HAL open science

Conception et réalisation de biocapteurs impédimétriques

Nadir Meini

▶ To cite this version:

Nadir Meini. Conception et réalisation de biocapteurs impédimétriques. Génie chimique. Université Claude Bernard - Lyon I; Université Badji Mokhtar-Annaba, 2014. Français. NNT : 2014LYO10074 . tel-01335716

HAL Id: tel-01335716

https://theses.hal.science/tel-01335716v1

Submitted on 22 Jun 2016

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.

THESE EN CO-TUTELLE

Entre

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR
FACULTE DES SCIENCES DE L'INGENIEUR
ANNABA

&

UNIVERSITE CLAUDE
BERNARD LYON1

Présentée et soutenue publiquement le 27 /Mai/ 2014

Par

MEINI Nadir

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Badji Mokhtar Annaba et de l'Université Claude Bernard Lyon1

Spécialité : **Chimie**

Titre

Conception et réalisation de Biocapteurs Impédimétriques

Co-directeur de thèse : **KHERRAT Rochdi** Professeur de l'Université de Annaba

Co-directeur de thèse : **Nicole JAFFREZIC-RENAULT** Directeur de recherche CNRS Université de Lyon 1

Devant la commission d'examen :

JURY :

Président : *Didier LEONARD Professeur à l'université Claude Bernard Lyon1*

Rapporteurs : *Hafsa KORRI-YOUSSOUFI Chargée de Recherche CNRS, HDR Université Paris-Sud*

Messaoud BENOUNIS Maître de Conférences, HDR Centre Universitaire de Khenchla

Examinateurs : *Oualid HAMDAOUI Professeur à l'université Badji Mokhtar Annaba*

Résumé
L'objectif du travail de recherche concerne la conception et la réalisation de biocapteurs à base de mesures impédimétriques, pour lesquels la demande est forte dans différents domaines d'intérêt sociétal, en particulier l'environnement, la sécurité alimentaire et le biomédical. Les biocapteurs sont des moyens d'analyse en plein essor à la fois rapides, sélectifs et peu coûteux applicables à des domaines extrêmement variés (environnement, santé, agroalimentaire,…). Dans ce type d'outil, un élément sensible de nature biologique (anticorps, enzyme, microorganisme, ADN…) doté d'un pouvoir de reconnaissance pour un analyte ou un groupe d'analytes est associé à un transducteur pouvant être de type électrochimique, optique ou thermique.

Dans la première partie de ce travail, un aptasensor a été développé pour la détection de la thrombine. Deux aptamères different ciblant la thrombine étaient directement immobilisés sur l'électrode en or. L'aptasensor élaboré présente une grande sensibilité, spécificité et stabilité pour la thrombine. Dans la seconde partie, en utilisant la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS), nous avons surveillé l'immobilisation de protéines et sans marquage sur une surface d'or, au moyen d'une stratégie d'électro-adressage, compatible avec la production de biopuces pour multi-détection.Cette fonctionnalisation est réalisée par la cycloaddition alcyne / azoture, mieux connu comme la réaction «clic».
Enfin, un biocapteur utilisant des protéines de phage à été développé pour la détection de E.coli.
Abstract
The objective of the research concerns the design and realization of biosensors based impedimetric measures, for which there is strong demand in various societal benefit areas, particularly the environment, food security and biomedical.Biosensors are rapid, selective and inexpensive devices that combine a biological recognition element, the so-called bioreceptor (e.g. enzymes, antibodies, DNA or microorganisms) to a physical transducer (e.g. electrochemical, optical, thermal or piezoelectrical). They can be used to detect one specific analyte or one family of analytes for a wide range of applications (e.g. environment, food, health). In the first part of this work, an aptasensor was developed for thrombin detection. Two different aptamers targeting thrombin were directly immobilized on the gold electrode. The aptasensor exhibits high sensitivity, specificity and stability in the detection of thrombin. In the second part, using electrochemical impedance spectroscopy (EIS), we have, monitored label-free 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. Finally, a biosensor using phage proteins was developed for detecting E. coli

Remerciement

Ce travail n'aurait pas été possible sans le bienveillant soutien de Dieu qui m'a facilité l'aboutissement de cette thèse malgré mes nombreux écarts et qui a placé sur ma route d'aussi remarquables personnes. Je suis incapable de dire avec les mots qui conviennent, le rôle qu'elles ont pu jouer à mes côtés pour en arriver là. Cependant, je voudrais les prier d'accueillir ici toute ma gratitude qui vient du fond du cœur, en acceptant mes remerciements.

Je souhaite exprimer tout d'abord ma sincère reconnaissance à Mme **Nicole JAFFREZIC-RENAULT** de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer son groupe de recherche et permis d'explorer le domaine fascinant des biocapteurs.

Je présente aussi mes remerciements à **M.Rochdi KHERRAT** pour la confiance qu'il m'a donnée durant ces années de thèse en m'accordant une grande liberté d'action.

Je remercie **M. Didier LEONARD** professeur à l'université Claude Bernard de Lyon et directeur de l'équipe SIMS (Surfaces-(bio)Interfaces-Micro/nanoSystèmes), d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

Je tiens également à exprimer mes remerciements aux rapporteurs qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci à **Mme KORRI-YOUSSOUFI** et **M.BENOUNIS** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et d'avoir consacré du temps à la lecture de ce manuscrit. Je remercie aussi **M Hamdaoui** pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Je voudrais également remercier **Mme Chaix Carole, Farre Carole, Ripert Micael** pour l'excellente collaboration et leur travail scientifique judicieux.

Je remercie toute l'équipe SIMS de l'ISA.

Je remercie mon ami Cheriak Tahar pour sa générosité et sa patience et qui a apporté à la fin de la rédaction de ce manuscrit sa touche d'artiste …

Je remercie mes parents et mes amis pour leur soutien.

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes parents sans qui je ne serai pas où j'en suis aujourd'hui…

A mes frères et sœurs,

A ma famille,

A tous mes amis, et à tous ceux qui m'ont soutenu,

S O M M A I R E

	Page
INTRODUCTION	01
CHAPITRE I NOTIONS DE BASES SUR LES BIOCAPTEURS ET PRESENTATION DES DIFFERENTS BIOCAPTEURS	
I. GENERALITES	03
I.1. Historique	03
I.3. Définition d'un biocapteur	04
I.3. Structure et principe de fonctionnement d'un biocapteur	04
I.4. Qualité des capteurs de mesure	05
I.5. Classification des biocapteurs	06
I.6. Classification des biocapteurs selon la nature des biorécepteurs	07
• Le biorécepteur (couche sensible)	07
I.6.1 . Les anticorps	08
I.6.2. Les enzymes	10
I.6.3. L'ADN	13
I.6.4. Cellule entière	15
I.6.5. Bactériophages	16
I.6.6. Les acide nucléiques peptidiques (PNAs)	18
I.6.7. Polymères à empreintes moléculaires (MIPs)	20
I.6.8. Les Aptamères	21
I.7. Classification des biocapteurs selon le type de transduction	22
• Le transducteur	22
I.7.1 Transduction piézoélectrique	23
I.7.2 Transduction thermique	26
I.7.3 Transduction Optiques	27
❖ Fibre optique	27
❖ Interféromètre de Mach- Zender	29
❖ Résonance plasmonique de surface (SPR)	30
I.7.4. Transduction électrochimique	32
❖ Biocapteurs à transduction ampérométriques	33
❖ Biocapteurs à transduction potentiométrique	36
❖ Biocapteurs à transduction conductimétrique	38
❖ Biocapteurs à transduction impédimétrique	39

Page

I.8. Techniques d'immobilisations 40
I.8.1 Les méthodes physiques d'immobilisation 42
I.8.1.1. L'adsorption physique 42
I.8.1.2. Emprisonnement physique 42
I.8.1.3. Le confinement 43
I.8.1.4. Microencapsulation 43

I.8.2 Les méthodes chimiques d'immobilisation 44
I.8.2.1 Liaison covalente 44
✓ Couplage direct 44
✓ Couplage indirect 45
I.8.2.2 La réticulation 46

CONCLUSION 47

REFERENCE CHAPITRE I 48

CHAPITRE II PRESENTATION DE LA SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE

II.1. SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE 60

II. 1. 1. Introduction 60
II. 1. 2. Théorie 62
II. 1. 2. 1. Réaction d'oxydo-réduction à l'interface métal/solution 62
II. 1. 2. 2. Transfert et transport de matière 64
II. 1. 2. 3. Interface métal/solution 64
II. 1. 2. 4. Double couche : Modèles d'Helmoltz, Gouy-Chapmann et Stern 65
II. 1. 2. 5. Processus faradique et non faradique: 69

II. 1. 3. Mesure d'impédance électrochimique : 70
II. 1. 3. 1. Principe 70
II. 1. 3. 2. Fonction de transfert 70
II. 1. 3. 3. Résistance de la solution Rs 74
II. 1. 3. 4. Résistance de transfert de charge Rtc 74
II. 1. 3. 5. Phénomène de diffusion et impédance de Warburg W 74
II. 1. 3. 6. Circuit électrique équivalent 75
II. 1. 3. 6. 1. Résistance - condensateur en série 75
II. 1. 3. 6. 2. Résistance - condensateur en parallèle 77
II. 1. 3. 6. 3. Circuit de Randles 78

II. 1. 4. Diagramme d'impédance totale 80

CONCLUSION 82
REFERENCE CHAPITRE II 83

Page

CHAPITRE III DEVELOPPEMENT D'UN APTASENSOR POUR LA DETECTION DE LA THROMBINE

III.1. INTRODUCTION 86
III.2. LES APTAMERES 87
III.3. MATERIEL ET METHODES 91
III.3.1. Réactifs et solutions 91
III.3.2. Synthése des aptamères 91
III.3.3. Dispositif expérimental : 92
III.3.4. Nettoyage et activation de la surface l'or 94
III.3.5. Fonctionnalisation des biopuces d'or par les aptamères 95

III.4. RESULTATS ET DISCUSSIONS 96
III.4.1. Caractérisation des électrodes fonctionnalisées par voltamétrie cyclique 96
III.4.2. Optimisation du potentiel 98
III.4.3. Réponses des aptasensors 99
III.4.4. Modélisation des spectres d'impédance 101
III.4.5. Etude comparative des caractéristiques analytiques des deux sondes 104
III.4.5.1. Courbe de calibration 104
III.4.5.2. Reproductibilité 106
III.4.5.3. Spécificité ou Sélectivité 106
III.4.5.4. Comparaison des performances analytiques des aptasensors avec travaux antérieurs 107
III.4.5.5. Stabilité 108

CONCLUSION 109

REFERENCE CHAPITRE III 110

CHAPITRE IV APPLICATION DE LA CHIMIE « CLICK » POUR L'ELECTROADRESSAGE SUR ELECTRODE D'OR ET LA DETECTION DE PROTEINE

IV.1. Introduction 115
IV.2. Chimie click 116
IV.2.1. Généralités 116
IV.2.2. Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen 118
IV.2.2.1. Catalyse de la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen 119
IV.2.2.2. Mécanisme catalytique et régiospécificité 120
IV.2.2.3. Applications de la cycloaddition CuAAC 121

Page

IV.3. Description de l'interaction entre la biotine et la streptavidine 123
IV.3.1. La biotine 123
IV.3.2. La Streptavidine 124
IV.3.3. Système biotine/streptavidine 124

IV.4. Matériels et méthodes 126
IV.4.1. Solutions et réactifs 126
IV.4.2. Équipement 127
IV.4.3. Autres techniques de caractérisations 127
IV.4.4. Synthèse supporté des dérivés bis (DTPA) 127
IV.4.5. Nettoyage et activation de la surface l'or 128
IV.4.6. Fonctionnalisation de la surface d'or par le bis(DTPA) héxynyle 129
IV.4.7. Stratégie de « click » du dérivé biotinylé et reconnaissance de la streptavidine 130
IV.4.7.1. Greffage du dérivé biotinylé par la réaction « click » 130
IV.4.7.2. Interaction Streptavidine / biotine sur une surface d'or fonctionnalisée 131

IV.4.8. Etude de la reconnaissance biotine/Nanoparticules fonctionnalisées à la strepatavidine par microscopie à fluorescence 132
IV.4.9. Immobilisation de la HSA biotinylée 133

IV.5. RESULTATS ET DISCUSSIONS 134
IV.5.1. Caractérisation électrochimique de la surface d'or nu 134
IV.5.2. Caracterisation par impédance des surfaces fonctionnalisées par la biotine et reconnaissance de la streptavidine 135
IV.5.3. Visualisation de la réaction « click » par microscopie à fluorescence 138
IV.5.4. Caractérisation par SIE l'immobilisation de HSA 139

CONCLUSION 141

REFERENCE CHAPITRE IV 142

Page

CHAPITRE V UTILISATION DE PROTEINES DE PHAGE POUR LA DETECTION DE BACTERIES

V.1Introduction 145
V.2.Modification de l'or par des monocouches-auto-assemblées (SAMS) 147

V.3 Matériel et méthodes 149
V.3.1. Matériel 149
V.3.2 Protocole de nettoyage 149
V.3.3 Culture bactériennes 149
V.3.4 Elaboration du biocapteur 150

V.4. RESULTATS ET DISCUSSIONS 151
V.4.1 Caractérisation par voltamétrie cyclique 151
V.4.2 Réponse du biocapteur 153
V.4.3 Courbe de calibration 155
V.4.4 Etude de la spécificité du biocapteur 156

CONCLUSION 157

REFERENCE CHAPITRE V 158

CONCLUSION GENERALE 160

LISTE DES FIGURES

Désignation des Figures	Page
Figure I.1 Schéma principe du fonctionnement d'un biocapteur	05
Figure I.2 Classification des biocapteurs	07
Figure I.3 Représentation schématique des différents biorécepteurs	08
Figure I.4 Structure schématique d'une molécule d'anticorps	10
Figure I.5 Mécanisme réactionnel d'une réaction enzymatique	11
Figure I.6 A) Réaction sans enzyme, B) Réaction avec enzyme	13
Figure I.7 Structure de l'ADN	14
Figure I.8 Image microscopique de Cocci	16
Figure I.9 Représentation schématique d'un phage	17
Figure I.10 Cycle lytique d'un bactériophage	18
Figure I.11 Structure d'un Acide nucléique peptidique	19
Figure 1.12 Principe d'assemblage spécifique des polymères à empreinte moléculaire(MIP).	21
Figure I.13 Courbes d'étalonnage d'un capteur	23
Figure I.14 Quartz minéral	24
Figure I.15 Représentation schématique d'une microbalance à quartz	25
Figure I.16 Schéma d'une fibre optique	28
Figure I.17 Schéma de principe d'un interféromètre Mach-Zender	30

Désignation des Figures	Page
Figure 1.18 Schéma de principe de la résonance plasmonique de surface	31
Figure 1.19 Réponses d'un capteur à résonance plasmonique de surface	32
Figure I.20 Principe de la mesure ampérométrique	34
Figure I.21 Dispositif expérimental pour réaliser des mesures potentiométriques	37
Figure I.22 Dispositif expérimental pour réaliser des mesures conductimétriques	38
Figure I.23 Dispositif expérimental pour réaliser des mesures impédimétriques	40
Figure I.24 Différentes techniques d'immobilisations	41
Figure II.1 Représentation de la réduction (a) et de l'oxydation (b) d'une espèce A en solution. Les orbitales moléculaires (OM) de l'espèce A qui sont représentées sur le schéma sont l'OM occupée la plus basse et l'OM vacante la plus haute.	63
Figure II.2 Modèle proposé pour la double couche à l'interface métal/solution	65
Figure II.3 La variation du potentiel à l'interface conformément au modèle de Helmoltz	66
Figure II.4 Variation du potentiel avec la distance dans la couche diffuse	67
Figure II.5 La distribution du potentiel selon Stern	69
Figure II.6 Exemple de courbe courant –tension	71
Figure II.7 Circuit résistance -condensateur en série	76
Figure II.8 Diagramme de Nyquist de l'impédance	76
Figure II.9 Diagramme de Bode	76
Figure II.10 Circuit résistance - condensateur en parallèle	77
Figure II.11 Diagramme de Nyquist de l'impédance pour résistance – condensateur en parallèle	78
Figure II.12 Diagramme de Bode d'un circuit résistance - condensateur en parallèle	78

Désignation des Figures	Page
Figure II.13 Modèle électrique de l'interface métal/solution	79
Figure II.14 Diagramme de Nyquist de l'impédance pour un circuit de Randles	81
Schéma III.1 de l'aptasensor conçu pour l'aptamère 1	90
Schéma III.2 Séquences de synthèse des aptamères sélectionnés	92
Schéma III.3 Dispositif expérimental pour réaliser les mesures électrochimiques	94
Figure III.4 nettoyage de l'or dans la soude.	95
Figure.III.5 Voltammogrammes pour une électrode d'or nue, modifiée par l''aptamer1 et l'aptamère 2 Vitesse de balayage est de 100 $mV.s^{-1}$.	97
Figure III.6 spectres d'impédance dans le plan de Nyquist à différentes polarisations : a) pour l'aptamère 1, b) pour l'aptamère 2.	98
Figure III.7 spectres d'impédance dans le plan de Bode à différentes polarisations : a) pour l'aptamère 1, b) pour l'aptamère 2.	99
Figure III.8 Diagrammes d'impédance avant et après incubations de différentes concentrations de la thrombine : a) pour l'aptamère1, b) pour l'aptamère 2.	100
Schéma III.9 Circuit Randles équivalent	101
Schéma III.10 exemple de fit basé sur le cicuit équivalent de Randle modélisé avec Zplot/ Zview	102
Figure III.11 Variation de la résistance de transfert en fonction de la concentration en thrombine pour les deux biocapteurs	105
Figure III.12 Stabilité de l'aptasensor après régénération avec de l'eau à 60°C	108
Schéma IV.1 Principales réactions de chimie « click ».	118
Figure IV.1 La cycloaddition de Huisgen mène à deux régioisomères du 1,2,3-triazole.	119

Désignation des Figures	Page
Figure IV.2. Cycloaddition de Huisgen catalysée	120
Figure IV.3 Figure catalytique de la CuAAC proposé en 2002 par K.B. Sharpless	121
Figure IV.4 Application de la click pour l'immobilisation de sonde ferrocène sur de l'or.	122
Figure IV.5 Structure de la biotine	124
Figure IV.6 Structure du composé azide-PEG3-Biotine.	126
Figure IV.7 Nettoyage de l'or dans la soude.	129
Figure IV.8 Electrode d'or fonctionnalisée avec du bis (DTPA)-hexynyle et passivée avec du mercaptopropanol.	130
Figure IV.9 Stratégie de greffage de biotine sur or, suivi de la reconnaissance de la streptavidine.	131
Figure IV.10 Clichés TEM des NPs fonctionnalisées à la streptavidine	132
Figure IV.11 Distribution du potentiel Zeta des NP fonctionnalisées à la streptavidine.	133
Figure IV.12 Diagramme de Nyquist pour l'or nu	134
Figure IV.13 Circuit équivalent pour l'or nu	135
Figure IV.14 Diagramme de Nyquist d'une électrode d'or , a) non fonctionnalisée, b) fonctionnalisée par le Bis(DTPA)héxynyle et le mercaptopropanol, c) après réaction de « click » avec l'azide-PEG3-Biotine, c) après incubation de la streptavidine	136
Figure IV.15 Diagramme de Nyquist d'une électrode d'or, a) non fonctionnalisée, b) fonctionnalisée par le Bis(DTPA)héxynyle et le mercaptopropanol, c) après click à + 300 mV de l'azide-PEG3-Biotine	137
Figure IV.16 Electrodes 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) +300mV	138
Figure IV.17 Diagramme de Nyquist à différentes concentrations de HSA.	139
Figure IV.18 Variations de la Rtc en fonction de [HSA]	140

Figure V.1 Représentation schématique d'une molécule d'alcanethiol auto-assemblée montrant l'angle d'inclinaison de la chaîne alcane par rapport à la surface d'or	148
Figure V.2 étapes d'élaboration du biocapteur	151
Figure V. 3 Voltamogramme d'une électrode d'or nue (a), modifiée avec du MHA(b), modifiée avec du MHA+ protéine de phage+ thiolamine(c).	152
Figure V.4 Diagrammes de Nyquist avant et après incubation de E.coli 0157 :H7.	153
Figure V.5 Circuit électrique équivalent de type Randles	154
Figure V.6 Exemple de fit basé sur le cicuit équivalent de Randle modélisé avec Zplot/ Zview	154
Figure V.7 Courbe de calibration du biocapteur impédimétrique	155
Figure V.8 Courbes de calibration du biocapteur pour les souches E.coli O157 :H7 et E.coli 7308009.	156

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

La détection d'espèces biologiques telles que les protéines, les virus ou les bactéries est un enjeu de plus en plus important dans de nombreux domaines (environnemental, médical, militaire, sécurité alimentaire, etc.). Dans le domaine de détection d'une espèce chimique ou biologique, il convient de distinguer les instruments classiques et les biocapteurs.

Les instruments d'analyses classiques (spectrométrie, chromatographie, colorimétrie,…) sont généralement des systèmes relativement complexes associant différents éléments mécaniques, chimiques et électriques. L'ensemble est souvent coûteux, encombrant et énergivore, ce qui les rend peu aptes à des mesures sur sites. De plus, ces instruments sont souvent affligés d'un temps de réponse long soit par la technique de détection elle-même soit par la nécessité de manipulation des échantillons.

Les biocapteurs, quant à eux, sont généralement des dispositifs simples issus de l'association d'un élément de reconnaissance de nature biologique sensible à l'analyte et d'un système de transduction transformant l'interaction en signal électrique mesurable. Souvent, les deux fonctions sont intimement liées.

Les avantages principaux des biocapteurs sont : leur faible encombrement, leur faible consommation énergétique, leur faible coût, les temps de réponse sont relativement courts, leur facilité d'utilisation. Tous ces avantages en font des instruments idéaux pour réaliser des mesures sur site et en temps réel.

Au cours de ces dernières décennies, les biocapteurs ont connu un développement rapide, lié aux multiples associations de nouveaux récepteurs avec des transducteurs sans cesse en évolution. Les

caractéristiques de ces biocapteurs ont été améliorées et leur fiabilité accrue permet d'exploiter de nouvelles applications.

Le travail de cette thèse s'organise autours de la conception et la réalisation de biocapteurs électrochimiques à transduction impédimétrique.

Ce mémoire est organisé en 5 chapitres. Le premier chapitre de la thèse a été consacré à une étude bibliographique approfondie sur les biocapteurs, la classification des biocapteurs selon le récepteur et selon le transducteur et les différents procédés d'immobilisation des biomolécules.

Le deuxième chapitre développe les bases théoriques de la spectroscopie d'impédance électrochimique utilisée tout au long de ce travail comme technique de caractérisation.

Le troisième chapitre est consacré à l'élaboration de deux aptasensors pour la détection de la thrombine. Deux aptamères spécifiques pour la thrombine ont été sélectionnés à partir de la littérature puis ils sont immobilisés à la surface des électrodes d'or par une simple chimisorption. Les propriétés remarquables des aptamères thrombine ont été mises à profit pour la préparation de nouveaux biocapteurs électrochimiques sensibles, sélectifs et stables.

Dans le quatrième chapitre, nous avons développé une stratégie d'électro-adressage sur surface d'or compatible avec la production de biopuces pour multi-détection. Cette électro-fonctionnalisation est réalisée via une cycloaddition dipolaire 1,3 de type Huisgen catalysée par le cuivre (I) plus connue sous le nom de « Click Chemistry ».

Le cinquième chapitre a été consacré au développement d'un biocapteur impédimetrique pour la détection de bactéries d'un serotype particulier de *Escherichia coli (E.coli O157: H7)* en utilisant une protéine de phage recombinante très spécifique à cette souche de bactérie.

Finalement, nous donnons une conclusion générale de ce travail, et ouvrons des perspectives pour les travaux à venir.

CHAPITRE I

NOTION DE BASE SUR LES BIOCAPTEURS ET PRÉSENTATION DES DIFFÉRENTS BIOCAPTEURS

CHAPITRE I

NOTIONS DE BASES SUR LES BIOCAPTEURS
ET PRESENTATION DES DIFFERENTS BIOCAPTEURS

I. Généralités

I. 1. Historique

L'histoire des biocapteurs débuta en 1956 lorsque le Professeur Clark Jr [1] publia ses travaux qui portaient sur le développement d'une électrode permettant de mesurer l'oxygène dissous dans le sang et depuis Mr Clark est considéré comme le père fondateur du concept « biocapteur ». Quelques années plus tard (1962),Lyons et Clark ont décrit une expérience dans laquelle la glucose oxydase (GOX) a été piégée sur une électrode à oxygène de Clark, en utilisant une membrane de dialyse [2]. La diminution de la concentration en oxygène mesurée est proportionnelle à la concentration en glucose. Toutefois, l'intérêt général sur les biocapteurs a considérablement augmenté depuis la description par Updike et Hicks [3] en 1967 du premier biocapteur contenant de la glucose-oxydase piégée dans un gel polymérisé. Ce développement a été un point de démarrage important au développement des biocapteurs électrochimiques du fait de sa commercialisation. Vers la fin des années soixante, en 1969, Guilbault et Montalvo [4] ont créé le premier capteur potentiométrique pour doser l'urée dans le sang et l'urine. En 1975 la société Américaine Yellow Springs Instrument (Ohio, Amérique) commercialisa le premier biocapteur à glucose basé sur la détection ampérométrique du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Depuis les biocapteurs font l'objet d'une grande activité scientifique et sont de plus en plus utilisés dans divers domaines.

I. 2. Définition

Les biocapteurs sont des capteurs chimiques dont le système de reconnaissance utilise un mécanisme biochimique [5]. Plusieurs définitions ont été utilisées pour définir un biocapteur ; d'après Grosnow, un biocapteur est un outil ou un système analytique constitué d'un composé biologique immobilisé, appelé « ligand », relié à un transducteur qui transforme le signal biochimique en un signal physique quantifiable [6].

Selon l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), un biocapteur est un dispositif intégré capable de fournir des informations spécifiques quantitatives ou semi-quantitatives grâce à un élément de reconnaissance d'origine biologique en contact direct avec un élément de transduction. De façon plus simple, un biocapteur est défini comme un outil analytique associant un composant biochimique (enzyme, anticorps, antigène, ADN, ARN, micro organisme….) à un transducteur qui assure la transformation du phénomène en signal électrique aisément exploitable.

I.3. Structure et principe de fonctionnement d'un Biocapteur

Un biocapteur se compose de deux éléments principaux: un élément biologique appelé biorécepteur qui reconnaît l'analyte cible et un transducteur, pour convertir l'événement de reconnaissance en un signal électrique mesurable. Les biorécepteurs peuvent être des enzymes, des tissus, des micro-organismes, des anticorps, des récepteurs cellulaires ou des matériaux d'origine biologique ou d'un composant biomimic intimement associé ou intégré dans un microsystème ou convertisseur physico-chimique de transduction qui peut être optique, électrochimique, thermométrique, piézoélectrique ou magnétique. La Figure I-1 représente le principe de fonctionnement d'un biocapteur permettant d'obtenir, à partir de l'espèce à détecter dans un milieu échantillon, toute l'information utile à son évaluation. Cette donnée pourra être traitée, enregistrée, stockée pour une utilisation ultérieure.

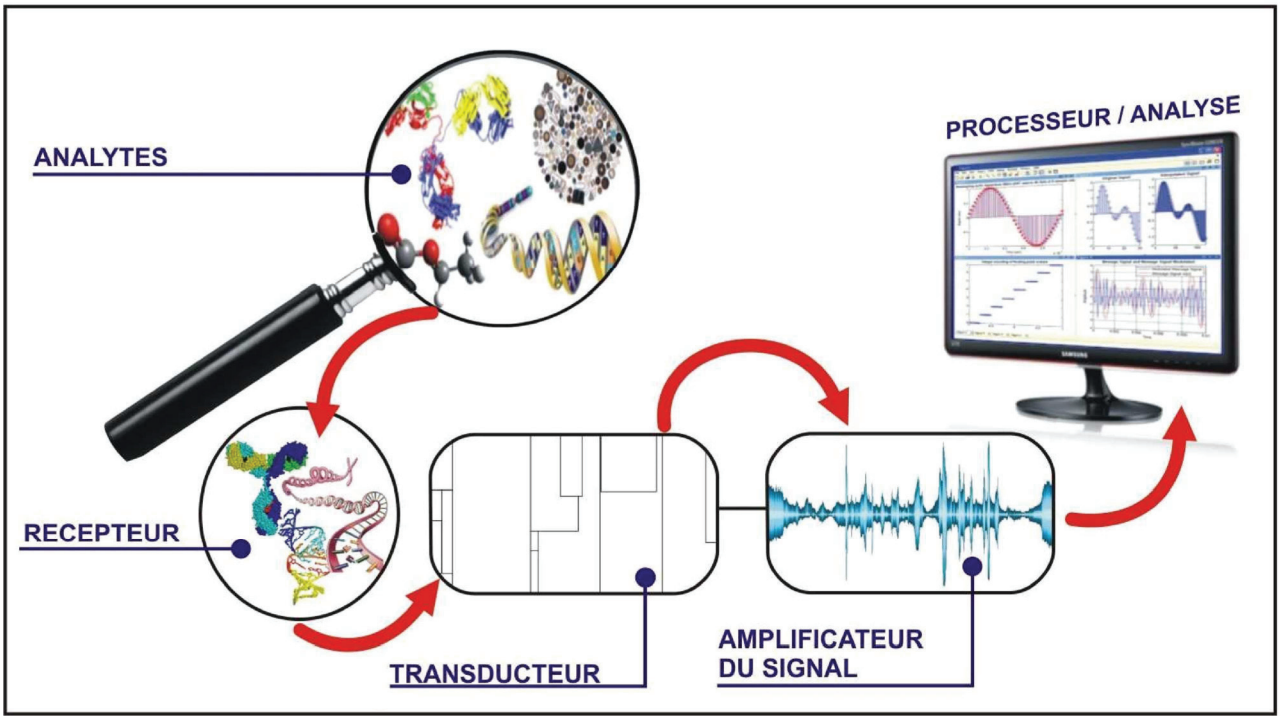


Figure I.1
Schéma principe du fonctionnement d'un biocapteur.

I.4. Qualité des capteurs de mesure

Il s'agit ici des caractéristiques qui permettent de qualifier le comportement d'un capteur et de déterminer s'il s'agit d'un « bon » ou d'un « mauvais » capteur (il est bien évident que ces jugements de valeur ne sont pas absolus et qu'il est fondamental d'apprécier les qualités du capteur par rapport à la nature de la grandeur à mesurer et aux conditions de mesure).

Ces qualités sont définies de la même manière pour les capteurs physiques et les capteurs chimiques :

- *Exactitude* (accuracy)

  Etroitesse de l'accord entre le résultat de la mesure et la valeur vraie de la grandeur mesurée.

- *Résolution* (resolution)

  Plus petit incrément de la valeur mesurée qui puisse être significativement mesuré par le capteur.

- *Fidélité* (fidelity, repeatability)
  L'aptitude d'un instrument de mesure à donner, dans des conditions définies, des réponses très voisines lors de l'application répétée d'un même signal d'entrée.

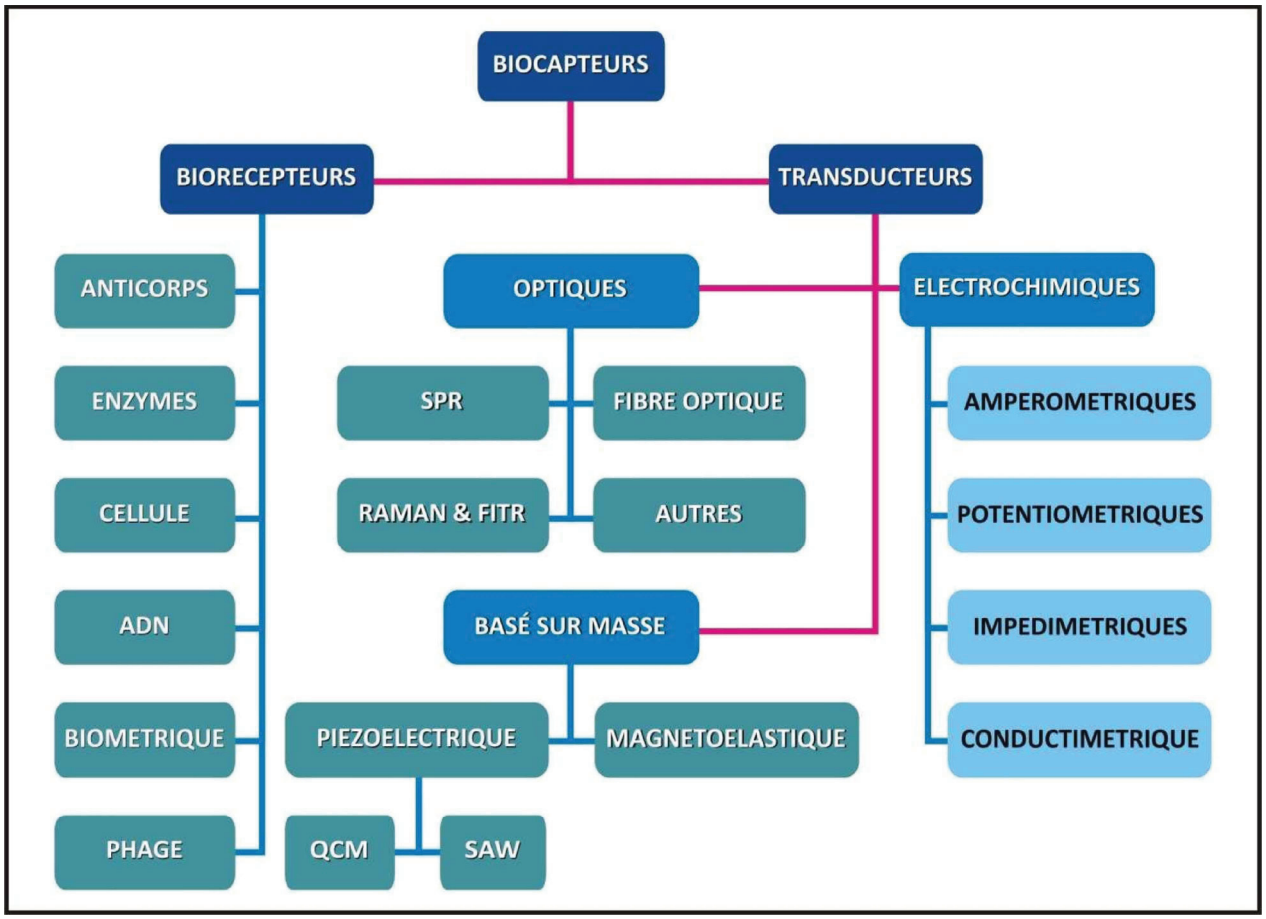
- *Sensibilité* (sensitivity)
  Quotient de l'accroissement de la réponse d'un instrument de mesure par l'accroissement correspondant du signal d'entrée.

- *Sélectivité* (selectivity)
  Il s'agit de la capacité du capteur à ne mesurer qu'une seule grandeur, ou, en d'autres termes, d'être le plus immune possible aux grandeurs d'influence, grandeurs qui ne font pas l'objet de la mesure, mais influent sur la sortie du capteur.

- *Limite de détection* (detection limit)
  C'est la plus petite valeur de la grandeur à mesurer pouvant être détectée par le biocapteur d'une façon significative différente du bruit de fond.

I.5 Classification des biocapteurs

Les biocapteurs peuvent être classés selon leurs types de biorécepteur, selon leurs modes de transducteur ou la combinaison entre les deux. La figure I.2 montre la classification des biocapteurs.



Figue I.2
Classification des biocapteurs

I. 6. Classification des biocapteurs selon la nature des biorécepteurs

- **Les biorécepteurs (couche sensible)**

La capacité d'un biocapteur à reconnaitre spécifiquement une molécule cible dépend directement de la couche sensible utilisée. Les biorécepteurs ou les éléments de reconnaissance biologique sont la clé de la spécificité des technologies des biocapteurs. Un biorécepteur est une espèce moléculaire qui utilise un mécanisme de reconnaissance biochimique spécifique. Les biorécepteurs qui sont couramment employés sont les enzymes et les anticorps. Mais les cellules entières, les organites cellulaires, les acides nucléiques ou encore les récepteurs de molécules biologiquement actives (hormones, toxines, facteurs de croissance, neurotransmetteurs...) peuvent aussi être utilisés (FigureI.3). Il est en fait possible d'utiliser toute molécule biologique permettant la reconnaissance spécifique de l' « analyte » recherché. Les composés biologiques fixés peuvent être séparés en deux catégories : ceux ayant une activité catalytique, comme les enzymes et les micro-organismes, et ceux fixant simplement l'analyte sans modification, comme les anticorps et

les récepteurs. L'étape de reconnaissance peut donc révéler un événement soit dynamique, soit statique. La reconnaissance dynamique est principalement employée pour les biocapteurs à enzyme, alors que la reconnaissance statique est surtout utilisée pour les biocapteurs mettant en œuvre la formation d'un complexe anticorps-antigène. Chaque type d'événement peut produire un changement transformé en un signal quantifiable par le transducteur [7].

Il est ainsi important de présenter les différentes classes des biorécepteurs utilisées pour la réalisation des biocapteurs.

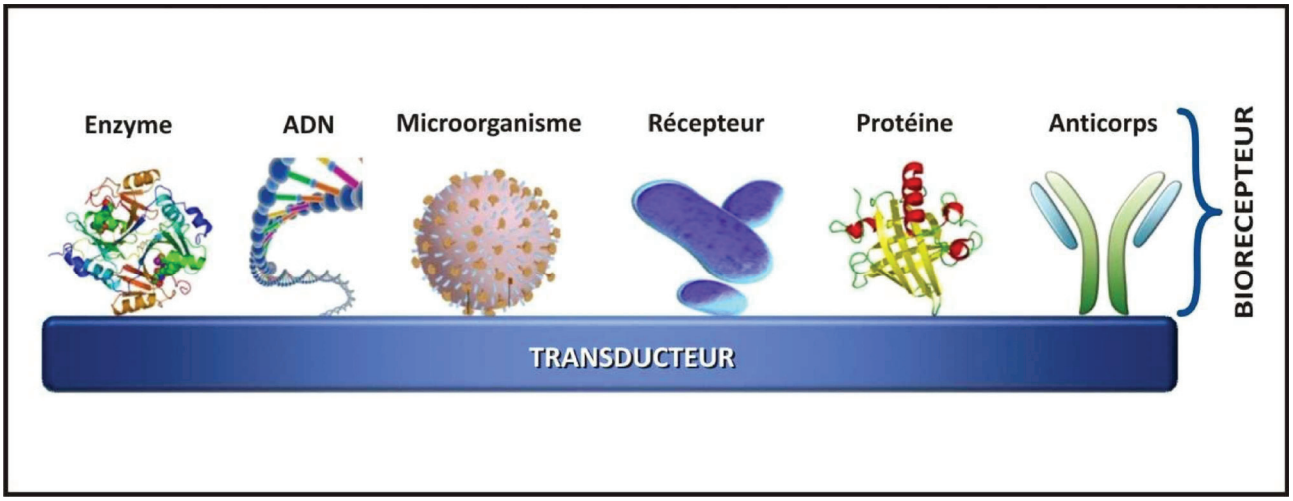


Figure I.3
Représentation schématique des différents biorécepteurs

I.6. 1. Les Anticorps

Les anticorps (Ac) ou immunoglobines (Ig) sont des glycoprotéines produite par l'organisme vivant suite à l'introduction d'un antigène étranger et capable de réagir spécifiquement avec lui et de le neutraliser.

Les anticorps sont des biorécepteurs couramment utilisés dans la fabrication des biocapteurs. Ils sont généralement immobilisés chimiquement à la surface du transducteur. L'immobilisation doit être judicieusement contrôlée afin d'assurer une orientation uniforme des sites récepteurs pour une réaction d'affinité optimale. L'interaction avec un antigène ou haptène est spécifique et peut être amplifiée à l'aide de marqueurs fluorescents ou enzymatiques. Les biocapteurs qui utilisent l'interaction antigène-anticorps sont appelés immunocapteurs.

