voltammetry. Current variations were compared. The longer the sequence, the greater the decrease in current. The system's detection limit was estimated at 3.5 pM (0.07 fmol in 20 μL) with the 50-base length target and provided a dynamic detection range between 3.5 pM and 5 nM. Single mismatch detection showed a good level of sensitivity. The system was regenerated twice with no significant loss of Fc signal. Finally, 1 pM sensitivity was reached with a long chain analog of DNA PCR products of Influenza virus.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The detection of nucleic acid sequences at the point-of-care is useful for a wide range of applications including clinical and research diagnostics [1], food safety control [2], forensics [3] and environmental monitoring [4]. In these fields, many research projects are currently devoted to the elaboration of miniaturized, integrated systems allowing efficient detection of biomolecules in very low volumes of biological fluids [5]. For this purpose, various optical, piezoelectric and electronic transduction techniques are employed [6]. Among them, electrochemical DNA sensors are widely recognized as being a promising solution for point-of-care diagnostics because electrochemical detectors are simple, portable and inexpensive [7,8]. Furthermore, this detection method can be easily adapted to a multiplexed array format.

The direct detection of nucleic acid sequences without enzymatic amplification is difficult, because the amount of nucleic acid available from samples is typically below 20 fM [9,10]. The standard sandwich-type strategy commonly employed for *in vitro* assays is far from achieving such levels of sensitivity. It is important to investigate systems able to detect very low concentrations of DNA (close to or below 1 pM), with efficient discrimination of single mismatches in DNA transcript sequences. Systems achieving such sensitivity should enable the reduction of the number of enzymatic amplification cycles before detection. Indeed, a more sensitive detection system means that the enzymatic amplification step required prior to detection is more cost-effective and less time-consuming [1]. This reduction of enzymatic amplification cycles is also a parameter required by the lab-on-chip technology aimed at integrating both amplification and DNA detection in a common microfluidic device [11].

Some groups working on high performance electrochemical sensors have described a very high level of sensitivity using enzymes for signal amplification. Liu et al. reported fM sensitivity by using an enzyme-based signal-ON E-DNA sensor that employed stem-loop structured probes which could be specifically conjugated with HRP enzymes upon DNA target hybridization [12]. Zhang et al. amplified the positive response resulting from the DNA target hybridization by using bilirubin oxidase (BOD) for the electrocatalytic reduction of ambient oxygen to water. They claimed the detection of 3000 copies of *Shigella* DNA (fM sensitivity) without enzymatic amplification [13]. Another work also achieved good sensitivity (1 pM) with a ligase-mediated electrochemical DNA sensor, particularly suitable for mismatch detection [14]. Nevertheless, the use of enzymes is expensive and systems require a rather complex architecture involving cumbersome steps, often resulting in

* Corresponding author. Tel.: +33 04 72 44 83 06; fax: +33 04 72 44 84 79.
E-mail address: carole.chaix-bauvais@univ-lyon1.fr (C. Chaix).

0013-4686/$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.electacta.2011.10.030

Annexe H. Seconde publication

Electrochimica Acta 91 (2013) 82–89

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Electrochimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/electacta

Selective functionalization of Au electrodes by electrochemical activation of the "click" reaction catalyst

Micaël Ripert, Carole Farre, Carole Chaix*

Université de Lyon, Université Lyon 1, UMR 5280, Institut des Sciences Analytiques, 5 rue de la Doua, Villeurbanne 69100, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 2 October 2012
Received in revised form
19 December 2012
Accepted 25 December 2012
Available online 2 January 2013

Keywords:
Click reaction
Addressing
Gold electrode
Ferrocene
Electrochemical catalysis
Electrochemical sensor
Bioconjugation

ABSTRACT

The potential-assisted copper-catalyzed alkyne–azide cycloaddition was investigated to modify a gold electrode surface. Firstly, a tetrathiol-hexynyl derivative was used to introduce alkyne functions on the surface. This anchor proved its robustness in conditions used for the "click" reaction and in wet storage. Then, the potential-assisted "click" reaction was studied with an azido ferrocene derivative. The experimental conditions were optimized according to the electrochemical response of the sensor by cyclic voltammetry and the "click" reaction yield was established. After functionalization, the presence of the 1,2,3-triazole group was confirmed by XPS. A fluorescent azido oligonucleotide was grafted onto the gold surface allowing visualization of the reaction by fluorescence microscopy.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

With the aim of developing rapid and selective analytical systems, much research is currently devoted to the elaboration of microarrays which allow real-time, label-free and multiplexed detection [1]. In the context of manufacturing a portable device, electrochemical sensors are considered the cutting edge of this domain [2]. The literature describes many of these systems [3] which are based either on electrochemical impedance spectroscopy measurement [4–7] or on voltammetry measurement thanks to the presence of a redox molecule in the sensitive layer of the electrodes [8–12]. Ferrocene (Fc) is widely used as a redox label and has already proven its efficiency as such [13,14]. A wide variety of Fc-oligonucleotide conjugates have been described for the electrochemical detection of DNA [15–23]. Fan et al. [23] and Immoos et al. [15] pioneered the use of Fc modified stem-loop DNA as a capture probe for sensors. In our laboratory, we have developed a strategy for modifying oligonucleotide sequences, with many ferrocene derivatives, directly during automated DNA synthesis [18]. A stem-loop DNA labeled with four Fc molecules was synthesized and used as a probe in a gold electrode microsensor to accomplish DNA target detection [24–26]. 1 pM sensitivity was achieved for the detection of a long chain analog of DNA PCR products [26]. The system was also able to differentiate single-mismatches in the DNA target.

Electrochemistry is also a method that can be easily adapted to a multiplexed format. The addressing of probes on a multidetection system is a crucial step that directly impacts biochip performance. For this purpose, much research has been devoted over the past decades to the electro-addressing of probes on a multi-electrode array. Electropolymerization of pyrrole, for instance, has proved to be an efficient method for addressing DNA on miniaturized electrodes [27–29]. A Ppy film can be easily generated on electrodes by well-controlled polymerization. Other groups have focused on developing strategies that avoid the presence of a polymer film between the DNA probes and the support. Aryl diazonium salt chemistry appears promising for achieving covalent grafting on carbon and gold surfaces by electroactivation. Corgier et al. described the grafting of aryl diazonium modified biomolecules, such as DNA or proteins, onto both polarized carbon [30,31] and gold [32] electrodes. The reduction of the aryl diazonium moiety achieved under a negative potential formed a covalent C—C or C—Au bond between the aryl group and the electrode. More recently, Devaraj et al. described the addressing of independent gold microelectrodes by electrochemical activation of the alkyne/azide cycloaddition (sharpless "click" reaction) [33]. This group introduced a method by which the active copper(I) catalyzing the 1,2,3-triazole formation between a terminal alkyne and an organic azide was selectively and locally generated under a negative potential on the electrode. They demonstrated that this technique can provide a spatial resolution

* Corresponding author. Tel.: +33 4 37 42 35 57.
E-mail address: carole.chaix-bauvais@univ-lyon1.fr (C. Chaix).

0013-4686/$ – see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2012.12.108

Label-free electrochemical monitoring of protein addressing through electroactivated "click"chemistry on gold electrodes

Nadir MEINI[1,2], Micaël RIPERT[1], Carole CHAIX[1], Carole FARRE[1], Gabriel DE CROZALS[1], Rochdi KHERRAT[2], Nicole JAFFREZIC-RENAULT[1*]

[1] *University of Lyon, Institute of Analytical Sciences, UMR CNRS 5280, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France*

[2] *Badji Mokhtar University of Annaba, Laboratory of Environmental Engineering, BP 12, Annaba 23000, Algeria*

*Corresponding author: Phone: +33437423558; e-mail: nicole.jaffrezic@univ-lyon1.fr

Abstract

In this work, using electrochemical impedance spectroscopy (EIS), we have, for the first time, label-free monitored protein immobilization on a gold surface, through a strategy of electroaddressing, compatible with the production of microarrays for multi-detection. This functionalization is achieved via the alkyne/azide cycloaddition, better known as the "click" reaction. The electroaddressing was applied to a polythiol hexynyl derivative previously grafted onto the gold surface. This compound consists of two dithiol phosphate groups and a hexynyl function and was synthesized through a supported synthesis approach, from a dithiol reagent, phosphoramidite (DTPA), and a hexynyl phosphoramidite. Next, an azide-PEG3-biotin derivative was grafted onto the modified gold surface by electro-chronocoulometry. The "click" reaction was controlled by electrochemical impedance spectroscopy, showing the change in impedance only when the electroaddressing was performed at -300 mV. No effect on the EIS signal was observed when a positive potential was applied, confirming the specificity of the electroactivation. Biotine modified electrodes were used to fix streptavidin and the immobilization was monitored using EIS. Fluorescent streptavidin-functionalized silica nanoparticles were also specifically grafted onto the biotinylated gold surface in order to confirm the "click" reaction using fluorescence microscopy. The obtained streptavidin platform was used to detect the surface coverage by biotinylated Human Serum Albumin (HSA). The lowest detectable concentration is 10 pg/mL and surface saturation is obtained with concentrations higher than 100 ng/mL.