Les anticorps peuvent être polyclonaux, monoclonaux ou recombinants, en fonction de leurs propriétés de sélectivité et la façon dont ils sont produits. Ils sont les molécules importantes du système immunitaire qui interviennent dans la reconnaissance de pathogènes, les immunoglobulines (Ig) sont un type d'anticorps. Chaque anticorps est spécifique pour un antigène particulier : un antigène peut être une protéine, un sucre, un lipide ou toute molécule qui attaque un organisme et active le système immunitaire. Les anticorps sont constitués de quatre chaînes polypeptidiques reliées par des ponts disulfures : deux de masse moléculaire 51 000 Da chacune, on les appelle chaines lourdes H (heavy) ; deux de masse moléculaire 22 000 Da chacune, on les appelle chaines légères L(light) (Da=Dalton, le dalton est l'unité de masse des atomes en biochimie, 1 Da = 1 g/mol). La partie de reconnaissance se trouve au niveau des chaines lourdes.

Trois classes principales d'immunoglobulines ont été décrites : les IgG, les IgA et les IgM, ainsi que deux classes secondaires : les IgD et les IgE. Il existe cinq types de chaines lourdes H, définissant cinq classes d'immunoglobulines : les chaines γ correspondent aux IgG , les chaines μ aux IgM, les chaines α aux IgA , les chaines ε aux IgE et les chaines IgD. Il existe également deux types de chaines légères L : χ (kappa) et λ (lambda) que l'on trouve indifféremment dans les cinq classes principales d'immunoglobulines.

La microscopie électronique a montré que les molécules d'immunoglobuline ont la forme d'un Y (Figure I.4) comportant deux extrémités remarquables. Chaque molécule d'anticorps présente deux sites de liaison (paratopes) de l'antigène (aux deux sommets du Y). Le déterminant antigénique est appelé épitope.

La formation d'un complexe antigène-anticorps peut être assimilée à un équilibre chimique :

$$\mathbf{Ac+Ag \leftrightarrow Ac\text{-}Ag,}$$

$$\mathbf{Keq=\frac{[Ac-Ag]}{[Ac][Ag]}.}$$

La constante d'équilibre Keq, représente la constante d'affinité de l'anticorps pour l'antigène. Elle dépend pour un couple antigène-anticorps :

- Du pH (qui modifie l'état ionique des groupements dissociables de l'antigène et de l'anticorps) ;
- De la température ;
- De la force ionique du milieu.

Les forces unissant l'antigène à l'anticorps sont des liaisons faibles, mais néanmoins nombreuses : forces de Van der Waals, forces électrostatiques, liaisons hydrogène, liaisons hydrophobes.

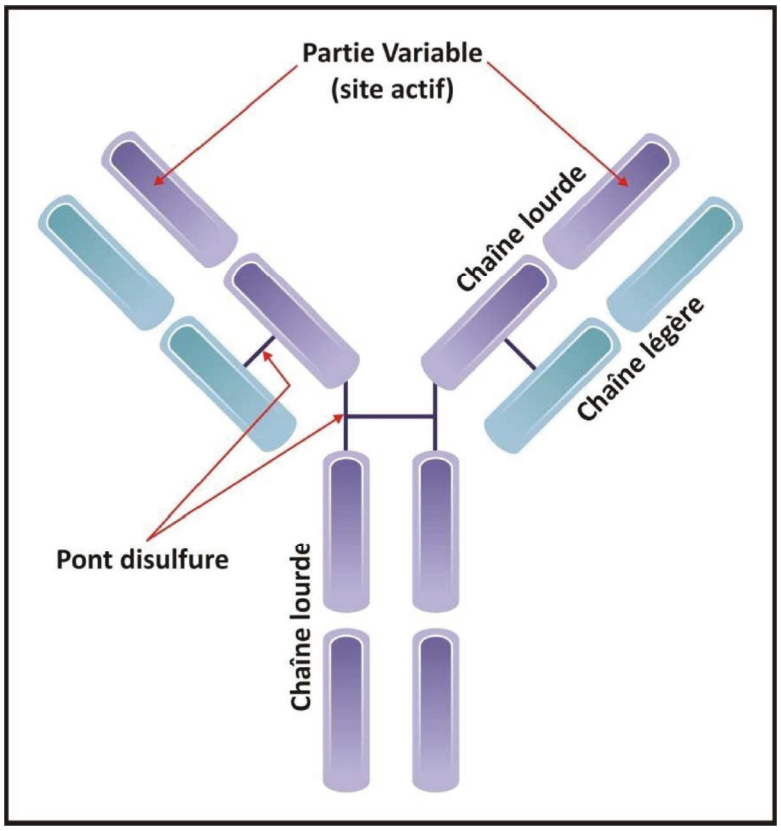


Figure I.4
Structure schématique d'une molécule d'anticorps

I.6. 2. Les Enzymes

Depuis le développement du premier biocapteur enzymatique par Clark et Lyons [2], l'utilisation d'enzymes comme élément de bioreconnaissance est un domaine bien développé et largement étudié. Les enzymes sont choisies en fonction de leur capacité de liaison spécifique et de leur activité catalytique.

Presque toutes les enzymes sont des protéines à l'exception de quelques enzymes ribonucleoprotéiques, dans lequel l'activité catalytique est dans l'ARN plutôt que dans la partie protéique. Elles sont donc constituées d'un nombre élevé d'acides aminés. La partie importante de l'enzyme est constituée d'un site actif. Le site actif est la région restreinte de l'enzyme, qui prend souvent la forme d'une cavité, au niveau de laquelle le substrat se fixe et pourra alors être soumis à l'action de l'enzyme afin de le transformer en produit (Figure I.5). Le site actif est en général enfoui dans la protéine.

Sa forme et celle du substrat sont exactement complémentaires. Le modèle de la clé et de la serrure est utilisé en général pour expliquer la spécificité de l'enzyme pour un seul substrat. Par exemple la glucose-oxydase est une enzyme spécifique qui ne catalyse pas l'oxydation des autres sucres comme le fructose ou le saccharose. Les enzymes ont pour mission d'accélérer (catalyser) des millions de fois les réactions chimiques dans les organismes vivants sans être consommées ou altérer les produits de la réaction [8, 9], d'où l'appellation de biorécepteurs catalytiques. Leurs propriétés fondamentales et leurs spécificités les rendent bien adaptées à la conception de biocapteurs sélectifs.

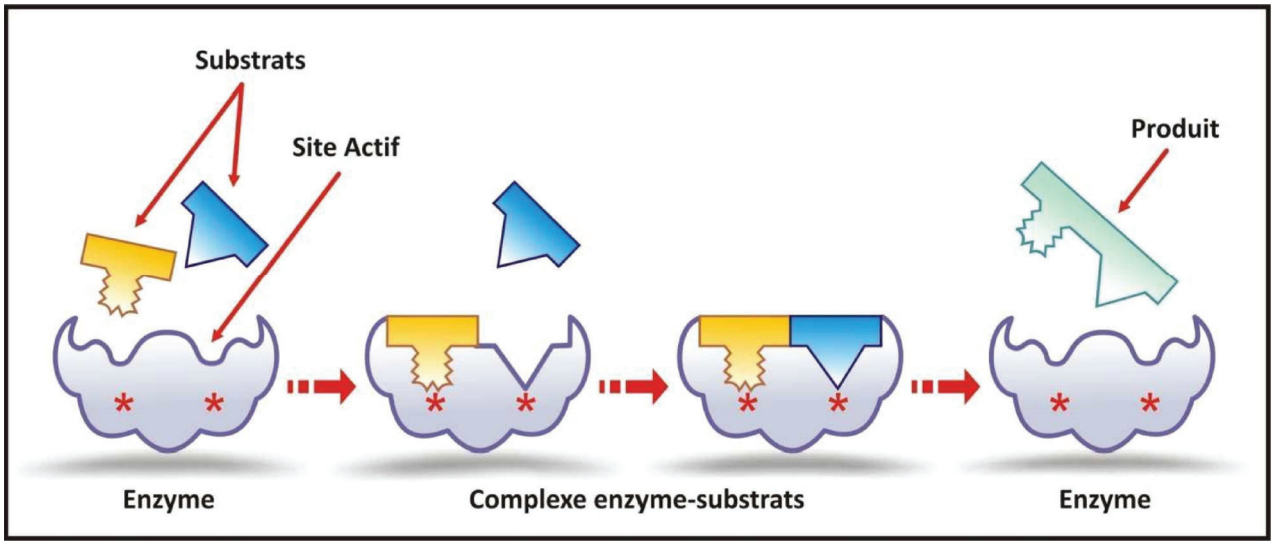


Figure I.5
Mécanisme réactionnel d'une réaction enzymatique

Le nom de l'enzyme renseigne sur le, ou les substrats spécifiques et sur le type de réaction catalysée. Il se termine par le suffixe *ase*. Par exemple la glucose-oxydase catalyse l'oxydation du glucose. Les oxydoréductases sont les enzymes les plus employées dans les capteurs électrochimiques.

On peut toutefois classer les enzymes en six catégories suivant la réaction biochimique qu'elles réalisent [10]:

- les oxydoréductases, qui catalysent des réactions d'oxydoréduction (comme la peroxydase) ;
- les transférases, qui transfèrent un groupement fonctionnel d'une molécule à l'autre (comme les méthyltransférases qui transfèrent un groupement méthyle) ;
- les hydrolases, qui hydrolysent des liaisons chimiques (comme les nucléases qui coupent l'ADN ou l'ARN) ;
- les lyases, qui rompent des liaisons mais en produisent de nouvelles simultanément (comme l'adénylate cyclase qui produit l'AMP cyclique à partir d'ATP) ;
- les isomérases, qui réarrangent les groupements fonctionnels d'une molécule pour former des isomères (comme les topoisomérases qui enroulent l'ADN) ;
- les ligases ou synthétases, qui permettent la jonction de deux molécules (comme les ADN ligases).

Dans une cellule vivante, toute activité met en jeu des réactions chimiques. Dans ces réactions, les liaisons chimiques des molécules organiques sont rompues, si bien que de nouvelles liaisons peuvent se former. Pour qu'une réaction démarre, les molécules ont besoin que leur environnement leur fournisse un apport initial d'énergie. Cette énergie est appelée énergie (E_A) d'activation, elle peut être perçue comme un obstacle énergétique qu'il est nécessaire de surmonter pour qu'une réaction puisse avoir lieu (figureI-6A).

Les enzymes sont des protéines qui abaissent l'énergie d'activation par différents mécanismes. Elles peuvent amener l'ensemble des molécules à prendre un état apte à réagir ou peuvent fournir un microenvironnement favorable à une réaction. Donc sans enzymes, une E_A ne pourrait pas être surmontée à la température normale d'une cellule. Les réactions chimiques s'effectueraient si lentement que la cellule en mourrait.

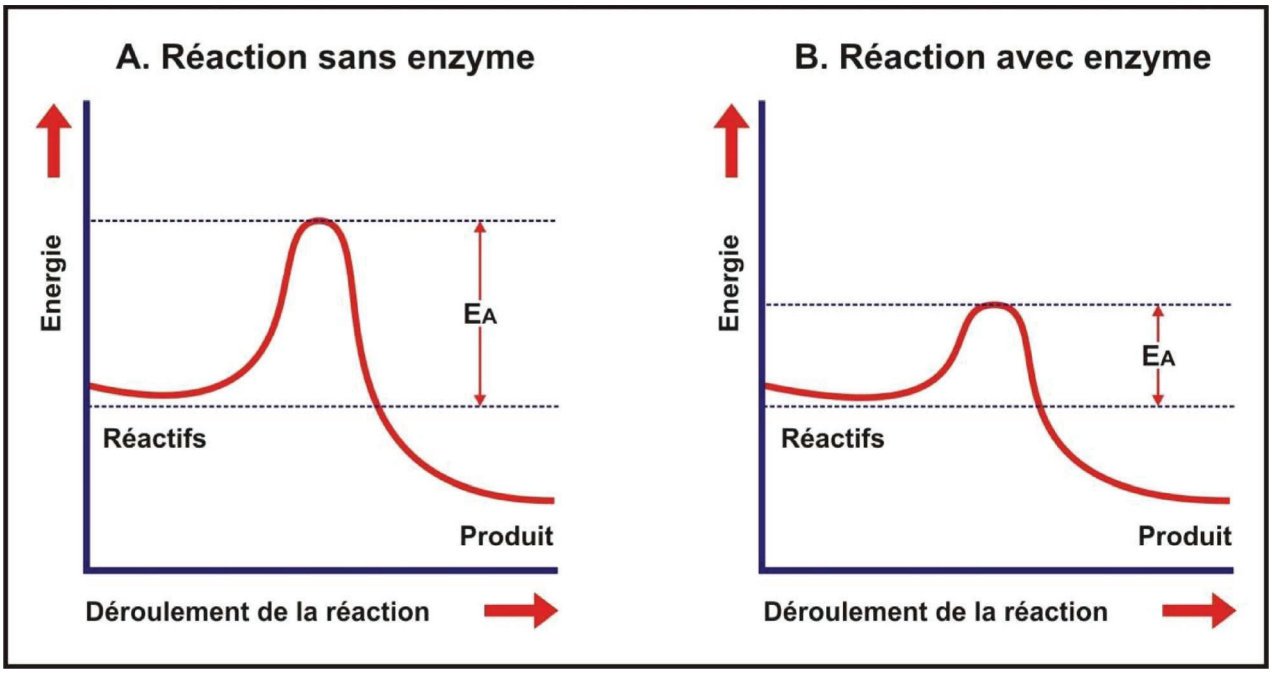


Figure I.6
A) Réaction sans enzyme, B) Réaction avec enzyme

E_A= énergie d'activation.

I. 6. 3. L'ADN :

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une macromolécule biologique présente dans toutes les cellules vivantes, elle renferme l'ensemble des informations nécessaires au développement et au fonctionnement d'un organisme. L'unité de base de cette information est le gène. Un gène est une petite séquence d'ADN particulière qui va être utilisée par la cellule pour synthétiser les protéines, les enzymes qui lui sont nécessaires pour assurer le bon fonctionnement de la machinerie cellulaire : respiration, division et croissance, échanges avec les autres cellules, lutte contre les agressions extérieures, dégradation ou transformation de différents métabolites...

La macromolécule d'ADN est formée par deux chaînes complémentaires qui s'emboîtent tout en s'enroulant l'une autour de l'autre pour former une double hélice droite (Fig.I.7). Chaque chaîne est constituée d'un squelette formé de phosphodiesters et de sucres (le ribose) en alternance. Chaque sucre porte en plus un groupe chimique appelé "base azotée" (une "lettre") du livre génétique; ces lettres sont: A (pour adénine), T (thymine), G (guanine) et C (cytosine). C'est le fait que les bases A et T, ainsi que G et C, peuvent s'appareiller entre elles qui permet la complémentarité des deux chaînes formant la double hélice. La complémentarité A-T et G-C fait que l'on parle alors de "paires de bases".

En plus de son rôle comme biomolécule d'intérêt biologique, l'ADN a suscité l'attention des chercheurs pour la mise au point de biocapteurs d'ADN. Ces derniers sont obtenus en immobilisant un ou deux brins d'acide nucléique sur la surface des transducteurs [11, 12]. Ces appareils servent à l'analyse in situ du cancer [13, 14], de pathogènes bactériens [15, 16], ou de mettre en évidence la détérioration des molécules d'ADN en présence de certains polluants [17, 18]. L'utilisation des molécules d'ADN double brin a été utilisée pour la détection rapide des toxines, des substances organiques cancérogènes [19, 20] ou encore dans l'identification de principes actifs anti-tumoraux [21, 22]. Le terme employé pour la réaction de reconnaissance ADN/ADN-complémentaire est plutôt celui d'hybridation.

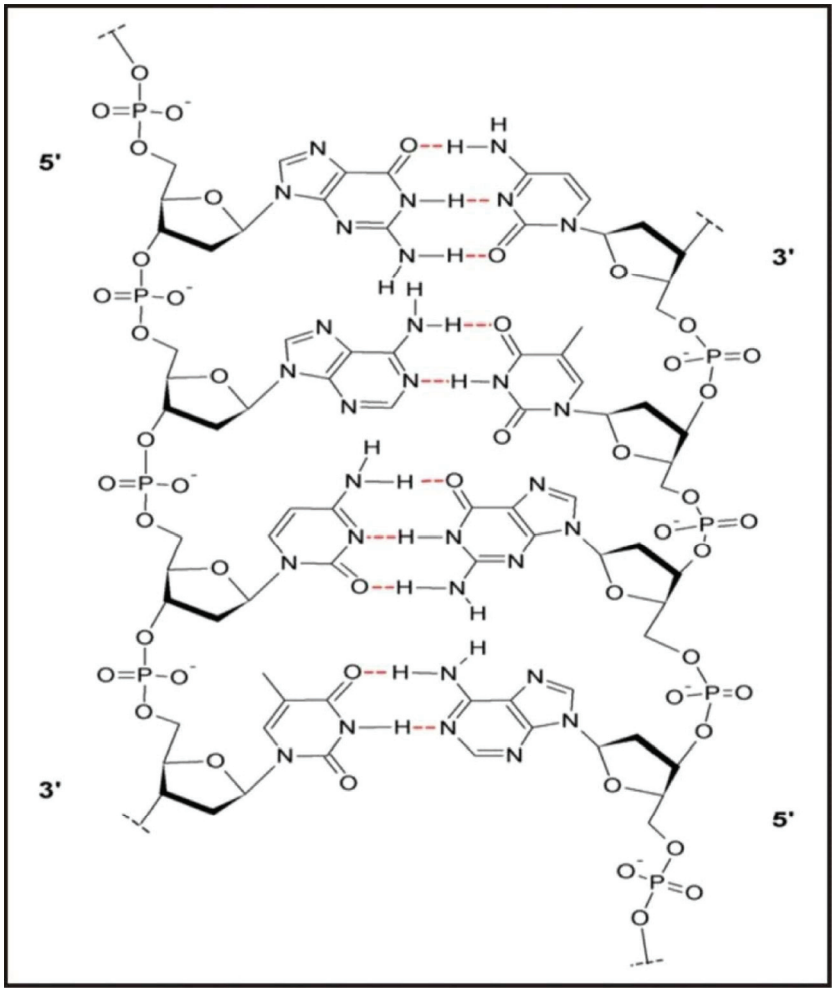


Figure I.7
Structure de l'ADN

I. 6. 4. Cellule entière :

L'utilisation de cellules vivantes dans le domaine des biocapteurs permet un suivi en temps réel du métabolisme cellulaire fournissant ainsi des informations précieuses permettant de détecter rapidement la toxicité de certains agents dans l'environnement [23]. Les biocapteurs cellulaires sont de nouveaux systèmes hybrides utilisant des cellules vivantes comme élément de reconnaissance pour mesurer les changements physiologiques causés par un stimuli interne ou externe [24-27]. L'utilisation de cellules vivantes a été suggérée pour remplacer les enzymes purifiées afin d'améliorer la réponse des biocapteurs. En effet, sous l'effet de molécules bioactives ou de substances toxiques, les cellules fournissent plus d'informations que des biocapteurs enzymatiques. De plus l'utilisation de cellules par rapport aux enzymes permet l'élimination des étapes d'extraction et de purification [28].

Parmi les inconvénients majeurs que représentent ces biocapteurs cellulaires est leur manque de spécificité liée à la présence d'un grand nombre d'enzymes. Pour pallier à ce problème les chercheurs ont fait appel à l'ingénierie génétique et à la biologie moléculaire, tout en procédant à des modifications génétiques par fusion de certains gènes avec des promoteurs, ces gènes rapporteurs pouvant être des gènes de sélection ou encore des gènes codant pour un caractère recherché ou permettant l'expression d'une molécule d'intérêt.

Plusieurs cellules de différentes natures ont été intégrées dans la conception des biocapteurs cellulaires, les plus communément utilisées sont les bactéries (Figure I.8) [29-31], les levures [32, 33], les algues [34-36] ou encore les moisissures [37].

L'utilisation de cellules entières permet ainsi d'obtenir des informations sur des cellules vivantes pour des applications dans des domaines très variés tels que la détection des pathogènes (virus, bactérie) [38], le criblage pharmacologique [39], les applications biomédicales et biotechnologiques [40] ainsi que les mesures environnementales [41, 42].

Les biocapteurs à base de cellule entière, selon leur mode de détection, peuvent être de nature électrique, optique ou piézoélectrique ou une combinaison de ces différents types [43] ou de nature électrochimique [44-46].

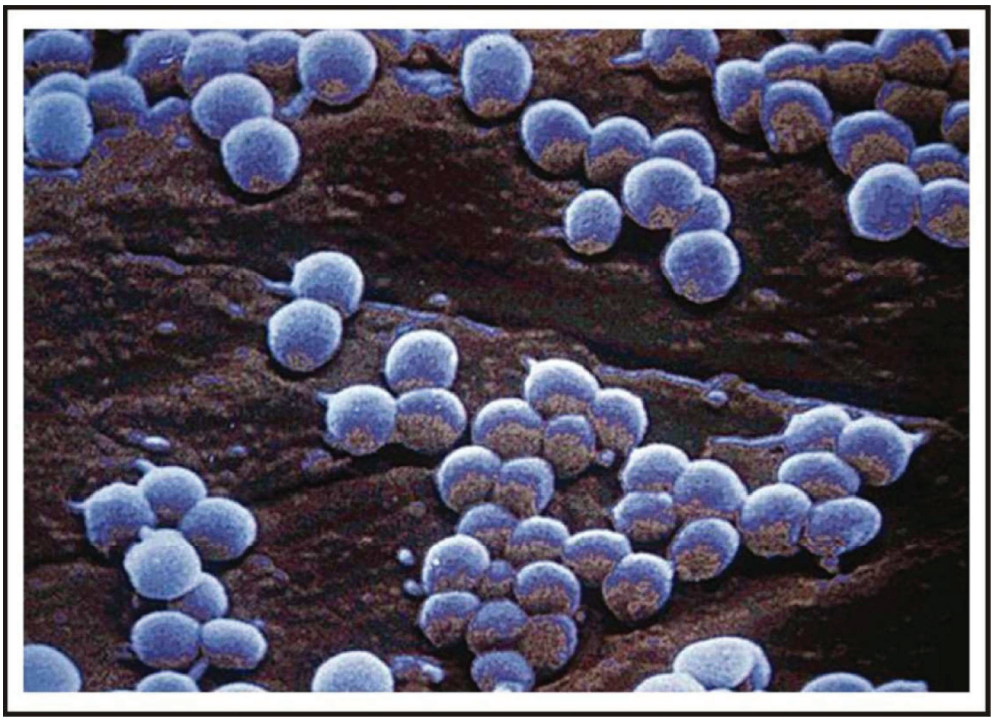


Figure I.8
Image microscopique de Cocci

I. 6. 5. Bactériophages

Récemment, les bactériophages sont utilisés comme éléments de bioreconnaissance pour l'identification de divers micro-organismes pathogènes. Ces bactériophages (phages) puissants sont des virus qui se lient à des récepteurs spécifiques sur la surface de la bactérie dans le but d'injecter leur matériel génétique à l'intérieur de la bactérie. Ces entités ont généralement des tailles de 20-200 nm [47]. Les phages reconnaissent les récepteurs bactériens par les protéines de queue et de pointes (Figure I.9). Etant donné que la reconnaissance est très spécifique, elle peut être utilisée pour le typage des bactéries et par conséquent elle a ouvert la voie à la mise au point de techniques de détection spécifiques de pathogènes. Des chercheurs ont rapporté l'application des phages comme un élément de bioreconnaissance pour la détection de divers pathogènes comme *E. coli* [47] , *Staphylococcus S. aureus* [48] et *spores B. anthracis* [49, 50] en utilisant différentes plates-formes de détection.

Comme il est incapable de se multiplier indépendamment, le bactériophage détourne le métabolisme de la cellule hôte pour forcer celle-ci à le répliquer.

Le cycle lytique d'un bactériophage est composé de cinq phases : l'adsorption du phage à la cellule hôte et la pénétration du matériel génétique viral, la synthèse de l'acide nucléique et des protéines virus, l'assemblage des virions complets et la libération des particules nouvelles à l'extérieur de la cellule hôte.

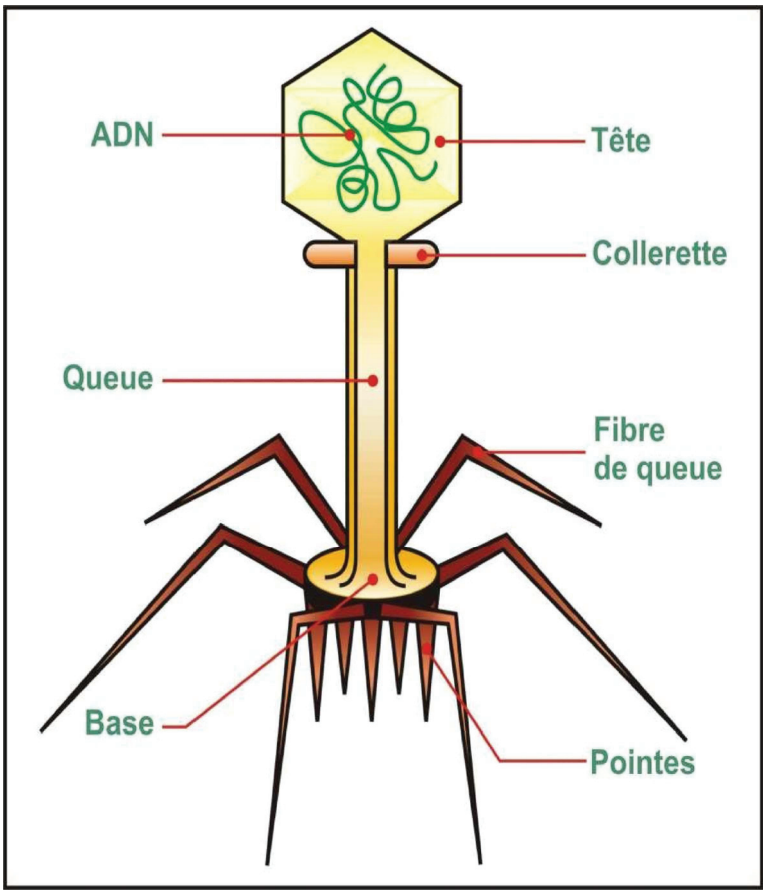


Figure I.9
Représentation schématique d'un phage

Les phages s'attaquent uniquement aux bactéries, généralement les jeunes bactéries en pleine croissance, dans lesquelles ils peuvent se reproduire. Ensuite, les bactéries se désintègrent et libèrent chacune 10 à 200 phages, qui vont faire de nouvelles victimes. La figure I.10 présente le scénario de l'attaque. Le phage s'attache à la surface de son hôte (1), et l'ADN est injecté dans la cellule. La "machinerie" cellulaire produit ensuite de nouveaux ADN phages et protéines phages (2;3). Les nouveaux phages s'assemblent à l'intérieur de la cellule bactérienne (4), qui est lysée (5) et les phages matures sont libérés.

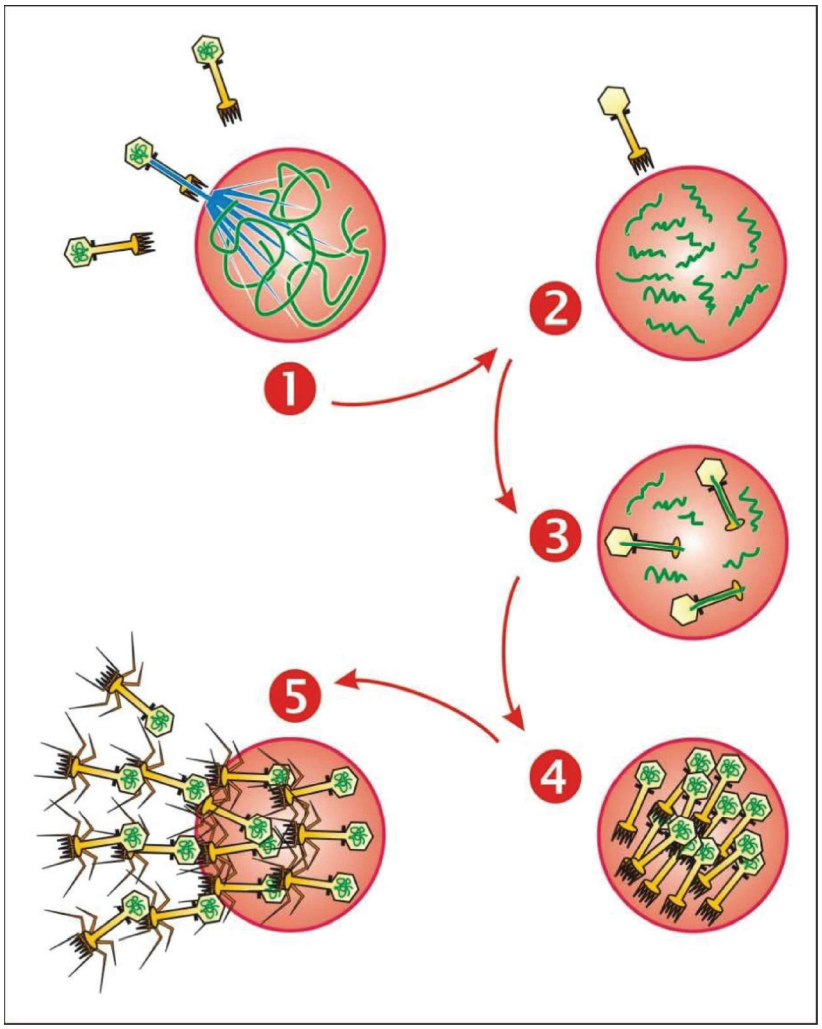


Figure I.10
Cycle lytique d'un bactériophage.

I. 6. 6. Les Acide Nucléiques Peptidiques (PNAs) :

Les acides nucléiques peptidiques (PNAs) figurent parmi les biorécepteurs de synthèse. Il s'agit d'oligo-amide artificiel composé d'une répétition d'unités N-(2-aminoethyl)-glycine reliées chacune à une base nucléique par une liaison méthylène carbonyle (Figure I.11), qui se greffe sur l'acide nucléique (ADN et ARN) de séquence complémentaire formant un complexe de stabilité très élevée [51]. Les progrès récents dans la reconnaissance d'acides nucléiques, comme l'introduction d'acide nucléique peptidique (PNA) a ouvert des opportunités intéressantes pour les biocapteurs à ADN. En effet le PNA est un ADN synthétisé dans lequel le squelette sucre-phosphate est remplacé par un pseudo-peptide.

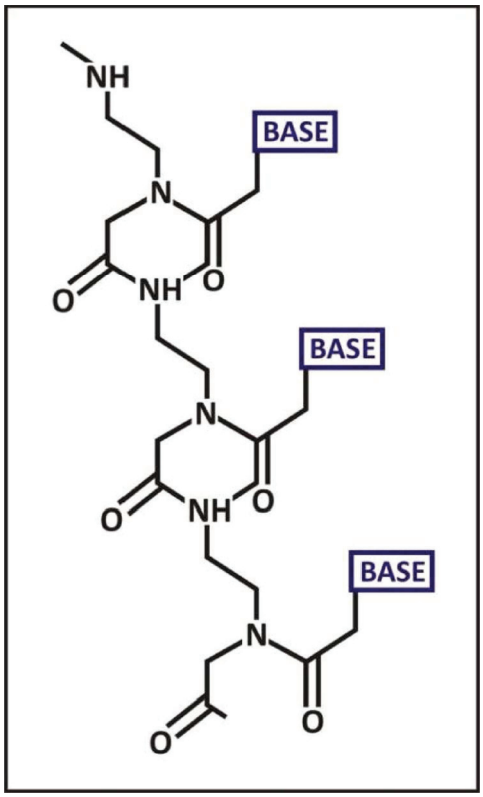


Figure I.11
Structure d'un acide nucléique peptidique

L'utilisation de l'acide nucléique peptidique comme molécule sonde présente plusieurs avantages tels que des caractéristiques de qualité d'hybridation, la détection de mésappariements d'une seule base et une amélioration de la stabilité enzymatique par rapport à des acides nucléiques et chimiques.

En outre, sa structure moléculaire différente permet de nouveaux modes de détection sans marquage et de contribuer de façon significative à la mise en place d'un processus d'analyse fiable, rapide et stable. Dans le cas de l'utilisation de biorécepteurs d'acide nucléique pour la détection de pathogènes, l'identification des séquences spécifiques est obtenue en faisant correspondre les paires de bases complémentaires par hybridation sur un brin d'ADN spécifique de cet organisme.

Etant donné que chaque organisme possède des séquences uniques d'ADN, toute autoréplication d'un micro-organisme peut être facilement identifiée. Les biocapteurs à base d'acide nucléique comme élément de bioreconnaissance sont simples et rapides, et donc ils sont largement utilisés dans la détection de pathogènes. Contrairement aux enzymes ou aux anticorps, les films de reconnaissance des acides nucléiques peuvent être facilement synthétisés et régénérés.

Des biocapteurs à base d'acide nucléique peptidique ont été utilisés pour la détection des pathogènes alimentaires tels que *E. coli O157*: H7 [52] et *Salmonella ssp* [53]. Les puces d'hybridation d'ADN ont été suggérées comme une plate-forme pour la détection simultanée de plusieurs micro-organismes pathogènes dans les aliments en un temps relativement court. La reconnaissance de l'acide nucléique en utilisant les PNAs comme élément de bioreconnaissance a été rapportée par de nombreux chercheurs [54-59].

Les biocapteurs à base PNA peuvent être utilisés pour détecter des agents pathogènes recherchés avec une grande stabilité et une affinité accrue pour des séquences cibles. Mais le principal inconvénient du PNA est que la synthèse est très coûteuse. Les autres inconvénients du PNA sont: peu solubles en milieu aqueux, de plus, les longs oligomère de PNA, en fonction de leur séquence, sont sujets à l'agrégation, difficiles à purifier et difficiles à caractériser [60].

I. 6. 7. Polymères à empreintes moléculaires (MIPs) :

L'impression moléculaire est l'une des techniques de fabrication des sites de reconnaissance artificielle par la formation d'un polymère autour d'une molécule qui peut être utilisée comme modèle. Les polymères à empreintes moléculaires (ou MIPs en anglais pour Molecularly Imprinted Polymers) sont apparus récemment en vue de mimer les récepteurs biologiques (anticorps, recepteurs, enzymes) [61].

Ils peuvent être synthétisés pour toute molécule d'analyte et sont capables de reconnaître les molécules cibles avec des affinités et des spécificités égales à celles des éléments de reconnaissance biologique. La synthèse est généralement réalisée dans un solvant aprotique et peu polaire (dichlorométhane) en présence de monomères préalablement choisis pour leur capacité à développer de fortes interactions non covalentes (liaisons hydrogènes) avec la molécule empreinte. Après polymérisation autour de cette molécule, son élimination conduit à la présence de cavités spécifiques (figure I.12). Ainsi, lors de la détection d'un échantillon, le MIP retient sélectivement la molécule empreinte et des composés de structure proche.

Les MIP offrent comme avantages une grande stabilité chimique et physique, une faible quantité de molécules bioactives nécessaires, et la possibilité de répartir spatialement les groupes fonctionnels de sorte à préserver les sites actifs de reconnaissance.

L'utilisation de polymères à empreinte moléculaire peut résoudre les problèmes les plus souvent rencontrés tels que la stabilité thermique, l'influence du pH sur le comportement ou la conservation dans le temps. En effet, la structure polymérique offre des propriétés de stabilité, de robustesse et de reproductibilité dans des conditions sévères [62] qui ont poussé le développement de tels biorécépteurs.

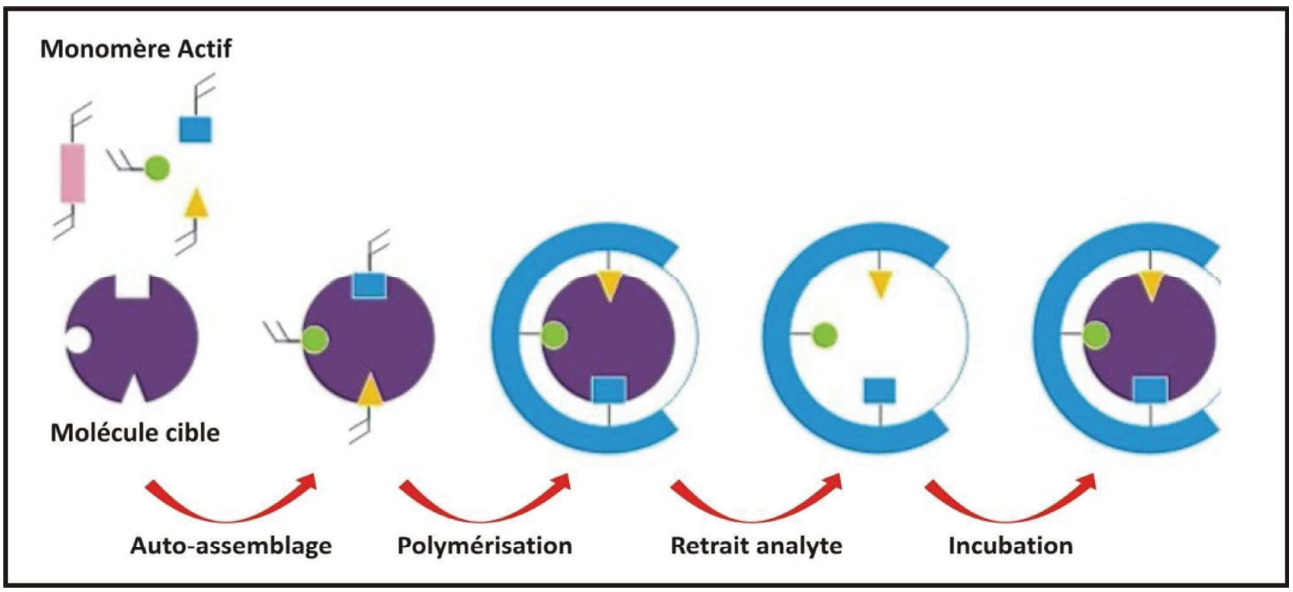


Figure I.12
Principe d'assemblage spécifique des polymères à empreinte moléculaire (MIP).

I. 6. 8. Les Aptamères :

Récemment de nouvelles molécules de synthèse sont apparues et présentent une aptitude à être utilisées comme biorécepteur à savoir les aptamères, c'est à cette famille que nous nous sommes intéressés dans la première partie expérimentale de ce manuscrit.

Les aptamères sont des simples brins d'ADN ou d'ARN qui ont une capacité de reconnaître différentes cibles, notamment des protéines, avec de fortes affinité et spécificité. Ils sont faciles à immobiliser à la surface d'un biocapteur et peuvent être synthétisés de façon reproductible et en grande quantité [63].

Dans ce travail, nous avons utilisé un aptamère pour la reconnaissance de la thrombine et nous développerons plus en détail la sélection et la fixation des aptamères sélectionnés sur les transducteurs électrochimiques dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

I. 7. Classification des biocapteurs selon le type de transduction :

- **Le Transducteur**

Le transducteur assure, par l'intermédiaire de moyens de détection optique, électrochimique, calorimétrique, piézoélectrique ...., la conversion d'une grandeur à analyser (par exemple la concentration) en un signal électrique (charge, tension, courant) quantifiable.

La combinaison d'un récepteur et d'un transducteur devrait déboucher sur un grand nombre de biocapteurs. En réalité, il faut qu'il y ait compatibilité entre le transducteur et le récepteur pour l'obtention d'un signal électrique car on ne peut pas, par exemple, utiliser un transducteur thermique si la réaction de transformation de la substance cible ne donne pas lieu à une variation d'enthalpie. Les transducteurs électrochimiques couplés à des récepteurs sont relativement faciles à réaliser en pratique car ces composants sont souvent disponibles sur le marché ou peuvent être obtenus assez facilement.

Sur la figure I.13, la grandeur physico-chimique objet de la mesure est représentée par « m ». Le capteur soumis à l'action de cette grandeur présente un signal de nature électrique désignée par « s » et qui est fonction de « m » :

$$s = F(m)$$

Pour tout capteur, cette relation est explicitée par un étalonnage : pour un ensemble de valeurs de m connues avec précision, on mesure les valeurs correspondantes de « s » (figureI.13 a) ; par cette relation à toute valeur mesurée de « s », on peut déterminer la valeur de « m » correspondante. (figure I.13b).

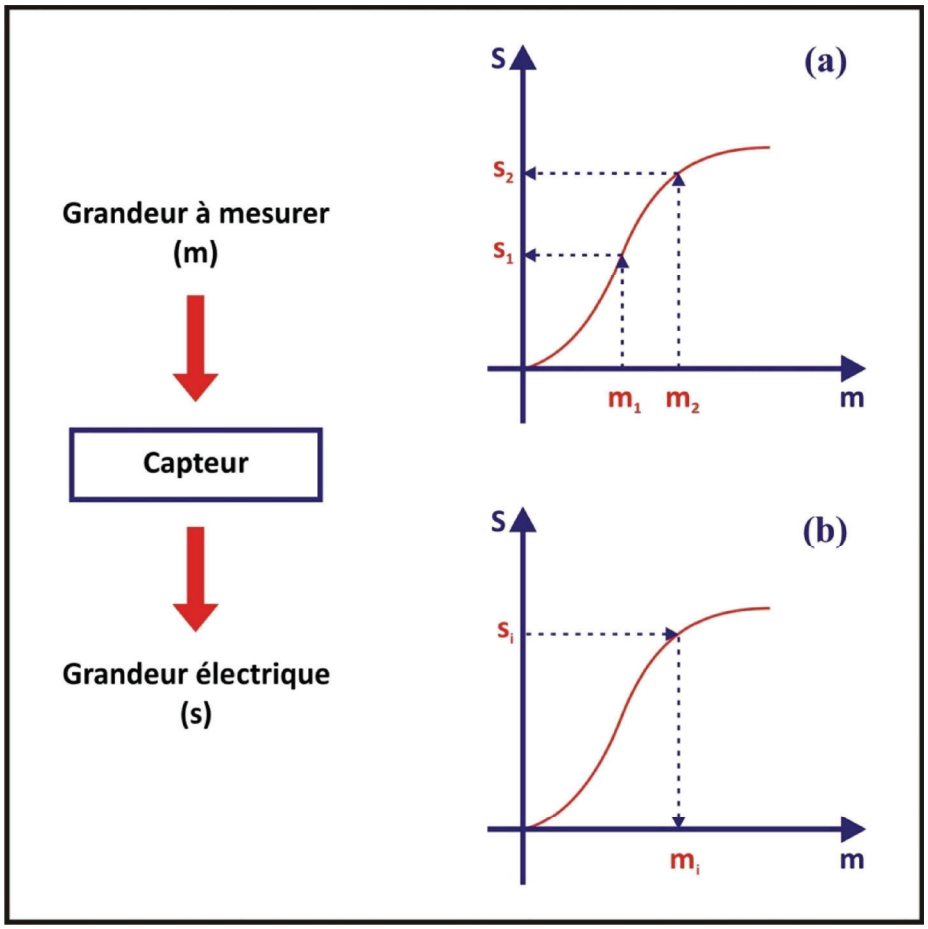


Figure I.13
Courbes d'étalonnage d'un capteur

(a) son établissement à partir de valeur connue de « m »

(b) son exploitation à partir des valeurs mesurées de la réponse « s » du capteur

Différentes méthodes de détection peuvent être mises en œuvre incluant les méthodes optiques, mécaniques, électriques ou encore électrochimiques. Nous nous attachons donc dans ce paragraphe, à présenter quelques exemples de ces modes de détection.

I. 7. 1. Transduction piézoélectrique

La piézoélectricité (du grec « piézein » presser, appuyer) est la propriété possédée par certains corps qui se polarise électriquement sous l'action d'une contrainte mécanique. Inversement ces corps peuvent se déformer sous l'action d'un champ électrique, c'est un processus réversible. La piézoélectricité traduit donc l'interdépendance des propriétés électriques et mécaniques de certains matériaux.

Ce phénomène a été découvert pour la première fois au XIXème siècle par les frères Pierre et Jacques Curie quand ils ont montré que le quartz soumis à une tension électrique, vibre à une fréquence très stable et bien définie.

Les matériaux piézoélectriques sont de différentes natures, ils peuvent être des matériaux naturels (quartz, topaze, tourmalite, berlinite…) ou artificiels (céramiques, polymères …). Le quartz est le cristal le plus utilisé (Figure I.14) pour des applications analytiques vu les propriétés électrique, mécanique et chimique qu'il présente.

Figure I.14
Quartz minéral

La microbalance à quartz (QCM) [64, 65] est le mode de transduction piézoélectrique le plus utilisé dans le domaine des biocapteurs. Elle comprend un quartz métallisé (généralement un disque de 10 à 16 mm de diamètre avec une épaisseur d'environ 0,15 mm) sur lequel les biorécepteurs sont immobilisés (Figure I.15). Une tension alternative est appliquée, la fréquence de résonance varie en présence d'espèces chimiques ou biologiques adsorbées sur le quartz. La loi de Sauerbrey permet de calculer, à partir de la variation de fréquence de résonance, la masse déposée sur la surface de quartz (EqI.1). Cependant, cette équation ne s'applique que pour des dépôts uniformes, rigides et minces.

$$\Delta f = -2.3 \times 10^{-6} \times f_0^2 \frac{\Delta m}{A} \text{.....(EqI.1)}$$

Avec

Δf : écart de fréquence à la résonance (en Hz) ;

$\mathbf{f_0}$ fréquence fondamentale de résonance du cristal (en Hz) ;

$\Delta \mathbf{m}$: variation de masse (en g) ;

A : surface de l'électrode (en cm^2).

La microbalance à quartz est une technique de biodétection très sensible avec une grande spécificité capable de mesurer des changements de masse de l'ordre du nanogramme [66] ceci signifie que cette technique permet de mesurer des changements de masse équivalent à une monocouche d'atomes, la rendant extrêmement attractive dans de nombreux domaines d'application.

Elle est peu coûteuse du fait qu'elle repose sur une instrumentation simple et légère. La sensibilité obtenue est environ 100 fois supérieure à celle d'une balance électronique [67].

Les biocapteurs piézoélectriques ont été utilisés dans le domaine de l'agroalimentaire [68], dans le domaine de l'environnement pour la détection de composés organiques volatils ou de bactéries pathogènes [69] ou dans celui de la santé humaine pour le diagnostic rapide de certaines maladies[70].

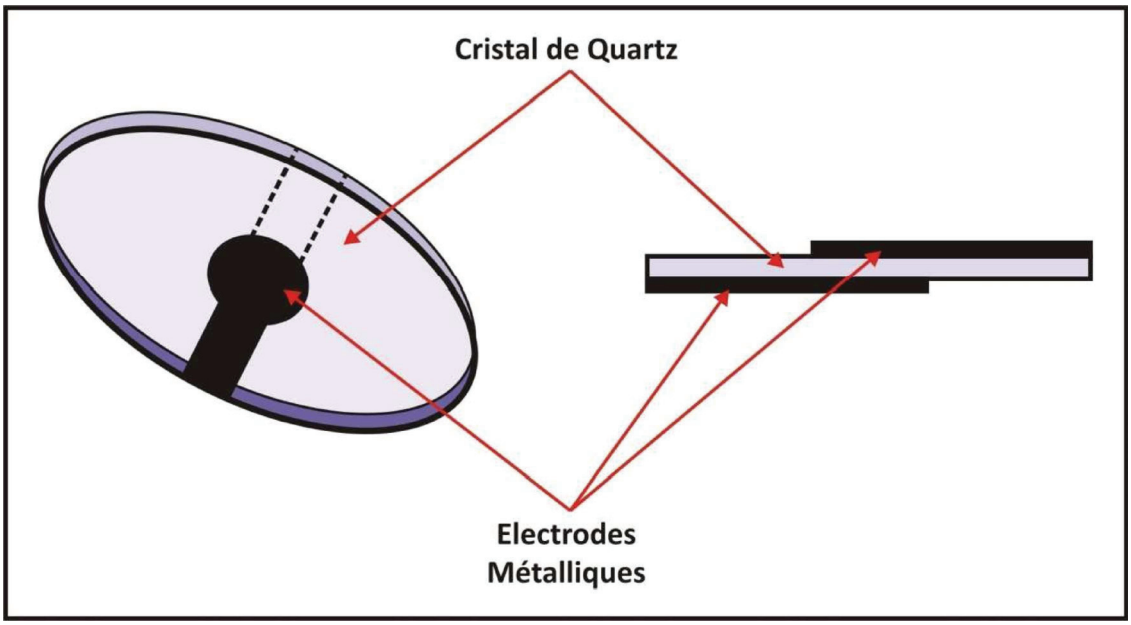


Figure I.15.
Représentation schématique d'une microbalance à quartz

I. 7. 2. Transduction thermique

Les biocapteurs à transduction thermique sont appelés biocapteurs thermométriques ou biocapteurs enthalpimétriques et permettent la détection de l'énergie calorifique qui se produit dans une réaction chimique catalysée par des enzymes ou des micro-organismes. Cependant, la chaleur ne peut pas être parfaitement confinée dans un système adiabatique et présente toujours une perte d'information car la chaleur produite est en partie perdue par rayonnement, conduction ou convection ce qui rend ces biocapteurs peu sensibles ; ils nécessitent des montages différentiels très bien équilibrés afin de compenser toute variation de température parasite.

La quantité de chaleur produite ou absorbée est proportionnelle à l'enthalpie molaire et au nombre total de molécules réactives. La variation d'enthalpie est utilisée à la variation de température selon la relation :

$$\Delta T = \frac{n\Delta H}{Cp} \quad \text{..... (Eq I.2)}$$

Avec

n : nombre de moles de substrat ayant réagi ;

ΔT : variation de température ;

ΔH : variation d'enthalpie ;

Cp : capacité calorifique totale du système.

Les biocapteurs thermiques peuvent être basés sur des thermistances ou des piles. Plusieurs composés importants pour le contrôle de la qualité des denrées alimentaires ont été déterminés en utilisant des transducteurs thermiques, y compris l'acide ascorbique, le glucose, le lactate, le galactose, l'éthanol, le saccharose, la pénicilline G, la céphalosporine et de l'acide oxalique [71-74]
Il faut noter aussi que des enzymes, des cellules microbiennes et des anticorps ont été également utilisés dans ces dispositifs pour des dosages immuno-enzymatiques thermométriques (TELISAs).
Cette technique a été appliquée à des tests de contamination microbienne dans les produits alimentaires [72].

I. 7. 3. Transduction Optique

Les techniques optiques utilisées dans le domaine des biocapteurs sont très nombreuses et peuvent être utilisées pour mesurer : de l'absorbance, de la chimiluminescence, de la fluorescence, de la résonance plasmonique de surface, de l'onde évanescente etc.
La reconnaissance moléculaire, dans ce mode de transduction, se traduit par des changements de propriétés optiques comme l'absorption, la diffusion, ou l'indice de réfraction.

Les transducteurs optiques sont parmi la catégorie des biocapteurs les plus populaires et les plus répandues à des fins de détection du fait de leur sélectivité et leur sensibilité. Ils ont un caractère non destructif, qui permet de faire des mesures in situ et en temps réel, ce qui permet de suivre la cinétique de croissance.

Aussi ces biocapteurs optiques offrent la possibilité d'être miniaturisés et une capacité de détection simultanée de plusieurs analytes.

Plusieurs capteurs optiques ont été proposés pour l'analyse biomédicale, agro-alimentaire et environnementale.

- **Fibre optique**

  Les capteurs à fibres optiques sont issus de la rencontre de deux technologies : les fibres optiques utilisés en télécommunication et l'optoélectronique [75]. Ces deux technologies ont connu un développement extraordinaire ces deux dernières décennies notamment au niveau de l'amélioration des performances, de la diminution des coûts et miniaturisation. Tout cela permis l'émergence de ces biocapteurs avec de nombreux avantages :

  - ✓ La fibre optique présente le plus haut degré de miniaturisation d'un composant optique,
  - ✓ Elle s'affranchit des problèmes liés aux déplacement mécaniques des appareillages traditionnels (ex : prisme pour la SPR (Résonance plasmonique de surface)…) ;
  - ✓ Ce type de capteur permet d'obtenir des mesures dans des endroits peu accessibles ou hostiles et est capable de transporter l'information sur la grandeur mesurée sur une longue distance.

- ✓ Il faut également signaler leur inertie chimique, leur compatibilité avec une large gamme de modifications de surface, la disponibilité de lasers bon marché et de photodétecteurs [76].

Une fibre optique est un guide d'onde composé d'un cœur en silice d'indice optique n_1, entourée d'une gaine d'indice légèrement inférieur n_2, le milieu ambiant ayant un indice n_0 [77] (Figure I.16).

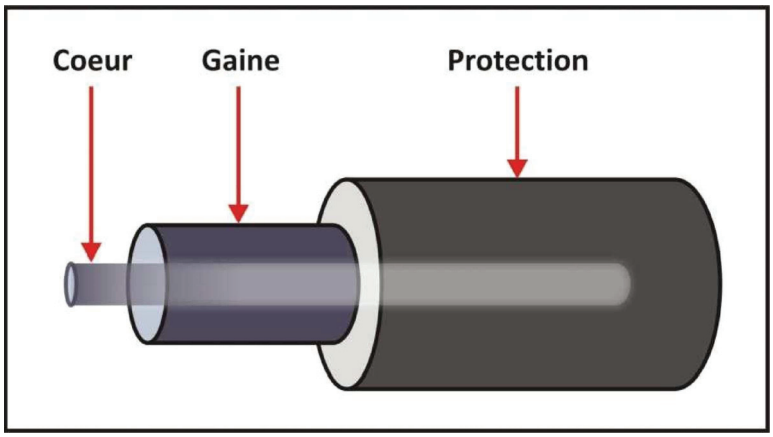


Figure I.16
Schéma d'une fibre optique

Les conditions de guidage de la lumière sont définies par :

$$\mathbf{n_0^2 \sin^2\theta_0 = n_1^2 - n_2^2} \quad \text{..... (EqI.3)}$$

Où $\boldsymbol{\theta_0}$ est l'ouverture numérique de la fibre ou l'angle d'injection limite du rayon incident.
Les biocapteurs à fibres optiques peuvent être classés en deux catégories [77] :

- **Les capteurs extrinsèques** le matériau spécifique se trouve en bout de fibre, c'est en général une substance dont l'absorption est modifiée en présence de l'espèce à détecter ou qui présente des propriétés de fluorescence qui sont modifiées en présence de l'espèce à détecter. Une fibre conduit la lumière excitatrice, une seconde fibre transporte le signal émis par le matériau spécifique jusqu'à un détecteur [78].

- **Les capteurs intrinsèques** mettent en jeu les caractéristiques propres de la fibre et en particulier la modulation du champ évanescent à l'interface cœur/gaine en présence de l'espèce à détecter. Ce sont, par exemple, des capteurs interférométriques qui exploitent les changements de phase de la lumière transmise. Dans le cas d'un biocapteur, une partie de la

fibre dénudée constitue l'élément sensible du biocapteur. La surface de cette partie est fonctionnalisée par des molécules spécifiques d'intérêt. Lorsque la fibre est polarisée par une source de lumière, la couche sensible cause un changement d'indice de réfraction en présence de l'espèce à détecter, d'où la variation de l'intensité de la lumière mesurée. Ce type de capteur peut être utilisé aussi pour détecter des variations de pression, de température ou de champ magnétique, mais aussi de la composition d'une atmosphère gazeuse [79-81].

- **Interféromètre de Mach- Zender**

Ce type de capteur repose sur la perturbation de la lumière se propageant dans un bras d'un guide optique. Quand une lumière se propage dans un guide d'onde optique par l'intermédiaire de la réflexion interne totale, un champ évanescent s'établit à l'interface cœur/gaine et se prolonge jusqu'au bout du guide. Si la surface du guide d'onde est fonctionnalisée par des molécules spécifiques d'intérêt, la couche sensible cause un changement d'indice de réfraction et la vitesse de phase du mode guidé diminue.

Dans une configuration typique de l'interféromètre Mach-Zehnder, la lumière de guidage est divisé en deux branches par l'intermédiaire d'une jonction Y. Une branche fonctionnalisée est utilisée comme bras sensible alors que l'autre sert de branche de référence (figure 1.17). A la sortie, la lumière propagée dans les deux branches est réunie dans une deuxième jonction Y, et il en résulte une interférence. L'intensité de la lumière obtenue est mesurée par un détecteur photoélectrique. Un changement au niveau de la surface du capteur provoque un changement de l'indice de réfraction de la branche contenant l'élément sensible, il en résulte alors un changement de l'intensité de la lumière détectée I.

Des mesures interférométriques différentielles peuvent être réalisées grâce à la configuration toute particulière de ce dispositif ce qui permet l'élimination du problème d'interactions non spécifiques.

Ce type de capteur permet de faire des mesures avec une grande sensibilité et une grande précision.

Le premier biocapteur basé sur ce principe a été réalisé pour le développement d'un immunocapteur pour la gonadotrophine chorionique en 1993 [82], par la suite, beaucoup de chercheurs se sont intéressés à ce types de biocapteurs et les études scientifiques sont nombreuses sur ce sujet [83-86].

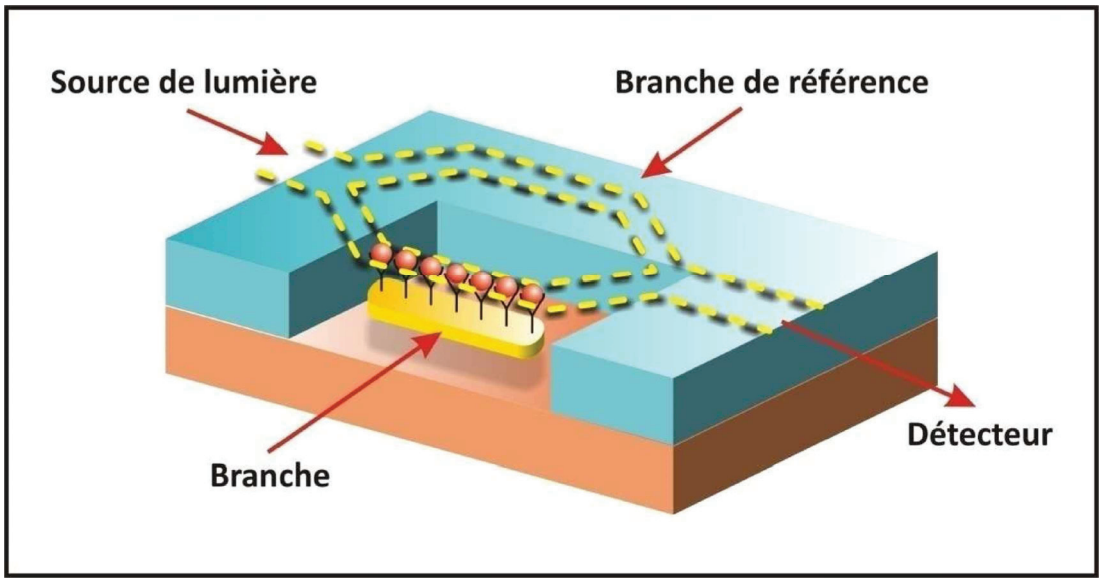


Figure I.17
Schéma de principe d'un interféromètre Mach-Zender.

- **Résonance plasmonique de surface (SPR)**

La résonance plasmonique de surface est une technique analytique optique qui repose sur l'oscillation de densité de charge qui existe à l'interface de deux milieux présentant des constantes diélectriques de charges opposées, un métal et un diélectrique.

Lorsqu'un rayon de lumière monochromatique illumine une interface entre ces deux milieux d'indices de réfraction différents, une partie de la lumière incidente est réfléchie sur l'interface et l'autre partie de la lumière est réfractée à travers la surface.

En pratique, c'est la configuration de Kretschmann [87] qui est la plus employée dans le développement des instruments SPR. En fait, une source de lumière monochromatique polarisée est envoyée vers l'interface entre les deux milieux (verre et solution biologique) (figure I.18).

Le verre est recouvert d'un film mince métallique (d'une épaisseur inférieure à celle de la longueur d'onde de la lumière). L'intensité de la lumière réfléchie diminue fortement pour θ égal à l'angle incident spécifique (appelé angle de résonance des plasmons de surface). Cette extinction est due au transfert de l'énergie de résonance entre l'onde évanescente et les plasmons de surface. Les conditions de résonance dépendent de la nature et de l'épaisseur du film métallique et du matériel adsorbé à la surface.

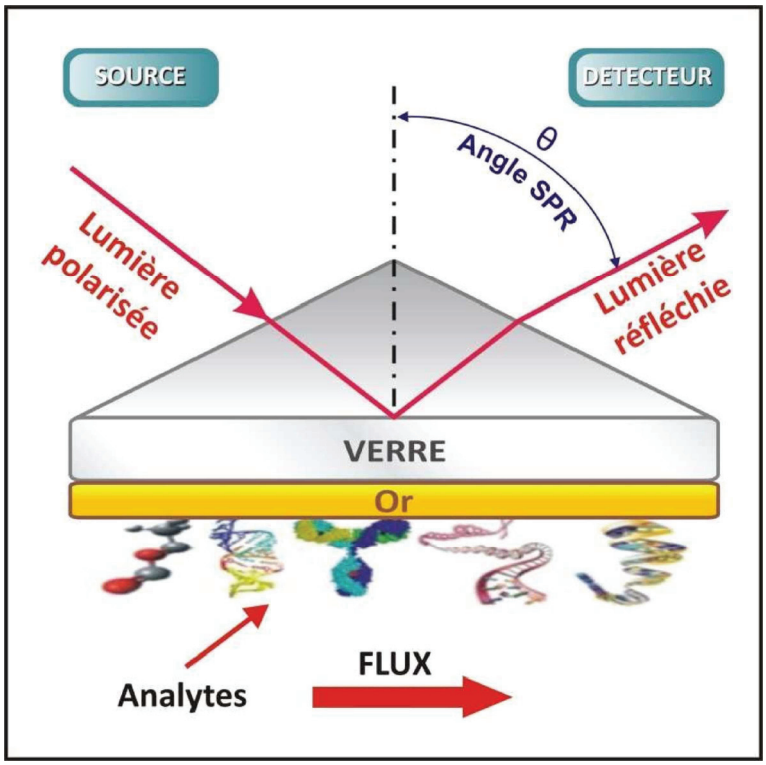


Figure *1.18*
Schéma de principe de la résonance plasmonique de surface

Les biocapteurs à base de SPR permettent de suivre les interactions moléculaires en temps réel et sans marquage spécifique [88]. Les changements de masse induits par l'association et la dissociation du complexe analyte/ligand à la surface modifient l'indice de réfraction du milieu et décalent la position de l'angle de résonance (Figure I.19). C'est une approche qui permet d'obtenir des informations sur la cinétique de réaction, l'épaisseur et la masse de la couche déposée sur la surface ainsi que sur le nombre de molécules fixées.

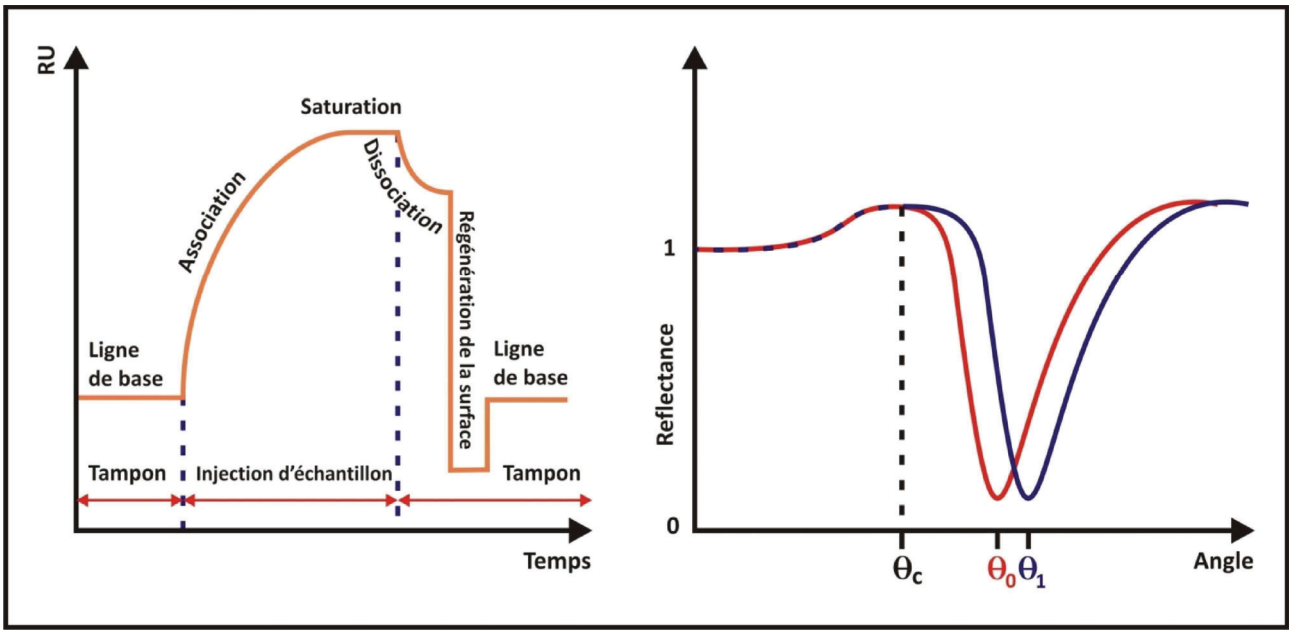


Figure .19
Réponses d'un capteur à résonance plasmonique de surface

(a) réflectivité en fonction de l'angle d'incidence de la source par rapport à la surface,

(b) suivi de l'angle de résonance en fonction du temps.

Aux cours de la dernière décennie, la résonance de plasmons de surface a été étudiée sur différents aspects et elle a fait l'objet de nombreuses recherches et publications [89-92].

Dans le domaine des biocapteurs, la SPR trouve beaucoup d'applications, elle a été utilisée pour suivre des interactions antigènes/anticorps [93], des interactions ADN/proteines [94], ou des interactions entre enzymes et substrat [95]. Récemment, un biocapteur SPR miniaturisé a été proposé avec la possibilité de détecter en temps réel des interactions biomoléculaires sur des nanostructures [96, 97].

I. 7. 4. Transduction électrochimique

Les biocapteurs électrochimiques font appel à des phénomènes électrochimiques proprement dits. Par définition, l'électrochimie est la science qui décrit les propriétés de couplages réciproques de la matière avec l'électricité, qu'il y ait transformation (définition restrictive) et/ou déplacement (transport) des espèces chimiques. Dans ce cadre, la transduction peut être de type :

- **Faradique,** lorsqu'il y a une consommation locale de matière par une réaction d'électrode (l'espèce est dite *électroactive*). Les capteurs ampérométriques et coulométriques entrent

dans cette catégorie, de même que ceux qui fonctionnent sur un mode de type pile à combustible ;

- **Non-Faradique,** dans ce cas, il n'y a *a priori* pas de consommation de matière, donc pas de perturbation notable du milieu analysé. Les capteurs impédancemétriques et potentiométriques (ou galvaniques) sont de ce type.

Depuis Faraday (1791-1867), ont été établies les relations qui régissent les réactions électrochimiques, c'est-à-dire les réactions dans lesquelles interviennent des particules chargées électriquement, généralement des ions et des électrons, dans un milieu dissociant comme l'eau. Un capteur électrochimique est donc, avant tout, un conducteur électrique que l'on implante au sein du milieu à étudier ; il s'établit alors un transfert de charges entre les espèces chargées présentes et le capteur ; la variation résultante d'énergie libre à l'interface est détectée par le capteur, et transmise à la chaîne de mesure sous la forme d'un signal électrique : courant ou tension.

Dans le cas d'une transduction électrochimique, la fixation de l'analyte entraîne généralement des modifications physico-chimiques au niveau de l'interface, ce qui modifie le signal électrique de sortie.

Les biocapteurs électrochimiques se répartissent en quatre catégories : ampérométrique, potentiométrique, impédimétrique et conductimétrique sur la base des paramètres observés tels que le courant, le potentiel, l'impédance et la conductance respectivement [98].

- **Biocapteurs à transduction ampérométrique**

L'ampérométrie est une technique qui repose sur la détermination de l'intensité de courant qui traverse une cellule électrochimique dans des conditions déterminées : l'intensité de ce courant est fonction notamment de la concentration des corps électroactifs et du potentiel imposé. Dans les conditions précises, il est possible, après étalonnage, de déterminer la concentration de certains corps présents à partir de la mesure de l'intensité de courant [99]. Dans la plupart des cas, on effectue une oxydation ou une réduction d'une espèce à une électrode indicatrice, la seconde électrode étant en général une électrode de référence (Figure I.20).

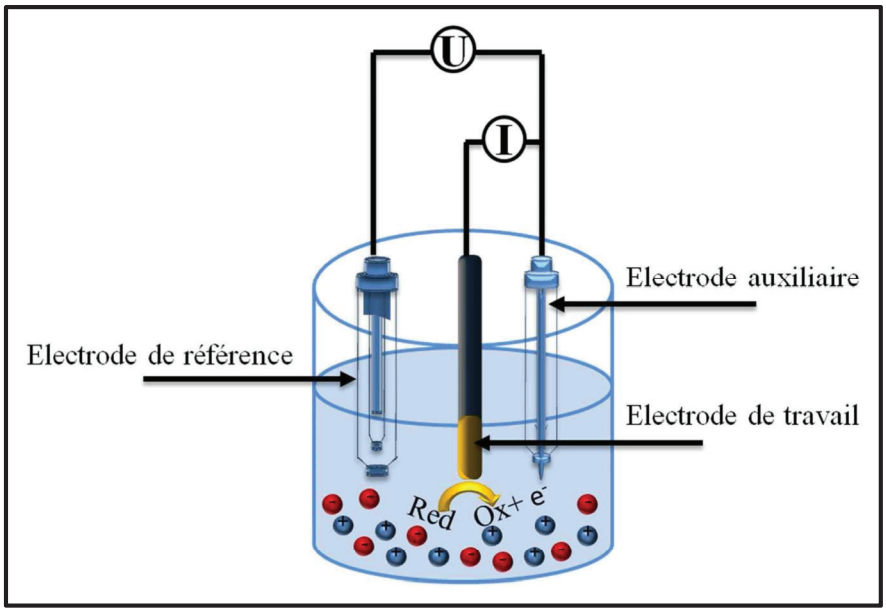


Figure I.20
Principe de la mesure ampérométrique

Si l'on applique à l'électrode indicatrice un potentiel *E* variable par rapport à l'électrode de référence, et que l'on trace la courbe de polarisation *i= f(E)*, la valeur de i du palier limite de diffusion est proportionnelle à la concentration du corps oxydé ou réduit à l'électrode indicatrice.

La transduction ampérométrique est la méthode de détection électrochimique la plus ancienne et la plus utilisée dans la fabrication des biocapteurs. La majorité des dispositifs commercialisés sont des électrodes ampérométriques recouvertes d'une membrane enzymatique. Le principe de fonctionnement des biocapteurs ampérométriques repose sur le suivi du processus de transfert de charges.

Les biocapteurs ampérométriques, ont conduit à la production de dispositifs prêts à l'emploi. Ils sont fondés sur le suivi des processus de transfert d'électrons. Le signal de ces biocapteurs est généré par l'échange d'électrons entre le système biologique dans la couche du bio-récepteur et l'électrode de travail.

De manière générale, quand on parle de l'utilisation d'un biocapteur ampérométrique, la substance à analyser est soumise à, ou impliquée dans, une réaction d'oxydo-réduction qui peut être suivie par la mesure du courant dans une cellule électrochimique. L'analyte, ou les espèces formées par l'intermédiaire d'une réaction (bio)chimique, modifie son état d'oxydation à une électrode. Le flux

d'électrons est alors contrôlé et il est proportionnel à la quantité de l'espèce transformée électrochimiquement sur l'électrode.

Ces biocapteurs ampérométriques présentent une sensibilité supérieure à celle des biocapteurs potentiométriques [100] , ils sont peu coûteux et offrent une réponse très rapide avec une gamme linéaire très large [101]. De nombreux chercheurs ont rapporté la détection ampérométrique du glucose [102, 103], des cytokines [104], de l'acide nucléique et des antigènes dans l'identification des maladies/diagnostic [105]…etc.

On peut distinguer trois générations de biocapteurs ampérométriques selon le principe de fonctionnement :

1. la première génération de biocapteurs ampérométriques mesure la consommation de l'oxygène ou la production d'eau oxygénée lors de la l'oxydation du substrat par une oxydase immobilisée.

2. La seconde génération de biocapteurs évite l'utilisation de l'oxygène et utilise des médiateurs redox (sels organométalliques) en tant que transporteurs d'électrons. Par simple adsorption, le médiateur peut être retenu à la surface de l'électrode, ou emprisonné dans les mailles du polymère ou greffé sur celui-ci…etc. Plusieurs médiateurs ont été utilisés dans divers biocapteurs pour la détection du glucose tel que le ferrocène, les quinones, l'hexacyanoferrate, la phénazine-méthosulfate, le tétracyanoquinodiméthane (TCNQ) [106,107].

   L'élimination de la dépendance par rapport à l'oxygène de la première génération a permis de mieux contrôler la réaction enzymatique et les performances du capteur et de diversifier les applications des biocapteurs ampérométriques.

3. La troisième génération concerne la co-immobilisation de l'enzyme et du médiateur qui peut être accomplie par immobilisations successives du médiateur et de l'enzyme ou par immobilisation du mélange. Ces biocapteurs de troisième génération offrent tous les avantages des capteurs de seconde génération, avec de nouvelles caractéristiques. En effet, ces nouveaux biocapteurs présentent une nouvelle autonomie puisque ni l'enzyme ni le

médiateur ne doivent être ajoutés dans le milieu de mesure ce qui facilite la réalisation de mesures répétées.

- **Biocapteurs à transduction potentiométrique**

Le principe des biocapteurs potentiométriques repose sur la mesure d'une différence de potentiel entre l'électrode de travail et une électrode de référence. Dans ce cas l'analyte n'est pas consommé, c'est une méthode non destructive (le courant circulant à travers l'électrode est égal ou proche de zéro). Cette même catégorie peut être subdivisée en trois sous catégories : les électrodes sélectives aux ions (ISE) constituent la part la plus importante, les électrodes redox et les transistors à effet de champ (ISFET) qui connaissent un essor important et constituent des microcapteurs. Tous ces capteurs obéissent à une loi de type Nernst (une relation logarithmique entre le potentiel généré et l'activité de l'espèce détectée).

$$\Delta\Phi = cte + \frac{RT}{Z_i F} \ln a_i \qquad \textit{Loi de Nernst} \text{ .....(Eq I.4)}$$

Où

ΔΦ représente la différence de potentiel de part et d'autre de la couche sensible

Z_i est la charge de l'ion i considéré,

R : constante des gaz parfaits (R = 8,314 J/(K.mol)),

T : température absolue (K),

F : constante de Faraday (F = 96485,309 C/mol).

a_i : représente l'activité des ions i dans la solution de mesure par rapport à un système de référence infiniment dilué.

Dans un milieu donné l'activité est reliée à la concentration par la relation $a = \gamma c$, dans laquelle γ est le coefficient d'activité. Celui-ci dépend de la force ionique I du milieu, c'est-à-dire de la quantité et de la charge des ions présents :

$$I = ½ \sum_i C_i Z_i^2$$

Il est donc nécessaire de faire en sorte que la force ionique des solutions d'étalonnage et de mesure soit la même afin que le terme γ soit constant. Pour cela, la technique généralement utilisée consiste à ajouter un excès important d'ions indifférents (ou électrolyte support ou sel de fond) dans les

solutions de mesure, afin que les variations de concentration mesurées soient toujours négligeables devant la quantité totale d'ions présents.

La figure I.21 représente le principe de fonctionnement de la transduction potentiométrique

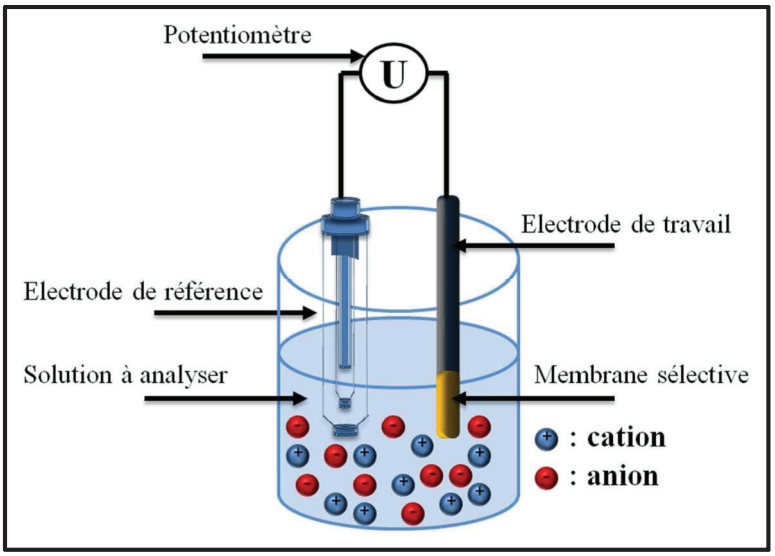


Figure I.21
Dispositif expérimental pour réaliser des mesures potentiométriques

Dans la littérature, de nombreuses publications ont été rapportés sur l'utilisation des biocapteurs potentiométriques dans l'électroanalyse. On peut citer quelques exemples :

Un biocapteur à base de nanotubes de ZnO a été proposé pour la détection du cholestérol [108].
Un biocapteur potentiométrique destiné pour la détection de phosphates en utilisant la réticulation chimique de la purine nucléoside phosphorylase (PNP) et la xanthine oxydase (XOD) dans un mélange de glutaraldéhyde (GLA) et de sérum albumine bovine (BSA), ce système a permis d'avoir un biocapteur stable et fiable [109].

Récemment l'enzyme uréase a été fixée de manière covalente sur le poly (méthacrylate de glycidyle) (PGMA) greffé par des nanoparticules d'oxyde de fer sur électrode d'or pour la fabrication de biocapteurs d'urée [110] etc.

- **Biocapteurs à transduction conductimétrique**

Cette technique consiste à mesurer la conductance électrique d'une solution électrolytique contenant des charges électriques mobiles, constituées par l'ensemble des ions.

En pratique la mesure de la conductance d'un électrolyte s'effectue en immergeant dans la solution une cellule de mesure comprenant deux électrodes soumises à un signal électrique (figure.I.22), généralement alternatif et de fréquence choisie pour minimiser les effets dus aux polarisations. La surface *S* et la longueur ***l*** des électrodes sont déterminées par étalonnage dans une solution de conductivité connue. La conductance électrique G, inverse de sa résistance, est proportionnelle à la surface S de la section perpendiculaire à la direction du courant et inversement proportionnelle à sa longueur. Elle est donnée par l'équation suivante :

$$G = \frac{\gamma * s}{l} \quad \text{.....(Eq I.5)}$$

Avec G conductance (S), γ conductance spécifique ou conductivité, caractéristique du corps ; elle est exprimée en Siemens par centimètre, S la surface en cm^2 et la l longueur en cm.

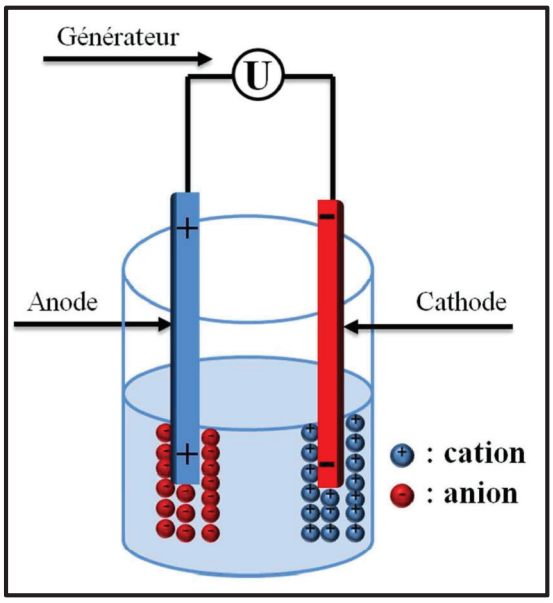


Figure I.22
Dispositif expérimental pour réaliser des mesures conductimétriques

En première approximation, pour des solutions de concentration faible, la conductivité est proportionnelle à la concentration de l'électrolyte.