Keywords

"Click" reaction; Electroaddressing; Gold chip; Biotin; Streptavidin; Electrochemical Impedance Spectroscopy; Protein immobilization

Annexe J. Liste des communications et publications

1. Communication sous forme Poster

- IRT 2010 : oster International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Lyon

« Multi-ferrocene modified stem-loop structure as a probe for sensitive detection and single-mismatch discrimination of DNA »

- JE 2011 : Journées d'électrochimie. Grenoble

« Etude d'une stratégie d'électroadressage par chimie " Click " sur électrode d'or »

- JRAB 2011 : Journée Rhône-Alpes des Biomolécules, Lyon

« Etude d'une stratégie d'électroadressage par chimie " Click " sur électrode d'or »

- SCF 2012 : Journée de printemps Société Chimique de France, Lyon

« Application de la chimie « Click » pour l'électroadressage sur électrode d'or pour une détection sans marquage et multiplexée de biomolécules »

2. Communication Orale

- JRAB 2012 : Journée Rhône-Alpes des Biomolécules, Grenoble

« Electroadressage par chimie "Click" sur électrode d'or pour une détection sans marquage et multiplexée de biomolécules »

3. Publications

- Chatelain, G.; Ripert, M.; Farre, C.; Ansanay-Alex, S.; Chaix, C., A "four-ferrocene" modified stem-loop structure as a probe for sensitive detection and singlebase mismatch discrimination of DNA. *Electrochim. Acta* **2012,** *59* (0), 57-63.

- Ripert, M.; Farre, C.; Chaix, C., Selective functionalization of Au electrodes by electrochemical activation of the “click” reaction catalyst. *Electrochim. Acta* **2013,** *91* (0), 82-89.

- Meini, N. ; Ripert, M. ; Farre, C. ; De Crozals, G. ; Chaix, C. ; Kherrat, R. ; Jaffrezic-Renault, N., Application of chemistry "click" for electro-adressing on a gold electrode and the detection of protein. Soumis à Materials Science and Engineering C

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Nagel, B.; Dellweg, H.; Gierasch, L., Glossary for chemists of terms used in biotechnology. *Pure Appl. Chem.* **1992,** *64*.

2. Dávila, D.; Esquivel, J. P.; Sabaté, N.; Mas, J., Silicon-based microfabricated microbial fuel cell toxicity sensor. *Biosens. Bioelectron.* **2011,** *26* (5), 2426-2430.

3. Woutersen, M.; Belkin, S.; Brouwer, B.; Wezel, A.; Heringa, M., Are luminescent bacteria suitable for online detection and monitoring of toxic compounds in drinking water and its sources? *Anal Bioanal Chem* **2011,** *400* (4), 915-929.

4. Wang, L.; Zhang, X.; Xiong, H.; Wang, S., A novel nitromethane biosensor based on biocompatible conductive redox graphene-chitosan/hemoglobin/graphene/room temperature ionic liquid matrix. *Biosens. Bioelectron.* **2010,** *26* (3), 991-995.

5. Liu, A.; Zhao, Q.; Guan, X., Stochastic nanopore sensors for the detection of terrorist agents: Current status and challenges. *Anal. Chim. Acta* **2010,** *675* (2), 106-115.

6. Tsanas, A.; Little, M. A.; McSharry, P. E.; Ramig, L. O. In *Enhanced classical dysphonia measures and sparse regression for telemonitoring of Parkinson's disease progression*, Acoustics Speech and Signal Processing (ICASSP), 2010 IEEE International Conference on, 14-19 March 2010; 2010; pp 594-597.

7. Rho, S.; Kim, S. J.; Lee, S. C.; Chang, J. H.; Kang, H.-G.; Choi, J., Colorimetric detection of ssDNA in a solution. *Current Applied Physics* **2009,** *9* (2), 534-537.

8. Epstein, J. R.; Biran, I.; Walt, D. R., Fluorescence-based nucleic acid detection and microarrays. *Anal. Chim. Acta* **2002,** *469* (1), 3-36.

9. Wilson, R.; Katherine Johansson, M., Photoluminescence and electrochemiluminescence of a Ru(ii)(bpy)3-quencher dual-labeled oligonucleotide probe. *Chem. Commun.* **2003,** (21), 2710-2711.

10. Allain, L. R.; Vo-Dinh, T., Surface-enhanced Raman scattering detection of the breast cancer susceptibility gene BRCA1 using a silver-coated microarray platform. *Anal. Chim. Acta* **2002,** *469* (1), 149-154.

11. Tyagi, S.; Kramer, F. R., Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. *Nat. Biotechnol.* **1996,** *14* (3), 303-308.

12. Li, J.; Tan, W.; Wang, K.; Xiao, D.; Yang, X.; He, X.; Tang, Z., Ultrasensitive Optical DNA Biosensor Based on Surface Immobilization of Molecular Beacon by a Bridge Structure. *Anal. Sci.* **2001,** *17* (10), 1149-1153.

13. Thiel, A. J.; Frutos, A. G.; Jordan, C. E.; Corn, R. M.; Smith, L. M., In Situ Surface Plasmon Resonance Imaging Detection of DNA Hybridization to Oligonucleotide Arrays on Gold Surfaces. *Anal. Chem.* **1997,** *69* (24), 4948-4956.

14. Sassolas, A.; Leca-Bouvier, B. D.; Blum, L. J., DNA biosensors and microarrays. *Chem. Rev.* **2008,** *108* (1), 109-139.

15. O'Sullivan, C. K.; Guilbault, G. G., Commercial quartz crystal microbalances – theory and applications. *Biosens. Bioelectron.* **1999,** *14* (8–9), 663-670.

16. Grate, J. W., Acoustic Wave Microsensor Arrays for Vapor Sensing. *Chem. Rev.* **2000,** *100* (7), 2627-2648.

17. Patolsky, F.; Lichtenstein, A.; Willner, I., Amplified microgravimetric quartz-crystal-microbalance assay of DNA using oligonucleotide-functionalized liposomes or biotinylated liposomes. *J. Am. Chem. Soc.* **2000,** *122* (2), 418-419.

18. Carrascosa, L. G.; Moreno, M.; Álvarez, M.; Lechuga, L. M., Nanomechanical biosensors: a new sensing tool. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2006,** *25* (3), 196-206.

19. Fritz, J.; Baller, M. K.; Lang, H. P.; Rothuizen, H.; Vettiger, P.; Meyer, E.; -J. Güntherodt, H.; Gerber, C.; Gimzewski, J. K., Translating Biomolecular Recognition into Nanomechanics. *Science* **2000,** *288* (5464), 316-318.

20. Umek, R. M.; Lin, S. W.; Vielmetter, J.; Terbrueggen, R. H.; Irvine, B.; Yu, C. J.; Kayyem, J. F.; Yowanto, H.; Blackburn, G. F.; Farkas, D. H.; Chen, Y.-P., Electronic Detection of Nucleic Acids: A Versatile Platform for Molecular Diagnostics. *The Journal of Molecular Diagnostics* **2001,** *3* (2), 74-84.

21. Drummond, T. G.; Hill, M. G.; Barton, J. K., Electrochemical DNA sensors. *Nat. Biotechnol.* **2003,** *21* (10), 1192-1199.

22. Ihara, T.; Maruo, Y.; Takenaka, S.; Takagi, M., Ferrocene-Oligonucleotide Conjugates for Electrochemical Probing of DNA. *Nucleic Acids Res.* **1996,** *24* (21), 4273-4280.

23. Ionescu, R. E.; Herrmann, S.; Cosnier, S.; Marks, R. S., A polypyrrole cDNA electrode for the amperometric detection of the West Nile Virus. *Electrochem. Commun.* **2006,** *8* (11), 1741-1748.

24. Miranda-Castro, R.; de-los-Santos-Álvarez, P.; Lobo-Castañón, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J., Hairpin-DNA Probe for Enzyme-Amplified Electrochemical Detection of Legionella pneumophila. *Anal. Chem.* **2007,** *79* (11), 4050-4055.

25. Steichen, M.; Buess-Herman, C., Electrochemical detection of the immobilization and hybridization of unlabeled linear and hairpin DNA on gold. *Electrochem. Commun.* **2005,** *7* (4), 416-420.

26. Kjällman, T. H. M.; Peng, H.; Soeller, C.; Travas-Sejdic, J., Effect of Probe Density and Hybridization Temperature on the Response of an Electrochemical Hairpin-DNA Sensor. *Anal. Chem.* **2008,** *80* (24), 9460-9466.

27. Fan, C.; Plaxco, K. W.; Heeger, A. J., Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA. *PNAS* **2003,** *100* (16), 9134-9137.