Les biocapteurs conductimétriques qui ont été proposés sont destinés à la détection de bactéries [111], de métaux lourds [112], de pesticides [113] et de l'urée [114].

Récemment un biocapteur a été proposé pour une multi détection du maltose, lactose, saccharose et glucose.

Ces deux dernières décades, une attention toute particulière de la part des chercheurs pour cette méthode d'analyse est justifiée par le nombre ascendant de travaux dans les revues et journaux.

- **Biocapteurs à transduction impédimétrique**

  La spectroscopie d'impédance électrochimique « SIE » a été longtemps utilisée pour étudier les systèmes électrochimiques y compris ceux qui sont impliqués dans la corrosion [115], l'électrodéposition [116], les batteries [117] et les piles à combustible [118]. Ces dernières années, la SIE est apparue comme une technique alternative aux techniques d'analyses conventionnelles notamment dans la conception et l'élaboration des biocapteurs et la caractérisation de l'édifice moléculaire qui constitue les biocapteurs.

  L'étude des surfaces modifiées représente l'usage majeur de cette technique [119], ce qui permet entre autre la détection spécifique de l'interaction entre un élément de reconnaissance immobilisé et une entité cible. La spectroscopie d'impédance renseigne également sur la cinétique de déroulement des phénomènes moléculaires au niveau de l'interface, ainsi que sur les taux de couverture et l'efficacité des greffages. La SIE s'est imposée comme un outil analytique très puissant vu le nombre de publications actuelles.

  Son principe est très simple, il consiste à surimposer une tension sinusoïdale aux bornes de l'échantillon polarisé, dans une gamme de fréquence aussi large que possible, et par l'intermédiaire du courant qui en résulte il est possible de calculer l'impédance de l'échantillon. La mesure de l'impédance s'effectue dans une cellule classique à trois électrodes, une électrode de travail fonctionnalisée par l'élément sensible (biorécépteur), une électrode de référence au calomel saturé et une électrode auxiliaire en platine (cf.Fig I.23).

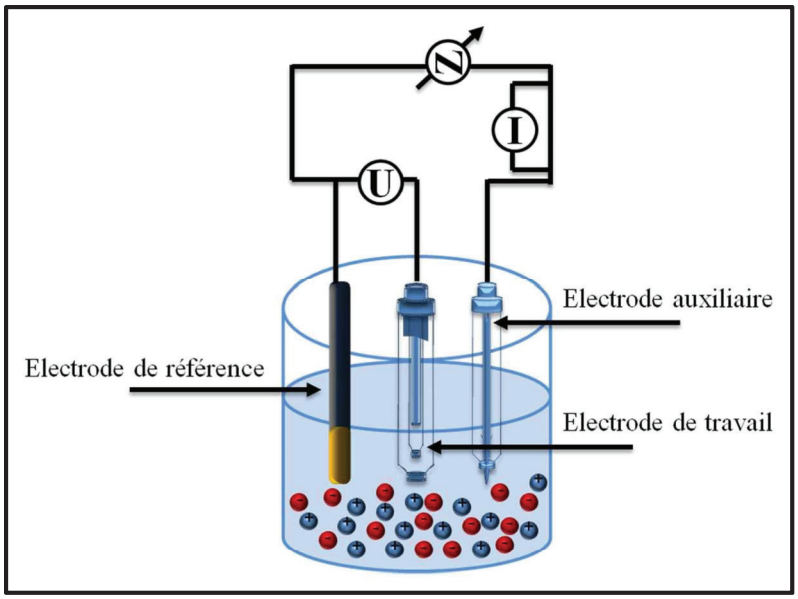


Figure I.23
Dispositif expérimental pour réaliser des mesures impédimétriques

La SIE a été utilisée pour la détection de détergents [120], de pesticides [121], de métaux lourds [122], d'agents pathogènes tels que les bactéries [123], l'élaboration d'immunocapteurs [124, 125]…etc. Les applications de l'impédance dans le domaine des biocapteurs sont très nombreuses et le nombre de travaux publiés ne cesse d'augmenter [126].

Cette technique a été utilisée dans ce travail et sera présentée en détails dans le deuxième chapitre.

I. 8. Techniques d'immobilisation

L'immobilisation de l'élément biologique (enzymes, anticorps, cellule ou tissus ...) sur la surface du transducteur est certainement l'étape la plus importante dans la fabrication et la conception des biocapteurs. Différentes techniques d'immobilisation de l'entité biologique sur la surface d'un transducteur ont été développées dans le but de maintenir intactes les propriétés biologiques du biorécepteur et de garantir une accessibilité et une réactivité maximales. Dans le domaine des biocapteurs électrochimiques, une espèce biologique (ou plusieurs) est généralement immobilisée à la surface du transducteur par différentes méthodes. L'ensemble formé par la biomolécule immobilisée et son environnement constitue un biomatériau qui doit aboutir à une immobilisation efficace et stable et permettre à l'entité biologique de maintenir ses propriétés biologiques intactes et de garantir une accessibilité et une réactivité maximales.

Les métaux nobles sont les supports les plus utilisés comme transducteur. En effet, l'or, le carbone et le platine présentent une grande résistance à la corrosion et à l'oxydation faisant d'eux des matériaux idéaux pour le développement des biocapteurs. Ayant une très bonne conductivité, l'or est le plus utilisé.

Le choix de la méthode appropriée dépendra certainement de la nature de la biomolécule, du type du transducteur utilisé, du mode de détection associé et de l'application envisagée. Cependant chaque méthode d'immobilisation présente des avantages et des inconvénients. Il existe plusieurs techniques d'immobilisation que l'on peut subdiviser en procédés physiques et chimiques.

Les principales méthodes d'immobilisation d'espèces biologiques sur la surface du transducteur sont représentées dans la figure I-24. Chacune d'entre elles va faire l'objet d'une brève description.

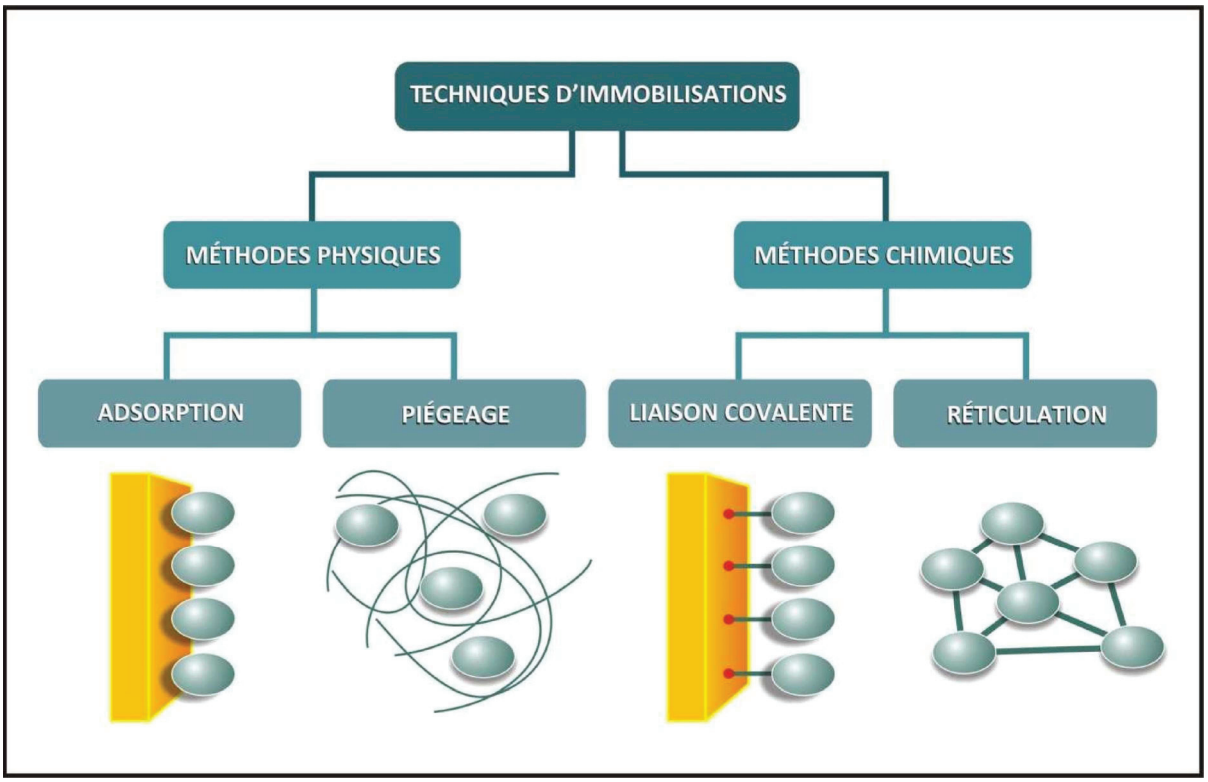


Figure I.24
Différentes techniques d'immobilisations

I. 8. 1. Les méthodes physiques d'immobilisation

I. 8. 1. 1. L'adsorption physique :

L'adsorption physique est, sans doute, la méthode la plus simple qui permet l'immobilisation de l'élément biologique sur le transducteur. Il suffit de laisser en contact le biorécépteur à un pH, une force ionique et une température convenables. C'est une technique non dénaturante, qui ne nécessite pas de modification chimique de la biomolécule et permet la régénération du biocapteur.

L'immobilisation par adsorption physique est basée sur l'établissement d'interactions de faible énergie de type ionique, polaire ou hydrophobe, ou encore des liaisons hydrogènes et des forces de Van der Waals, entre les groupes fonctionnels de la biomolécule active et la surface de support.
L'inconvénient majeur de cette technique est sans doute la faible résistance de l'assemblage. En effet, les phénomènes de désorption sont régulièrement observés suite à des variations de conditions du milieu (pH, force ionique, température) [127]. La stabilité et la durée d'utilisation des biocapteurs ainsi obtenus s'en trouvent diminuées [128]. Malgré la simplicité de mise en œuvre de cette méthode, elle demeure peu utilisée pour la conception des biocapteurs.

I.8.1.2 Emprisonnement physique :

La méthode d'inclusion physique consiste à incorporer le biorécépteur dans un gel insoluble. Ce gel peut être constitué d'une matrice organique (polymère) [129-131], inorganique (argiles HDL) [132] ou biologique tel que l'alginate, la carraghénane, l'agarose, le chitosane, le collagène, le polyacrylamide, le polyéthylène glycol, le polyuréthane, l'alcool polyvinylique [127]. Dans tous ces cas de figure, le récepteur est mélangé au matériau, puis déposé à la surface du transducteur sous certaines conditions. La biomolécule se trouve piégée mécaniquement à l'intérieur des matrices polymériques, inorganiques ou biologiques. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de l'entité biologique tout en permettant la diffusion du substrat grâce à une porosité du gel suffisante. L'inconvénient majeur de ce type de technique réside dans l'établissement d'une résistance diffusionnelle supplémentaire qui se traduit par une baisse de la sélectivité et une augmentation des limites de détection [127]. Le relargage du biorécepteur dans le milieu réactionnel suite à la modification des conditions expérimentales telles que le pH, la force ionique, la température ou encore la présence de solvant peut également constituer, dans certains cas, une limitation à cette technique.

I.8.1.3. Le confinement :

Le confinement au sein d'une membrane semi-perméable [133] fait également partie des techniques de piégeage physique. Le récepteur biologique est dans ce cas immobilisé entre la membrane et le transducteur. Cette membrane semi-perméable permet la circulation du substrat et du produit de la réaction. La sélectivité est maintenue grâce au contrôle de la porosité de la membrane ainsi que de ses propriétés chimiques. Les membranes de dialyse, de filtration ainsi que les membranes à base de cellulose sont les plus utilisées [134].

I. 8. 1. 4. Microencapsulation

La microsencapsulation est un procédé d'immobilisation de biomolécules sur le transducteur qui consiste à enfermer les protéines en solution à l'intérieur d'un compartiment limité par une membrane sélective. Cette membrane est formée de cavités ou de microsphères assez importantes pour retenir les protéines de grande taille tout en laissant diffuser les molécules cibles ou les produits de la réaction de taille beaucoup plus petite. Il existe différents types de membranes (Teflon, acétate de cellulose (CA), polycarbonate, polyuréthane) qui sont utilisés dans la construction de biocapteur, dont les propriétés sont déterminantes dans l'application des biocapteurs pour les différents types de substances à analyser dans différentes matrices. Ainsi, à titre d'exemple, les membranes CA sont imperméables aux protéines; celles en Teflon sont perméables à certains gaz, etc.

L'avantage de cette méthode est de laisser l'espèce biologique en solution et donc de maximiser son activité et de limiter certains phénomènes d'inhibition par excès de substrat et de protéger l'élément biologique contre certaines fluctuations physicochimiques pouvant avoir lieu dans le milieu réactionnel (T°, pH, force ionique). Le désavantage de cette méthode est sa complexité, surtout si elle est appliquée à un dispositif miniaturisé [135] ; de plus, le taux de la réaction biochimique est faible du fait que l'analyte doit passer à travers la membrane pour arriver au biorécépteur, ce qui conduit à une analyse non complète [136].

I. 8. 2. Les méthodes chimiques d'immobilisation

I. 8. 2. 1. Liaison covalente

L'immobilisation par liaison covalente est l'une des techniques les plus employées et les plus répandues pour immobiliser les biomolécules à la surface du transducteur.

La liaison covalente est réalisée par formation de liaisons fortes et irréversibles entre les groupements fonctionnels de la biomolécule et les groupes réactifs du transducteur. Ces groupes fonctionnels tels que les groupements carboxyliques, amines ou sulfhydriles des biomolécules et les groupements amines, carboxyliques, époxys ou tosyles des transducteurs [137, 138] , en général peu réactifs et nécessiteront une activation préalable. A priori, il faut activer soit la biomolécule, soit le support. Généralement, on choisit d'activer le support afin de maintenir l'activité de la biomolécule.

Cette liaison peut être directe (couplage avec une fonction amine ou thiol) ou indirecte (système biotine-avidine).

D'autres stratégies utilisent des interactions d'affinité spécifique entre les molécules préalablement fixées aux supports et les molécules sondes à immobiliser.

Cette méthode est considérée comme une méthode simple, efficace et irréversible, toutefois elle doit faire l'objet de précautions, car elle peut impliquer des changements drastiques des performances de la biomolécule en termes d'activité, de sélectivité et de stabilité voire même la détruire.

- **Couplage direct**

  Le couplage direct est la technique de référence pour la fixation des biomolécules de petites tailles.

  Elle est basée sur la fonctionnalisation de la surface du transducteur (or, Silice, ….) avec une monocouche auto-assemblée (self assembly monolayer SAM) (silane [139] ou thiol [140]) ou encore avec un film de polymère conducteur (polypyrrole [141], polyaniline [142].….etc). Pour qu'il y ait une fixation, la biomolécule doit contenir au moins un groupement fonctionnel tel qu'une amine primaire, un aldéhyde ou un thiol.

Dans le cas du couplage avec une fonction amine, la réaction est basée sur une substitution nucléophile entre les amines primaires des biomolécules et une terminaison carboxyle de la surface modifiée par un thiol. Le schéma général de la réaction se présente alors comme suit :

$$\mathbf{R\text{-}COOH + R1NH_2 \longrightarrow RCO\text{-}NHR_1 + H_2O}$$

Un grand intérêt a été porté sur la chimie des thiols puisque la liaison avec un groupement thiol (SH) est plus robuste que la liaison avec un groupement amine et les conditions de greffage sont généralement moins critiques.

- **Couplage indirect**

Le couplage indirect des biomolécules à la surface du transducteur est réalisé en général à l'aide d'un intermédiaire biologique (par exemple le système biotine-avidine ou biotine-strepatvidine). Ce dernier intervient quand le couplage direct est peu convenable ou impossible. L'utilisation du système biotine-avidine ou (biotine-streptavidine) est due à sa constante d'affinité très élevée (10^{15}M) et qui est la plus forte dans la nature.

Les biomolécules peuvent être immobilisées par interaction d'affinité par l'assemblage du film biotine/avidine-biotine/biomolécule. Cette stratégie permet d'avoir un biocapteur stable et surtout régénérable puisque le complexe biotine/avidine-biotine peut être désassemblé par un surfactant [143].

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à une technique de couplage covalent à savoir la chimie click (cycloaddition de Huisgen). La cycloaddition de Huisgen est aussi appelée cycloaddition 1,3-dipolaire. La cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre(I) entre un azoture et un alcyne (CuAAC), réaction de « chimie click » par excellence, suscite un grand intérêt en raison de son efficacité et de sa polyvalence. La chimie click présente une nouvelle approche pour l'immobilisation des biomolécules. Cette technique sera présentée plus en détails dans le chapitre IV.

I. 8. 2. 2. La réticulation :

La réticulation est une technique d'association de biomolécules à l'aide d'agents chimiques bi ou multifonctionnels appelés agent de couplage. Il s'agit de molécules de pontage capables dans un premier temps de se greffer d'une façon covalente sur la surface activée et dans un deuxième temps de se lier aux biomolécules et de les lier entre elles.

En effet, l'utilisation d'agents chimiques bi ou multifonctionnels et d'une biomolécule conduit à la formation de liaisons entre les fonctions de surface NH_2 de la biomolécule et de l'agent de réticulation. Il existe plusieurs agents de couplage, tel que le glutaraldéhyde qui est fréquemment utilisé dans ce type d'immobilisation.

CONCLUSION

Les soucis en matière de contrôle de l'environnement, les besoins de diagnostic en temps quasi réel, liés au développement des microtechniques et aux progrès de la chimie moléculaire peuvent susciter l'émergence de nouveaux capteurs chimiques de faible coût.

Au cours de ces dernières décennies, les capteurs chimiques ont connu un développement rapide, lié aux multiples associations de nouveaux récepteurs avec des transducteurs sans cesse en évolution. Les caractéristiques de ces capteurs ont été améliorées et leur fiabilité accrue permet d'exploiter de nouvelles applications.

RÉFÉRENCES – CHAPITRE I

[1] L.C.Clark Jr., "Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions," *Trans. Am. Artif. Intern. Organs,* vol. 2, pp. 41-48, 1956.

[2] L.C. Clark Jr. and C. Lyons, "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery," *Ann. NY Acad. Sci,* vol. 102, pp. 29-45, 1962.

[3] S.J. Updike and G.P. Hicks, "The enzyme electrode,," *Nature,* vol. 214 pp. 986-988, 1967.

[4] G. G. Guilbault; and J. G. J. Montalvo, "A urea-specific enzyme electrode," *Am. Chem. Soc,* vol. 91, pp. 2164-2165, 1969.

[5] K. Cammann; Bio-sensors based on ion-selective electrodes, *Fresenius* Z. *Anal*. *Chem*., *287*, *1–9* (*1977*).

[6] M. Gronow, "Biosensors, ," *Trends Biochem. Sci,* vol. 9, pp. 336-340, 1984.

[7] D. DUPONT, "Applications des biocapteurs : du contrôle des aliments à la recherche de vie sur Mars," *Techniques de l'Ingénieur,2009.*

[8] I. S. West., *Chemstry in Britain,* pp. 1220, December 1988.

[9] O. Moe. and R. Cornelius, *J. Chemical Education,* vol. 65, pp. 137, 1988.

[10] J. Stolkowski., *Les Enzymes,* vol. 6° édition, 1983.

[11] J. P. Tosar, G. Branas, and J. Laiz, "Electrochemical DNA hybridation sensors applied to real and complex samples," *Biosens. Bioelectron,* vol. 26, pp. 1205-1217, 2010.

[12] S. Cagnin, M. Caraballo, C. Guiducci, P. Martini, M. Ross, D. Danley, T. West, and G. Lanfranchi, "Overview of electrochemical DNA Biosensors : new approaches to detect the expression of life," *Sensors,* vol. 9, pp. 3122-3148. , 2009.

[13] L. G. Carrascosa, A. Calle, and L. M. Lechuga, " Label-free detect ion of DNA mutations by SPR : application to the early detection of inherited breast cancer.," *Anal. Bioanal. Chem,* vol. 393, pp. 1173-1182, 2009.

[14] A. A. Ensafi, M. Taei, H. R. Rahmani, and T. Khayamian, "Sensitive DNA impedance biosensor fo detection of cancer, chronic lymphocytic leukmia, based on gold nanoparticules/gold modified electrode. ," *Electrochim.Acta,* vol. 56, pp. 8176-8183. 2011.

[15] M. Tichoniuk, D. Gwiazdowska, M.Liqaj, and M. Filipiak, " Electrochemical detection of foodborne pathogen Aeromonas hydrophila by DNA hybridization biosensor," *Biosens. Bioelectron,* vol. 26, pp. 1618-1623, 2010.

[16] A. Walter, J. Wu, G.U. Flechsig, D. A. Haake , and j.Wang., "Redox cycling amplified electrochemical detection of DNA hybridization : application to pathogen E. coli bacterial RNA. ," *Anal.Chim. Acta,* vol. 689, pp. 29-33 2011.

[17] Q. Zhan, P. Dai, and Z. Yang, "Sensitive DNA hybridization biosensors based on gold nanoparticles for testing DNA damage by Cd(II) ions.," *Microchim Acta,* vol. 173, pp. 347-352., 2011.

[18] A. M. Nowicka, A. Kowalczyk, Z. Stojek, and M. Hepel, "Nanogravimetric and voltammetric DNA-hybridization biosensors for studies of DNA damage by common toxicants and pollutant," *Biophys. Chem. ,* vol. 146, pp. 42-53, 2010.

[19] A. A. Ensafi, B. Rezaei, M. Amini, and E. Heydari-Bafrooei, "Anovel sensisitive DNA-biosensor for detection of carcinogen,SudanII, using electrochemically treated pencil graphite electrode by voltammetric methods.," *Talanta,* vol. 88, pp. 244-251 2012.

[20] M. D. Carlo, M. Di Marcello, M. Perugini, V. Ponzielli, M. Sergi, M. Mascini, and D. Compagnone, "Electrochemical DNA biosensor for polycyclic aromatic hydrocarbon detection.," *Microchim. Acta,* vol. 163, pp. 163-169, 2008.

[21] D. Maciejewska, I. Szpakowska, I. Wolska, M. Niemyjska, M. Mascini, and M.Maj-Zurawska., "DNA-based electrochemical biosensors for minotoring of bis-indoles as potential antitumoral agents, chemistry,X-ray crystallography. ," *Bioelectrochemistry,* vol. 69, pp. 1-9, 2006.

[22] A. Farukh, A. Musbashira, and T. Sartaj, "Cyclic voltammetry-An electrochemical approach to study metal-based potential antitumor drug-DNA interactions," *Cuur. Anal. Chem,* vol. 7, pp. 71-79, 2011.

[23] A. Bentley, A. Atkinson, J. Jezek, and D. M. Rawson, "“Whole cell biosensors-electrochemical and optical approaches to ecotoxicity testing,”" *Toxicology in Vitro, ,* vol. 15, pp. 469-475, 2001.

[24] L. Bousse, " Whole cell biosensors. ," *Sensors and Actuators B: Chemical,,* vol. 34, pp. 270-275, 1996.

[25] P. McFadden, "BIOSENSORS: Broadband Biodetection: Holmes on a Chip.," *Science,* vol. 297, pp. 2075-2076, 2002.

[26] J. Pancrazo, J. Whelan, D. Borkholder, W. Ma, and D. Stenger, " Development and Application of Cell-Based Biosensors. ," *Annals of Biomedical Engineering, ,* vol. 27 pp. 697-711, 1999.

[27] D. Stenger, G. Gross, E. Keefer, K. Shafter, J. Andreadis, W. Ma, and J. Pancrazio, "Detection of physiologically active compounds using cell-based biosensors.," *Trends in Biotechnology,* vol. 19, pp. 304-309, 2001. .

[28] T. Campbell, A. Hodgson, and G. Wallace, "Incorporation of Erythrocytes into Polypyrrole to Form the Basis of a Biosensor to Screen for Rhesus (D) Blood Groups and Rhesus (D) Antibodies.," *Electroanalysis,* vol. 11, pp. 215-222, 1999.

[29] F. Bettaieb, L. Ponsonnet, P. Lejeune, H. Ben Ouada, C. Martelet, A. Bakhrouf, N. Jaffrezic-Renault, and A. Othmane, "Immobilization of E. coli bacteria in three-dimensional matrices for ISFET biosensor design,," *Bioelectrochemistry* vol. 71, pp. 118-125, 2007.

[30] R. Zlatev, JP. Magnin, P. Ozil, and M. Stoytcheva, "Bacterial sensors based on Acidithiobacillus ferrooxidans: Part I. Fe2+ and S2O32− determination " *Biosensors and Bioelectronics* vol. 21 pp. 1493-1500, 2006.

[31] M. Stoytcheva, R. Zlatev, B. Valdez, J.P. Magnin, and Z. Velkova., "Electrochemical sensors based on Arthrobacter globiformis for cholinesterase activity determination.," *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 22, pp. 1-9, 2006.

[32] E. Akyilmaz, A. Erdogan, R. Ozturk, and I. Yasa, "Sensitive determination of L-Lysine with a new amperometric microbial biosensor based on S.cerevisiae yeast cells, ," *Biosensors & Bioelectronics,,* vol. 22, pp. 1055-1060, 2007.

[33] L.Rotariu, C. Bala, and V.Magearu, "Yeast cells sucrose biosensor based on a potentiometric oxygen electrode " *Analytica Chimica Acta,* vol. 458 p. 215, 2002.

[34] R. E.Ionescu, K.Abu-Rabeah, S. Cosnier, C.Durrieu, J.M.Chovelon, and S.R Marks, "Amperometric algal Chlorella vulgaris cell biosensors based on alginate and polypyrrole-alginate gels."," *Electroanalysis,* vol. 18, pp. 1041-1046., 2006.

[35] S.K.Alpat, S.Alpat, B.Kutlu, O.Ozbayrak, and H.B.Buyukisik, . "Development of biosorption-based algal biosensor for Cu(II) using Tetraselmis chuii," *Sensors and Actuators B: Chemical,,* vol. 128, 2007.

[36] C.Durrieu, C.Tran-Minh, J.M.Chovelon, L.Barthet, C.Chouteau, and C.Védrine, " "Algal biosensors for aquatic ecosystems monitoring." " *The European Physical Journal- Applied Physics,* vol. 36, pp. 205-209, 2006.

[37] K. H. Baronian, "The use of yeast and moulds as sensing elements in biosensors," *Biosensors and Bioelectronics, ,* vol. 19, pp. 953-962, 2004.

[38] T. Rider, M. Petrovick, F. Nargi, J. Harper, E. Schwoebel, R. Mathews, D. Blanchard, L. Bortolin, A. Young, J. Chen, and M. Hollis, "A B Cell-Based Sensor for Rapid Identification of Pathogens.," *Science,* vol. 301, pp. 213-215, 2003.

[39] F. Asphahani and M. Zhang, "Cellular impedance biosensors for drug screening and toxin detection.," *The Analyst,* vol. 132, pp. 835-841, 2007.

[40] F. Bettaieb, L. Ponsonnet, P. Lejeune, H. Ben Ouada, C. Martelet, A. Bakhrouf, N. Jaffrezic-Renault, and A. Othmane, "Immobilization of E. coli bacteria in three-dimensional matrices for ISFET biosensor design.," *Bioelectrochemistry,* vol. 71, pp. 118-125, 2007.

[41] L. Bousse "Whole cell biosensors.," *Sensors and Actuators B: Chemical,,* vol. 34, pp. 270-275., 1996.

[42] T. Park and M. Shuler, "Integration of Cell Culture and Microfabrication Technology.," *Biotechnology Progress,* vol. 19, pp. 243-253., 2003.

[43] B. De Blasio, M. Laane, T. Walman, and I. Giaever, "Combining optical and electrical impedance techniques for quantitative measurement of confluence in MDCK-1 cell cultures.," *Biotechniques,* vol. 36, pp. 650-662, 2004.

[44] T. Ikeda, K. Kato, M. Maeda, H. Tatsumi, K. Kano, and K. Matsushita, "Electrocatalytic properties of Acetobacter aceti cells immobilized on electrodes for the quinone-mediated oxidation of ethanol.," *Journal of Electroanalytical Chemistry,* vol. 430, pp. 197-204., 1997.

[45] Y. Kitagawa, M. Ameyama, and K. Nakashima, "Amperometric Alcohol Sensor Based on an lmmobilised Bacteria Cell Membrane," *ANALYST,* vol. 12, pp. 1747-1749, 1987.

[46] Y. Lei, W. Chen, and A. Mulchandani, "Microbial biosensors," *Analytica Chimica Acta,,* vol. 568, , pp. 200-210, 2006.

[47] A. Singh, N. Glass, M .Tolba, L. Brovko, M. Griffiths, and S.Evoy., "Immobilization of bacteriophages on gold surfaces for the specific capture of pathogens.," *Biosens Bioelectron,* vol. 24, pp. 3645-3651, 2009;.

[48] S.Balasubramanian,I.B. Sorokulova, V.J.Vodyanoy , and A.L. Simonian, "Lytic phage as a specific and selective probe for detection of Staphylococcus aureus - A surface plasmonresonance spectroscopic study.," *Biosens Bioelectron* vol. 22, pp. 948-955, 2007.

[49] S .Huang, S.Q Li, H. Yang, M. Johnson, J. Wan, I .Chen, V.A. Petrenko, J.M. Barbaree, and B.A. Chin " Optimization of phage-based magnetoelastic biosensor performance. ," *Sens Transducers* vol. 3, pp.87-96, 2008.

[50] F. Xie, H .Yang, S. Li, W. Shen, J. Wan, M.L. Johnson, H.C.Wikle, D.J. Kim, and B.A. Chin "Amorphous magnetoelastic sensors for the detection of biological agents. ," *Intermetallics,* vol. 17, pp. 270-273, 2009.

[51] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, and O. Buchardt, "" Sequence-selective recognition of DN A by strand displacement with a thymine-substituted polyamide"," *Science,* vol. 254(5037), pp. 1497-1500, 1991.

[52] SH. Chen, VC. Wu, YC.Chuang, and CS. Lin., "Using oligonucleotide-functionalized Au nanoparticles to rapidly detect foodborne pathogens on a piezoelectric biosensor. ," *J Microbiol Methods,* vol. 73, pp. 7-17,2008.

[53] A.Lermo, S.Campoy, J.Barbe, S.Hernandez,S. Alegret and MI.Pividori., " In situ DNA amplification with magnetic primers for the electrochemical detection of food pathogens. ," *Biosens Bioelectron,* vol. 22, pp. 2010-2017, 2007.

[54] C.Briones, E.Mateo-Marti, C.Gomez-Navarro,V. Parro, E.Roman, and JA.Martin-Gago., " Ordered self-assembled monolayers of peptide nucleic acids with DNA recognition capability. ," *Phys Rev Lett,*volume 93, pp.208103, 2004.

[55] Y. Fan, X.Chen, J. Kong, CH. Tung, and Z.Gao., "Direct detection of nucleic acids by tagging phosphates on their backbones with conductive nanoparticles," *Angew Chem Int Ed,* vol. 46, pp. 2051-2054, 2007.

[56] J.Li, H.Wang, L.Cheng, Y. Zhao, H.Liu, N.He, Z. Lu, "Peptide nucleic acid (PNA) biosensors for DNA recognition. ," *editors. Micromachining and microfabrication process technology and devices; ,* pp. 417-421, 2001.

[57] E.Mateo-Marti,C. Briones, CM. Pradier, andJA Martin-Gago., "A DNA biosensor based onpeptide nucleic acids on gold surfaces.," *Biosens Bioelectron,* vol. 22, pp. 1926-1932, 2007.

[58] S.Sawata,E. Kai,K. Ikebukuro,T. Iida, T.Honda, and I.Karube., "Application of peptide nucleic acid to the direct detection of deoxyribonucleic acid amplified by polymerase chain reaction. ," *Biosens Bioelectron,* vol. 14, pp. 397-404, 1999.

[59] M.Steichen,Y. Decrem, E.Godfroid, andC. Buess-Herman., "Electrochemical DNA hybridization detection using peptide nucleic acids and [Ru(NH3)(6)](3+) on gold electrodes," *Biosens Bioelectron,* vol. 22, pp. 2237-2243., 2007.

[60] A. A. Gall, V.I. Kutyavin, N. M. J. Vermeulen, and R. O. Dempcy, "Non-aggregating, non-quenching oligomers comprising nucleotide analogues; methods of synthesis and use there of," *Official Gazette of the United States Patent and Trademark Office Patents. [Patent Number: US 6660845],* vol. 1277, pp. 2003, 2003.

[61] L. Ye, and K. Haupt, "Molecularly imprinted polymers as antibody and receptor mimics for assays, sensors and drug discovery.," *Anal. Bioanal. Chem.,* vol. 378, pp. 1887-1897, 2004.

[62] D. Kriz and K. Mosbach, "Competitive amperometric morphine sensor based on an agarose immobilised molecularly imprinted polymer " *Anal. Chim. Acta,* vol. 300, pp. 71, 1995.

[63] M. Lee and D.R. Walt., "A fiber-optic microarray biosensor using aptamers as receptors," *Anal. Biochem.,* vol. 282, pp. 142 - 146, 2000.

[64] G. N. Ferreira, A. C. Da-Silva, and B. Tomé., "Acoustic wave biosensors : pysical models and biological applications of quartz crystal microbalance. ," *Trends Biotechnol,* vol. 27, pp. 689-697, 2009.

[65] B. Becker and M. A. Cooper, "A survey of the 2006-2009 quartz crystal microbalance biosensor literature," *J. Mol. Recognit,* vol. 24, pp. 754-787, 2011.

[66] C. K. O'Sullivan and G. G. Guilbault, "Commercial quartz crystal microbalances- theory and applications .Biosens.," *Bioelectron,* vol. 14, pp. 663-670, 1999.

[67] T. T. Nguyen, "Microbiocapteurs conductimetriques utilisant des oxydoreductases, De la conception à l'application à l'environnement et l'agroalimentaire. ," *Thèse,* 2013.

[68] P. Aroa, A. Sindhu, N. Dilbaghi, and A. Chaudhury, "Biosensors as innovative tools for the detection of borne pathogens. ," *Biosens. Bioelectron,* vol. 25, pp. 1-12, 2011.

[69] L. Du, C. Wu, Q. Liu, L. Huang, and P. Wang, "Recent a dvances in olfactory receptor-based biosensors.," *Biosens. Bioelectron.,* vol. 42, pp. 570-580, 2013,.

[70] X. Zeng, Z. Shen, and R. Mernaugh, "Recombinant antibodies and their use in biosensors. ," *Anal. Bioanal. Chem.,* vol. 402, pp. 3027-3038 2012.

[71] P. Bataillard, " Calorimetric sensingin bioanalytical chemistry: principles, applications and trends. ," *Trends in Analytical Chemistry,,* vol. 12, pp. 387-394, 1993.

[72] K. Mosbach, "Thermal biosensors.," *Biosensors and Bioelectronics,,* vol. 6, pp. 179-182, 1995.

[73] K. Ramanathan, B. Jonsson, and B. Danielsson, " Sol-gel based thermal biosensor for glucose.," *Analytica Chimica Acta,* vol. 427, pp. 1-10, 2001.

[74] K. Ramanathan, M. Rank, J. Svitel, A. Dzgoev, and B. Danielsson, "The developments and application of thermal biosensors for bioprocess monitoring.," vol. 17, pp. 499-505., 1999.

[75] M. E. Bosch, A. J. R. Sanchez, and C. B. Ojeda, "Recent development in optical fiber biosensors," *Sensors,* vol. 7, pp. 797-703, 2007.

[76] A. Leung, P. M. Shankar, and R. Murtharasan, "A review of fiber-optic biosensors. ," *Sensors and Actuators B,* vol. 125, pp. 688-703, 2007.

[77] X.-D. Wang and O. S. Wolfbeis, "Fober-optic cheùical sensors and biosensors (2008-2012). ," *Anal. Chem.,* vol. 85, pp. 487-508, 2013.

[78] R. S. Marks and al., "Indium tin oxide-coated optical fiber tips for affinity electropolymerization,," *Materials Science and Engineering:C,* vol. 21, p. 189., 2002.

[79] K.Cherif and al., "Chemical detection in liquid media with a refractometric sensor based on a multimode optical fibre,," *Sensors,,* vol. 2 pp. 195, 2002.

[80] A. Abdelghani and al., "Stabilization of a surface plasmon resonance (SPR) optical fibre sensor with an ultra-thin organic film: Application to the detection of Chloro-fluoro-carbon (CFC),," *Synthethic Metals,,* vol. 90, p. 193, 1997.

[81] A. Abdelghani and al., "Surface plasmon resonance fibre optic sensor for gas detection, ," *Sensors and Actuators B,* vol. 38 p. 407, 1997.

[82] R.G.Heideman, R.P.H.Kooyman, and J.Greve., " Performance of a highly sensitive optical waveguide Mac-Zehnder interferometer immunosensor.," *Sensors and Actuators B,,* vol. 10, pp. 209-217, 1993.

[83] F. J. Blanco, M. Agirregabiria, J. Berganzo, K. Mayora, J. Elizalde, A. Calle, C. Dominguez, and L. M. Lechuga, "Microfluidic-optical integrated CMOS compatible devices for label-free biochemical sensing. ," *Journal of Micromechanics and Microengineering,* vol. 16, pp. 1006-1016, 2006.

[84] B. Luff, J.; , J. S. Wilkinson, J. Piehler, U. Hollenbach, J. Ingenhoff, and N.Fabricius, "Integrated optical Mach-Zehnder biosensor. ,". *J. Lightware Technol.,* vol. 16, pp. 583-592, 1998

[85] Z-M. Qi, N. Matsuda, K. Itoh, M. Murabayashi, and C. R. Lavers, "Adesign for improving the sensitivity OF A Mach-Zehnder interfermoter to chemical and biological measurands,," *Sensors and Actuators, B,* vol. 81, pp 254-258, 2002.

[86] E. Melnik, R. Bruck, R. Hainberger, and M. Lammerhofer, "Multi-step surface functionalization of polyimide based evanescent wavaphotonic biosensors and application for DNA hybridation by Mach-Zehnder interfermoter. ," *Anal. Chim. Acta,* vol. 699, pp. 206-215, 2011.

[87] E. Kretschmann, H. Reather, "Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light.," *Z Naturforsch,* vol. 23A, p. 2135, 1968.

[88] J.A. De Feijter ,J. Benjamins, and FA.Veer, "Ellipsometry as a tool to study the adsorption behaviour of synthetic and biopolymers at the air-water interface interface," *Biopolymers,* vol. 17, pp. 1759-1772, 1978.

[89] V. E. Kochergin, A. A. Beloglazov, M. V. Valeiko, and P. I. Nikitin, "Phase properties of a surface-plasmon resonance from the view point of sensor applications, ," *Quantum electronics,* vol. 28, pp. 444-448, 1998.

[90] S. Boussaad, J. Pean, and N. J. Tao, "High-Resolution multiwavelenght surface Plasmon resonance spectroscopy for probing conformational and electronic changes in Redox Proteins, ," *Anal.Chem.,* vol. 72, pp. 222-226, 2000.

[91] B. Lamprecht, J. R. Krenn, G. Schider, H. Ditlbacher, M. Salermo, N. Felidj, A. Leitner, R. Aussenegg, and J. C. Weeber, "Surface plasmon propagation in microscale metal stripes, ," *Applied physics letters,* vol. 79, pp. 51-53, 2001.

[92] K. Kurihara and K. Suzuki, "Theoretical understanding of absorption-based surface plasmon resonance sensor based on Kretchmannn‟s theory,," *Anal. Chem.,* vol. 74, pp. 696- 701, 2002.