28. Bouchet, A.; Chaix, C.; Marquette, C. A.; Blum, L. J.; Mandrand, B., Cylinder-shaped conducting polypyrrole for labelless electrochemical multidetection of DNA. *Biosens. Bioelectron.* **2007,** *23* (5), 735-740.

29. Boon, E. M.; Livingston, A. L.; Chmiel, N. H.; David, S. S.; Barton, J. K., DNA-mediated charge transport for DNA repair. *PNAS* **2003,** *100* (22), 12543-12547.

30. Wang, K.; Goyer, C.; Anne, A.; Demaille, C., Exploring the Motional Dynamics of End-Grafted DNA Oligonucleotides by in Situ Electrochemical Atomic Force Microscopy. *J. Phys. Chem. B* **2007,** *111* (21), 6051-6058.

31. Anne, A.; Demaille, C., Dynamics of Electron Transport by Elastic Bending of Short DNA Duplexes. Experimental Study and Quantitative Modeling of the Cyclic Voltammetric Behavior of 3‘-Ferrocenyl DNA End-Grafted on Gold. *J. Am. Chem. Soc.* **2005,** *128* (2), 542-557.

32. Anne, A.; Bouchardon, A.; Moiroux, J., 3‘-Ferrocene-Labeled Oligonucleotide Chains End-Tethered to Gold Electrode Surfaces: Novel Model Systems for Exploring Flexibility of Short DNA Using Cyclic Voltammetry. *J. Am. Chem. Soc.* **2003,** *125* (5), 1112-1113.

33. Devaraj, N. K.; Dinolfo, P. H.; Chidsey, C. E. D.; Collman, J. P., Selective Functionalization of Independently Addressed Microelectrodes by Electrochemical Activation and Deactivation of a Coupling Catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* **2006,** *128* (6), 1794-1795.

34. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001,** *40* (11), 2004-2021.

35. Kolb, H. C.; Sharpless, K. B., The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today* **2003,** *8* (24), 1128-1137.

36. Rust, W. L.; Carper, S. W.; Plopper, G. E., The Promise of Integrins as Effective Targets for Anticancer Agents. *J. Biomed. Biotechnol.* **2002,** *2* (3), 124-130.

37. Jin, H.; Varner, J., Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br. J. Cancer* **2004,** *90* (3), 561-565.

38. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002,** *67* (9), 3057-3064.

39. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002,** *41* (14), 2596-2599.

40. Golas, P. L.; Tsarevsky, N. V.; Sumerlin, B. S.; Matyjaszewski, K., Catalyst Performance in "Click" Coupling Reactions of Polymers Prepared by ATRP: Ligand and Metal Effects. *Macromolecules* **2006,** *39* (19), 6451-6457.

41. Haubner, R., αvβ3-integrin imaging: a new approach to characterise angiogenesis? *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2006,** *33* (1), 54-63.

42. Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G., Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Alkynes and Organic Azides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005,** *127* (46), 15998-15999.

43. Matter, A., Tumor angiogenesis as a therapeutic target. *Drug Discovery Today* **2001,** *6* (19), 1005-1024.

44. Vonlaufen, A.; Wiedle, G.; Borisch, B.; Birrer, S.; Luder, P.; Imhof, B. A., Integrin αvβ3 Expression in Colon Carcinoma Correlates with Survival. *Mod Pathol* **2006,** *14* (11), 1126-1132.

45. Ruoslahti, E., The RGD story: a personal account. *Matrix Biol.* **2003,** *22* (6), 459-465.

46. Corti, A.; Curnis, F., Isoaspartate-dependent molecular switches for integrin-ligand recognition. *J. Cell Sci.* **2011,** *124* (4), 515-522.

47. Melissa Millard; Srinivas Odde; Neamati, N., Integrin targeted therapeutics. . *Theranostics* **2011,** (1), 154-188.

48. Burrows, C. J.; Muller, J. G., Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chem. Rev.* **1998,** *98* (3), 1109-1152.

49. Sigman, D. S.; Mazumder, A.; Perrin, D. M., Chemical nucleases. *Chem. Rev.* **1993,** *93* (6), 2295-2316.

50. Marks, I. S.; Kang, J. S.; Jones, B. T.; Landmark, K. J.; Cleland, A. J.; Taton, T. A., Strain-Promoted "Click" Chemistry for Terminal Labeling of DNA. *Bioconjugate Chem.* **2011,** *22* (7), 1259-1263.

51. Best, M. D., Click chemistry and bioorthogonal reactions: unprecedented selectivity in the labeling of biological molecules. *Biochemistry* **2009,** *48* (28), 6571-6584.

52. Ess, D. H.; Jones, G. O.; Houk, K. N., Transition States of Strain-Promoted Metal-Free Click Chemistry: 1,3-Dipolar Cycloadditions of Phenyl Azide and Cyclooctynes. *Org. Lett.* **2008,** *10* (8), 1633-1636.

53. Niu, G.; Chen, X., Why Integrin as a Primary Target for Imaging and Therapy. *Theranostics* **2011,** *1*, 30-47.

54. Heckmann, D.; Laufer, B.; Marinelli, L.; Limongelli, V.; Novellino, E.; Zahn, G.; Stragies, R.; Kessler, H., Breaking the Dogma of the Metal-Coordinating Carboxylate Group in Integrin Ligands: Introducing

Hydroxamic Acids to the MIDAS To Tune Potency and Selectivity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009,** *48* (24), 4436-4440.

55. Shiu, J.-H.; Chen, C.-Y.; Chang, L.-S.; Chen, Y.-C.; Chen, Y.-C.; Lo, Y.-H.; Liu, Y.-C.; Chuang, W.-J., Solution structure of γ-bungarotoxin: The functional significance of amino acid residues flanking the RGD motif in integrin binding. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2004,** *57* (4), 839-849.

56. Stupp, R.; Hegi, M. E.; Neyns, B.; Goldbrunner, R.; Schlegel, U.; Clement, P. M. J.; Grabenbauer, G. G.; Ochsenbein, A. F.; Simon, M.; Dietrich, P.-Y.; Pietsch, T.; Hicking, C.; Tonn, J.-C.; Diserens, A.-C.; Pica, A.; Hermisson, M.; Krueger, S.; Picard, M.; Weller, M., Phase I/IIa Study of Cilengitide and Temozolomide With Concomitant Radiotherapy Followed by Cilengitide and Temozolomide Maintenance Therapy in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology* **2010,** *28* (16), 2712-2718.

57. Vermorken, J. B.; Guigay, J.; Mesia, R.; Trigo, J. M.; Keilholz, U.; Kerber, A.; Bethe, U.; Picard, M.; Brummendorf, T. H., Phase I/II trial of cilengitide with cetuximab, cisplatin and 5-fluorouracil in recurrent and/or metastatic squamous cell cancer of the head and neck: findings of the phase I part. *Br. J. Cancer* **2011,** *104* (11), 1691-1696.

58. Chen, Y.; Lu, N.; Ling, Y.; Wang, L.; You, Q.; Li, Z.; Guo, Q., LYG-202, a Newly Synthesized Flavonoid, Exhibits Potent Anti-angiogenic Activity In Vitro and In Vivo. *J. Pharmacol. Sci.* **2010,** *112* (1), 37-45.

59. Tsai, M.-Y.; Yang, R.-C.; Wu, H.-T.; Pang, J.-H. S.; Huang, S.-T., Anti-angiogenic effect of Tanshinone IIA involves inhibition of matrix invasion and modification of MMP-2/TIMP-2 secretion in vascular endothelial cells. *Cancer Letters* **2011,** *310* (2), 198-206.

60. Meldal, M.; Tornøe, C. W., Cu-Catalyzed Azide−Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008,** *108* (8), 2952-3015.

61. Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V., Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis. *Org. Lett.* **2004,** *6* (17), 2853-2855.

62. Hong, V.; Presolski, S. I.; Ma, C.; Finn, M. G., Analysis and Optimization of Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition for Bioconjugation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009,** *48* (52), 9879-9883.

63. Rodionov, V. O.; Presolski, S. I.; Díaz Díaz, D.; Fokin, V. V.; Finn, M. G., Ligand-Accelerated Cu-Catalyzed Azide−Alkyne Cycloaddition: A Mechanistic Report. *J. Am. Chem. Soc.* **2007,** *129* (42), 12705-12712.

64. Gupta, S. S.; Kuzelka, J.; Singh, P.; Lewis, W. G.; Manchester, M.; Finn, M. G., Accelerated Bioorthogonal Conjugation: A Practical Method for the Ligation of Diverse Functional Molecules to a Polyvalent Virus Scaffold. *Bioconjugate Chem.* **2005,** *16* (6), 1572-1579.

65. Mantovani, G.; Ladmiral, V.; Tao, L.; Haddleton, D. M., One-pot tandem living radical polymerisation-Huisgens cycloaddition process ("click") catalysed by N-alkyl-2-pyridylmethanimine/Cu(i)Br complexes. *Chem. Commun.* **2005,** *0* (16), 2089-2091.

66. Li, F.; Hor, T. S. A., Facile Synthesis of Nitrogen Tetradentate Ligands and Their Applications in CuI-Catalyzed N-Arylation and Azide–Alkyne Cycloaddition. *Chem. Eur. J.* **2009,** *15* (40), 10585-10592.

67. Meng, J.-c.; Fokin, V. V.; Finn, M. G., Kinetic resolution by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Tetrahedron Lett.* **2005,** *46* (27), 4543-4546.

68. Campbell-Verduyn, L. S.; Mirfeizi, L.; Dierckx, R. A.; Elsinga, P. H.; Feringa, B. L., Phosphoramidite accelerated copper(i)-catalyzed [3 + 2] cycloadditions of azides and alkynes. *Chem. Commun.* **2009,** *0* (16), 2139-2141.

69. Bai, S.-Q.; Koh, L. L.; Hor, T. S. A., Structures of Copper Complexes of the Hybrid [SNS] Ligand of Bis(2-(benzylthio)ethyl)amine and Facile Catalytic Formation of 1-Benzyl-4-phenyl-1H-1,2,3-triazole through Click Reaction. *Inorg. Chem.* **2009,** *48* (3), 1207-1213.

70. Brotherton, W. S.; Michaels, H. A.; Simmons, J. T.; Clark, R. J.; Dalal, N. S.; Zhu, L., Apparent Copper(II)-Accelerated Azide-Alkyne Cycloaddition. *Org. Lett.* **2009,** *11* (21), 4954-4957.

71. Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H., CuI-Catalyzed Alkyne–Azide "Click" Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. *Eur. J. Org. Chem.* **2006,** *2006* (1), 51-68.

72. Tanaka, K.; Kageyama, C.; Fukase, K., Acceleration of Cu(I)-mediated Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition by histidine derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2007,** *48* (37), 6475-6479.

73. Candelon, N.; Lastecoueres, D.; Diallo, A. K.; Ruiz Aranzaes, J.; Astruc, D.; Vincent, J.-M., A highly active and reusable copper(i)-tren catalyst for the "click" 1,3-dipolar cycloaddition of azides and alkynes. *Chem. Commun.* **2008,** *0* (6), 741-743.

74. Özçubukçu, S.; Ozkal, E.; Jimeno, C.; Pericàs, M. A., A Highly Active Catalyst for Huisgen 1,3-Dipolar Cycloadditions Based on the Tris(triazolyl)methanol-Cu(I) Structure. *Org. Lett.* **2009,** *11* (20), 4680-4683.

75. Fabbrizzi, P.; Cicchi, S.; Brandi, A.; Sperotto, E.; van Koten, G., An Efficient (2-Aminoarenethiolato)copper(I) Complex for the Copper-Catalysed Huisgen Reaction (CuAAC). *Eur. J. Org. Chem.* **2009,** *2009* (31), 5423-5430.

76. Díez-González, S.; Correa, A.; Cavallo, L.; Nolan, S. P., (NHC)Copper(I)-Catalyzed [3+2] Cycloaddition of Azides and Mono- or Disubstituted Alkynes. *Chem. Eur. J.* **2006,** *12* (29), 7558-7564.

77. Díez-González, S.; Nolan, S. P., [(NHC)2Cu]X Complexes as Efficient Catalysts for Azide–Alkyne Click Chemistry at Low Catalyst Loadings. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008,** *47* (46), 8881-8884.

78. Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V., Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **2004,** *127* (1), 210-216.

79. Orgueira, H. n. A.; Fokas, D.; Isome, Y.; Chan, P. C. M.; Baldino, C. M., Regioselective synthesis of [1,2,3]-triazoles catalyzed by Cu(I) generated in situ from Cu(0) nanosize activated powder and amine hydrochloride salts. *Tetrahedron Lett.* **2005,** *46* (16), 2911-2914.

80. Lipshutz, B. H.; Taft, B. R., Heterogeneous Copper-in-Charcoal-Catalyzed Click Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006,** *45* (48), 8235-8238.

81. Chassaing, S.; Kumarraja, M.; Sani Souna Sido, A.; Pale, P.; Sommer, J., Click Chemistry in CuI-zeolites: The Huisgen [3 + 2]-Cycloaddition. *Org. Lett.* **2007,** *9* (5), 883-886.

82. Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A., Click chemistry reactions in medicinal chemistry: Applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes. *Med. Res. Rev.* **2008,** *28* (2), 278-308.

83. Angelo, N. G.; Arora, P. S., Nonpeptidic Foldamers from Amino Acids: Synthesis and Characterization of 1,3-Substituted Triazole Oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **2005,** *127* (49), 17134-17135.

84. Bock, V. D.; Speijer, D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H., 1,2,3-Triazoles as peptide bond isosteres: synthesis and biological evaluation of cyclotetrapeptide mimics. *Org. Biomol. Chem.* **2007,** *5* (6), 971-975.

85. Oh, K.; Guan, Z., A convergent synthesis of new [small beta]-turn mimics by click chemistry. *Chem. Commun.* **2006,** *0* (29), 3069-3071.

86. Roy, O.; Faure, S.; Thery, V.; Didierjean, C.; Taillefumier, C., Cyclic β-Peptoids. *Org. Lett.* **2008,** *10* (5), 921-924.

87. Spinelli, N.; Defrancq, E.; Morvan, F., Glycoclusters on oligonucleotide and PNA scaffolds: synthesis and applications. *Chem. Soc. Rev.* **2013,** *42* (11), 4557-4573.

88. Wu, P.; Feldman, A. K.; Nugent, A. K.; Hawker, C. J.; Scheel, A.; Voit, B.; Pyun, J.; Fréchet, J. M. J.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V., Efficiency and Fidelity in a Click-Chemistry Route to Triazole Dendrimers by the Copper(I)-Catalyzed Ligation of Azides and Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004,** *43* (30), 3928-3932.

89. Nuzzo, R. G.; Zegarski, B. R.; Dubois, L. H., Fundamental studies of the chemisorption of organosulfur compounds on gold (111). Implications for molecular self-assembly on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1987,** *109* (3), 733-740.

90. Bain, C. D.; Troughton, E. B.; Tao, Y. T.; Evall, J.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G., Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1989,** *111* (1), 321-335.

91. Bain, C. D.; Whitesides, G. M., Correlations between wettability and structure in monolayers of alkanethiols adsorbed on gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1988,** *110* (11), 3665-3666.

92. Bain, C. D.; Whitesides, G. M., Formation of two-component surfaces by the spontaneous assembly of monolayers on gold from solutions containing mixtures of organic thiols. *J. Am. Chem. Soc.* **1988,** *110* (19), 6560-6561.

93. Herne, T. M.; Tarlov, M. J., Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1997,** *119* (38), 8916-8920.

94. Dubois, L. H.; Zegarski, B. R.; Nuzzo, R. G., Fundamental studies of the interactions of adsorbates on organic surfaces. *PNAS* **1987,** *84* (14), 4739-4742.

95. Losic, D.; Gooding, J. J.; Shapter, J. G.; Hibbert, D. B.; Short, K., The Influence of the Underlying Gold Substrate on Glucose Oxidase Electrodes Fabricated Using Self-Assembled Monolayers. *Electroanalysis* **2001,** *13* (17), 1385-1393.

96. Everett, W. R.; Welch, T. L.; Reed, L.; Fritsch-Faules, I., Potential-Dependent Stability of Self-Assembled Organothiols on Gold Electrodes in Methylene Chloride. *Anal. Chem.* **1995,** *67* (2), 292-298.

97. Horn, A. B.; Russell, D. A.; Shorthouse, L. J.; Simpson, T. R. E., Ageing of alkanethiol self-assembled monolayers. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1996,** *92* (23), 4759-4762.

98. Cooper, E.; Leggett, G. J., Static Secondary Ion Mass Spectrometry Studies of Self-Assembled Monolayers: Influence of Adsorbate Chain Length and Terminal Functional Group on Rates of Photooxidation of Alkanethiols on Gold. *Langmuir* **1998,** *14* (17), 4795-4801.

99. English, R. D.; Van Stipdonk, M. J.; Sabapathy, R. C.; Crooks, R. M.; Schweikert, E. A., Characterization of Photooxidized Self-Assembled Monolayers and Bilayers by Spontaneous Desorption Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2000,** *72* (24), 5973-5980.

100. Liepold, P.; Kratzmüller, T.; Persike, N.; Bandilla, M.; Hinz, M.; Wieder, H.; Hillebrandt, H.; Ferrer, E.; Hartwich, G., Electrically detected displacement assay (EDDA): a practical approach to nucleic acid testing in clinical or medical diagnosis. *Anal Bioanal Chem* **2008,** *391* (5), 1759-1772.