[93] B. Hock, M. Seifert, and K. Kramer, "Engineering receptors and antibodies for biosensors, ," *Biosensors and bioelectronics, ,* vol. 17, pp. 239-249, 2002.

[94] D. Hao, M. Ohme-Takagi, and K. Yamasaki, "A modified chip for surface Plasmon resonance enables a rapid determination of sequence specificity of DNA-binding proteins, ," *FEBS letters,* vol. 536, pp. 151-156, 2003.

[95] H. C. M. Yau, S. Y. Wu, H. P. Ho, M. Yang, and "Surface plasmon resonance measurement of pyridoxal kinase-pyridoxamine binding on self-assembled monolayer, ," *Sensors and Actuators B,,* vol. 85, pp. 227-231, 2002.

[96] E. E. Bedford, J. Spadavecchia, C.-M. Pradier, and F. X. Gu, "Surface biosensors Incorporating Gold Nanoparticles.," *Macromol.Biosci,* vol. 12, pp. 724-739, 2012.

[97] H. Sipova and J. Homola, "Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids ; ," *Areview. Anal.Chim. Acta,* vol. 773, pp. 9-23, 2013.

[98] M. Mehrvar and M. Abdi, "Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors,," *Analytical Sciences,,* vol. 20, pp. 1113, 2004.

[99] Minh C.T., "Les biocapteurs : principes, construction et applications, ," *Masson. ,* 1991.

[100] N. J. Ronkainen, H. B. Halsall, and W. R. Heineman, "Electrochemical sensor," *Chem.Soc. Rev,* vol. 39, pp. 1747-1763, 2010.

[101] J. Wang, "Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring : ," *a review. J Pharm Biomed. Anal. ,* vol. 19, pp. 47-53, 1999.

[102] Z. Jianzhong, L. Z. Ziqiang, Zongsheng, W. Rong, G. Xiaoming, W. Xiaqin, Z. Guoxiong, Z. Zongrang, W. Yiting, and C. Zongyou, ""Planar Amperometric Glucose Sensor Based on Glucose Oxidase Immobilized by Chitosan Film on Prussian Blue Layer," " *Sensors,* vol. 2, pp. 127-136, 2002.

[103] K. Petr, B. Petra, R. Sona, K. Kurt, and V. Karel, ""Amperometric Glucose Biosensor Based on Rhodium Dioxide-Modified Carbon Ink,"" *Electroanalysis,* vol. 18, pp. 1499 - 1504, 2006.

[104] G. Ghosh, I. Mehta, A. Cornette, and K. Anderson, ". Measuring permeability with a whole cell-based biosensor as an alternate assay for angiogenesis: Comparison with common in vitro assays.," *Biosensors and Bioelectronics, ,* vol. 23, pp. 1109-1116, 2007.

[105] W. Jiapeng and Y. Siu-Tung, ""Field-effect amperometric immuno-detection of protein biomarker," " *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 29, pp. 210-214, 2011.

[106] A.E. Cass, G.Davis, G.D. Francis and. al., "Ferrocene mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. ," *Anal Chem,* vol. 56, pp. 667-671, 1984.

[107] J.Wang, L-H Wu, Z.Lu, R.Li, and J. Sanchez, "Mixed ferrocène-glucose-oxidase-carbon-paste electrode for amperometric determination of glucose. ," *Anal Chim Acta,* vol. 228, pp. 251-257, 1990.

[108] M.Q. Israr , J.R. Sadaf, M.H. Asif, O. Nur, M. Willander, and B. Danielsson, "Potentiometric cholesterol biosensor based on ZnO nanorods chemically grown on Ag wire," *Thin Solid Films* vol. 519, pp. 1106-1109, 2010.

[109] S. B. Adeloju and A. T. Lawal, " Fabrication of a bilayer potentiometric phosphate biosensor by cross-link immobilization with bovine serum albumin and glutaraldehyde. ," *Analytica Chimica Acta,* vol. 691, pp. 89-94, 2011.

[110] E. Çevik, M.Şenel, A. Baykal, and "Potentiometric urea biosensor based on poly(glycidylmethacrylate)-grafted iron oxide nanoparticles " *Current Applied Physics* vol. 13, pp. 280-286, 2013.

[111] M. Hnaiein , W.M. Hassen, A. Abdelghani, C. Fournier-Wirth , J. Coste , F. Bessueille , D. Leonard , and N. Jaffrezic-Renault, "A conductometric immunosensor based on functionalized magnetite nanoparticles for E. coli detection," *Electrochemistry Communications,* vol. 10, pp. 1152-1154, 2008.

[112] N. Tekaya , O. Saiapina , H. Ben Ouada , F. Lagarde , H. Ben Ouada , and N. Jaffrezic-Renault, " Ultra-sensitive conductometric detection of heavy metals based on inhibition of alkaline phosphatase activity from Arthrospira platensis," *Bioelectrochemistry,* vol. 90, pp. 24-29, 2013.

[113] N. Tekaya , O. Saiapina , H. Ben Ouada , F. Lagarde , H. Ben Ouada , and N. Jaffrezic-Renault, "Ultra-sensitive conductometric detection of pesticides based on inhibition of esterase activity in Arthrospira platensis," *Environmental Pollution,* vol. 178, pp. 182-188, 2013.

[114] O.Y. Saiapina, V.M. Pyeshkova, O.O. Soldatkin, V.G. Melnik, B. Akata Kurç, A. Walcarius, S.V. Dzyadevych, and N. Jaffrezic-Renault, "Conductometric enzyme biosensors based on natural zeolite clinoptilolite for urea determination," *Materials Science and Engineering C,* vol. 31, pp. 1490-1497., 2011.

[115] D. C. Silverman, "Corrosion prediction in complex environments using electrochemical impedance spectroscopy " *Electrochimica Acta,* vol. 38, pp. 2075-2078, 1993.

[116] W.G. Proud and C. Müller, "The electrodeposition of nickel on vitreous carbon: Impedance studies " *Electrochimica Acta,* vol. 38, pp. 405-413, 1993.

[117] A. Hammouche, E. Karden, J. Walter, and R. W. D. Doncker, "On the impedance of the gassing reactions in lead-acid batteries " *Journal of Power Sources,* vol. 96, pp. 106-112, 2001.

[118] W. Jenseit, O. Böhme, F.U. Leidich, and H. Wendt, "Impedance spectroscopy: a method for in situ characterization of experimental fuel cells," *Electrochimica Acta,,* vol. 38, pp. 2115-2120, 1993.

[119] E. Barsoukov and J. R. Macdonald, "Impedane Spectroscopy Theory, Experiment and Applications," *John Wiley & Sons Ltd., Hoboken, New Jersey.,* 2005.

[120] A. Bratov, N. Abramova, A. Ipatov, and A. Merlos, "An impedimetric chemical sensor for determination of detergents residues " *Talanta,* vol. 106, pp. 286-292, 2013.

[121] Z. O. Uygun and Y. Dilgin, "A novel impedimetric sensor based on molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite electrode for trace level determination of chlorpyrifos " *Sensors and Actuators B,* vol. 188 pp. 78-84, 2013.

[122] C. Chouteau, S. Dzyadevych, J. M. C. Durrieu, and Chovelon, "A bi-enzymatic whole cell conductometric biosensor for heavy metal ions and pesticides detection in water samples. ," *Biosens. Bioelectron. ,* vol. 21, p. 273, 2005.

[123] A. D. Chowdhury, A. De, C. R. Chaudhuri, K. Bandyopadhyay, and P. Sen, "Label free polyaniline based impedimetric biosensor for detection of E. coli O157:H7 Bacteria " *Sensors and Actuators B,* pp. 916- 923 2012.

[124] A. Hayat, L. Barthelmebs, and J-L. Marty, "Electrochemical impedimetric immunosensor for the detection of okadaic acid in mussel sample," *Sensors and Actuators B* vol. 171- 172, pp. 810- 815, 2012.

[125] N. Meini, C. Farre, C. Chaix, K. Kherrat, S. Dzyadevych, and N. Jaffrezic-Renault, *Sensors and Actuators B,* vol. 166-167, pp. 715-720, 2012.

[126] B. Pejcic and R. D. Marco, " Impedance spectroscopy : over 35 years of electrochemical sensor optimisation.," *Electrochim. Acta,* vol. 51, pp. 6217-6229, 2006.

[127] Y. Lei, Chen. W., and A Mulchandani. Review, " microbial biosensors," *Anal. Chim.Acta,* vol. 568, pp. 200-210, 2006.

[128] S.F. D'Souza., "Microbial biosensors," *Biosensors &Bioeloctronics,* vol. 16, pp. 337-353, 2001.

[129] A.Bratov., N.Abramova.,J. Munor., C. Domínguez, S. Alegret., and J.Bartrolí ., "Photocurable polymer matrices for potassium-sensitive ion selective electrode. ," *Anal. Chem. ,* vol. 67, pp. 3589-3595, 1995.

[130] J. L. Marty, N. Mionetto, and R. Rouillon, *Anal. letters,* vol. 25, pp. 1389-398, 1992.

[131] K.Wan, J.M Chovelon, N. Jaffrezic-Renault, and A.P.Soldatkin, "Sensitive detection of pesticide using ENFET with enzymes immobilized by cross-linking and entrapment method.," *Sensors and Actuators B,* vol. 58, pp. 399-408, 1999.

[132] J.L. Besombes, S. Cosnier, and P. Labbé., Improvement of poly(amphiphilic pyrrole) enzyme electrodes via the incorporation of synthetic laponite-clay-nanoparticles. *Talanta,* vol. 44 p. 2209, 1997.

[133] A. P. F. Turner, I. Karube, G. S. Wilson, and P. J. Worsfold., Biosensors: Fundamentals ans applications.; *Analytica Chimica Acta,* vol. 201, pp. 363-364., 1987.

[134] M.F Martin Choi., "Progress in enzyme based biosensors using optical transducers.," *Microchemica Acta, ,* vol. 148, pp. 107-132., 2004.

[135] Rita MAALOUF, "Conception, élaboration et caractérisation de biocapteurs pour la détection de neurotransmetteurs et de bactéries dans les milieux physiologiques, ," *UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1,* 2006.

[136] Domínguez O and A. MJ., "Electrochemical Biosensors.," *Encyclopedia of Sensors. USA: American Scientific Publishers,* vol. 3, 2006.

[137] A. Sassolas, L. J. Blum, and B. D. Leca-Boubier, "Immobilization stratégies to develop enzymatic biosensors.," *Biotechnol. Adv,* vol. 30, pp. 489-511, 2012.

[138] S. Datta, L. R. Christena, and Y. R. S. Rajaram, "Enzyme immobilization : an overview on techniques and support materials," *Biotechniques,* vol. 3, pp. 1-9, 2013.

[139] A. Tlili, and al., , "A novel silicon nitride biosensor for specific antibody-antigen interaction.," *Materials Science and Engineering:C,* vol. 25, pp. 490-495 2005.

[140] D. Du, and al., , "Development of acetylcholinesterase biosensor based on CdTe quantum dots modified cysteamine self-assembled monolayers.," *Journal of Electroanalytical Chemistry,* vol. 623, pp. 81-85, 2008.

[141] J. Rubio Retama, and al., "Design of an amperometric biosensor using polypyrrole-microgel composites containing glucose oxidase. ," *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 20, pp. 1111-1117 2004.

[142] Z. M. Tahir, E.C. Alocilja, and D.L. Grooms, "Polyaniline synthesis and its biosensor application.," *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 20, pp. 1690-1695., 2005. .

[143] G. HOUSSEMEDDINE, "Mise au point de biocapteurs basés sur la mesure d'activités enzymatiques de cellules algales pour la surveillance des milieux aquatiques," *THESE* 2010

CHAPITRE II

PRÉSENTATIONS DE LA SPECTROSCOPIE D'IMPEDENCE

CHAPITRE II

PRESENTATION DE LA SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE

II. 1. SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE

II. 1. 1. Introduction

L'histoire de la spectroscopie d'impédance a commencé en 1886, lorsque le mathématicien et physicien Oliver Heaviside introduit l'impédance en génie électrique [1]. Son travail fut bientôt étendu pour inclure des diagrammes vectoriels, des représentations dans le plan complexe et l'utilisation de circuits équivalents pour représenter la réponse impédimétrique [2]. La spectroscopie d'impédance (SI) est un terme général qui désigne la fonction de transfert d'un matériau d'intérêt soumis à une perturbation sinusoïdale surimposée à une contrainte fixe continue (mécanique, électrique, optique…). L'analyse conséquente de cette fonction permet d'obtenir les informations utiles sur les propriétés physico-chimiques du système.

La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) est la catégorie principale de la spectroscopie d'impédance qui a été largement utilisée dans de nombreux domaines de l'électrochimie, par exemple, pour étudier la cinétique des réactions aux électrodes, la double couche, les batteries, la corrosion, l'électrochimie à l'état solide, et bioelectrochemistry [3]. La SIE peut être définie comme une technique de caractérisation qui fournit des informations électriques dans un domaine des fréquences [4-7]. Elle combine l'analyse à la fois des propriétés résistives et capacitives de matériaux, suite à une faible perturbation du système de l'état d'équilibre [8-11].

La perturbation est appliquée sous la forme d'une tension sinusoïdale de faible amplitude couvrant un large spectre de fréquences, typiquement de 100 mHz à 100 kHz.

Avec cette technique, un processus qui se déroule dans une cellule électrochimique peut être modélisé à l'aide d'une combinaison de circuits électriques qui donnent la même réponse en courant que le système électrochimique. Par l'utilisation de circuits équivalents [12], les spectres expérimentaux peuvent être modélisés par une courbe théorique correspondant au modèle de circuit sélectionné, en obtenant ainsi des valeurs des grandeurs électriques (par exemple, résistance, capacité …etc.) qui sont en corrélation directe avec les phénomènes électrochimiques spécifiques se produisant dans le système étudié.
La SIE est apparue comme une technique intéressante pour la caractérisation, l'analyse et l'étude des piles à combustible [13], l'électrodéposition [14], les batteries [15], et les phénomènes de corrosion [16]. Elle a également été largement utilisée comme un outil pour étudier la cinétique d'électrodes, les polymères conducteurs, les semi-conducteurs, les tissus d'origine animale et végétale et le matériel en général[17].

Grâce à sa grande capacité pour la caractérisation des interfaces électrode - électrolyte [18] et sa grande sensibilité pour sonder les propriétés interfaciales d'une surface d'électrode modifiée, la SIE a été largement appliquées aux biocapteurs au cours des dernières années. Les techniques impédimétriques ont été utilisées pour caractériser la fabrication des biocapteurs et contrôler les réactions catalysées par des enzymes ou des événements de reconnaissance biomoléculaires par des liaisons spécifiques de protéines, de lectines, de récepteurs, d'acides nucléiques, de cellules entières, des anticorps ou des substances liées à l'anticorps…[17].

En plus de surveiller l'effet du processus de reconnaissance, la spectrométrie d'impédance électrochimique est une méthode utile pour rechercher l'état de la surface de l'électrode après modification [19]. Il s'agit d'un pas important dans le développement de différents types de capteurs basés sur des couches de reconnaissance sur une surface de matériau conducteur [17, 20].

Afin de gagner plus de perspicacité dans la SIE, un petit rappel sur l'électrochimie et une brève description des bases de la spectroscopie d'impédance sont données dans ce chapitre.

II. 1. 2. Théorie

Les raisons pour lesquelles on effectue des mesures de nature électrochimique sur les systèmes chimiques sont très variées. On peut rechercher des données thermodynamiques sur une réaction. On peut vouloir générer une espèce intermédiaire telle qu'un ion radical et étudier sa vitesse de disparition ou ses propriétés spectroscopiques. On peut encore désirer analyser une solution en déterminant les concentrations en traces de cations métalliques ou de substances organiques. Dans ces exemples, les méthodes électrochimiques sont utilisées comme des outils pour l'étude des systèmes chimiques, comme le sont fréquemment les méthodes spectroscopiques. Pour d'autres types de recherche, l'étude des propriétés électrochimiques des systèmes constitue l'intérêt principal, par exemple dans la conception d'un nouveau générateur d'énergie électrique ou pour l'électrosynthèse d'une molécule donnée. De nombreuses méthodes électrochimiques ont été mises au point pour l'ensemble de ces centres d'intérêt. Leur utilisation réclame d'avoir compris les principes fondamentaux des réactions électrochimiques et les propriétés électriques des interfaces électrode-solution.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous intéressons à l'interface métal/électrolyte.
Un tel transfert de charge qui correspond au passage d'un courant électrique à travers l'interface électrochimique, a pour principal effet de produire une transformation chimique appelée réaction d'oxydo-réduction.

II. 1. 2. 1. Réaction d'oxydo-réduction à l'interface métal/solution [21]

Expérimentalement, le contrôle du potentiel de l'électrode indicatrice est équivalent à contrôler l'énergie des électrons dans l'électrode. En portant cette électrode à des potentiels plus négatifs, l'énergie des électrons est accrue et ils peuvent éventuellement atteindre un niveau d'énergie suffisant pour occuper des positions vacantes qui existent sur certaines espèces présentes dans l'électrolyte. Lorsqu'il en est ainsi, un flux d'électrons (courant de réduction) circule de l'électrode vers la solution (figure II.1.a) :

$$A^{+} + \text{(électrode)}\,\overset{\nearrow}{e^{-}} \rightarrow A$$

Inversement on peut diminuer l'énergie des électrons en imposant un potentiel plus positif, et il peut en résulter que des électrons des solutés de l'électrolyte trouvent des conditions d'énergie plus

favorables dans l'électrode et y soient transférés. Leur flux, de la solution vers l'électrode, est un courant d'oxydation (figure II.1.b) :

$$A \rightarrow A^{+} + e^{-}$$

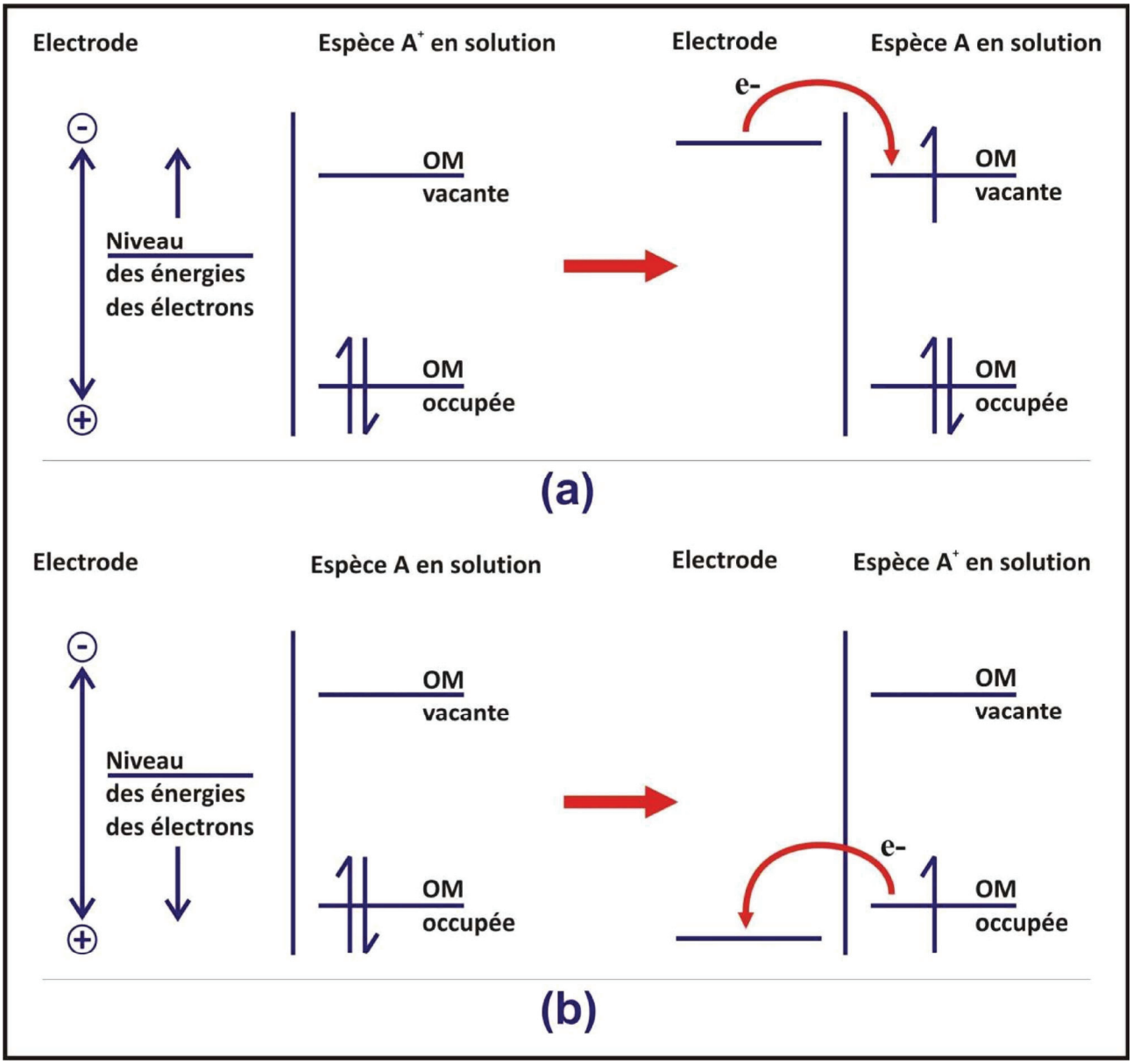


Figure II.1
Représentation de la réduction (a) et de l'oxydation (b) d'une espèce A en solution. Les orbitales moléculaires (OM) de l'espèce A qui sont représentées sur le schéma sont l'OM occupée la plus basse et l'OM vacante la plus haute.

II. 1. 2. 2. Transfert et transport de matière

Que ce soit dans la matière solide ou la matière liquide, il est nécessaire pour étudier le transport et le transfert de matière de considérer les 3 modes suivants :

- la diffusion : c'est le mouvement des espèces électroactives provoqué par un gradient de concentration créé à la suite d'oxydoréduction des espèces à la surface de l'électrode ;

- la migration : c'est le mouvement des espèces chargées provoqué par un gradient de potentiel appliqué à l'électrode ;

- la convection : c'est le mouvement des espèces en solution provoqué par des forces mécaniques (exemple : agitation de la solution).

II. 1. 2. 3. Interface métal/solution[21, 22]

Lorsqu'un métal est placé en contact d'un électrolyte, une interface électrique est immédiatement développée. La zone de l'interface métal/solution où existent les espèces chargées est appelée la double couche électrique. A un potentiel donné, l'interface électrode/solution est caractérisée par une capacité de double couche, Cd. Le coté de la double couche situé dans la solution est constitué de plusieurs couches. Celle qui est la plus proche de l'électrode est appelée couche d'Helmholtz. Elle contient les molécules de solvant et parfois certaines espèces (ions ou molécules) qui sont spécifiquement adsorbés. Le lieu des centres électriques des ions spécifiquement adsorbés est appelé plan interne d'Helmholtz (PIH), situé à une distance x_1 de l'électrode. Les ions solvatés ne peuvent s'approcher du métal qu'à une distance égale à x_2; le lieu des centres des ions solvatés est appelé plan externe d'Helmholtz (PEH). L'interaction des ions solvatés avec le métal chargé met en jeu uniquement des forces électrostatiques à grande distance. Ces ions sont dits non spécifiquement adsorbés. En raison de l'agitation thermique dans la solution, les ions non spécifiquement adsorbés sont situés dans une région appelée couche diffuse, qui s'étend du PEH au sein de la solution.

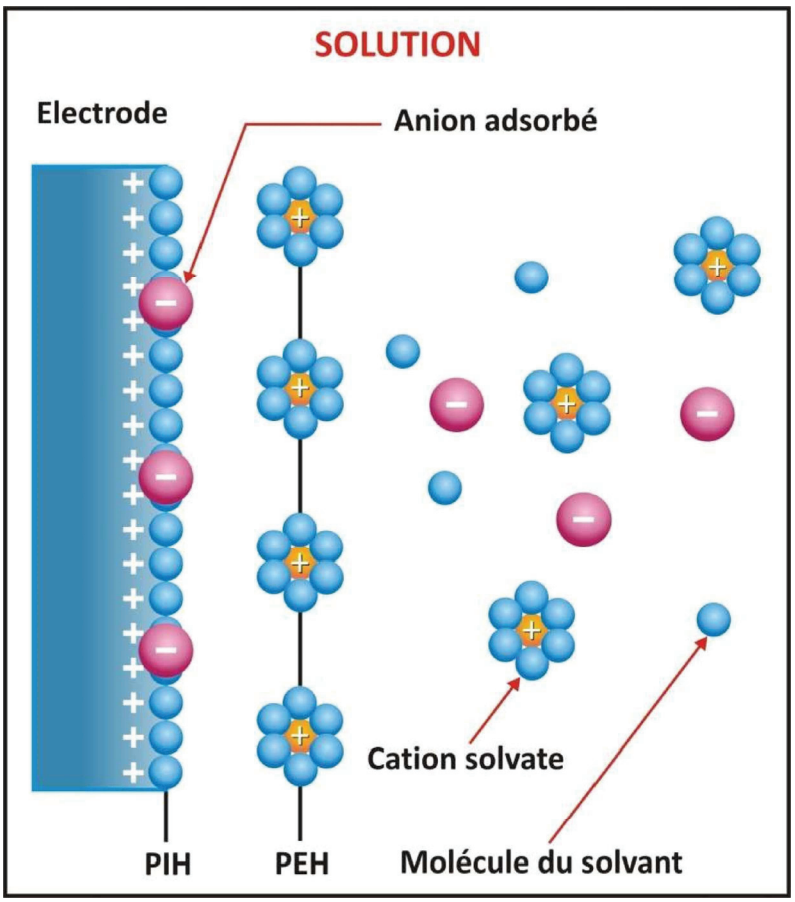


Figure. II-2
Modèle proposé pour la double couche à l'interface métal/solution

II. 1. 2. 4. Double couche : modèles d'Helmholtz, Gouy-Chapmann et Stern

Comme cela a été mentionné dans le paragraphe précédent, le contact métal/électrolyte crée à l'intérieur de l'électrolyte une zone de charge d'espèce au voisinage de l'interface. Cependant la structure exacte de cette zone reste très difficile à déterminer, c'est ce qui a donné naissance à plusieurs modèles :

En 1879, Helmholtz a introduit la notion de double couche. D'après Helmholtz, l'interface électrode/solution se comporte comme un condensateur plan, une chute linéaire de potentiel entre le métal et la solution. L'électrode métallique porte une charge q^M, et la solution porte une charge, q^S (le signe du métal par rapport à la solution dépend du potentiel). Dans tous les cas, $q^M = -q^S$. La charge sur le métal q^M est localisée dans une couche extrêmement mince (~100pm) à la surface du métal. La charge en solution q^S est constituée d'un excès soit de cations, soit d'anions au voisinage de la surface de l'électrode.

$$C_H = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r}{d_{PEH}} \qquad (II.1)$$

Où C_H est la capacité surfacique de la double couche électrique ε_0 est la permittivité du vide et ε_r est la permittivité relative de l'électrolyte et d_{PEH} est l'épaisseur de la double couche électrique.

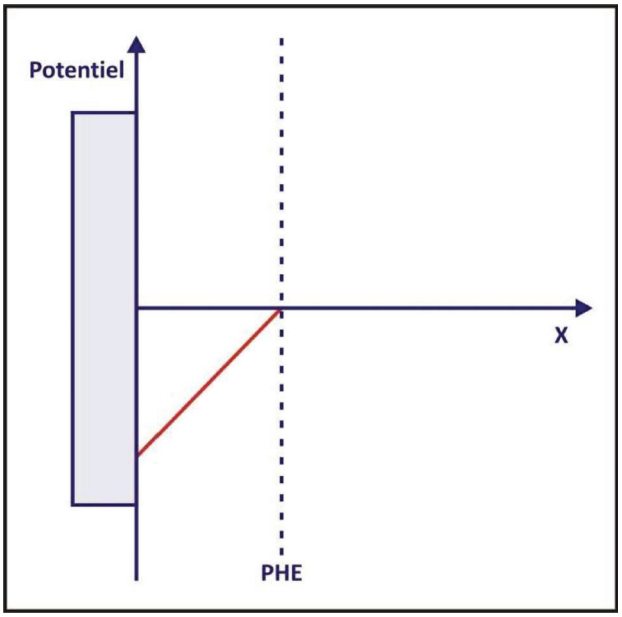


Figure II.3
La variation du potentiel à l'interface conformément au modèle de Helmholtz

Le modèle de la double couche est simple mais il ne suffit pas à expliquer les résultats expérimentaux. Gouy et Chapmann ont amélioré le modèle d'Helmholtz en proposant un modèle où les ions qui forment la charge électrique de l'interface du côté solution ne sont plus localisés en totalité dans le plan d'Helmholtz mais ont une distribution décroissante exponentiellement avec la distance à l'électrode. Cette distribution résulte de l'équilibre entre les forces de nature électrique et celles de nature thermique. La double couche devient couche diffuse. La chute de potentiel va avoir elle aussi une décroissance en fonction de la distance à l'électrode en tendant asymptotiquement vers zéro au sein de la solution. L'approximation faite par Gouy et Chapmann est de considérer les ions comme des charges électriques ponctuelles.

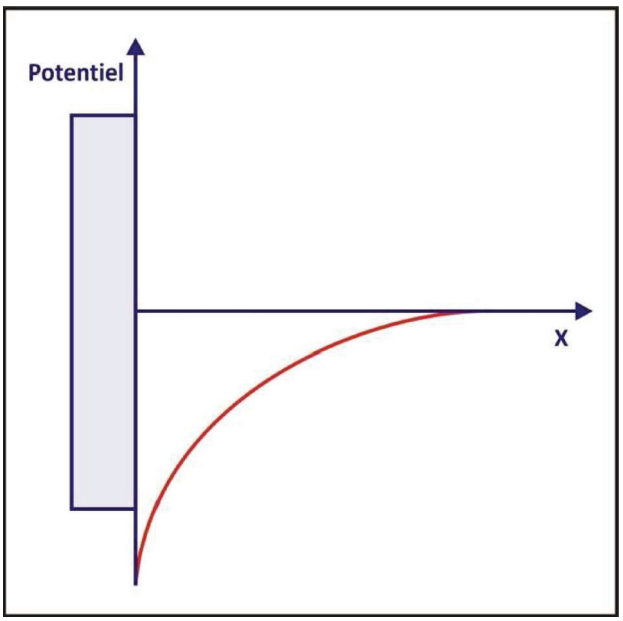


Figure II.4
Variation du potentiel avec la distance dans la couche diffuse

La chute de potentiel en fonction de la distance à l'électrode x, est donnée par :

$$V(x) = V_0 e^{\left[\frac{x}{L_D}\right]} \qquad (II.2)$$

Où

V_0 est le potentiel à la surface de l'électrode ($x = 0$),

L_D est la longueur de Debye qui représente l'épaisseur de la couche diffuse.

$$L_D = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r V_t}{2 n_0 z^2 q}} \qquad (II.3)$$

Où

V_t représente la tension thermique, $V_t = \frac{kT}{q}$,

n_0 est le nombre d'ions par unité de volume (ions/l),

z est la valence des ions

q est la charge d'un électron.

La capacité de la double couche par unité de surface (F/m^2) est donnée par :

$$C_G = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r}{L_D} \cosh\left(\frac{zV_0}{2V_t}\right) \qquad (II.4)$$

Où

le terme ($\varepsilon_0\varepsilon_r/L_D$) représente la capacité par unité de surface d'un condensateur plan dont les armatures sont séparées d'une distance L_D, l'effet des charges mobiles étant compensé par le terme en cosinus hyperbolique.

Bien que le modèle de Gouy-Chapmann constitue une amélioration par rapport à celui d'Helmholtz, la valeur théorique de la capacité varie avec la tension appliquée beaucoup plus que la valeur observée expérimentalement et elle est aussi trop dépendante de la concentration ionique.

Stern a rectifié cette divergence en combinant le modèle de Helmholtz avec celui de Gouy-Chapmann. Stern n'a pas fait l'approximation des charges ponctuelles du modèle de couche diffuse et il a considéré que les ions ne peuvent pas s'approcher de l'électrode au delà d'une certaine distance critique. Les porteurs de charge en solution, selon la théorie de Stern, ont la même distribution que dans le cas de la couche diffuse avec la différence que la distribution ne commence pas à la surface de l'électrode (x = 0) mais à partir du plan d'Helmholtz, ce qui implique deux chutes de potentiel :

$$V_M - V_S = (V_M - V_H) + (V_H - V_S) \qquad (II.5)$$

Où

V_M est le potentiel de l'électrode,

V_S le potentiel au sien de la solution,

V_H le potentiel en solution au plan externe de Helmoltz.

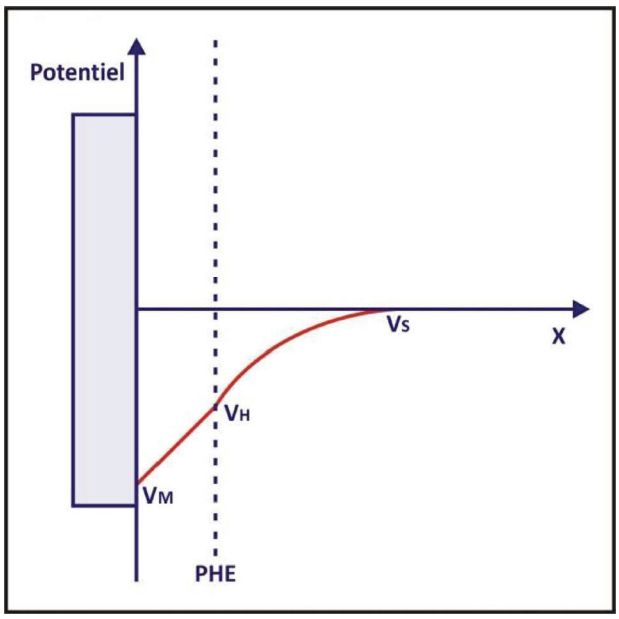


Figure II.5
La distribution du potentiel selon Stern

Ainsi la capacité interfaciale totale est la combinaison de deux capacités en série :

$$\frac{1}{C_I} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_G} \qquad (II.6)$$

Où

C_I est la capacité interfaciale totale de Stern,

C_H est la capacité d'Helmholtz

C_G celle de Gouy-Chapmann.

II. 1. 2. 5. Processus faradique et non faradique:

Les électrodes sont le siège de deux types de processus. Le premier concerne les transferts d'électrons à travers l'interface métal/solution. Ce transfert électronique provoque une oxydation ou une réduction (phénomènes décrits précédemment): on dit qu'il s'agit d'un processus faradique.

Dans certaines conditions, à une interface électrode/solution donnée, il existe un domaine de potentiel où aucune réaction de transfert de charge n'a lieu parce que de telles réactions sont thermodynamiquement ou cinétiquement défavorisées (par exemple, une électrode métallique plongée dans une solution de PBS (Phosphate Buffer Salin) ne comportant pas de couple redox). Cependant, d'autres processus tels qu'une adsorption ou une désorption peuvent se produire, et la

structure de l'interface électrode/solution varie avec le potentiel et la composition de la solution. Ces processus sont appelés non faradiques.

II. 1. 3. Mesure d'impédance électrochimique :

II. 1. 3. 1. Principe :

La mesure de l'impédance ou de l'admittance d'un système électrochimique s'effectue en appliquant au système une contrainte sous la forme d'une variation sinusoïdale de différence de potentiel électrique, de fréquence $f=\omega/2\pi$. Pour l'étude du comportement d'un système électrochimique à une électrode indicatrice donnée, cette différence de potentiel étant imposée entre l'électrode de travail et une électrode de référence (de potentiel supposé fixe), la contrainte revient à surimposer une variation sinusoïdale $\Delta E(t)$ du potentiel de l'électrode de travail à une valeur fixe E_0 (généralement E_0 est choisie de façon a avoir un courant nul dans la cellule électrochimique : le potentiel d'abandon) ; soit la loi de contrainte :

$$\boldsymbol{E(t) = E_0 + \Delta E(t) = \Delta E_0 \sin(\omega t)} \qquad (II.7)$$

La réponse du système est un courant d'intensité $I(t)$, une composante continue I_0 (le courant correspondant au potentiel E_0, courant évidement nul dans le cas où E_0 est le potentiel d'abandon) et une composante alternative $\Delta I(t)$. Si I_0 n'est pas nul, on opère dans les conditions où ce courant est stationnaire (I_0=constante).

$$\boldsymbol{I(t) = I_0 + \Delta I(t) = \Delta I_0 \sin(\omega t + \varphi)} \qquad (II.8)$$

II. 1. 3. 2. Fonction de transfert [23]

Par définition, la fonction de transfert d'un système linéaire est définie comme le rapport des transformées de Laplace des variations des fonctions de sortie et d'entrée.
Pour un système linéaire, la réponse du système à une perturbation est déterminée par une équation différentielle du n^e ordre ou par un ensemble de n équations différentielles du premier ordre:

$$\boldsymbol{\sum_{i-1}^{n} a_i \frac{d^i y(t)}{dt^i} = \sum_{i-1}^{n} b_i \frac{d^i x(t)}{dt^i}} \qquad (II.9)$$

Un système linéaire satisfait au principe de superposition qui établit que la fonction de sortie d'une combinaison linéaire de fonctions d'entrée est égale à la combinaison linéaire des fonctions de sortie respectives.

La fonction de transfert s'écrit :

$$\boldsymbol{H(s) = \frac{\Delta\bar{y}(s)}{\Delta\bar{x}(s)}} \qquad (\boldsymbol{II.10})$$

Quand une interface est éloignée de son équilibre au moyen d'une source d'énergie externe, un flux de charge et de matière s'établit. Cela est dû à l'existence de réactions électrochimiques qui impliquent le transfert des charges électriques entre le métal et l'électrolyte. Les lois élémentaires qui gouvernent la cinétique du transport de matière et les diverses réactions électrochimiques, ainsi que les couplages complexes entre ces processus élémentaires, imposent aux systèmes électrochimiques un comportement non linéaire.

Toutefois, on peut montrer que le comportement d'un système non linéaire peut être entièrement défini en termes linéaires si les équations linéaires équivalentes sont connues en chaque point de la caractéristique stationnaire. Par conséquent, l'analyse locale de ce système non linéaire peut alors se limiter à la théorie des systèmes linéaires.