101. Wegner, G. J.; Lee, H. J.; Corn, R. M., Characterization and Optimization of Peptide Arrays for the Study of Epitope−Antibody Interactions Using Surface Plasmon Resonance Imaging. *Anal. Chem.* **2002,** *74* (20), 5161-5168.

102. Kerman, K.; Mahmoud, K. A.; Kraatz, H.-B., An electrochemical approach for the detection of HIV-1 protease. *Chem. Commun.* **2007,** *0* (37), 3829-3831.

103. Aoki, H.; Tao, H., Label- and marker-free gene detection based on hybridization-induced conformational flexibility changes in a ferrocene-PNA conjugate probe. *Analyst* **2007,** *132* (8), 784-791.

104. Kaufmann, R.; Averbukh, I.; Naaman, R.; Daube, S. S., Controlling the Reactivity of Adsorbed DNA on Template Surfaces. *Langmuir* **2008,** *24* (3), 927-931.

105. Aqua, T.; Naaman, R.; Daube, S. S., Controlling the Adsorption and Reactivity of DNA on Gold. *Langmuir* **2003,** *19* (25), 10573-10580.

106. Kelley, S. O.; Barton, J. K.; Jackson, N. M.; McPherson, L. D.; Potter, A. B.; Spain, E. M.; Allen, M. J.; Hill, M. G., Orienting DNA Helices on Gold Using Applied Electric Fields. *Langmuir* **1998,** *14* (24), 6781-6784.

107. Levicky, R.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J.; Satija, S. K., Using Self-Assembly To Control the Structure of DNA Monolayers on Gold: A Neutron Reflectivity Study. *J. Am. Chem. Soc.* **1998,** *120* (38), 9787-9792.

108. Pavlovic, E.; Lai, R. Y.; Wu, T. T.; Ferguson, B. S.; Sun, R.; Plaxco, K. W.; Soh, H. T., Microfluidic Device Architecture for Electrochemical Patterning and Detection of Multiple DNA Sequences. *Langmuir* **2008,** *24* (3), 1102-1107.

109. Iyer, R. P.; Egan, W.; Regan, J. B.; Beaucage, S. L., 3H-1,2-Benzodithiole-3-one 1,1-dioxide as an improved sulfurizing reagent in the solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleoside phosphorothioates. *J. Am. Chem. Soc.* **1990,** *112* (3), 1253-1254.

110. Ihara, T.; Nakayama, M.; Murata, M.; Nakano, K.; Maeda, M., Gene sensor using ferrocenyl oligonucleotide. *Chem. Commun.* **1997,** *0* (17), 1609-1610.

111. Brisset, H.; Navarro, A.-E.; Spinelli, N.; Chaix, C.; Mandrand, B., The first automated synthesis of ferrocene-labelled phosphorothioate DNA probe: A new potential tool for the fabrication of DNA microarrays. *Biotechnol. J.* **2006,** *1* (1), 95-98.

112. Delamar, M.; Hitmi, R.; Pinson, J.; Saveant, J. M., Covalent modification of carbon surfaces by grafting of functionalized aryl radicals produced from electrochemical reduction of diazonium salts. *J. Am. Chem. Soc.* **1992,** *114* (14), 5883-5884.

113. Corgier, B. P.; Marquette, C. A.; Blum, L. J., Diazonium−Protein Adducts for Graphite Electrode Microarrays Modification: Direct and Addressed Electrochemical Immobilization. *J. Am. Chem. Soc.* **2005,** *127* (51), 18328-18332.

114. Laforgue, A.; Addou, T.; Bélanger, D., Characterization of the Deposition of Organic Molecules at the Surface of Gold by the Electrochemical Reduction of Aryldiazonium Cations. *Langmuir* **2005,** *21* (15), 6855-6865.

115. Downard, A. J., Electrochemically assisted covalent modification of carbon electrodes. *Electroanalysis* **2000,** *12* (14), 1085-1096.

116. Gooding, J. J., Advances in interfacial design for electrochemical biosensors and sensors: aryl diazonium salts for modifying carbon and metal electrodes. *Electroanalysis* **2008,** *20* (6), 573-582.

117. Lee, C.-S.; Baker, S. E.; Marcus, M. S.; Yang, W.; Eriksson, M. A.; Hamers, R. J., Electrically Addressable Biomolecular Functionalization of Carbon Nanotube and Carbon Nanofiber Electrodes. *Nano Lett.* **2004,** *4* (9), 1713-1716.

118. Baranton, S.; Bélanger, D., Electrochemical Derivatization of Carbon Surface by Reduction of in Situ Generated Diazonium Cations. *J. Phys. Chem. B* **2005,** *109* (51), 24401-24410.

119. Corgier, B. P.; Laurent, A.; Perriat, P.; Blum, L. J.; Marquette, C. A., A versatile method for direct and covalent immobilization of DNA and proteins on biochips. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007,** *46* (22), 4108-4110.

120. Corgier, B. P.; Bellon, S.; Anger-Leroy, M.; Blum, L. c. J.; Marquette, C. A., Protein−Diazonium Adduct Direct Electrografting onto SPRi-Biochip. *Langmuir* **2009,** *25* (16), 9619-9623.

121. Bernard, M.-C.; Chaussé, A.; Cabet-Deliry, E.; Chehimi, M. M.; Pinson, J.; Podvorica, F.; Vautrin-Ul, C., Organic layers bonded to industrial, coinage, and noble metals through electrochemical reduction of aryldiazonium salts. *Chem. Mater.* **2003,** *15* (18), 3450-3462.

122. Wang, J.; Carlisle, J. A., Covalent immobilization of glucose oxidase on conducting ultrananocrystalline diamond thin films. *Diamond Relat. Mater.* **2006,** *15* (2), 279-284.

123. Shabani, A.; Mak, A.; Gerges, I.; Cuccia, L.; Lawrence, M., DNA immobilization onto electrochemically functionalized Si (100) surfaces. *Talanta* **2006,** *70* (3), 615-623.

124. Liu, G.; Böcking, T.; Gooding, J. J., Diazonium salts: Stable monolayers on gold electrodes for sensing applications. *J. Electroanal. Chem.* **2007,** *600* (2), 335-344.

125. Polsky, R.; Harper, J. C.; Dirk, S. M.; Arango, D. C.; Wheeler, D. R.; Brozik, S. M., Diazonium-functionalized horseradish peroxidase immobilized via addressable electrodeposition: direct electron transfer and electrochemical detection. *Langmuir* **2007,** *23* (2), 364-366.

126. Polsky, R.; Harper, J. C.; Wheeler, D. R.; Dirk, S. M.; Arango, D. C.; Brozik, S. M., Electrically addressable diazonium-functionalized antibodies for multianalyte electrochemical sensor applications. *Biosens. Bioelectron.* **2008,** *23* (6), 757-764.

127. Harper, J. C.; Polsky, R.; Wheeler, D. R.; Brozik, S. M., Maleimide-activated aryl diazonium salts for electrode surface functionalization with biological and redox-active molecules. *Langmuir* **2008,** *24* (5), 2206-2211.

128. Harper, J. C.; Polsky, R.; Wheeler, D. R.; Dirk, S. M.; Brozik, S. M., Selective Immobilization of DNA and Antibody Probes on Electrode Arrays: Simultaneous Electrochemical Detection of DNA and Protein on a Single Platform. *Langmuir* **2007,** *23* (16), 8285-8287.

129. Livache, T.; Bazin, H.; Caillat, P.; Roget, A., Electroconducting polymers for the construction of DNA or peptide arrays on silicon chips. *Biosens. Bioelectron.* **1998,** *13* (6), 629-634.

130. Gondran, C.; Dubois, M.-P.; Fort, S.; Cosnier, S.; Szunerits, S., Detection of carbohydrate-binding proteins by oligosaccharide-modified polypyrrole interfaces using electrochemical surface plasmon resonance. *Analyst* **2008,** *133* (2), 206-212.

131. Navarro, A.-E.; Fages, F.; Moustrou, C.; Brisset, H.; Spinelli, N.; Chaix, C.; Mandrand, B., Characterization of PEDOT film functionalized with a series of automated synthesis ferrocenyl-containing oligonucleotides. *Tetrahedron* **2005,** *61* (16), 3947-3952.

132. Fang, B.; Jiao, S.; Li, M.; Qu, Y.; Jiang, X., Label-free electrochemical detection of DNA using ferrocene-containing cationic polythiophene and PNA probes on nanogold modified electrodes. *Biosens. Bioelectron.* **2008,** *23* (7), 1175-1179.

133. Tian, S.; Liu, J.; Zhu, T.; Knoll, W., Polyaniline/Gold Nanoparticle Multilayer Films: Assembly, Properties, and Biological Applications. *Chem. Mater.* **2004,** *16* (21), 4103-4108.