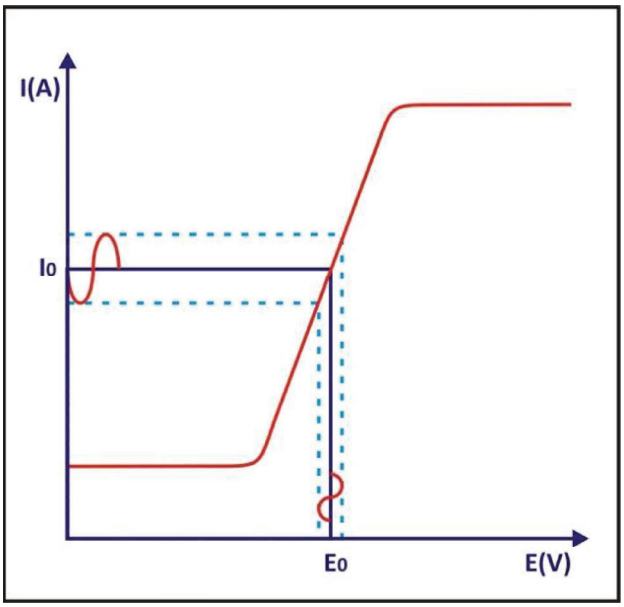


Figure (II.6)
Exemple de courbe courant –tension

Dans le cas d'une excitation sinusoïdale, nous avons :

$$\boldsymbol{\Delta x(t) = \Delta x \sin \omega t} \qquad (\boldsymbol{II.11})$$

Dont la transformée de Laplace est :

$$\boldsymbol{\Delta \overline{x}(s) = \Delta x \frac{\omega}{s^2 + \omega^2}} \qquad (\boldsymbol{II.12})$$

La fonction de sortie s'écrit ainsi

$$\boldsymbol{\Delta \overline{y} = H(s).\Delta \overline{x}(s) = \Delta x \frac{H(s).\omega}{s^2 + \omega^2}} \qquad (\boldsymbol{II.13})$$

La transformée inverse de l'équation *II.13* dans le domaine de fréquence, s=jω, donne la partie sinusoïdale de la fonction de sortie et s'écrit :

$$\boldsymbol{\Delta y(t) = \Delta x |H(\omega)| \sin(\omega t + \phi)} \qquad (\boldsymbol{II.14})$$

Où

|H(ω)| est le module de *H(ω)* défini en fonction des parties réelles *ReH(ω)* et imaginaires *ImH(ω) :*

$$|H(\omega)| = \sqrt{|ReH(\omega)|^2 + |ImH(\omega)|^2} \qquad (\boldsymbol{II.15})$$

Et ***φ*** □l'argument défini par :

$$\varphi = Arg[H(\omega)] = Arc\tan\left[\frac{ImH(\omega)}{ReH(\omega)}\right] \qquad (\boldsymbol{II.16})$$

Dans le cas d'un circuit électrique ou d'un système électrochimique, la fonction de transfert entre le potentiel (fonction d'entrée) et le courant (fonction de sortie) s'appelle l'admittance Y du système. Dans le domaine de fréquence, elle est définie par :

$$\boldsymbol{\Delta \overline{I}(\omega) = Y(\omega) \Delta \overline{E}(\omega)} \qquad (\boldsymbol{II.17})$$

De la même manière, la fonction de transfert entre le courant (fonction d'entrée) et le potentiel (fonction de sortie) s'appelle l'impédance Z du système. Dans le domaine de fréquence, elle est définie par :

$$\Delta\overline{E} = Z(\omega)\Delta\overline{I}(\omega) \qquad (II.18)$$

Il est clair que l'admittance est l'inverse de l'impédance.

La fonction de transfert dans le domaine de fréquence étant un nombre complexe, il est utile de la présenter en traçant la partie imaginaire en fonction de la partie réelle

$$H(\omega) = ReH(\omega) + jImH(\omega) \qquad (II.19)$$

En fait en électrochimie, il est d'usage de tracer plutôt $-ImH(\omega)$ en fonction de $Re\ H(\omega)$. Le graphe ainsi obtenu s'appelle un diagramme de Nyquist.

Une autre manière de représenter un nombre complexe est de tracer le module en fonction de la vitesse angulaire. En électrochimie, il est aussi usuel de tracer $log\ |H(\omega)|$ en fonction de $log\omega$ et le graphe ainsi obtenu s'appelle un diagramme de Bode.

De façon générale, vis-à-vis d'une faible excitation sinusoïdale, une cellule électrochimique équivaut simplement à une impédance ; on doit donc être capable d'en donner les caractéristiques sous forme d'un circuit électrique équivalent, formé de résistances et de capacités, et traversé, pour une excitation donnée, par un courant de même amplitude et de même déphasage que la cellule réelle.

A l'interface électrode/solution le passage de courant peut s'effectuer suivant deux voies parallèles :

- La production d'une réaction électrochimique par transfert d'électrons à travers l'interface, donnant naissance au courant faradique I_F
- La variation de charge interfaciale, donnant naissance au courant capacitif I_C.

II. 1. 3. 3. Résistance de la solution Rs

Cette résistance modélise le phénomène de passage du courant entre l'électrode indicatrice (l'électrode de travail) et la contre électrode. Cette résistance dépend, principalement, de la résistivité de la solution, de l'aire et de la géométrie de l'électrode de travail et intègre les résistances des contacts.

$$R_s(\Omega) = \frac{\rho\sqrt{\pi}}{4\sqrt{A}} \qquad (II.20)$$

Où

A est la surface en cm^2

ρ est la résistivité de la solution.

II. 1. 3. 4. Résistance de transfert de charge Rtc

La résistance de transfert de charge est définie par :

$$\frac{1}{R_{tc}} = \left(\frac{\delta I_F}{\delta E}\right) \qquad (II.21)$$

Au potentiel d'équilibre la résistance de transfert de charge s'écrit :

$$R_{tc} = \frac{RT}{nFI_0} \qquad (II.22)$$

II. 1. 3. 5. Phénomène de diffusion et impédance de Warburg W

Nous allons centrer notre étude sur des tensions sinusoïdales, les ions restant confinés aux voisinages de PEH. Si la fréquence d'excitation est élevée, ces ions ne peuvent pas suivre l'oscillation du champ et l'impédance de diffusion tend vers zéro.

En 1899, Warburg propose un modèle qui décrit la dépendance en fréquence de l'impédance de diffusion [12] :

$$|Z_w| = \frac{k}{\sqrt{f}} \qquad (II.23)$$

Où *k* représente une constante déterminée par l'électrochimie et par la mobilité des ions impliqués dans la réaction de transfert de charge. L'impédance de Warburg est placée en série avec la résistance de transfert de charge puisque la diffusion et le transfert de charge sont deux phénomènes qui se produisent successivement. En effet, les charges doivent diffuser du volume de la solution vers l'interface pour contribuer aux réactions d'oxydoréduction.

Cette impédance de Warburg a pour expression :

$$Z_W = (1 - j)\frac{\sigma}{(\omega)^{\frac{1}{2}}} \qquad (II.24)$$

Avec

$$\sigma = \frac{RT}{n^2 F^2 A\sqrt{2}}\left(\frac{1}{D_0^{1/2}\ C_0^*} + \frac{1}{D_R^{1/2}\ C_R^*}\right) \qquad (II.25)$$

Où

A est l'aire de l'électrode,

Do et **DR** représentent respectivement le coefficient de diffusion de l'oxydant et du réducteur,

C^*_R et C^*_o sont les concentrations en oxydant et en réducteur dans la solution,

T la température absolue,

F est la constante de Faraday,

n le nombre d'électrons échangés.

Si les réactions électrochimiques sont lentes, la résistance de transfert de charge est donc élevée et domine la partie résistive. Par contre, si la cinétique de transfert de charge est rapide, l'impédance de diffusion l'emporte par rapport à la résistance de transfert de charge, et l'impédance varie en $\omega^{-1/2}$.

II. 1. 3. 6. Circuit électrique équivalent

II. 1. 3. 6. 1. Résistance - condensateur en série

L'impédance de deux circuits en série est égale à la somme des impédances des éléments du circuit. En effet, la tension aux bornes du circuit est égale à la somme des tensions aux bornes de chaque élément, et le courant est identique à travers les éléments d'un circuit en série.

$$Z = \frac{\Delta\overline{E}}{\Delta\overline{I}} = \frac{\Delta\overline{E_1} + \Delta\overline{E_2}}{\Delta\overline{I}} = Z_1 + Z_2 \qquad (II.26)$$

Figure (II.7)
Circuit résistance -condensateur en série

Dans le cas présent d'une résistance et d'un condensateur en série, on a ainsi :

$$Z(\omega) = Z_R(\omega) + Z_C(\omega) = R + \frac{j}{C\omega} \qquad (II.27)$$

La représentation de Nyquist de l'impédance donne une droite verticale qui à hautes fréquences tend vers le point $Z_R = R$ (figure II.8).

Le diagramme de Bode peut être schématisé par deux droites qui se coupent à la vitesse angulaire *1/RC*. A haute fréquence, l'impédance du circuit tend vers celle d'une résistance pure comme l'illustre la figure II.9.

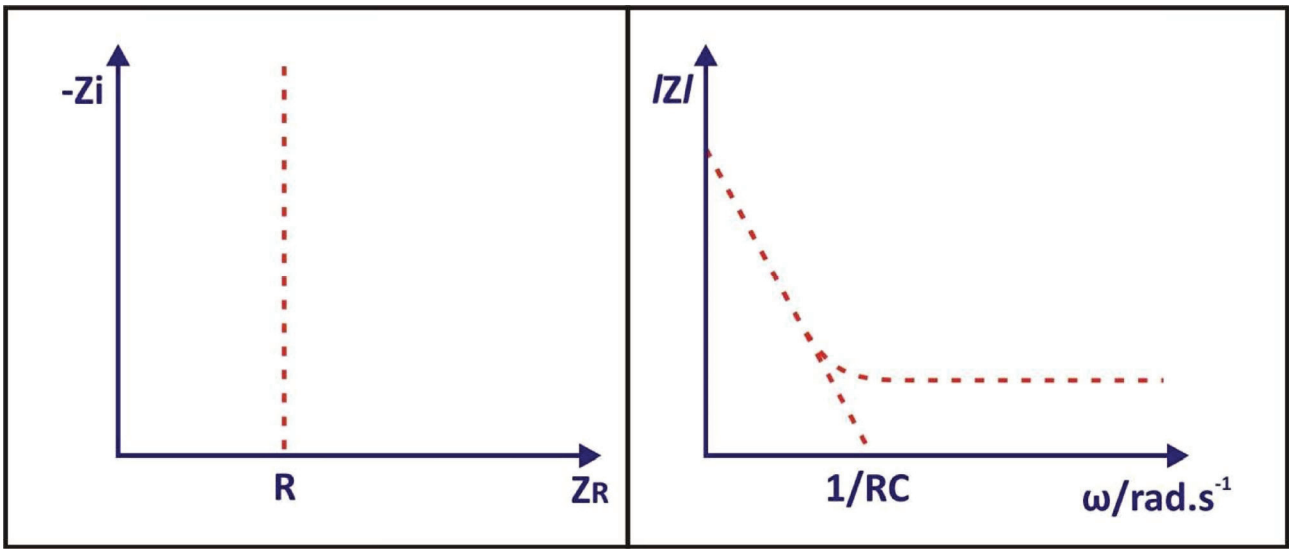


Figure (II.8)
Diagramme de Nyquist de l'impédance

Figure (II.9)
Diagramme de Bode

II. 1. 3. 6. 2. Résistance - condensateur en parallèle

L'admittance d'un circuit d'éléments en parallèle est égale à la somme des admittances des éléments respectifs. En effet, le courant à travers le circuit est égal à la somme des courants à travers chaque élément, et la tension est la même aux bornes de tous les éléments.

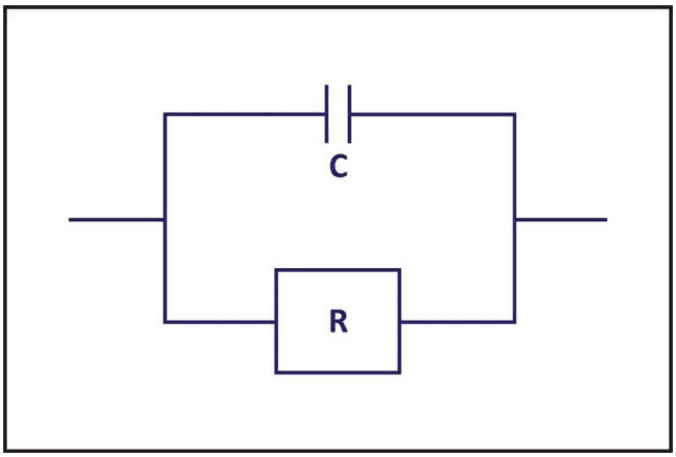


Figure (II.10)
Circuit résistance - condensateur en parallèle

$$Y = \frac{\Delta \bar{I}}{\Delta E} = \frac{\Delta \bar{I}_1 + \Delta \bar{I}_2}{\Delta E} = Y_1 + Y_2 \qquad (II.28)$$

Dans le cas présent d'une résistance et d'un condensateur en parallèle, on a ainsi :

$$Y(\omega) = Y_R(\omega) + Y_C(\omega) = \frac{1}{R} + jC\,\omega \qquad (II.29)$$

L'impédance est l'inverse de cette expression

$$Z(\omega) = \frac{R}{1 + jRC\,\omega} \qquad (II.30)$$

Le diagramme de Nyquist de l'impédance est donc un demi-cercle dont la vitesse angulaire au sommet correspond à l'inverse de *RC*. A basse fréquence, l'impédance tend vers le point $Z_R = R$, et à haute fréquence l'impédance tend vers l'origine (figure II.11).

Le diagramme de Bode peut être schématisé par deux droites qui se coupent à la valeur angulaire *1/RC* comme illustre la figure II.12.

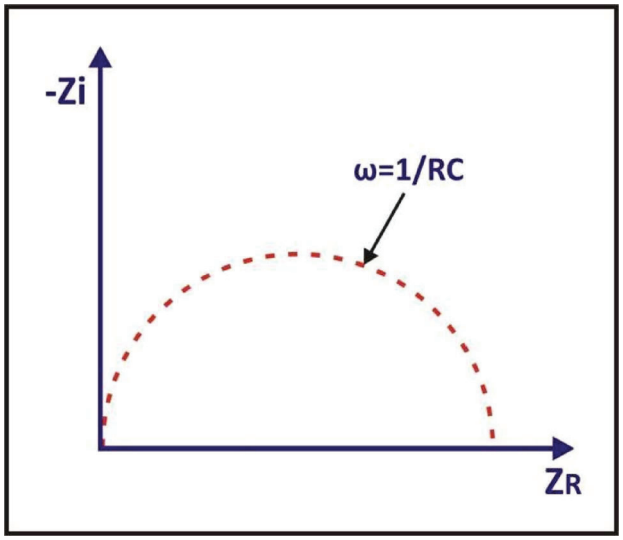


Figure (II.11)
Diagramme de Nyquist de l'impédance pour résistance - condensateur en parallèle

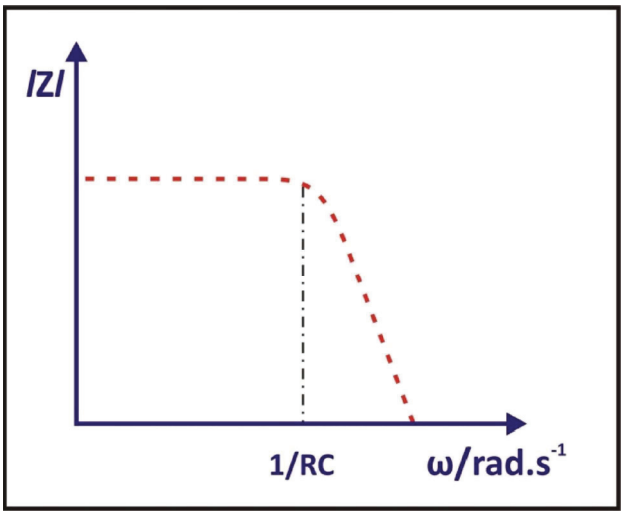


Figure (II.12)
Diagramme de Bode d'un circuit résistance - condensateur en parallèle

II. 1. 3. 6. 3. Circuit de Randles

Le circuit électrique équivalent le plus souvent utilisé pour une interface électrochimique est celui de Randles [13,14]. Il comporte la résistance R_s de l'électrolyte, une impédance de Warburg, Z_W, résultant de la diffusion des ions du volume de la solution à l'interface, la capacité de la double

couche C_{dl} et la résistance de transfert de charge R_{tc} qui existe s'il y a un couple redox dans la solution.

Les éléments agissant en parallèle (C_{dl} *et* R_{tc}, Z_W) du circuit équivalent sont introduits car le courant total qui traverse l'électrode est la somme du courant faradique, I_F, et du courant capacitif, I_C.

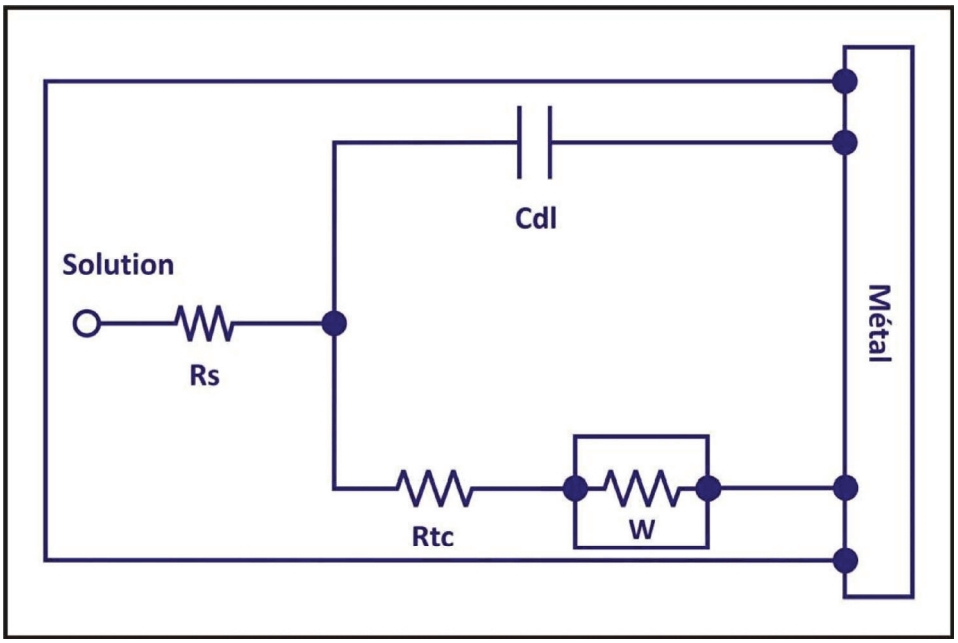


Figure (II.13)
Modèle électrique de l'interface métal/solution

Ce circuit équivalent formé d'éléments idéaux, capacités et résistances, ne peut pas tenir compte des imperfections de l'interface notamment de la rugosité et de l'inhomogénéité de la couche organique sur une électrode modifiées. Pour remédier à ce problème, une alternative intéressante consiste à substituer ces éléments idéaux par des impédances généralisées dites aussi des CPEs (élément de phase constante) [15,16] qui traduisent la non-linéarité et la dépendance en fréquence des impédances.

En effet, il est établi que la rugosité et la porosité des électrodes modifiées peuvent être à l'origine d'une dispersion en fréquence des spectres d'impédance. Plus tard, il a été démontré que les électrodes, qui sont le siège ou non d'un transfert de charge à l'interface, possèdent des impédances qui s'expriment sous la forme d'une loi d'échelle;

$$\boldsymbol{Z = K(\omega)^{-\alpha}\ ,\ \ -1 \leq \alpha \leq 1} \qquad (\boldsymbol{II.31})$$

En particulier, Z représente une résistance si $\alpha = 0$, une capacité si $\alpha = 1$, une impédance de Warburg si $\alpha = 0.5$ et une inductance si $\alpha = -1$.

II. 1. 4. Diagramme d'impédance totale

Compte tenu de l'intervention à l'interface électrode/électrolyte d'un courant capacitif et d'une résistance R_S, la grandeur mesurable est l'impédance totale exprimée par la relation :

$$Z = R_s + \frac{Z_F}{1 + j\omega\, C_{dl} Z_F} = Z_F \frac{1 - j\omega\, C_{dl} Z_F}{1 + (\, C_{dl} Z_F)^2} \qquad (II.32)$$

Or Z_F tend vers R_{tc} lorsque la fréquence est élevée. Alors l'équation 26 devient :

$$Z = R_s + R_{tc} \frac{1 - j\omega\, C_{dl} Z_{tc}}{1 + (\, C_{dl} Z_{tc})^2} \qquad (II.33)$$

Où les composantes réelle Z_{re} et imaginaire Z_{Im} de l'impédance peuvent s'exprimer par:

$$Z_{re} = R_s + \frac{R_{tc}}{1 + (\omega C_{dl} R_{tc})^2} \qquad (II.34)$$

$$Z_{Im} = \frac{\omega C_{dl}\, R_{tc}^2}{1 + (\omega C_{dl}\, R_{tc})^2} \qquad (II.35)$$

L'équation de l'impédance (équation II.33) est l'équation d'un demi-cercle de diamètre R_{tc} dont les extrémités, sur l'axe des réels, sont les points d'abscisse R_s et R_s+R_{tc}. La fréquence à laquelle correspond le sommet du demi-cercle a pour valeur :

$$f_c = \frac{1}{2\pi R_{tc}\, C_{dl}} \qquad (II.35)$$

Comme l'illustre la figure II.14, le diagramme de Nyquist correspondant au circuit de Randles comprend un demi-cercle dû à la résistance de transfert de charge R_{tc} et à la capacité de la double couche C_{dl}. Aux bases fréquences, l'impédance de Warburg est prédominante et le diagramme devient linéaire avec une pente égale à l'unité.

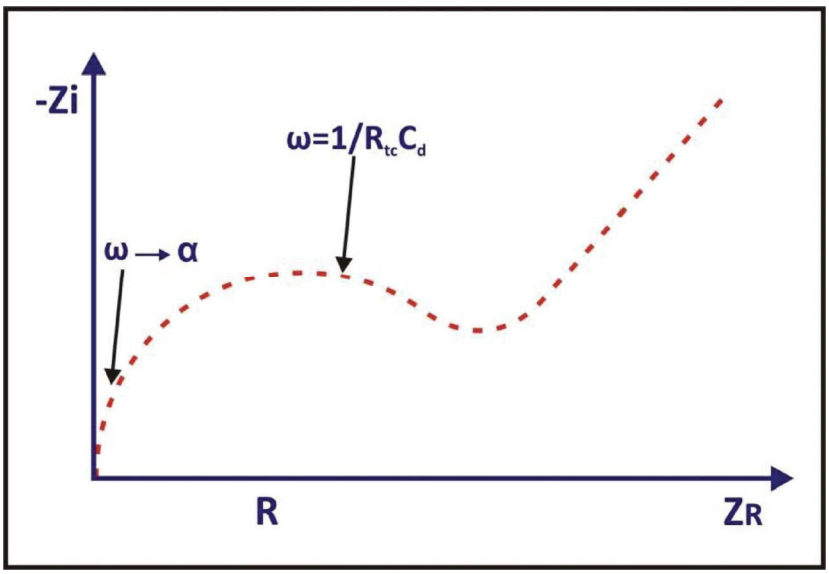


Figure (II.14)
Diagramme de Nyquist de l'impédance pour un circuit de Randles

CONCLUSION

La méthode d'impédance est basée sur l'interprétation des valeurs de la résistance de transfert et la capacité de la double couche en terme de phénomène à l'interface. Cette méthode peut être d'une grande précision, et elle est fréquemment utilisée pour la détermination des paramètres de transfert de charge et les études de structure de la double couche.

REFERENCES – CHAPITRE II

[1] H. J. Josephs., "The Heaviside Papers found at Paignton in 1957 Electromagnetic Theory by Oliver Heaviside.,". , vol. Chelsea Publishing Co.: New York, p. 197.

[2] J. R. MACDONALD, "Impedance speciroscopy and its use in analyzing the steady-state ac response of solid and liquid electrolytes " *J. Electroanal. Chem,,* vol. 223 pp. 25-50, 1987.

[3] M.E. Orazem, B. Tribollet., and "Electrochemical Impedance Spectroscopy.," *Wiley-Interscience: Hoboken, New Jersey,,* 2008.

[4] J. R. Macdonald., " Impedance spectroscopy," *Annals of Biomedical Engineering,* vol. 20, pp. 289-305, 1992.

[5] J.R. Macdonald, "Impedance Spectroscopy," *Wiley:New York,* 1987.

[6] A.J. Bard, L. R. Faulkner., and "Electrochemical Methods.," *Wiley: New York, Bott,* 1980.

[7] A. W. Bott., " Electrochemical techniques for the characterization of redox polymers. ," *Curr. Separat,* vol. 19, pp. 71-75 2001.

[8] J. Janata, "Electrochemical sensors and their impedances: A tutorial.," *Crit. Rev. Anal. Chem.,* vol. 32, pp. 109-120, 2002.

[9] M. E. Orazem and B. Tribollet, "Electrochemical Impedance Spectroscopy,," *John Wiley & Sons, Hoboken New Jersey,* 2008.

[10] E. Barsoukov and J. R. Macdonald, "Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications,," *Wiley-Interscience, Hoboken,,* vol. 2nd Edition, 2005.

[11] C. M. A. Brett and A. M. O. Brett, "In Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications,," *Oxford University Press, Oxford,* pp. 224-252., 1994.

[12] M. Sluyters-Rehbach and J. H. Sluyters., "Electroanalytical Chemistry. ," *Marcel Dekker: New York,* 1970.

[13] W. Jenseit, O. Böhme, F.U. Leidich, and H. Wendt, " ac Impedance study of the oxygen reduction mechanism on La1−xSrxMnO3 in solid oxide fuel cells " *Electrochimica Acta,* vol. 38, pp. 2115-2020, 1993.

[14] W.G. Proud and C. Müller, "The electrodeposition of nickel on vitreous carbon: Impedance studies," *Electrochimica Acta* vol. 38, pp. 405-413, 1993.

[15] A Hammouche, E Karden, J Walter, and R. W. D. Doncker, "On the impedance of the gassing reactions in lead-acid batteries " *Journal of Power Sources* vol. 96, pp. 106-112, 2001.

[16] D. C. Silverman, "Corrosion prediction in complex environments using electrochemical impedance spectroscopy," *Electrochimica Acta* vol. 38, pp. 2075-2078; 1993.

[17] J-G GUAN, Y-Q MIAO, Q.-J. ZHANG, "Impedimetric Biosensors " *Journal of Bioscience and Bioengineering,* vol. 97, pp. 219-226., 2004.

[18] S.M. Park, J. S. Yoo., "Electrochemical impedance spectroscopy for better electrochemical measurements.," *Analytical Chemistry. ,* vol. 75, pp. 455A-461A, 2003.

[19] H. O. Finklea, " Electrochemistry of organized monolayers of thiols and related molecules on electrodes,in Electroanalytical Chemistry:," *A Series of Advances (eds A.J. Bard and I. Rubenstein), Dekker, New York,,* pp. 109-335., 1996.

[20] E. Katz, "Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors," *Electroanalysis,,* vol. 15, pp. 913-947, 2003.

[21] A. J. Bard, L. R. Faulkner, and "Electrochimie, Principes, méthodes et applications, *Masson,* 1983.

[22] J. Besson, "Precis de thermodynamique & cinetique electrochimiques, ," *Ellipses,* 1984.

[23] Hubert H. Girault, "Electrochimie : physique et analytique, " *Presses polytechnique et universitaires romandes,* 2007.

CHAPITRE III

DÉVELOPPEMENTS D'UN APTASENSOR IMPDIMÉTRIQUE POUR LA DÉTECTION DE LA THROMBINE

CHAPITRE III

DEVELOPPEMENT D'UN APTASENSOR IMPEDIMETRIQUE POUR LA DETECTION DE LA THROMBINE

III. 1. INTRODUCTION

La reconnaissance moléculaire joue un rôle très important dans la nature, il existe différentes types de couples biomoléculaires dans les systèmes biologiques, y compris les anticorps et les antigènes [1], les hormones et les récepteurs hormonaux [2], les promoteurs de l'ADN et des facteurs de transcription [3], les enzymes et les substrats [4] ….etc. La plupart de ces couples biomoléculaires présentent une grande affinité, spécificité et leurs interactions sont largement étudiées. Elles sont d'un grand intérêt pour différentes applications biologiques et biomédicales, dont les biocapteurs. Une grande variété de biocapteurs à été développée depuis la conception du premier biocapteur à base d'enzyme glucose oxydase depuis plus de 40 ans [5]. Toutefois, des défis restent à relever lors de l'utilisation de ces types de systèmes biomoléculaires naturels dans les conditions expérimentales. La plupart de ces biomolécules tel que les enzymes et les anticorps ont des structures fonctionnelles instables surtout quand elles sont placées dans un environnement qui est différent de leurs conditions idéales, elles peuvent être facilement dénaturées et perdent leur fonction biologique initiale. Par conséquent, ces couples moléculaires ont des applications analytiques limitées dans de nombreuses situations. De toute évidence, il est d'intérêt et de grande importance à explorer des ligands synthétiques qui ont non seulement une grande affinité et spécificité vis à vis des molécules cibles, mais aussi des caractéristiques spéciales pour résister aux conditions drastiques chimiques et biologiques. Les aptamères ont été développés pour répondre à ces exigences, dans ce qui suit, nous allons donner une description de ces aptamères et de leurs propriétés.

III. 2. LES APTAMERES

Les aptamères sont des oligonucléotides (molécules d'ADN, d'ARN simple ou double brin) isolés in vitro à partir de banques combinatoires d'un grand nombre de composés de séquence aléatoire (contenant jusqu'à 10^{15} séquences différentes) par une méthode de sélection itérative appelée SELEX (*systematic evolution of ligands by exponentiel enrichment)* [6, 7]. Les aptamères sont aussi appelés «anticorps chimiques» en raison de leur processus de sélection artificielle in vitro basé sur la méthode SELEX [8]. Les aptamères ont d'abord été produits indépendamment dans deux laboratoires en 1990 : celui de Larry Gold [7] à l'Université du Colorado à Boulder, qui a utilisé le terme SELEX pour le processus de sélection des ARN se liant à l'ADN polymérase T4, et Jack Szostak [6] au Massachusetts General Hospital, à Boston aux Etats-Unis, en sélectionnant des ARN se liant à différents colorants organiques, et qui a inventé le terme « sélection in vitro » et « aptamère ». Le terme aptamère derive du mot latin "aptus" qui signifie (apte, approprié à, ou se lie à, qui joint) et du suffixe grec "meros" (mer : l'unité de base composant un polymère) désignant un polymère adapté à une fonction. Ils ont une taille intermédiaire (environ 8 à 15 kDa), entre les petits peptides (environ 1kDa) et les fragments d'anticorps simple chaîne (environ 25 kDa) et adoptent des structures tridimensionnelles leur permettant de se fixer spécifiquement à une molécule cible ou à un ligand.

Contrairement à la préparation d'anticorps, qui dépend de l'induction du système immunitaire de l'animal, le processus SELEX permet la préparation d'aptamères pour des cibles non immunogènes et toxiques, ce qui est impossible à obtenir par le système immunitaire [9]. En outre, il est également possible de produire des aptamères vis-à-vis de régions spécifiques de cibles, ce qui est parfois difficile pour les anticorps, car le système immunitaire des animaux contient intrinsèquement des épitopes sur des molécules cibles.

Les aptamères présentent certains avantages par rapport aux anticorps conventionnels, du fait qu'ils sont faciles à synthétiser, beaucoup plus stables, forment des liaisons spécifiques avec l'analyte, sont moins immunogènes, moins toxiques, sont moins chers, et qu'ils peuvent être stockés à long terme et ils offrent la possibilité de multiples modifications.

Ils peuvent être sélectionnés pour un large éventail de cibles, y compris des ions (tel que : K^+ , Zn^{2+} , Ni^{2+}), de petites molécules organiques (par exemple : les acides aminés, les nucléosides / nucléotides, les médicaments, les vitamines, les colorants organiques et les toxines), des peptides et des protéines (comme la thrombine, des facteurs de croissance et les peptides associés au VIH) et des cellules entières, même ou des micro-organismes (bactéries, virus) [10-19].

De manière significative, la disponibilité d'une telle pépinière d'aptamères permet d'explorer des outils de tests biologiques novateurs couvrant divers domaines, y compris le diagnostic, l'anti-bioterrorisme, l'environnement et l'analyse des aliments [20].

Les aptamères ont été utilisés d'abord en tant qu'agents thérapeutiques. Le meilleur exemple actuel de l'intérêt pharmacologique des aptamères est sans doute celui de la thrombine; un aptamère qui se lie sélectivement à la thrombine a été développé dans le but de l'utiliser comme un anticoagulant [21]. Depuis, le domaine de recherche sur les aptamères connaît une grande importance et une montée ascendante comme en témoigne le nombre de publications sur une période de deux ans qui est de 2000 dont 250 commentaires résultant d'une recherche sur SciFinder (2009-2010) [22].

Les aptamères trouvent leur application comme éléments de bioreconnaissance dans différentes méthodes analytiques: chromatographie, électrophorèse capillaire, la spectrométrie de masse ainsi que dans la conception de biocapteurs [20].

Le premier biocapteur utilisant un aptamère comme élément de bioreconnaissance a été décrit en 1998 [23]. Les biocapteurs basés sur les aptamères comme élément de bioreconnaissance sont appelés "aptasensors". Ils représentent une nouvelle classe de biocapteurs qui utilisent les propriétés uniques du récepteur artificiel – aptamère. Ainsi l'utilisation de ce dernier comme élément de bioreconnaissance se positionne comme une alternative puissante et compétitive comparée à d'autres molécules de bioreconnaissance comme les anticorps ou les enzymes.

La caractéristique la plus attractive pour leur utilisation en tant que biorécepteur est sans doute la possibilité de les régénérer après utilisation. Comme il s'agit d'acides nucléiques, les aptamères peuvent subir des cycles répétés de dénaturation puis de renaturation afin de

rétablir leur conformation active. Plusieurs méthodes sont disponibles pour régénérer un aptamère : la chaleur, la concentration en sels et en ions métalliques, l'ajout d'agents chélatants et le pH du milieu, même si ce dernier paramètre, poussé à l'extrême, risque de l'endommager.

Les aptamères ont la capacité de reconnaître différentes cibles, avec une forte affinité et spécificité, permettant ainsi la conception de biocapteurs pour une large variété de molécules. Par ailleurs, grâce à la possibilité de les modifier chimiquement, ils sont faciles à immobiliser, avec la densité désirée, à la surface du biocapteur et peuvent être synthétisés de façon reproductible et en grande quantité.

A ce jour, les aptamères dans ce contexte sont ceux pour la thrombine, c'est la raison pour la quelle nous nous sommes intéressés à cette protéine.

La thrombine est une protéine de type protéase à sérine classée parmi les « Trypsine-like » de poids moléculaire 3600 Kdalton. Elle joue un rôle important dans la cascade des réactions de coagulation. Elle convertit le fibrinogène soluble en filaments de fibrine insolubles, et qu'elle participe dans de nombreuses autres réactions liées à la coagulation. Ses fonctions procoagulantes assurent la maintenance globale de l'intégrité vasculaire. La thrombine exerce également un effet anti-coagulant par l'activation de la protéine C [24]. Sur la surface de la thrombine, il existe deux sites de liaison chargés positivement, exosite I et II, qui sont situés à l'opposé (environ 2,0 nm) du centre actif (His57, Asp102, Ser195). Les deux exosites permettent à la thrombine de se lier à différents substrats ou ligands chargés négativement de manière à réguler les différents rôles de la thrombine. Il a été démontré que l'exosite I lie le fibrinogène, la thrombomoduline (TM), l'hirudine et l'héparine cofacteur II, alors que l'exosite II lie glycosaminoglycanes, l'héparine, les fragments prothrombine et l'Ig G [25-27]. Ainsi, la détection et la quantification de la thrombine jouent un rôle essentiel dans les applications cliniques et dans la recherche fondamentale.

Diverses méthodes ont été utilisées pour la détection des interactions thrombine/aptamères l'électrochimiluminescence [7, 28]; la détection optique [29] ; la fluorescence [30], la microbalance à cristal de quartz [31]; la résonance de plasmon de surface [32] et la détection électrochimique [33-37].

Les applications analytiques d'aptamères sont souvent à base de transductions électrochimiques, non seulement, parce que les techniques électrochimiques ont une grande sensibilité, mais aussi parce que l'instrumentation est simple, peu coûteuse et peut être facilement miniaturisée.

Le but de ce travail est de montrer l'intérêt d'un concept générique d'aptamères obtenus directement grâce à une synthèse supportée en utilisant des synthons phosphoramidites pour une application biocapteur. Ainsi, nous serons en mesure d'adapter les groupements d'ancrage et les espaceurs spécifiques pour la réalisation des "aptasensors". Le concept est validé sur un "aptasensor" impédimétrique pour la détection de la thrombine qui devrait être sensible, sélectif et stable.

Deux aptamères spécifiques pour la thrombine ont été sélectionnés à partir de la littérature [38] puis il ont été immobilisés à la surface par une simple chimisorption. Il a été démontré que les deux aptamères sélectionnés forment une structure de forme G-quadruplex suite à la formation du complexe thrombine-aptamère [39, 40]. L'"aptasensor" conçu est schématisé dans la figure III.1 pour l'aptamère 1.

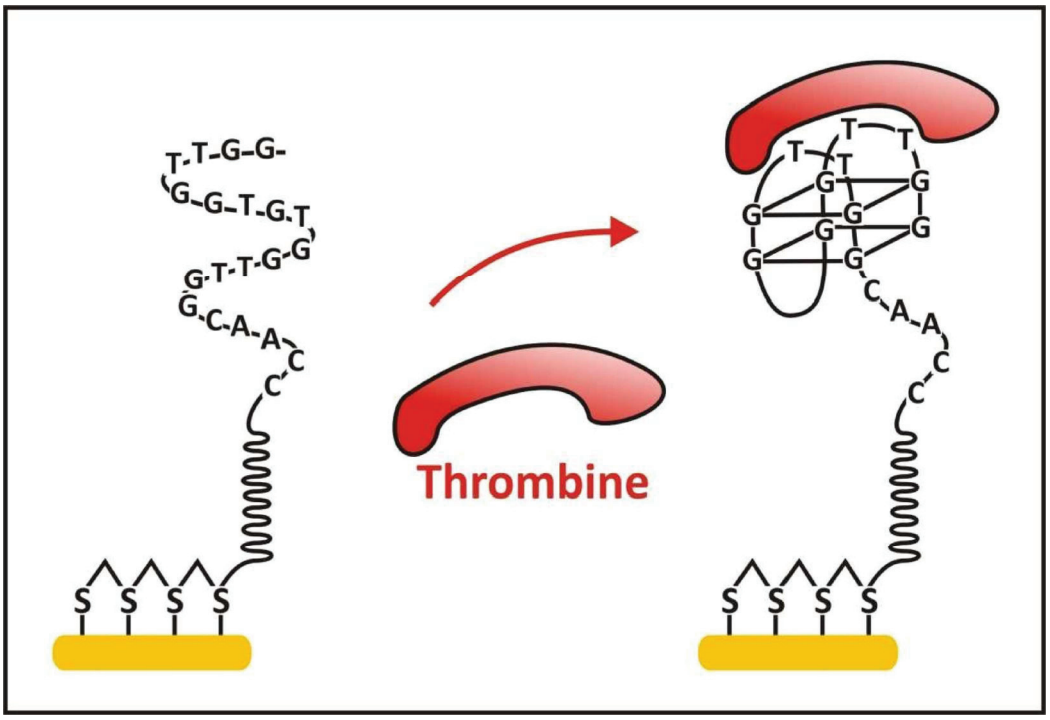


Figure III.1 Schéma de l' Aptasensor conçu pour l'aptamère 1

La réalisation de ces "aptasensors" nécessite préalablement une étape d'immobilisation robuste et reproductible, compatible avec la détection par spectroscopie d'impédance électrochimique.

Les deux aptamères ont été immobilisés à la surface de l'électrode d'or par simple chimisorption par l'intermédiaire des 4 fonctions thiol ancrée à leurs extrémités. Par la suite nous avons étudié la sélectivité des biocapteurs élaborés par rapport à une autre protéine modèle la BSA (albumine de sérum bovin).

La spectroscopie d'impédance électrochimique a été choisie pour étudier la formation du complexe aptamère-thrombine. Contrairement aux autres techniques de détection de ce complexe, la SIE permet une détection simple, facile et sans marquage.

III. 3. MATERIELS ET METHODES :

III. 3. 1. Réactifs et solutions :

Des solutions tampon de greffage, de réduction, d'activation et de tampons d'analyse ont été préparées afin de réaliser les différentes étapes de conception des "aptasensors". Toutes les solutions aqueuses ont été préparées avec de l'eau ultra-pure (résistivité > 18 MΩ.cm) obtenue à partir d'un système de purification Simplicity (Millipore). Les réactifs permettant de préparer la solution piranha (H_2SO_4/H_2O_2) (acide sulfurique 98% / eau oxygénée 35%), tris (2-carboxyéthyl) phosphine chlorhydrate (TCEP, HCl), ont été fournis par Aldrich (Saint Quentin, Fallavier, France). La thrombine et l'albumine de sérum bovin (BSA) ont été fournis par Sigma.

III. 3. 2. Synthése des aptamères :

Les aptamères de la thrombine ont été synthétisés, caractérisés et purifiés par Carole Farre (Ingénieur de recherche CNRS au sein de l'ISA). Ces aptamères présentent les séquences suivantes: un 20-mer aptamer 5'DTPA-DTPATT-PEG-CCA ACG GTT GGT GTG GTT GG3' et un 29-mer aptamer 5'DTPA-DTPA-TT-PEG-A GTC CGT GGT AGG GCA GGT TGG GGTGAC T3'(figure III.2).

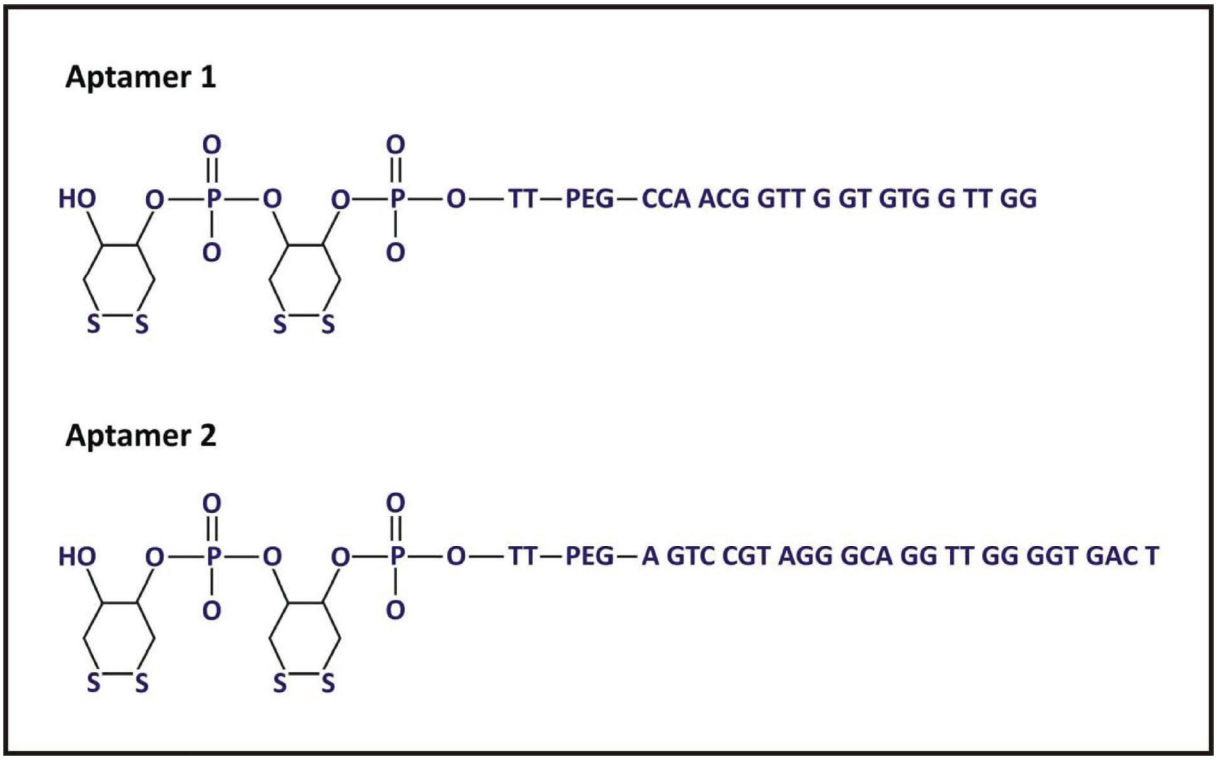


Figure III.2
Formule des aptamères sélectionnés et synthétisés

Ces aptamères sont constitués de plusieurs éléments, chaque élément présentant une fonction bien définie : une fonction d'accroche, le dithiolphosphoramidite (DTPA) qui va servir comme élément d'ancrage; deux groupement de DTPA ont été incorporés de manière à avoir 4 fonctions thiols ce qui nous permet d'accroître la stabilité du greffage des sondes à long terme;

un espaceur : polyéthylène glycol (PEG) afin de limiter l'adsorption non spécifique et donner plus de flexibilité à l'aptamère gréffé; la sonde : l'aptamère qui va assurer la reconnaissance de la thrombine.

III. 3. 3. Dispositif expérimental :

Dans le but d'étudier la réponse des "aptasensors" par la formation du complexe thrombine-aptamère, nous avons utilisé une cellule électrochimique en verre (Verre Equipements, Collonges au Mont d'Or, France) à trois électrodes de volume 5 ml. La cellule électrochimique est bien lavée avec une solution d'acide sulfochromique puis avec de l'eau ultrapure et enfin séchée dans l'étuve avant et après toute utilisation. Une électrode de travail

en or, une contre électrode en platine et une électrode de référence au calomel saturée (SCE) sont installées dans la cellule.

Un potentiostat-galvanostat PGZ 402-voltalab 80 relié aux trois électrodes nous permet de polariser l'électrode de travail par rapport à l'électrode de référence en surimposant une perturbation sinusoïdale de faible amplitude.

Le pilotage et l'acquisition des paramètres expérimentaux se fait par l'intermédiaire d'un logiciel volta Master 4. Le dispositif pour les mesures électrochimiques est donné à la figure III.3.

Toutes les mesures électrochimiques ont été réalisées en présence de la sonde redox $[Fe(CN)6]^{3-/4-}$ dans le PBE (tampon phosphate) à température ambiante et dans une cage de Faraday. Le tampon PBE (tampon phosphate électrolyte: phosphate de sodium 20 mM, 250 perchlorate de sodium mM, pH 6,4) a été choisi car il favorise le repliement des structures d'oligonucléotides [41].

Pour satisfaire la condition de linéarité de la réponse du système électrochimique étudié, il faut que l'amplitude de la tension perturbatrice (DE) soit assez faible (pour toutes les expériences une valeur de 10 mV a été choisie).

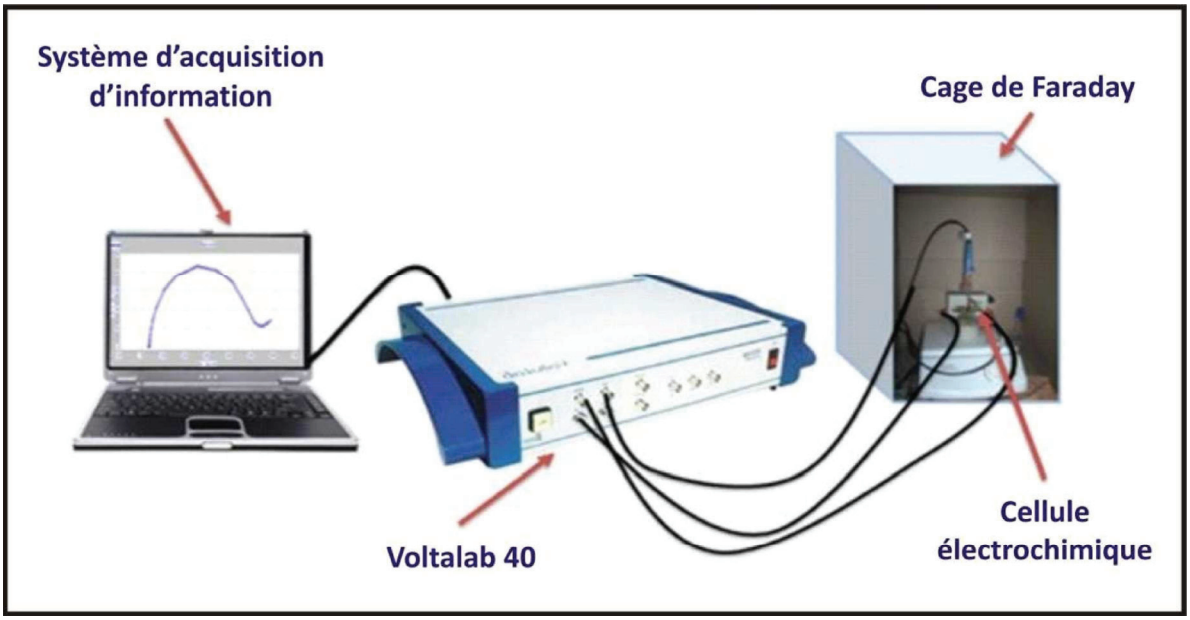


Figure III.3
Dispositif expérimental pour réaliser les mesures électrochimiques

III. 3. 4. Nettoyage et activation de la surface l'or

Les électrodes d'or utilisées étaient constituées d'une fine couche d'or déposée (épaisseur 300 nm) par évaporation sur des substrats de Si/SiO_2 en utilisant une couche d'accrochage de 30 nm de Titane (Ti). Ces électrodes d'or été fournies par le Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS), Toulouse. Une couche de résine est déposée sur la surface d'or afin de protéger la surface d'or pendant le transport.

Le premier nettoyage consiste à enlever la couche de résine sur la surface d'or; pour ce faire la plaque d'or est immergée dans l'acétone dans un bain à ultrasons pendant 15 minutes. La surface est ensuite séchée sous un flux d'azote (N_2).

L'électrode est ensuite plongée 5 minutes dans une solution de piranha, cette solution étant composée d'un mélange d'acide sulfurique à 98% et d'eau oxygénée à 35 % (H_2SO_4/H_2O_2 70 :30 v/v). Le mélange est très exothermique. L'échantillon est ensuite rincé abondamment avec de l'eau ultrapure.

En suite, la plaque d'or est montée sur la cellule, de même pour la contre-électrode en platine. La cellule est remplie de la solution de soude à 0,5M soit 5mL, l'électrode de référence est ajoutée au système. La cellule est reliée au potentiostat, la surface d'or est alors activée en milieu basique [42] en imposant une série de balayages en potentiels (de -400 mV à -1400 m V), ce qui permet de produire de l'hydrogène à la surface par l'électrolyse de l'eau dans la soude et conduit à une surface d'or propre et réduite (Au°). La stabilisation du voltammogramme indique la fin du nettoyage et que toute les impuretés sont désorbées (figure III.4).

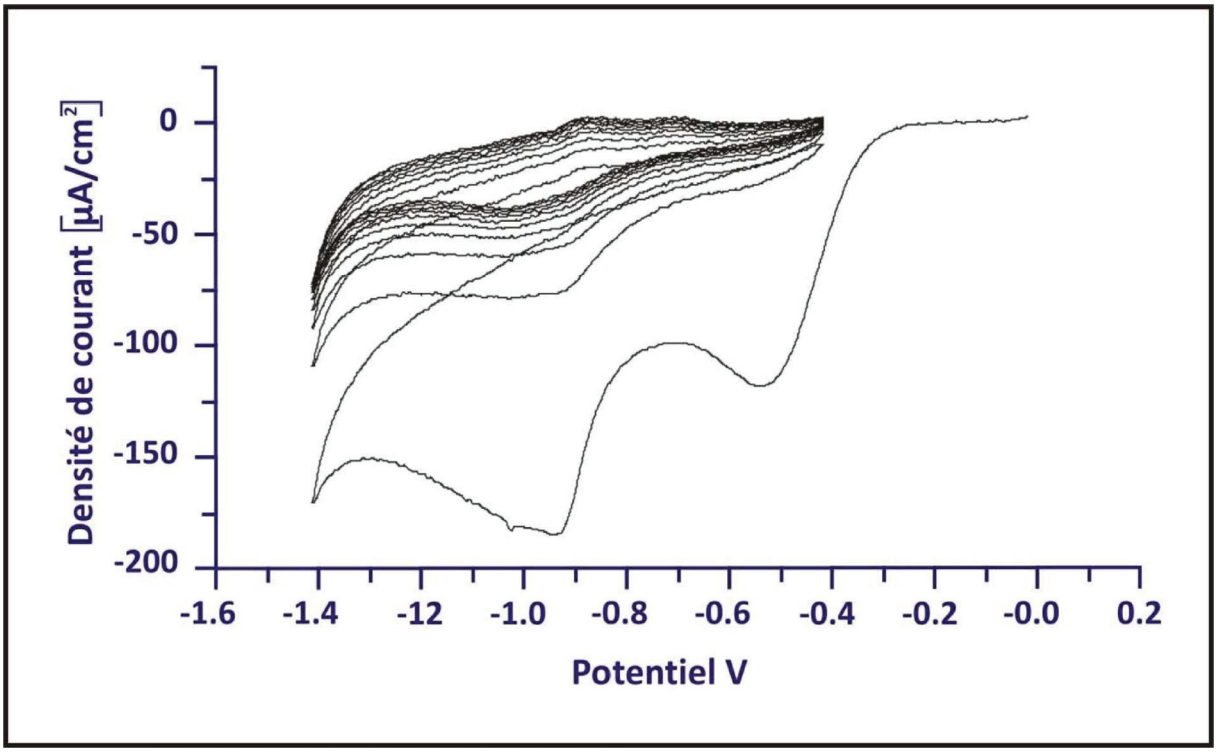


Figure III.4
Nettoyage électrochimique de l'or dans la soude (0,5M)

III. 3. 5. Fonctionnalisation des électrodes d'or par les aptamères

Avant la fonctionnalisation des plaques d'or par la sonde à greffer, il est nécessaire de réduire les fonctions thiol des aptamères avant greffage. La réduction des fonctions thiols se fait dans une solution de chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl)phosphine TCEP, HCl 20 mM sous gaz inerte.

2 nmol de solution d'aptamères est ajoutée à 1µl de la solution-TCEP, HCL (160 mM) et ajustée avec de l'eau milliQ filtrée puis dégazée pour obtenir un volume total de 8µl. La solution obtenue est dégazée par un flux d'argon.

Après au moins 2h de réduction, le milieu réactionnel aptamère TCEP est dilué 12 fois dans du tampon dit tampon de greffage (tampon de phosphate 100 mM pH 8) pour obtenir un volume finale de 96µl.

La solution ainsi obtenue est mise au contact de la plaque d'or fraîchement activée. Le système obtenu est mis sous atmosphère inerte et rendu hermétique grâce à du parafilm. La plaque est laissée à greffer 3 jours, à température ambiante.

Après 72 heures de greffage, la cellule est rincée avec de l'eau milliQ, puis la passivation de la plaque est effectuée en laissant tremper la plaque d'or dans 150 µl d'une solution de mercaptopropanol à 1 mM, pendant 1 heure à température ambiante.

La cellule est rincée avec de l'eau distillée puis stockée dans un tampon de phosphate (20mM), $NaClO_4$ (250mM), pH 6,5.

Du point de vue expérimental, la fonctionnalisation des plaques d'or avec les aptamères est très longue puisque elle comporte 5 étapes réalisées sur 4 jours :

- Nettoyage judicieux des électrodes suivi d'activation
- Réduction des fonctions thiol (2h)
- Greffage des aptamères pendant 3 jours
- Passivation de la surface
- Stockage des électrodes dans le tampon.

III.4 RESULTATS ET DISCUSSION:

III. 4. 1. Caractérisation des électrodes fonctionnalisées par voltamétrie cyclique:

La voltamétrie cyclique est une technique électrochimique qui nous a permis de caractériser la modification de la surface de l'or par les aptamères et de vérifier le bon édifice moléculaire. Elle peut également donner des informations sur la capacité des électrons des espèces redox en solution à traverser cet assemblage et d'atteindre la surface de l'or sur laquelle les aptamères sont immobilisés.

Cette technique consiste à soumettre l'électrode de travail à une rampe de potentiel (balayage triangulaire) et à mesurer le courant résultant. Le potentiel appliqué varie entre deux valeurs E1 et E2 avec une vitesse de balayage v.

En fait l'immobilisation des aptamères provoque un changement des propriétés électrochimiques de la surface d'or et influe donc sur les pics d'oxydo-réduction.

Afin de s'assurer du bon greffage des aptamères à la surface des plaques d'or, des mesures de voltampérometrie cyclique (CV) ont été réalisées dans une solution de ferri-ferrocyanure de potassium (5mM dans l'électrolyte d'analyse PBE : solution tampon pH 6,4 constituée de phosphate de sodium à 20 mM, et de perchlorate de sodium à 250 mM) et dans un intervalle de potentiel allant de -400mV jusqu'à +400mV avec une vitesse de balayage égale à 100mV/s.

La figure III.5 représente les courbes obtenues pour des mesures voltampérometriques de l'électrode d'or nue et des électrodes modifiées. Il est très clair qu'après fonctionnalisation des plaques d'or, les pics d'oxydoréduction de l'espèce électroactive sont réduits de manière très significative, cette diminution traduit bien que la couche immobilisée a un caractère bloquant et empêche les électrons du couple redox $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ d'atteindre la surface de l'or, ce qui confirme la présence d'un édifice moléculaire et que les aptamères sont bien greffés sur la surface d'or.

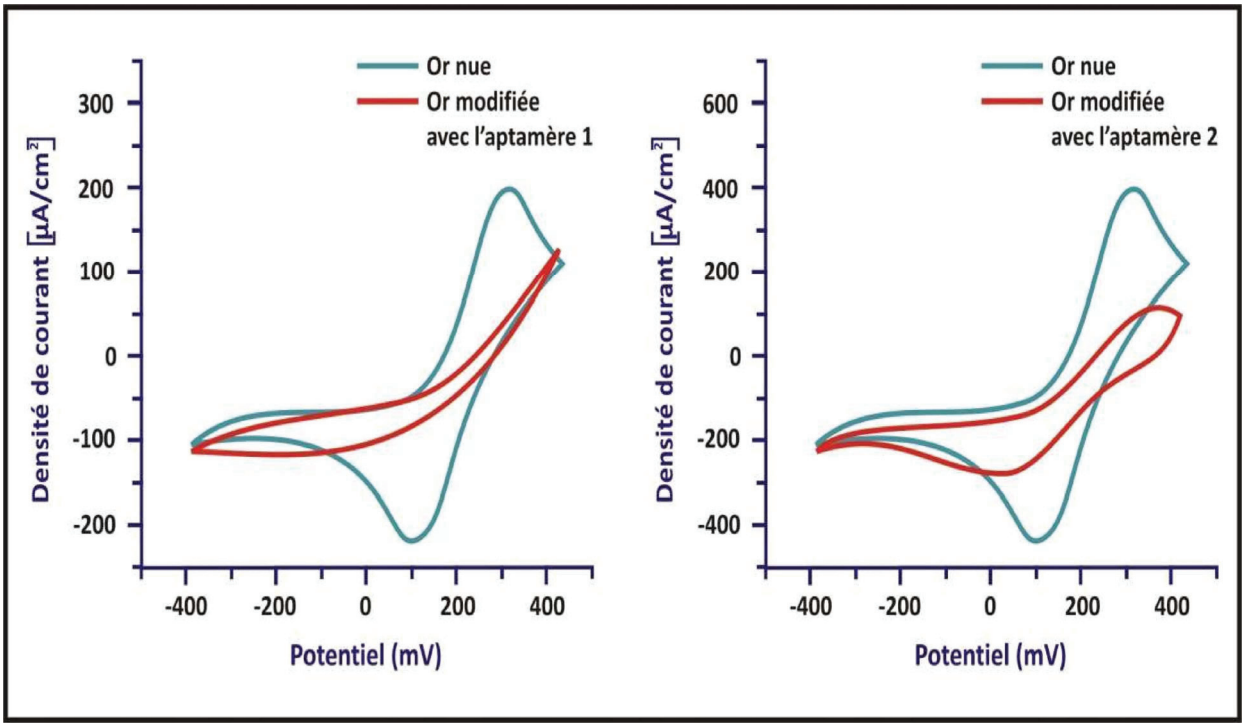


Figure. III.5
Voltammogrammes pour une électrode d'or nue, modifiée par l''aptamère 1 et l'aptamère 2. Vitesse de balayage 100 mV.s-^{1}

III. 4. 2. Optimisation du potentiel

Dans un premier temps, nous avons cherché la valeur de la tension de polarisation qu'il faut imposer à notre système en vue d'obtenir la plus faible valeur d'impédance possible et de minimiser le phénomène de diffusion.

Les mesures d'impédance électrochimique ont été réalisées dans le tampon PBE (pH 6,4) en présence du couple redox $[Fe(CN)_6]^{4-/3}$ dans une gamme de fréquences comprises entre 100 kHz et 100 mHz à différentes tensions de polarisation de – 400 mV à +400 mV.

Les diagrammes de Nyquist présentés sur la figure III.6 montrent la réponse électrochimique de l'électrode d'or gréffée avec les deux aptamères (a et b) à différents potentiels imposés.

On constate que la meilleure réponse se manifeste pour une polarisation de +200 mV avec la plus faible valeur de résistance et une impédance de Warburg très courte pour les deux aptamères.

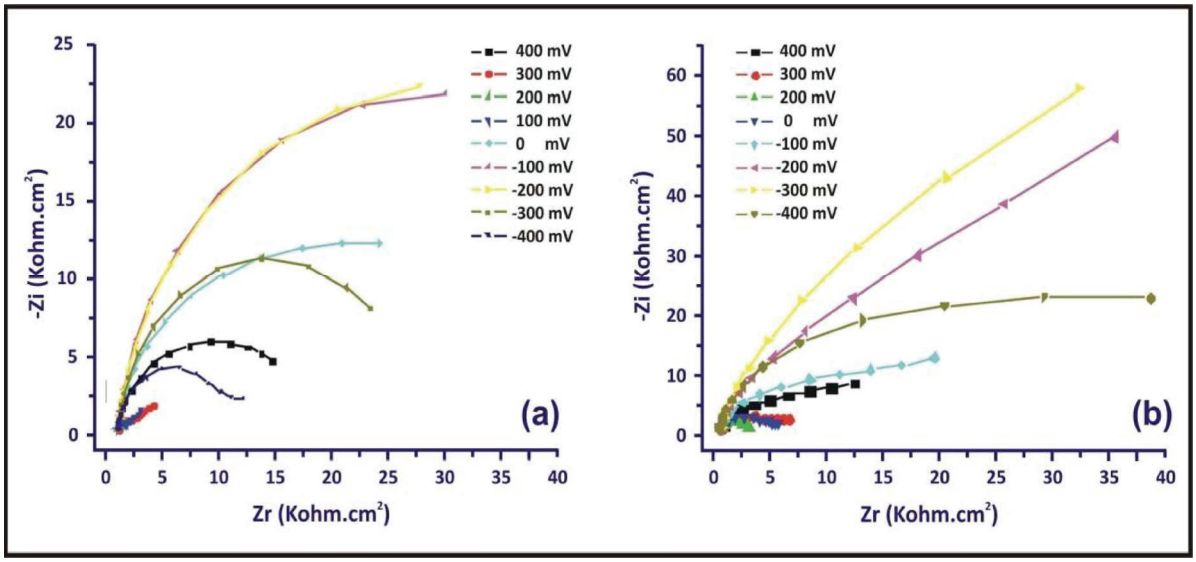
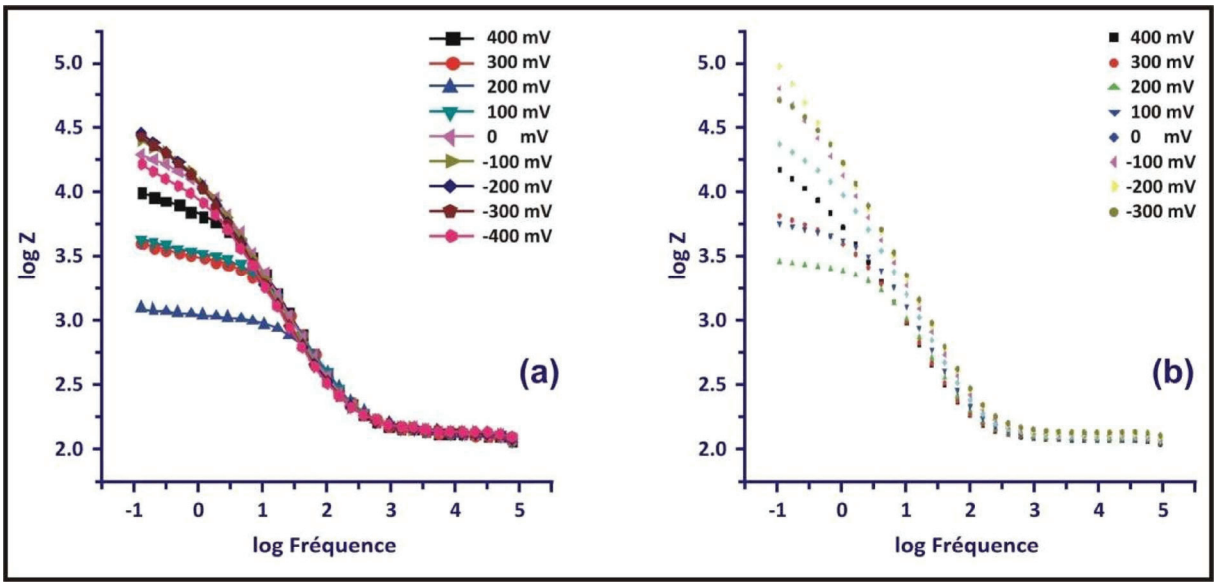


Figure III.6
spectres d'impédance dans le plan de Nyquist à différentes polarisations
a) pour l'aptamère 1, b) pour l'aptamère 2

Une autre représentation de l'impédance est parfois envisagée; c'est la représentation de l'impédance selon le diagramme de Bode : le module de l'impédance z est présenté en

fonction de la fréquence. La représentation des spectres d'impédance dans le diagramme de Bode pour les deux "aptasensors" est montrée sur la figure III.7.



FigureIII.7
spectres d'impédance dans le plan de Bode à différentes polarisations
a) pour l'aptamère 1, b) pour l'aptamère 2

D'après les digrammes de Bode, on peut constater que : à hautes fréquences, l'allure des courbes obtenues reste presque la même quelque soit la polarisation; les courbes se superposent et la polarisation n'a pas d'effet; à basses fréquences, l'allure des courbes n'est pas la même, un écart important est observé entre la courbe de polarisation à +200 mV et les autres courbes de polarisation pour les deux "aptasensors".

A +200 mV, l'impédance de Warburg présente une petite droite c'est-à-dire le transfert de masse qui est dû aux ions au sein de la solution n'influence pas trop la réponse des biocapteurs élaborés. Il faut noter que cette polarisation de +200 mV est très proche du potentiel à l'équilibre. C'est cette polarisation qui sera retenue pour la suite de notre travail.

III. 4. 3. Réponses des "aptasensors"

Après l'immobilisation des aptamères et l'élaboration des biocapteurs, la détection de la thrombine est réalisée. Pour cela, les électrodes modifiées avec les aptamères subissent des incubations successives pendant 30 min dans des solutions de concentrations croissantes en thrombine.

Après chaque incubation, la cellule est rincée trois fois avec du tampon d'analyse pour enlever toute adsorption non-spécifique sur la surface du biocapteur qui peut induire des artefacts sur la réponse.

Les mesures d'impédance électrochimiques ont été réalisées dans le tampon PBE (pH6,4) en présence du couple redox $[Fe(CN)_6]^{4-/3}$ dans une gamme de fréquences comprises entre 100 kHz et 100 mHz à un potentiel imposé égal +200 mV.
Ainsi les différentes réponses des deux "aptasensors" suite à l'incubation de la thrombine sont représentées selon le plan de Nyquist et présentées sur la figure III.8.

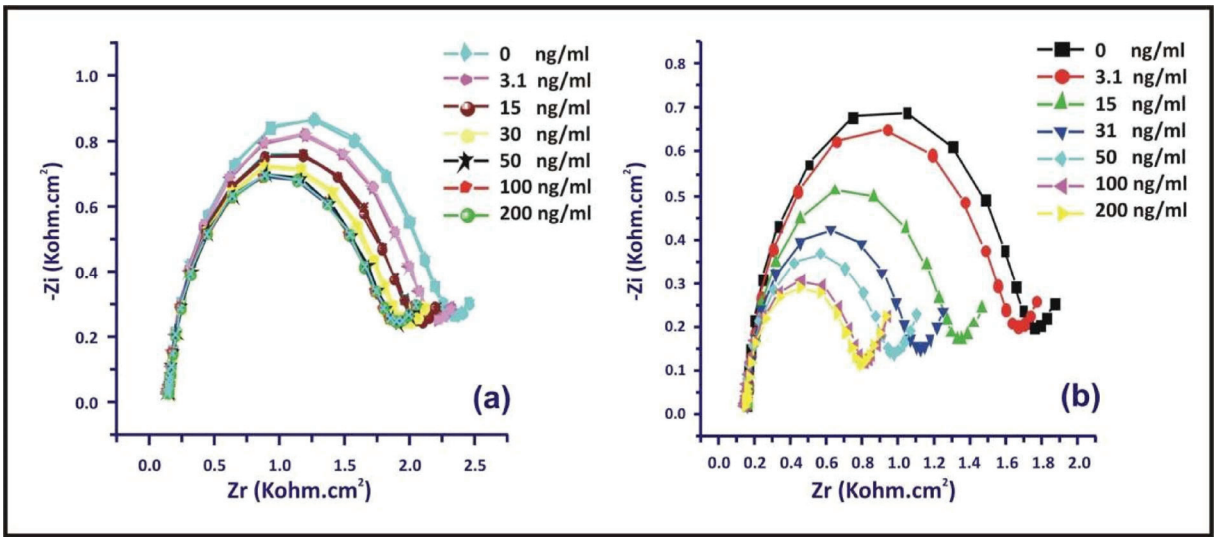


Figure III.8

Diagrammes d'impédance avant et après incubation de différentes concentrations de thrombine

a) pour l'aptamère 1, b) pour l'aptamère 2

Les mesures d'impédances électrochimiques obtenues suite à l'augmentation successive de la concentration en thrombine montrent une diminution de la résistance de transfert de charge (Rtc). Ce résultat semble en désaccord avec la formation du complexe aptamère-thrombine qui forme une structure en « tétrade de G » qui normalement devrait gêner le passage des électrons de la sonde redox vers la surface de l'or. Ce résultat a déjà été observé dans une étude précédente sur la détection de la lysozyme en présence de la sonde rédox $[Fe(CN)]^{3-/4-}$ [43].

Il est bien connu que : à un pH inferieur au point isoélectrique (PI) des protéines, la charge de surface (initialement négative) est inversée lorsque le complexe protéine-aptamère est formé. Un excès de charge positive sur l'électrode fonctionnalisée facilite l'approche de la sonde redox vers la surface et diminue ainsi la résistance de transfert de charge. Dans notre cas, on travaille à pH 6,4, la thrombine est chargée positivement puisque son PI est entre 7,0 et 7,6 [44]. Les résultats obtenus peuvent être expliqués par cette inversion de charge de surface. Néanmoins un grand nombre de travaux publiés relate une augmentation de la résistance de transfert de charge lorsque la concentration de la thrombine augmente [45-50].

La plupart de ces travaux sont basés sur un système électrochimique à base de nanoparticules ou de dendrimères [45-48] et une forte densité de surface des sondes d'aptamères immobilisées. L'association de l'aptamère à sa cible entraîne un changement conformationnel qui influe sur le transfert électronique entre l'espèce électro-active et l'électrode.

III.4.4 Modélisation des spectres d'impédance :

Une cellule électrochimique, peut être représentée par un circuit électrique équivalent comprenant des éléments simples.

Le modèle de Randles est le circuit électrique le plus couramment utilisé pour décrire une cellule électrochimique (figure III.9) [51-53].

Afin d'extraire un maximum d'informations sur les processus se déroulant à l'interface électrode/électrolyte et le comportement électrique de ce système, les spectres d'impédance obtenus pour les deux "aptasensors" pour les différentes concentrations de thrombine, ont été modélisés selon le circuit de Randles simplifié en utilisant Zplot / Zview schéma III.4.

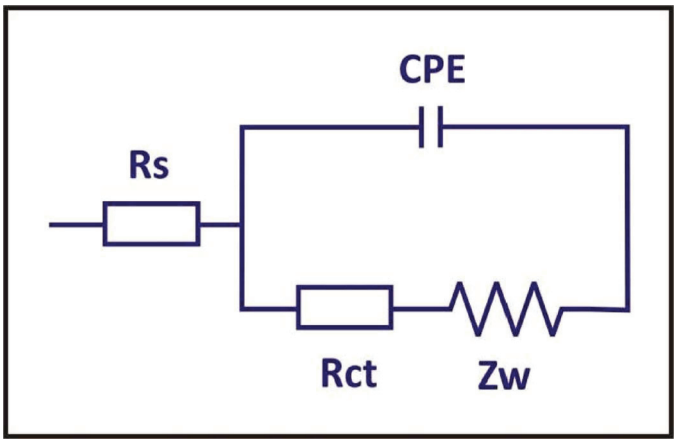


Figure III.9
Circuit Randles équivalent

La figure III.10 montre bien que la courbe modélisée est bien superposée à la courbe expérimentale, par conséquent le modèle choisi est satisfaisant.

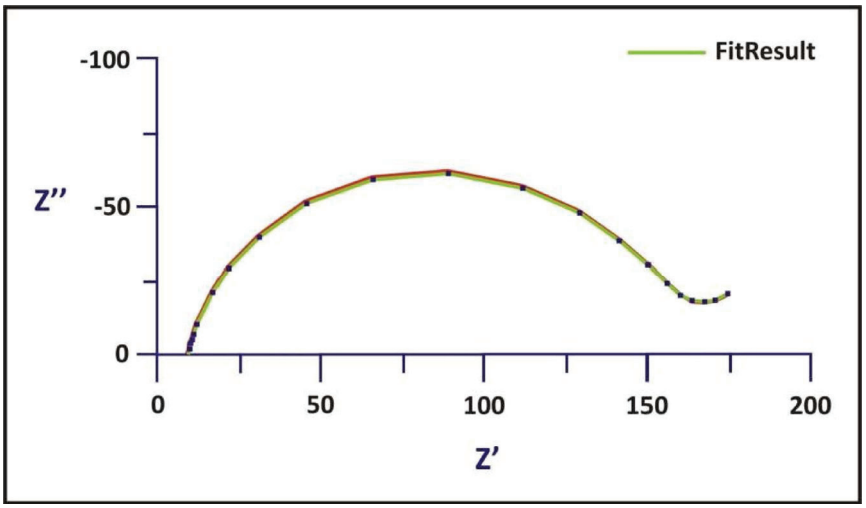


Figure III.10
Exemple de fit basé sur le cicuit équivalent de Randle modélisé avec Zplot/ Zview

Le circuit équivalent obtenu est composé de 4 composants :

- ✓ La résistance de la solution (Rs correspond à la valeur sur l'axe Z_R au départ du demi-cercle) due à la chute ohmique entre l'électrode de travail et l'électrode de référence.
- ✓ La résistance de transfert de charge (R_{tc} se lit sur l'axe Z_R et équivaut au diamètre du demi-cercle) correspond au transfert d'électrons.
- ✓ La capacité C_{dl} caractérisant l'interface métal/solution qui est une zone de distribution de charges. Le caractère non parfait de cette capacité traduit le caractère rugueux de la surface de l'électrode. La capacité est dite non parfaite ou CPE (Elément à Phase Constante).
- ✓ L'impédance de Warburg qui traduit le phénomène de diffusion dû au transport de matière (on remarque une courte impédance de Warburg qui varie peu avec la concentration de la thrombine).

Les paramètres électriques suite à la modélisation des spectres d'impédances sont rapportés sur les tableaux III.1 et III.2.

[Thrombin] ng/mL	Rs(Ω)	CPE_1-T ($\mu F(rad/s)^{1-n}$)$^{(10-4)}$	CPE_1-P (n)	W_1-R (Ω)	W1-T (S)	W_1-P	R_{tc} (kΩ)	Chi-squared (10^{-4})
0	9,136	1.6	0,87024	103,3	33,26	0,43929	**146.9**	7,2
3.1	8,457	1.7	0,86693	102	34,37	0,46442	**138.3**	20,7
115	9,053	1.7	0,86884	105,1	39,2	0,43228	**127.2**	16,1
31	8,922	1.7	0,86790	119,3	47,83	0,42921	**120**	18,4
50	8,807	1.7	0,86773	120,9	51,83	0,43028	**115.3**	19,8
100	8,791	1.7	0,87166	122,4	51,61	0,40296	**115.8**	21,6

Tableau III.1
Résultats de la modélisation des spectres d'impédance pour la détection de la thrombine (aptamère1)

[Thrombin] ng/mL	Rs(Ω)	CPE_1-T ($\mu F(rad/s)^{1-n}$)$^{(10-4)}$	CPE_1-P (n)	W_1-R (Ω)	W1-T (S)	W_1-P	R_{tc} (kΩ)	Chi-squared (10^{-4})
0	16,12	1,29	0,91388	100,1	17,3	0,5	**153,1**	16
3.1	12,59	1,34	0,90987	100,26	17,94	0,5	**143,7**	20
15	14,01	1,71	0,09804	68,04	9,908	0,5	**111,9**	29
31	15,79	1,91	0,88687	69,39	10,44	0,5	**91,4**	39
50	13,2	2,05	0,88319	71,25	10,65	0,5	**83,46**	39
100	13,46	2,11	0,87464	55,14	8,842	0,5	**73,11**	41
150	12,35	2,07	0,87352	77,91	11,33	0,5	**62,9**	70
200	12,99	2,25	0,86437	75,64	12,7	0,5	**60,45**	75

Tableau III.2
Résultats de la modélisation des spectres d'impédance pour la détection de la thrombine (aptamère2)

Les données sur les tableaux montrent que la résistance de transfert de charge apparaît comme valeur variable lors de la formation du complexe aptamère-thrombine. On a une diminution au fur et à mesure que la concentration en thrombine augmente pour les deux aptamères.

III. 4. 5. Etude comparative des caractéristiques analytiques des deux sondes

III. 4. 5. 1. Courbe de calibration :

Afin d'extraire les caractéristiques analytiques des deux "aptasensors" conçus telles que la gamme de linéarité, la sensibilité et la limite de détection, nous avons tracé la variation de la résistance de transfert de charge en fonction de la concentration en thrombine.
Cette variation est donnée par la relation:

$$\Delta Rtc = Rtc_0 - Rtc \quad \text{(III.1).}$$

Où

Rtc0 : correspond à la valeur de résistance de transfert de charge avant ajout de la thrombine

Rtc : correspond à la valeur de résistance de transfert de charge après chaque incubation de la thrombine.

Afin de mieux comparer les résultats obtenus pour les deux biocapteurs nous avons représenter la variation relative da la résistance de transfert de charge :

$$\frac{\Delta R}{Rtc0} = \frac{Rtc0 - Rtc}{Rtc0} \quad \text{(III.2).}$$

La relation entre le quotient $\frac{\Delta Rtc}{Rtc0}$ avec la variation de la concentration en thrombine pour les deux biocapteurs est illustrée dans la figure III.5.