134. Nickels, P.; Dittmer, W. U.; Beyer, S.; Kotthaus, J. P.; Simmel, F. C., Polyaniline nanowire synthesis templated by DNA. *Nanotechnology* **2004,** *15* (11), 1524.

135. Diaz, A.; Kanazawa, K. K.; Gardini, G. P., Electrochemical polymerization of pyrrole. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979,** (14), 635-636.

136. Delabouglise, D.; Garnier, F., Chiral metals: amino acid-substituted conducting polypyrroles. *Synth. Met.* **1990,** *39* (1), 117-120.

137. Garnier, F.; Youssoufi, H. K.; Srivastava, P.; Yassar, A., Enzyme recognition by polypyrrole functionalized with bioactive peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1994,** *116* (19), 8813-8814.

138. Livache, T.; Roget, A.; Dejean, E.; Barthet, C.; Bidan, G.; Teoule, R., Preparation of a DNA matrix via an electrqchemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group. *Nucleic Acids Res.* **1994,** *22* (15), 2915-2921.

139. Livache, T.; Fouque, B.; Roget, A.; Marchand, J.; Bidan, G.; Téoule, R.; Mathis, G., Polypyrrole DNA Chip on a Silicon Device: Example of Hepatitis C Virus Genotyping. *Anal. Biochem.* **1998,** *255* (2), 188-194.

140. Bidan, G.; Billon, M.; Livache, T.; Mailley, P.; Roget, A., Ingénierie et électrochimie moléculaires pour la conception de puces à ADN. *L'Actualité chimique* **2003,** (11-12), 39-46.

141. Korri-Youssoufi, H.; Garnier, F.; Srivastava, P.; Godillot, P.; Yassar, A., Toward Bioelectronics: Specific DNA Recognition Based on an Oligonucleotide-Functionalized Polypyrrole. *J. Am. Chem. Soc.* **1997,** *119* (31), 7388-7389.

142. Chaix-Bauvais, C.; Moustrou, C.; Navarro, A.-E.; Brisset, H.; Garnier, F.; Mandrand, B.; Spinelli, N., Bi-functional metallocenes, preparation process and use in the labeling or biological molecules. Google Patents: 2007.

143. Tlili, C.; Korri-Youssoufi, H.; Ponsonnet, L.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N., Electrochemical impedance probing of DNA hybridisation on oligonucleotide-functionalised polypyrrole. *Talanta* **2005,** *68* (1), 131-137.

144. Korri-Youssoufi, H.; Makrouf, B., Electrochemical biosensing of DNA hybridization by electroactive ferrocene functionalized polypyrrole. *Synth. Met.* **2001,** *119* (1–3), 265-266.

145. Korri-Youssoufi, H.; Makrouf, B., Electrochemical biosensing of DNA hybridization by ferrocenyl groups functionalized polypyrrole. *Anal. Chim. Acta* **2002,** *469* (1), 85-92.

146. Devaraj, N. K.; Miller, G. P.; Ebina, W.; Kakaradov, B.; Collman, J. P.; Kool, E. T.; Chidsey, C. E. D., Chemoselective Covalent Coupling of Oligonucleotide Probes to Self-Assembled Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **2005,** *127* (24), 8600-8601.

147. Hansen, T. S.; Daugaard, A. E.; Hvilsted, S.; Larsen, N. B., Spatially Selective Functionalization of Conducting Polymers by “Electroclick” Chemistry. *Advanced Materials* **2009,** *21* (44), 4483-4486.

148. Canete, S. J. P.; Yang, W.; Lai, R. Y., Folding-based electrochemical DNA sensor fabricated by "click" chemistry. *Chem. Commun.* **2009,** (32), 4835-4837.

149. Canete, S. J. P.; Lai, R. Y., Fabrication of an electrochemical DNA sensor array via potential-assisted "click" chemistry. *Chem. Commun.* **2010,** *46* (22), 3941-3943.

150. Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H., Deoxynucleoside phosphoramidites—A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1981,** *22* (20), 1859-1862.

151. Matteucci, M. D.; Caruthers, M. H., Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support. *J. Am. Chem. Soc.* **1981,** *103* (11), 3185-3191.

152. McBride, L. J.; Caruthers, M. H., An investigation of several deoxynucleoside phosphoramidites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides. *Tetrahedron Lett.* **1983,** *24* (3), 245-248.

153. Dorman, M. A.; Noble, S. A.; McBride, L. J.; Caruthers, M. H., Synthesis of oligodeoxynucleotides and oligodeoxynucleotide analogs using phosphoramidite intermediates. *Tetrahedron* **1984,** *40* (1), 95-102.

154. Freier, S. M.; Kierzek, R.; Jaeger, J. A.; Sugimoto, N.; Caruthers, M. H.; Neilson, T.; Turner, D. H., Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability. *PNAS* **1986,** *83* (24), 9373-9377.

155. Smith, M.; Rammler, D. H.; Goldberg, I. H.; Khorana, H. G., Studies on Polynucleotides. XIV.1 Specific Synthesis of the C3"-C5" Interribonucleotide Linkage. Syntheses of Uridylyl-(3"→5")-Uridine and Uridylyl-(3"→5")-Adenosine2. *J. Am. Chem. Soc.* **1962,** *84* (3), 430-440.

156. Beaucage, S. L.; Iyer, R. P., Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach. *Tetrahedron* **1992,** *48* (12), 2223-2311.

157. Zatsepin, T. S.; Andreev, S. Y.; Hianik, T., Ferrocene-containing nucleic acids. Synthesis and electrochemical properties. *Russ. Chem. Rev.* **2003,** *72* (6), 537-554.

158. Eckermann, A. L.; Feld, D. J.; Shaw, J. A.; Meade, T. J., Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers. *Coord. Chem. Rev.* **2010,** *254* (15–16), 1769-1802.

159. Lietard, J.; Meyer, A.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F., An efficientreagent for 5′-azidooligonucleotidesynthesis. *Tetrahedron Lett.* **2007,** *48* (50), 8795-8798.

160. Shervedani, R. K.; Bagherzadeh, M., Hydroxamation of gold surface via in-situ layer-by-layer functionalization of cysteamine self-assembled monolayer: Preparation and electrochemical characterization. *Electrochim. Acta* **2008,** *53* (22), 6293-6303.

161. Cotton, *Advanced inorganic chemistry*. 6 ed.; Wiley India Pvt. Limited: 2007; p 1376.

162. Patterson, G. S.; Holm, R. H., Structural and electronic effects on the polarographic half-wave potentials of copper (II) chelate complexes. *Bioinorganic Chemistry* **1975,** *4* (3), 257-275.

163. Karlin, K. D.; Zubieta, J., *Copper coordination chemistry: biochemical & inorganic perspectives*. Adenine press: 1983.

164. Zolezzi, S.; Spodine, E.; Decinti, A., Electrochemical studies of copper(II) complexes with Schiff-base ligands. *Polyhedron* **2002,** *21* (1), 55-59.

165. Donnelly, P. S.; Zanatta, S. D.; Zammit, S. C.; White, J. M.; Williams, S. J., 'Click' cycloaddition catalysts: copper(i) and copper(ii) tris(triazolylmethyl)amine complexes. *Chem. Commun.* **2008,** *0* (21), 2459-2461.

166. Hong, V.; Udit, A. K.; Evans, R. A.; Finn, M. G., Electrochemically Protected Copper(I)-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *ChemBioChem* **2008,** *9* (9), 1481-1486.

167. Didziulis, S. V.; Butcher, K. D.; Cohen, S. L.; Solomon, E. I., Chemistry of copper overlayers on zinc oxide single-crystal surfaces: model active sites for copper/zinc oxide methanol synthesis catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **1989,** *111* (18), 7110-7123.

168. Benson, M. C.; Ruther, R. E.; Gerken, J. B.; Rigsby, M. L.; Bishop, L. M.; Tan, Y.; Stahl, S. S.; Hamers, R. J., Modular "Click" Chemistry for Electrochemically and Photoelectrochemically Active Molecular Interfaces to Tin Oxide Surfaces. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011,** *3* (8), 3110-3119.

169. Farre, C.; Spinelli, N.; Bouchet, A.; Marquette, C.; Mandrand, B.; Garnier, F.; Chaix, C., Synthesis and electropolymerization studies of water-soluble pyrrole-ferrocene derivatives towards biochip device application. *Synth. Met.* **2007,** *157* (2â€"3), 125-133.

170. Bard, A. J.; Faulkner, L. R., Electrochemical methods : fundamentals and applications. 2nd ed.; Wiley, Ed. wiley: New York, 2001.

171. Yu, H.-Z.; Luo, C.-Y.; Sankar, C. G.; Sen, D., Voltammetric Procedure for Examining DNA-Modified Surfaces: Quantitation, Cationic Binding Activity, and Electron-Transfer Kinetics. *Anal. Chem.* **2003,** *75* (15), 3902-3907.

172. Chatelain, G.; Ripert, M.; Farre, C.; Ansanay-Alex, S.; Chaix, C., A "four-ferrocene" modified stem-loop structure as a probe for sensitive detection and singlebase mismatch discrimination of DNA. *Electrochim. Acta* **2012,** *59* (0), 57-63.

173. Laviron, E., General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1979,** *101* (1), 19-28.

174. Smalley, J. F.; Finklea, H. O.; Chidsey, C. E. D.; Linford, M. R.; Creager, S. E.; Ferraris, J. P.; Chalfant, K.; Zawodzinsk, T.; Feldberg, S. W.; Newton, M. D., Heterogeneous Electron-Transfer Kinetics for Ruthenium

and Ferrocene Redox Moieties through Alkanethiol Monolayers on Gold. *J. Am. Chem. Soc.* **2003,** *125* (7), 2004-2013.

175. Wang, J.; Xu, D.; Kawde, A.-N.; Polsky, R., Metal Nanoparticle-Based Electrochemical Stripping Potentiometric Detection of DNA Hybridization. *Anal. Chem.* **2001,** *73* (22), 5576-5581.

176. Li, Y.; Wang, J.; Cai, C., Rapid Grafting of Azido-Labeled Oligo(ethylene glycol)s onto an Alkynyl-Terminated Monolayer on Nonoxidized Silicon via Microwave-Assisted "Click" Reaction. *Langmuir* **2011,** *27* (6), 2437-2445.

177. Phares, N.; White, R. J.; Plaxco, K. W., Improving the Stability and Sensing of Electrochemical Biosensors by Employing Trithiol-Anchoring Groups in a Six-Carbon Self-Assembled Monolayer. *Anal. Chem.* **2009,** *81* (3), 1095-1100.

178. Moses, S.; Brewer, S. H.; Lowe, L. B.; Lappi, S. E.; Gilvey, L. B. G.; Sauthier, M.; Tenent, R. C.; Feldheim, D. L.; Franzen, S., Characterization of Single- and Double-Stranded DNA on Gold Surfaces. *Langmuir* **2004,** *20* (25), 11134-11140.

179. Lee, M.-T.; Hsueh, C.-C.; Freund, M. S.; Ferguson, G. S., Air Oxidation of Self-Assembled Monolayers on Polycrystalline Gold: The Role of the Gold Substrate. *Langmuir* **1998,** *14* (22), 6419-6423.

180. Flynn, N. T.; Tran, T. N. T.; Cima, M. J.; Langer, R., Long-Term Stability of Self-Assembled Monolayers in Biological Media. *Langmuir* **2003,** *19* (26), 10909-10915.

181. De Crozals, G.; Farre, C.; Hantier, G.; Leonard, D.; Marquette, C. A.; Mandon, C. A.; Marmuse, L.; Louis, C.; Toulme, J.-J.; Billotey, C.; Janier, M.; Chaix, C., Oligonucleotide solid-phase synthesis on fluorescent nanoparticles grafted on controlled pore glass. *RSC Advances* **2012,** *2* (31), 11858-11866.

182. Chaix, C.; De Crozals, G.; Farre, C., Material for supported synthesis and method for growing oligonucleotides or peptides. WO Patent 2,013,007,944: 2013.

183. Faure, A.-C.; Hoffmann, C. l.; Bazzi, R.; Goubard, F.; Pauthe, E.; Marquette, C. A.; Blum, L. c. J.; Perriat, P.; Roux, S. p.; Tillement, O., Functionalization of Luminescent Aminated Particles for Facile Bioconjugation. *ACS Nano* **2008,** *2* (11), 2273-2282.

184. du Vigneaud, V.; Hofmann, K.; Melville, D. B.; György, P., Isolation of biotin (vitamin H) from liver. *Journal of Biological Chemistry* **1941,** *140* (2), 643-651.

185. Attwood, P. V.; Wallace, J. C., Chemical and Catalytic Mechanisms of Carboxyl Transfer Reactions in Biotin-Dependent Enzymes. *Accounts of Chemical Research* **2002,** *35* (2), 113-120.

186. Jitrapakdee, S.; Wallace, J. C., The Biotin Enzyme Family: Conserved Structural Motifs and Domain Rearrangements. *Current Protein & Peptide Science* **2003,** *4* (3), 217-229.

187. Nikolau, B. J.; Ohlrogge, J. B.; Wurtele, E. S., Plant biotin-containing carboxylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2003,** *414* (2), 211-222.

188. Wilchek, M.; Bayer, E. A., Foreword and introduction to the book (strept)avidin-biotin system. *Biomolecular engineering* **1999,** *16* (1-4), 1-4.

189. Laitinen, O. H.; Hytönen, V. P.; Nordlund, H. R.; Kulomaa, M. S., Genetically engineered avidins and streptavidins. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006,** *63* (24), 2992-3017.

190. Marttila, A. T.; Laitinen, O. H.; Airenne, K. J.; Kulik, T.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Kulomaa, M. S., Recombinant NeutraLite Avidin: a non-glycosylated, acidic mutant of chicken avidin that exhibits high affinity for biotin and low non-specific binding properties. *FEBS Letters* **2000,** *467* (1), 31-36.

191. Argarana, C. E.; Kuntz, I. D.; Birken, S.; Axel, R.; Cantor, C. R., Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene. *Nucleic Acids Research* **1986,** *14* (4), 1871-1882.

192. Østergaard, S.; Hansen, P. H.; Olsen, M.; Holm, A., Novel avidin and streptavidin binding sequences found in synthetic peptide libraries. *FEBS Letters* **1995,** *362* (3), 306-308.

193. Diamandis, E. P.; Christopoulos, T. K., The biotin-(strept) avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clinical chemistry* **1991,** *37* (5), 625-636.

194. Qureshi, M. H.; Wong, S.-L., Design, production, and characterization of a monomeric streptavidin and its application for affinity purification of biotinylated proteins. *Protein Expression and Purification* **2002,** *25* (3), 409-415.

195. Morag, E.; Bayer, E. A.; Wilchek, M., Reversibility of biotin-binding by selective modification of tyrosine in avidin. *Biochemical Journal* **1996,** *316* (Pt 1), 193.

196. Morag, E.; Bayer, E. A.; Wilchek, M., Immobilized Nitro-avidin and Nitro-streptavidin as Reusable Affinity Matrices for Application in Avidin–Biotin Technology. *Analytical Biochemistry* **1996,** *243* (2), 257-263.

197. Williams, E.; Pividori, M. I.; Merkoçi, A.; Forster, R. J.; Alegret, S., Rapid electrochemical genosensor assay using a streptavidin carbon-polymer biocomposite electrode. *Biosens. Bioelectron.* **2003,** *19* (3), 165-175.

198. Burns, J. A.; Butler, J. C.; Moran, J.; Whitesides, G. M., Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl)phosphine. *J. Org. Chem.* **1991,** *56* (8), 2648-2650.

199. Ricci, F.; Lai, R. Y.; Heeger, A. J.; Plaxco, K. W.; Sumner, J. J., Effect of Molecular Crowding on the Response of an Electrochemical DNA Sensor. *Langmuir* **2007,** *23* (12), 6827-6834.

200. Van Blaaderen, A.; Vrij, A., Synthesis and characterization of monodisperse colloidal organo-silica spheres. *J. Colloid Interface Sci.* **1993,** *156*, 1-1.

201. Ronaghi, M.; Pettersson, B.; Uhlén, M.; Nyrén, P., PCR-introduced loop structure as primer in DNA sequencing. *BioTechniques* **1998,** *25*, 876-884.

202. Kaboev, O. K.; Luchkina, L. A.; Tret'iakov, A. N.; Bahrmand, A. R., PCR hot start using primers with the structure of molecular beacons (hairpin-like structure). *Nucleic Acids Res.* **2000,** *28* (21), e94.

203. Broude, N. E., Molecular beacons and other hairpin probes. In *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*, Boston University, Boston, Massachusetts, U.S.A, 2005; Vol. 11, pp 846-850.

204. Bonnet, G.; Tyagi, S.; Libchaber, A.; Kramer, F. R., Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes. *PNAS* **1999,** *96* (11), 6171-6176.

205. Kramer, F. R. Introduction to Molecular Beacons. http://www.molecular-beacons.com/default.htm.

206. Culha, M.; Stokes, D. L.; Griffin, G. D.; Vo-Dinh, T., Application of a miniature biochip using the molecular beacon probe in breast cancer gene BRCA1 detection. *Biosens. Bioelectron.* **2004,** *19* (9), 1007-1012.

207. Horejsh, D.; Martini, F.; Poccia, F.; Ippolito, G.; Di Caro, A.; Capobianchi, M. R., A molecular beacon, bead-based assay for the detection of nucleic acids by flow cytometry. *Nucleic Acids Res.* **2005,** *33* (2), e13.

208. Kim, H.; Kane, M. D.; Kim, S.; Dominguez, W.; Applegate, B. M.; Savikhin, S., A molecular beacon DNA microarray system for rapid detection of E. coli O157:H7 that eliminates the risk of a false negative signal. *Biosens. Bioelectron.* **2007,** *22* (6), 1041-1047.

209. Cady, N. C.; Strickland, A. D.; Batt, C. A., Optimized linkage and quenching strategies for quantum dot molecular beacons. *Mol. Cell. Probes* **2007,** *21* (2), 116-124.

210. Strohsahl, C. M.; Du, H.; Miller, B. L.; Krauss, T. D., Towards single-spot multianalyte molecular beacon biosensors. *Talanta* **2005,** *67* (3), 479-485.

211. Cederquist, K. B.; Stoermer Golightly, R.; Keating, C. D., Molecular Beacon−Metal Nanowire Interface: Effect of Probe Sequence and Surface Coverage on Sensor Performance. *Langmuir* **2008,** *24* (16), 9162-9171.

212. Immoos, C. E.; Lee, S. J.; Grinstaff, M. W., Conformationally Gated Electrochemical Gene Detection. *ChemBioChem* **2004,** *5* (8), 1100-1103.

213. Radi, A.-E.; Acero Sánchez, J. L.; Baldrich, E.; O'Sullivan, C. K., Reagentless, Reusable, Ultrasensitive Electrochemical Molecular Beacon Aptasensor. *J. Am. Chem. Soc.* **2005,** *128* (1), 117-124.

214. Mukumoto, K.; Nojima, T.; Takenaka, S., Synthesis of ferrocenylcarbodiimide as a convenient electrochemically active labeling reagent for nucleic acids. *Tetrahedron* **2005,** *61* (49), 11705-11715.

215. Patolsky, F.; Weizmann, Y.; Willner, I., Redox-Active Nucleic-Acid Replica for the Amplified Bioelectrocatalytic Detection of Viral DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2002,** *124* (5), 770-772.

216. Wlassoff, W. A.; King, G. C., Ferrocene conjugates of dUTP for enzymatic redox labelling of DNA. *Nucleic Acids Res.* **2002,** *30* (12), e58.

217. Beilstein, A. E.; W. Grinstaff, M., On-column derivatization of oligodeoxynucleotides with ferrocene. *Chem. Commun.* **2000,** *0* (6), 509-510.

218. Pike, A. R.; Ryder, L. C.; Horrocks, B. R.; Clegg, W.; Elsegood, M. R. J.; Connolly, B. A.; Houlton, A., Metallocene–DNA: Synthesis, Molecular and Electronic Structure and DNA Incorporation of C5-Ferrocenylthymidine Derivatives. *Chem. Eur. J.* **2002,** *8* (13), 2891-2899.

219. Meunier, P.; Ouattara, I.; Gautheron, B.; Tirouflet, J.; Camboli, D.; Besançon, J., Synthèe, caractérisation et propriétés cytotoxiques des premiers 'métallocénonucléosides'. *Eur. J. Med. Chem.* **1991,** *26* (3), 351-362.

220. Tharamani, C. N.; Song, H.; Ross, A. R. S.; Hughes', R.; Kraatz, H.-B., Electrochemical investigation of metal ion interactions of a ferrocene deoxyuridine conjugate. *Inorg. Chim. Acta* **2008,** *361* (1), 393-399.

221. Yu, C. J.; Yowanto, H.; Wan, Y.; Meade, T. J.; Chong, Y.; Strong, M.; Donilon, L. H.; Kayyem, J. F.; Gozin, M.; Blackburn, G. F., Uridine-Conjugated Ferrocene DNA Oligonucleotides: Unexpected Cyclization Reaction of the Uridine Base. *J. Am. Chem. Soc.* **2000,** *122* (28), 6767-6768.

222. Song, H.; Li, X.; Long, Y.; Schatte, G.; Kraatz, H.-B., Ferrocene-modified pyrimidine nucleosides: synthesis, structure and electrochemistry. *Dalton Transactions* **2006,** *0* (39), 4696-4701.

223. Kraatz, H.-B., Ferrocene-Conjugates of Amino Acids, Peptides and Nucleic Acids. *J Inorg Organomet Polym* **2005,** *15* (1), 83-106.

224. Yu, C. J.; Wan, Y.; Yowanto, H.; Li, J.; Tao, C.; James, M. D.; Tan, C. L.; Blackburn, G. F.; Meade, T. J., Electronic Detection of Single-Base Mismatches in DNA with Ferrocene-Modified Probes. *J. Am. Chem. Soc.* **2001,** *123* (45), 11155-11161.

225. Yu, C. J.; Wang, H.; Wan, Y.; Yowanto, H.; Kim, J. C.; Donilon, L. H.; Tao, C.; Strong, M.; Chong, Y., 2'-Ribose-Ferrocene Oligonucleotides for Electronic Detection of Nucleic Acids. *J. Org. Chem.* **2001,** *66* (9), 2937-2942.

226. Zauner, G.; Wang, Y.; Lavesa-Curto, M.; MacDonald, A.; Mayes, A. G.; Bowater, R. P.; Butt, J. N., Tethered DNA hairpins facilitate electrochemical detection of DNA ligation. *Analyst* **2005,** *130* (3), 345-349.

227. Nakayama, M.; Ihara, T.; Nakano, K.; Maeda, M., DNA sensors using a ferrocene-oligonucleotide conjugate. *Talanta* **2002,** *56* (5), 857-866.

228. Chatelain, G.; Chaix, C.; Brisset, H.; Moustrou, C.; Fages, F.; Mandrand, B., Synthesis of electrochemical probes for nucleic acid detection. *Sens. Actuators, B* **2008,** *132* (2), 439-442.

229. Navarro, A.-E.; Spinelli, N.; Moustrou, C.; Chaix, C.; Mandrand, B.; Brisset, H., Automated synthesis of new ferrocenyl-modified oligonucleotides: study of their properties in solution. *Nucleic Acids Res.* **2004,** *32* (17), 5310-5319.

230. Chatelain, G., Synthèse d'oligonucléotides de structure tige-boucle ou alpha phosphoramidates modifiés par des ferrocènes : application à la détection électochimique d'acides nucléiques. Université Claude Bernard Lyon 1: Lyon, 2009; p 295.

231. Tyagi, S. Designing molecular beacons. www.molecular-beacons.org/download/design.pdf.

232. Dubertret, B.; Calame, M.; Libchaber, A. J., Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.* **2001,** *19* (4), 365-370.

233. Trémillon, B., Electrochimie analytique et réactions en solution. Tome 2 Réactions et méthodes électrochimiques. Masson, Ed. Masson: Paris, 1993.

234. Buffle, J.; Tercier-Waeber, M.-L., In situ monitoring of aquatic systems. Chemical analysis and speciation. J. Buffle, G. H., Ed. Wiley: Chichester, 2000.

235. Kauffman, A. M. *Understanding Electrochemical Cells*; solartron: Farnborough UK, 1997; pp 1-32.

236. Orazem, M. E.; Pébère, N.; Tribollet, B., Enhanced Graphical Representation of Electrochemical Impedance Data. *J. Electrochem. Soc.* **2006,** *153* (4), B129-B136.

237. Tsourkas, A.; Behlke, M. A.; Rose, S. D.; Bao, G., Hybridization kinetics and thermodynamics of molecular beacons. *Nucleic Acids Res.* **2003,** *31* (4), 1319-1330.

238. Durand, M.; Chevrie, K.; Chassignol, M.; Thuong, N. T.; Maurizot, J. C., Circular dichroism studies of an oligodeoxyribonucleotide containing a hairpin loop made of a hexaethylene glycol chain: conformation and stability. *Nucleic Acids Res.* **1990,** *18* (21), 6353-6359.

239. Serra, M. J.; Axenson, T. J.; Turner, D. H., A model for the stabilities of RNA hairpins based on a study of the sequence dependence of stability for hairpins of six nucleotides. *Biochemistry* **1994,** *33* (47), 14289-14296.

240. Marky, L. A.; Breslauer, K. J., Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves. *Biopolymers* **1987,** *26* (9), 1601-1620.

241. Puglisi, J. D.; Tinoco Jr, I., [22] absorbance melting curves of RNA. In *Methods Enzymol.*, James E. Dahlberg, J. N. A., Ed. Academic Press: 1989; Vol. Volume 180, pp 304-325.

242. SantaLucia, J., A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *PNAS* **1998,** *95* (4), 1460-1465.

243. Hannoush, R. N.; Damha, M. J., Remarkable Stability of Hairpins Containing 2‘,5‘-Linked RNA Loops. *J. Am. Chem. Soc.* **2001,** *123* (49), 12368-12374.

244. Ramsing, N. B.; Rippe, K.; Jovin, T. M., Helix-coil transition of parallel-stranded DNA. Thermodynamics of hairpin and linear duplex oligonucleotides. *Biochemistry* **1989,** *28* (24), 9528-9535.