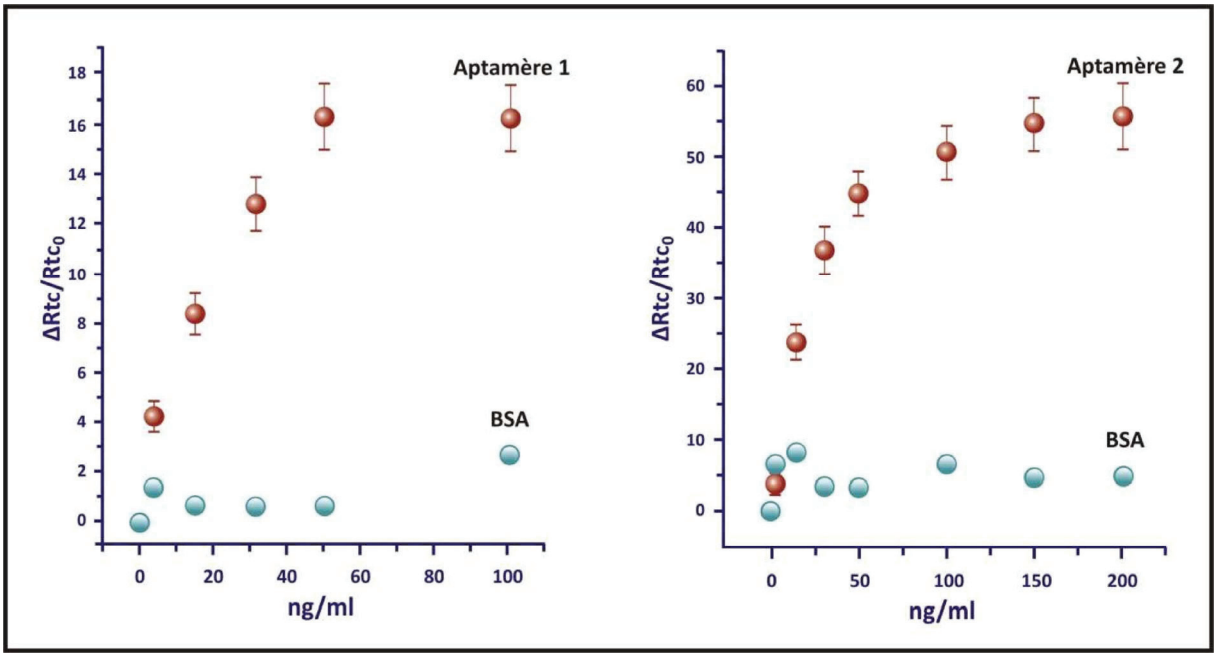


Figure III.11
Variation relative de la résistance de transfert de charge en fonction de la concentration en thrombine pour les deux biocapteurs

La figure III.11 représente les courbes d'étalonnage pour les deux "aptasensors". Ces deux courbes présentent une partie linéaire comprise entre de 3,1 à 30 ng/ml pour l'aptamère 1 et 3,1 à 50 ng/ml pour l'aptamère 2, pour laquelle la réponse des deux capteurs est proportionnelle à la variation de la concentration en thrombine. Au-delà de ces deux gammes de linéarité commence la saturation des "aptasensors". La limite de détection est de 3,1 ng/ ml 80 pmol / l) pour les deux capteurs.

Les courbes de calibration ainsi obtenues pour les deux biocapteurs présentent une forme d'isotherme de Langmuir. Il est alors possible de déduire les valeurs des constantes de dissociation Kd pour les deux complexes aptamère-thrombine : Kd est égale à 240 pM pour l'aptamère 1 et de 666 pM pour l'aptamère 2. Ces valeurs de Kd sont dans la gamme de nM en accord avec les valeurs publiées précédemment [54].

III. 4. 5. 2. Reproductibilité

Pour l'étude de la reproductibilité des résultats, nous avons réalisé des essais inter capteurs sur trois "aptasensors" élaborés de la même façon et dans les mêmes conditions pour la détection de la thrombine. Les résultats obtenus montrent un écart-type de 10% (figure III.11) ce qui vérifie la bonne reproductibilité du système conçu. Un signal plus stable est obtenu pour l'aptamère 1.

III. 4. 5. 3. Spécificité ou Sélectivité

La sélectivité ou la spécificité est sans doute l'une des caractéristiques la plus importante d'un biocapteur. Donc il est nécessaire de mettre en évidence la sélectivité des capteurs élaborés. Pour cela deux "aptasensors" ont été préparés avec les deux aptamères, dans les mêmes conditions et on a étudié leur sélectivité par rapport à une protéine modèle l'albumine de sérum bovin (BSA).

Les courbes de d'étalonnage obtenues, suite à l'incubation de la BSA, dans la même gamme de concentration que la thrombine, sont présentées sur la figure III.11. On constate que la variation de la Rtc en présence de la BSA est presque imperceptible. Ce qui montre bien la sélectivité des capteurs étudiés dans les conditions opératoires.

Par ailleurs, nous avons calculé le rapport entre la variation relative de la résistance de transfert de charge relative pour la thrombine et pour la BSA. Ce rapport est de 5% pour l'aptamère 1 et 2,5% pour l'aptamère 2. Lorsque l'on compare ce rapport à celui obtenu avec l'aptamère marqué ferrocène pour lequel il est de 50% [55] nous pouvons conclure que la conception des aptamères et la passivation de la surface de l'électrode greffée permettent la fabrication d'un "aptasensor" sélectif. Dans la référence [46], la concentration testée de BSA a été trois fois plus élevée que la concentration de thrombine. Le Rapport du signal pour la BSA (variation relative de Rtc) par rapport au signal de la thrombine étant de 2,5 (aptamère 2) pour une même concentration, lorsque la concentration de la BSA est trois fois supérieure à celle de la thrombine, la contribution du signal de la BSA sera inférieure à 7,5% du signal de la thrombine. Toujours dans la référence [46], le signal de la BSA est de l'ordre de 6 % de celui de la thrombine, donc l'"aptasensor" préparé avec l'aptamère 2 est plus sélectif et plus sensible.

III. 4. 5. 4. Comparaison des performances analytiques de nos "aptasensors" avec les travaux antérieurs :

Les caractéristiques analytiques des capteurs élaborés dans ce travail sont comparées à celles des "aptasensors" basés sur différents transducteurs (EIS, amperometrie et SPR) et sont rapportées dans le tableau III.3 :

Mode de transduction (M)	Mode d'immobilisation d'aptamère	Limite de détection LD	Sélectivité BSA/thrombine	Référence
EIS sans marquage	4 Thiols	80 pmol/l	2.5-5%	Ce travail
EIS sans marquage	Streptavidine/biotine	5 nmol/l		**[41]**
EIS sans marquage	Dendrimère	10 pmol/l	15%	**[45]**
EIS sans marquage	Couche par couche	40 pmol/l	10%	**[46]**
EIS sans marquage	1 Thiol/AuNPs	13 pmol/l	2.8%	**[48]**
EIS sans marquage	1 Thiol	0.1 nmol/l		**[49]**
EIS sans marquage	Amine-aptamère/ électrode de carbone polarisée	0.5 nmol/l		**[50]**
EIS sans marquage	chimisorption	2 nmol/l		**[56]**
EIS sans marquage	1 Thiol	30 fmol/l	50%	**[55]**
Ampérometrie	Billes magnétiques	0.45 nmol/l		**[38]**
SPR	BSA carboxylée	0.1 nmol/l	2.5%	**[57]**
SPR	2 Thiols	25 nmol/l		**[58]**

Tableau III.
Comparaison des caractérisations analytiques de nos capteurs et les autres aptasensors développés précédemment pour la détection de la thrombine

La limite de détection obtenu (80 pmol / L) est dans la plage inférieure de limites de détection obtenues avec des capteurs sans marquage.

III. 4. 5. 5. Stabilité

La stabilité des capteurs a été étudiée pendant une durée de 20 jours (figure III12). Le capteur est régénéré après chaque mesure avec de l'eau UHQ à une température de 60 °C pendant 10 min et l'électrode est maintenue dans un tampon phosphate. Sur une période de 20 jours, aucune perte de signal n'a été observée ce qui montre une bonne stabilité de notre capteur. La stabilité observée a été plus élevé, comparativement à celle rapportée dans la référence [46] où l'"aptasensors" à retenu 93,1% de sa réponse initiale après une période de stockage de 10 jours.

La bonne stabilité peut être attribuée à l'attachement ferme de la molécule aptamère avec quatre groupes thiolates sur la surface de l'électrode en or.

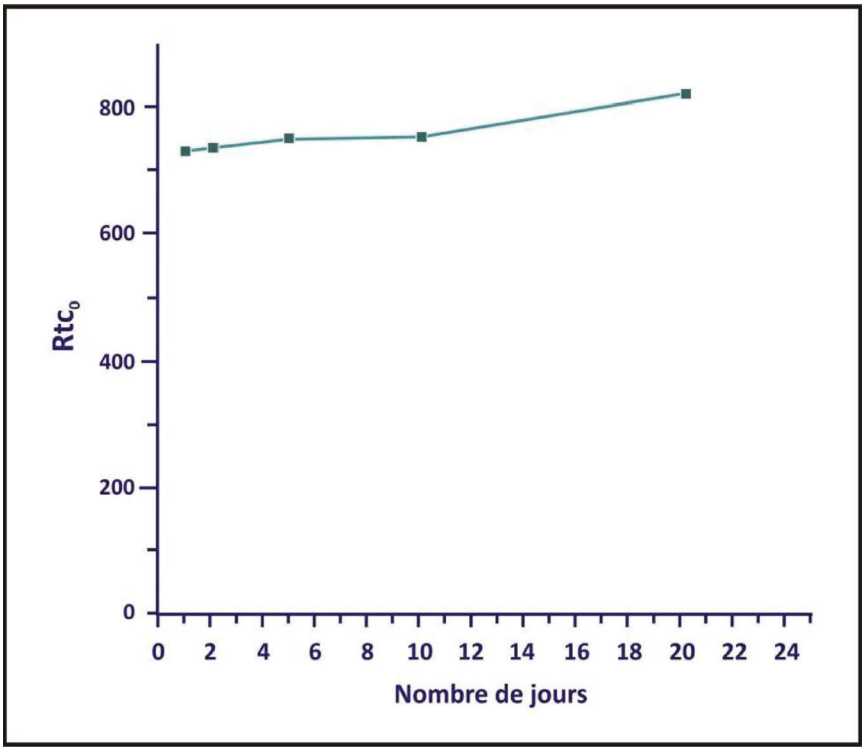


Figure III.12
Stabilité de l'"aptasensor" après régénération avec de l'eau à 60°C

CONCLUSION

Dans le cadre de ce travail, nous avons développé deux "aptasensors" pour la détection de la thrombine. Les deux aptamères sélectionnés pour la détection de la thrombine ont été directement immobilisés par une simple chimisorption sur l'électrode en or.

Les deux "aptasensors" présentent une grande sensibilité, spécificité et stabilité pour la détection de la thrombine. La limite de détection est de 3,1 ng ml-1 (80 pmol / l) pour les deux aptamères, le second aptamère a montré une sensibilité plus élevée que le premier et une meilleure sélectivité.

Ce travail, par rapport aux travaux précédents, montre le grand intérêt de la synthèse directe des aptamères modifiés à l'aide de synthons phophoramidites pour un ancrage fort des thiolates de l'aptamère et une grande flexibilité fournie par les espaceurs ciblés.

REFERENCES – CHAPITRE III

[1] M. C.Thielges, J.Zimmermann, W.Yu, M.Oda, and F. E.Romesberg, "Exploring the Energy Landscape of Antibody-Antigen Complexes:Protein Dynamics, Flexibility, and Molecular Recognition,," *Biochemistry,,* vol. 47: , pp. 7237-7247, 2008.

[2] D. A.Weigent, D. J.Carr, and J. E.Blalock, "Bidirectional communication between the neuroendocrine and immune systems. Common hormones and hormone receptors,," *Annals of the New York Academy of Sciences,,* vol. 579:, 1990.

[3] E.Burnett, J.Christensen, and P.Tattersall, "A Consensus DNA Recognition Motif for Two KDWK Transcription Factors Identifies Flexible-length, CpG-methylation Sensitive Cognate Binding Sites in the Majority of Human Promoters,," *Journal of Molecular Biology,* vol. 314, pp. 1029-1039, 2001.

[4] L.Kime, S. S.Jourdan, and K. J.Mcdowall, "Identifying and characterizing substrates of the RNase E/G family of enzymes, ," *Methods in Enzymology,,* vol. 447, pp. 215-241, 2008.

[5] Updike S. J., and Hicks G. P., "Enzyme electrode, ," *Nature,,* vol. 214 pp. 986-988, 1967.

[6] A.D.Ellington. and J.W. Szostak., " In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. ," *Nature,,* vol. 346, pp. 818-822., 1990.

[7] C.Tuerk.; and L.Gold., "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase," *Science* vol. 249, pp. 505-510., 1990.

[8] D.Irvine, C.Tuerk, and L.Gold, "Selexion: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment with integrated optimization by non-linear analysis," *Journal of Molecular Biology,* vol. 222, pp. 739-761, 1991.

[9] S.D.Jayasena, "Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics, ," *Clinical Chemistry,,* vol. 45, pp. 1628-1650, 1999.

[10] E.Ramos, D.Pineiro, M. Soto, D. R.Abanades, M. E.Martin, M. E.Salinas, and V. M.Gonzalez, "A DNA aptamer population specifically detects Leishmania infantum H2A antigen,," *Laboratory Investigation, ,* vol. 87, pp. 409-416,, 2007.

[11] W.Niu, N.Jiang, and Y.Hu, "Detection of proteins based on amino acid sequences by multiple aptamers against tripeptides, ," *Analytical Biochemistry,* vol. 362:, pp. 126-135, 2007. .

[12] S.Lee, Y. S.Kim, M.Jo, M.Jin, D. K.Lee, and S.Kim, "Chip-based detection of hepatitis C virus using RNA aptamers that specifically bind to HCV core antigen,," *Biochemical and Biophysical Research Communications,* vol. 358:, pp. . 47-52, 2007.

[13] M.Ikanovic, W. E.Rudzinski, J. G.Bruno, A.Allman, and C. J.Andrews, "Fluorescence assay based on aptamer-quantum dot binding to Bacillus thuringiensis spores,," *Journal of Fluorescence,* vol. 17, pp. 193-199, 2007.

[14] N.De-Los-Santos-Alvarez, M. J.Lobo-Castanon, A. J.Miranda-Ordieres, and P.Tunon-Blanco, "Modified-RNA Aptamer-Based Sensor for Competitive Impedimetric Assay of Neomycin B, ," *Journal of the American Chemical Society,* vol. 129: , pp. 3808-3809,, 2007.

[15] K.Senior, "Aptamers as potential probes for cancer, ," *Lancet Oncology,,* vol. 7, p. 712, 2006.

[16] N.Rupcich, R.Nutiu, Y. Li, and J. D.Brennan, "Solid-phase enzyme activity assay utilizing an entrapped fluorescence-signaling DNA aptamer," *Angewandte Chemie, International Edition,* vol. 45, pp. 3295-3299, 2006.

[17] J. W.Guthrie, C. L.Hamula, H.Zhang, and X. C.Le, "Assays for cytokines using aptamers, ," *Methods,,* vol. 38, pp. 324-330, 2006.

[18] M.Minunni, S.Tombelli, A. Gullotto, E.Luzi, and M. Mascini, "Development of biosensors with aptamers as bio-recognition element: the case of HIV-1 Tat protein, ," *Biosensors & Bioelectronics, ,* vol. 20, pp. 1149-1156, 2004. .

[19] M. N.Tojanovic and D. W.Landry, "Aptamer-Based Colorimetric Probe for Cocaine, ," *Journal of the American Chemical Society,,* vol. 124, pp. 9678-9679, 2002.

[20] S.Tombelli, M.Minunni, and M.Mascini, "Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis,," *Biomolecular Engineering,,* vol. 24:, pp. 191-200, 2007.

[21] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, and J. J. Toole, "Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin." *Nature,* vol. 355, p. 564, 1992.

[22] A.B. Iliuk, L. Hu, and W.A. Tao, "Aptamer in bioanalytical applications, ," *Chemistry* vol. 83, pp. 4440-4452, 2011.

[23] F. Kleinjung, S. Klussmann, V.A. Erdmann, F.W. Scheller, JP Fürste, and F. Bier, " High-affinity RNA as a recognition element in a biosensor," *Anal Chem,,* vol. 70 pp. 328-331, 1998.

[24] K.G. Mann "Thrombin: can't live without it; probably die from it," *Chest* vol. 124, pp. 1S-3S, 2003.

[25] M.T. Stubbs and W. Bode, " A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure, Thromb," *Res,* vol. 69, pp. 1-58., 1993.

[26] M.T. Stubbs and W. Bode, "The clot thickens: clues provided by thrombin structure,," *Trends Biochem. Sci.,* vol. 20, pp. 23-28, 1995.

[27] N.S. Colwell, M.A. Blinder, M. Tsiang, C.S. Gibbs, P.E. Bock, and D.M. Tollefsen, "Allosteric effects of a monoclonal antibody against thrombin exosite II," *Biochemistry* vol. 37, pp. 15057-15065, 1998.

[28] X. Gan, R. Yuan, Y. Chai, Y. Yuan, L. Mao, Y. Cao, and Y. Liao, "4-(Dimethylamino)butyric acid@PtNPs as enhancer for solid-state electrochemiluminescence aptasensor based on target-induced strand displacement " *Biosensors and Bioelectronics, ,* vol. 34, pp. 25-29, 2012.

[29] H.A. Ho and M. Leclerc, "Optical sensors based on hybrid aptamer/conjugated polymer complexes," *Journal of the American Chemical Society, ,* vol. 126, pp. 1384-1387, 2004.

[30] Y. Wang, Z. Li, H. Li, M. Vuki, D. Xu, and H.Y. Chen " A novel aptasensor based on silver nanoparticle enhanced fluorescence. ," *Biosensors and Bioelectronics,,* vol. 32, pp. 76-81, 2012.

[31] T. Hianik, V. Ostatná, M. Sonlajtnerova, and I. Grman, "Influence of ionic strength, pH and aptamer configuration for binding affinity to thrombin.," *Bioelectrochemistry,,* vol. 70, pp. 127-133, 2007.

[32] C.C. Chang, S. Lin, C.H. Lee, T.L. Chuang, P.R. Hsueh, H.C. Lai, and C.W. Lin, "Amplified surface plasmon resonance immunosensor for interferon-gamma based on a streptavidin-incorporated aptamer. ," *Biosensors and Bioelectronics,,* vol. 37, pp. 68-74, 2012.

[33] I. Willner and M. Zayats, "Electronic aptamer-based sensors." *Angewandte Chemie International Edition,* vol. 46, pp. 6408-6418 2007.

[34] G.S. Bang, S. Cho, and B.G. Kim, "A novel electrochemical detection method for aptamer biosensors.," *Biosensors and Bioelectronics, ,* vol. 21, pp. 863-870, 2005.

[35] W. Cheng, S. Ding, Q. Li, T. Yu, Y. Yin, H. Ju, and G. Ren, "A simple electrochemical aptasensor for ultrasensitive protein detection using cyclic target-induced primer extension. ," *Biosensors and Bioelectronics,,* vol. 36 pp. 12-17, 2012.

[36] L. Jiang, R. Yuan, Y. Chai, Y. Yuan, L. Bai, and Y. Wang, "Aptamer-based highly sensitive electrochemical detection of thrombin via the amplification of graphene. " *Analyst,* vol. 137 pp. 2415-2420, 2012.

[37] H.Y. Bai, F. J. Del Campo, and Y.C. Tsai, "Sensitive electrochemical thrombin aptasensor based on gold disk microelectrodearrays," *Biosensors and Bioelectronics* vol. 42, pp. 17-22 2013.

[38] S. Centi, S. Tombelli, M. Minunni, and M. Mascini, "Aptamer-based detection of plasma proteins by an electrochemical assay coupled to magnetic beads,," *Anal. Chem.,* vol. 79 pp. 1466-1473, 2007.

[39] N. Hamaguchi, A. Ellington, and M. Stanton, "Aptamer beacons for the direct detection of proteins,," *Anal. Biochem. ,* vol. 294, pp. 126-131, 2001.

[40] Y. Li, H.J. Lee, and R.M. Corn, "Detection of protein biomarkers using RNA aptamer microarrays and enzymatically amplified surface plasmon resonance imaging,," *Anal. Chem.,* vol. 79, pp. 1082-1088, 2007.

[41] G. Chatelain, M. Ripert, C. Farre, S. Ansanay-Alex, and C. Chaix, "A. four-ferrocene modified stem-loop structure as a probe for sensitive detection and single-base mismatch discrimination of DNA,," *Electrochim. Acta,* vol. 59, pp. 57-63., 2012.

[42] H. Aoki and H. Tao, " Label-and marker-free gene detection based hybridization-induced comformational flexibility changes in ferrocene-PNA conjugate probe. ," *Analyst,* vol. 132, pp. 784-791., 2007.

[43] M.C. Rodriguez, A.N. Kawde, and J. Wang, "Aptamer biosensor for label-free impedance spectroscopy detection of proteins based on recognition-induced switching of the surface charge,," *Chem. Commun.,* pp. 4267-4269, 2005.

[44] J.W. FentonII, B.H. Landis, D.A. Walz, J.S. Finlayson, Human thrombins, in: R.L. Lundblad,J.W. FentonII, and K. G. M. (Eds.), "Chemistry and Biology of Thrombin," *Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, Michigan, ,* pp. 43-70, 1977,.

[45] Z. Zhang, W. Yang, J. Wang, C. Yang, F. Yang, and X. Yang, "A sensitive impedimetric thrombin aptasensor based on polyamidoamine dendrimer,," *Talanta,* vol. 78, pp. 1240-1245., 2009.

[46] Y. Yuan, R. Yuan, Y. Chai, Y. Zhuo, Z. Liu, L. Mao, S. Guan, and X. Qian, "A novel label-free electrochemical aptasensor for thrombin based on the{nano-Au/thionine}n multilayer films as redox probes, ," *Anal. Chim. Acta* vol. 668, pp. 171-176, 2010.

[47] Z. Chen, L. Li, H. Zhao, L. Guo, and X. Mu, "Electrochemical impedance spectroscopy detection of lysozyme based on electrodeposited gold nanoparticles,," *Talanta,* vol. 83 pp. 1501-1506, 2011.

[48] L.D. Li, H.T. Zhao, Z.B. Chen, X.J. Mu, and L. Guo, "Aptamer biosensor for label-free impedance spectroscopy detection of thrombin based on gold nanoparticles,," *Sens. Actuators B* vol. 157, pp. 189-194, 2011.

[49] H. Cai, T.M.H. Lee, and I.M. Hsing, "Label-free protein recognition using an aptamerbased impedance measurement assay,," *Sens and Actuators B,* vol. 114, pp. 433-437, 2006.

[50] J.A. Lee, S. Hwang, J. Kwak, S.II. Park, S.S. Lee, and K.C. Lee, "An electrochemical impedance biosensor with aptamer-modified pyrolyzed electrode for labelfree protein detection, ," *Sens. Actuators B,* vol. 129, pp. 372-379., 2008.

[51] S. Ding, B. Chang, C. Wu, M. Lai, and H. Chang, " Impedance spectral studies of self-assembly of alkanethiols with different chain lengths using different immobilization strategies on Au electrodes. ," *Analytica Chimica Acta,,* vol. 554, pp. 43-51, 2005.

[52] C. Fernandez-Sanchez, C. McNeil, and K. Rawson, "Electrochemical impedance spectroscopy studies of polymer degradation: application to biosensor development. " *Trends in Analytical Chemistry,* vol. 24, pp. 37-48, 2005.

[53] Y. Hou, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, A. Zhang, J.Minic-Vidic, T.Gorojankina., MA.Persuy, E. Pajot-Augy, R. Salesse, V. Akimov, L. Reggiani, C. Pennetta, E. Alfinito, O. Ruiz, G. Gomila, J. Samitier, and A. Errachid, "A novel detection strategy for odorant molecules based on controlled bioengineering of rat olfactory receptor I7.," *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 22, pp. 1550-1555., 2007.

[54] E. Baldrich, A. Restrepo, and C.K. O'Sullivan, "Aptasensor development: elucidation of critical parameters for optimal aptamer performance," *Anal. Chem. ,* vol. 76, pp. 7053-7063, 2004.

[55] M. Mir, A. Toby, A. Jenkins, and I. Katakis, "Ultrasensitive detection based on an aptamer beacon electron transfer chain, ," *Electrochem. Commun. ,* vol. 10, pp. 1533-1536, 2008.

[56] A.E Radi, J.L. Acero Sanchez, E. Baldrich, and C.K. O'Sullivan, "Reusable impedimetric aptasensor, ," *Anal. Chem.,* vol. 77, pp. 6320-6323, 2005.

[57] C. Polonschii, S. David, S. Tombelli, M. Mascini, and M. Gheorghiu, "A novel low-cost and easy to develop functionalization platform. Case study: aptamer-based detection of thrombin by surface plasmon resonance, ," *Talanta,* vol. 80, pp. 2157-2164. 2010.

[58] R.J. Mani, R.G. Dye, T.A. Snider, S. Wang, and K.D. Clinkenbeard, "Bi-cell surface plasmon resonance detection of aptamer mediated thrombin capture in serum," *Biosens. Bioelectron.* vol. 26, pp. 4832-4836., 2011.

CHAPITRE IV

APPLICATION DE LA CHIMIE " CLICK " POUR L'ÉLECTROADRESSAGE SUR ÉLECTRODE D'OR ET LA DÉTECTION DE PROTÉINE

CHAPITRE IV

APPLICATION DE LA CHIMIE « CLICK » POUR L'ELECTROADRESSAGE SUR ELECTRODE D'OR ET LA DETECTION DE PROTEINE

IV. 1. Introduction

Dans les biocapteurs d'affinité, un bioélément de reconnaissance (sonde) immobilisé se lie sélectivement à la substance à analyser (molécule cible). La détection de l'événement de liaison (cible / sonde) est basée sur la variation d'un paramètre électrique au niveau de l'interface électrode / électrolyte où un transducteur électrochimique est utilisé.

Ces transducteurs peuvent être de nature potentiométrique [1], ampérométrique [2], conductimétrique [3] ou impédimétrique [4] , et il permettent la conversion des informations biochimiques en un signal mesurable.

Les biocapteurs électrochimiques ont récemment reçu une attention toute particulière car ils possèdent un certain nombre de caractéristiques intéressantes : leur simplicité, leur faible cout, leurs faible temps de réponse, leurs capacité de miniaturisation, ils permettent une détection sans marquage et une production en masse…etc.

En se concentrant sur les biocapteurs impédimétriques, ils permettent la détection de cibles biologiques sans aucune étape de marquage précédente (fluorophores, enzymes redox ...) des biomolécules [5]. Par ailleurs, les techniques impédimétriques ont été utilisées pour caractériser la fabrication de biocapteurs et de suivre les réactions catalysées par des enzymes ou des événements de reconnaissance biomoléculaires des liaisons spécifiques protéines, des lectines, des récepteurs, des acides nucléiques, des cellules entières, des anticorps ou des substances liées à l'anticorps [6].

L'étape cruciale dans la fabrication / conception de biocapteur reste le choix de la méthode d'immobilisation de la matière biologique sur l'électrode. Les techniques d'immobilisation de biomolécules les plus couramment utilisées pour la conception de biocapteurs spécifiques sont : l'adsorption physique, le piégeage, la réticulation et le couplage covalent [7]. Parallèlement à ces techniques d'immobilisation répandues, les méthodes électrochimiques d'immobilisation et en particulier les méthodes d'électro-adressages suscitent un intérêt particulier comme de nouvelles approches pour fixer des biomolécules actives à la surface d'un matériau conducteur. L'application d'un potentiel électrochimique de l'électrode spécifique (puce) permet l'immobilisation de biomolécules qui devrait être compatible avec la production de biopuces pour une multidétection.
Dans cette optique, beaucoup de recherches ont été consacrées au cours des dernières décennies pour l'électro-adressage des sondes sur des microréseaux. L'électropolymérisation du pyrrole, par exemple, s'est avérée être une méthode efficace pour l'adressage de l'ADN sur des électrodes miniaturisées [8-11]. La chimie du sel d'aryle diazonium semble prometteuse pour la réalisation de greffage covalent sur des surfaces de carbone et d'or par électroactivation. Corgier et al ont décrit le greffage de biomolécules d'aryle diazonium modifiées, tels que l'ADN ou des protéines, sur des électrodes de carbones [12, 13] polarisées et sur des électrodes d'or [14]. La réduction du groupement aryle diazonium obtenu sous un potentiel négatif constitué d'une liaison C-C covalente ou C-Au liaison entre le groupe aryle et l'électrode.

Parmi toutes ces méthodes d'électro-adressages existantes, la « chimie click » ou « cycloaddition de Huisgen » a été utilisée récemment pour le greffage et l'adressage de sondes sur des surfaces solides organiques et inorganiques. C'est à cette chimie que nous nous sommes intéressés dans le cadre de ce travail et que nous développerons juste après.

IV. 2. Chimie click

IV. 2. 1. Généralités

Le concept de la chimie click est un concept récent introduit par K.Barry Sharpless en 2001 [15] qui définit un groupe de réactions d'une grande efficacité. La chimie click présente une solution pour la conception de nouvelles méthodes d'immobilisation de biomolécules. En fait, il suffit d'intégrer aux deux partenaires des fonctions chimiques présentant une réactivité réciproque, unique et spécifique. En général, l'un des deux synthons porte une fonction nucléophile et l'autre une fonction électrophile complémentaire. Ces réactions, que l'on pourrait qualifier de « quasi parfaites »,

répondent à une série de caractéristiques précises pour qu'une réaction puisse être considérée comme type « click », celle-ci doit :

- Etre modulable et doit s'appliquer à un large spectre de substrats,
- Aboutir à de bons rendements et être efficace,
- Générer uniquement des sous- produits inoffensifs,
- Etre stéréospécifique,
- S'effectuer selon un protocole simple,
- Les techniques de purification doivent être simples.

La diversité des réactions possibles entraîne différents types de liaisons chimiosélectives (Cf. Shema IV.1). Les quatres classes de transformations sont :

- ✓ Les cycloadditions d'especes insaturées ; particulièrement les réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire Azoture-Alcyne (CuAAC) et de Diels-Alder.
- ✓ Les substitutions nucléophiles, particulièrement les réactions d'ouvertures d'hétérocycles contraints comme les époxydes.
- ✓ La chimie des carbonyles non énolisables, comme la formation d'hydrazones ou la chimie des oximes.
- ✓ Les additions sur des liaisons multiples carbone-carbone, soit les réactions d'oxydations telles que les époxydations, et certaine additions de Michael.

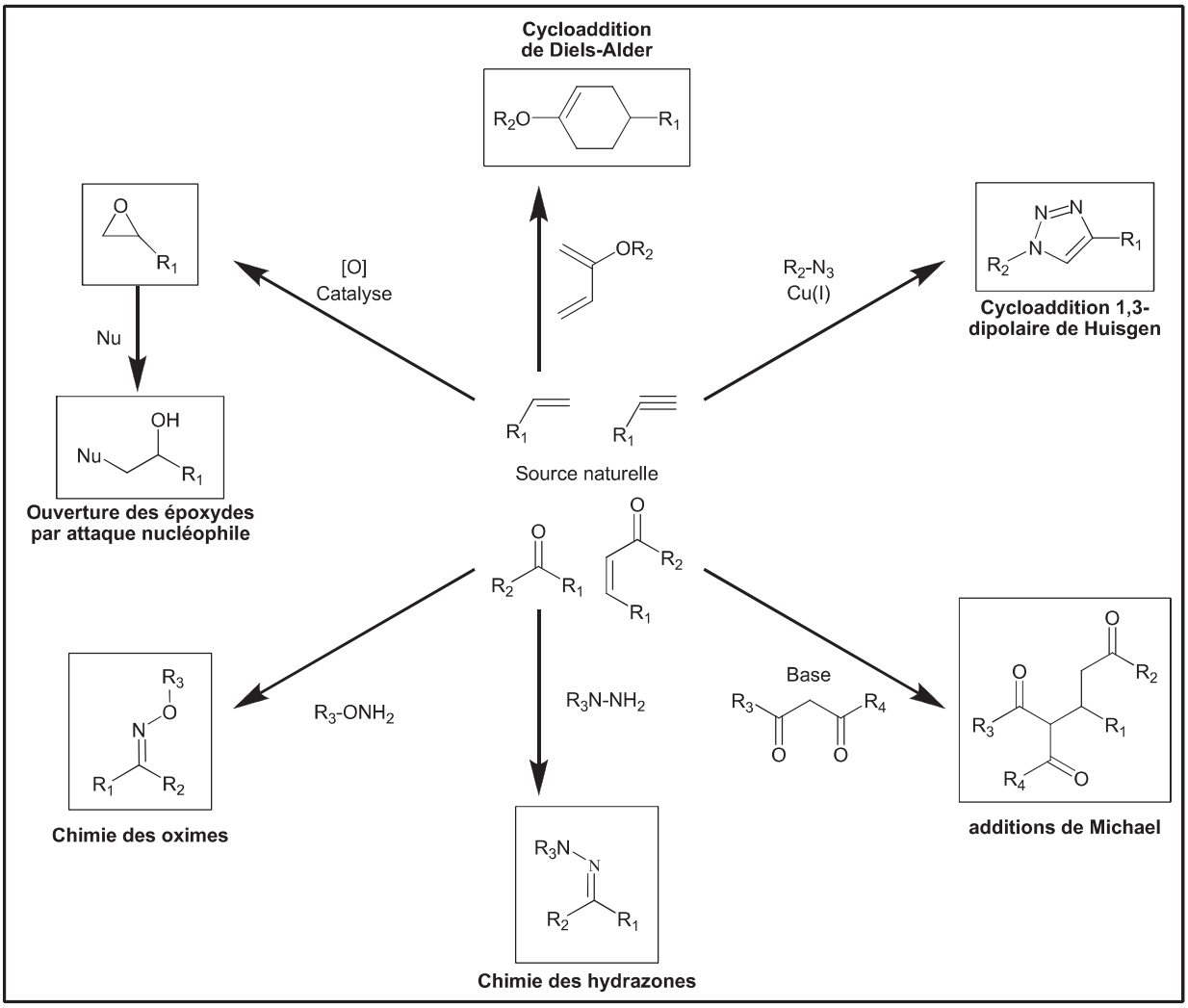


Schéma IV.1
Principales réactions de chimie « click ».

Parmi les différentes réactions click, la cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par du cuivre (I) entre un azoture et un alcyne est la réaction représentant au mieux le concept de la chimie click. En raison de sa simplicité et de son efficacité, cette cycloaddition est la réaction click par excellence [15].

IV. 2. 2. Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen

Dans les années 1960, Huisgen met en évidence la réaction de cycloaddition d'un azoture sur un alcyne pour donner un 1,2,3-triazole [16].

Cette réaction présente l'avantage d'être très permissive en terme de solvants utilisés et peu sensible aux fonctions chimiques avoisinantes. En contrepartie, elle présente l'inconvénient d'être non régiospécifique, donnant un mélange de triazoles substitués en 1,4 et 1,5 (Figure IV.1). Néanmoins, il est possible d'orienter la régiosélectivité en utilisant des alcynes terminaux particulièrement

déficitaires en électrons ou même d'assurer une régiospécificité dans le cas de cycloadditions intramoléculaires conduisant à des composés bicycliques [17].

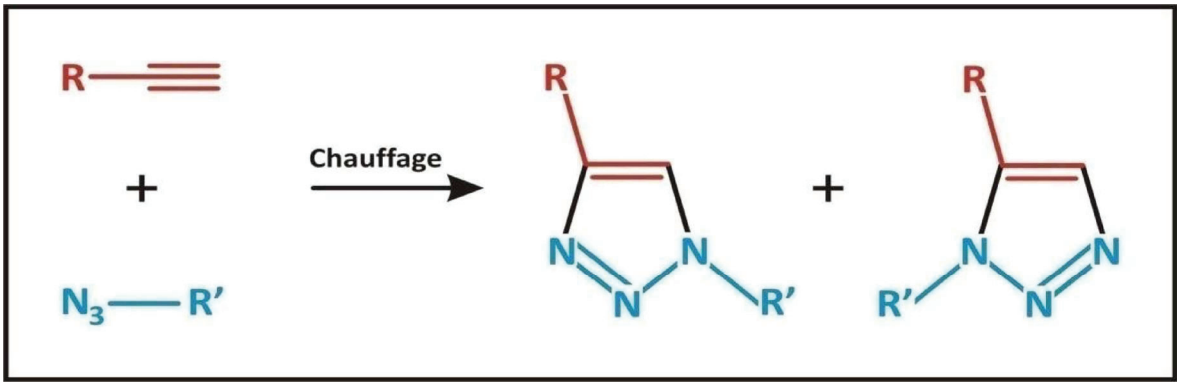


Figure IV.1.
La cycloaddition de Huisgen mène à deux régioisomères du 1,2,3-triazole.

Outre sa non régiospécificité, cette réaction nécessite de chauffer à des températures élevées en absence du catalyseur adéquat. Son utilisation avec des azotures de faible poids moléculaire devient dangereuse en raison du caractère facilement explosif de ces derniers. Pour toutes ces raisons, cette réaction a peu été utilisée dans ces conditions.

IV. 2. 2. 1. Catalyse de la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen

En 2002, le groupe de Meldal introduit l'utilisation des sels de Cu(I) pour catalyser cette cycloaddition [18], permettant la synthèse régioselective, à température ambiante, d'un triazole disubstitué en position 1 et 4 : la CuAAC (Cu-Catalysed Azide-Alkyne Cycloaddition) est née. Cette réaction a été développée en parallèle par le groupe de Sharpless qui propose rapidement un premier mécanisme [19].

On retrouve dans la littérature des tentatives avec d'autre sels métalliques ($NiCl_2$, $PtCl_2$, $PdCl_2$) [20]. Le catalyseur à base de platine présente une activité significative par rapport à la réaction non catalysée, mais la cinétique est 10 fois plus lente que dans le cas de CuBr. Enfin, il apparaît intéressant de noter que certains catalyseurs à base de ruthénium [21] favorisent la formation de l'isomère 1,5 lors de la cycloaddition, comme démontré par le groupe de Sharpless [22]. Cependant, cette réaction ne peut être considérée comme « click » car elle ne se déroule pas dans l'eau et de plus nécessite un chauffage du milieu réactionnel.

L'utilisation de métaux de transition a permis le développement d'une version catalysée de la cycloaddition de Huisgen, l'utilisation de complexes de Cu(I) a permis l'obtention spécifique du régioisomère 1,4 [23] (Figure IV.2.).

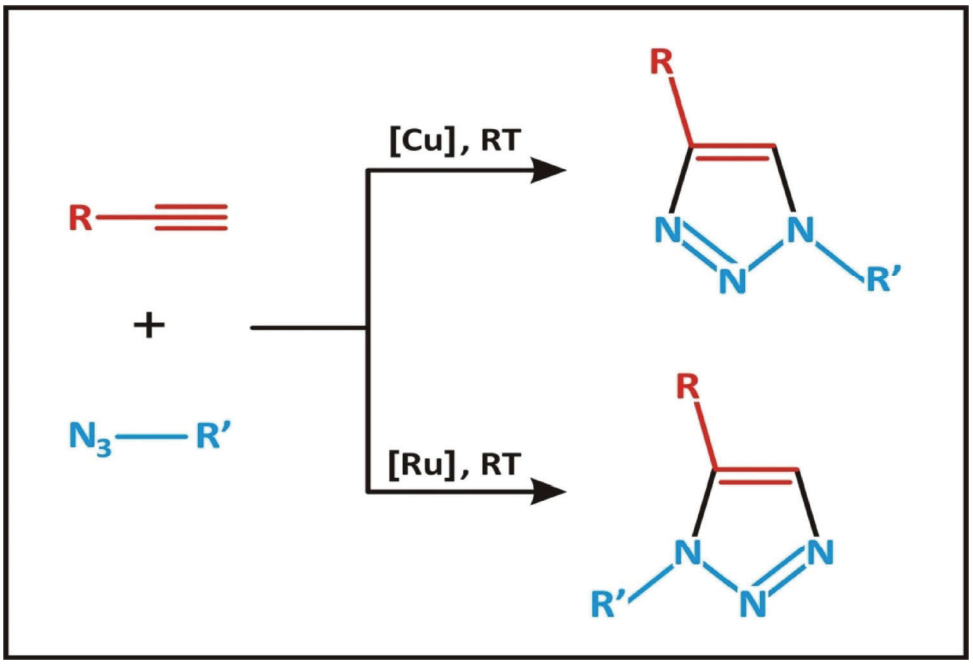


Figure IV.2.
Cycloaddition de Huisgen catalysée

La chimie « click » est régulièrement utilisée en chimie combinatoire pour le développement de banques ou chimiothèques de composés. Celles-ci peuvent être préparées en solution mais le plus souvent, pour des raisons de simplicité de traitement post-réactionnel, les chimiothèques sont développées sur support solide [24, 25].

IV. 2.2.2. Mécanisme catalytique et régiospécificité :

L'explication du phénomène catalytique lié à la présence du Cu(I) repose sur l'activation de l'alcyne (Figure IV.3). Cette activation a pour conséquence une augmentation de la vitesse de réaction d'un facteur allant jusqu'à 10^7 dans certains cas. Le passage par un intermédiaire cyclique à 6 chaînons proposé par K.B.Sharpless permet l'obtention du triazole substitué1,4 et la régénération du catalyseur.

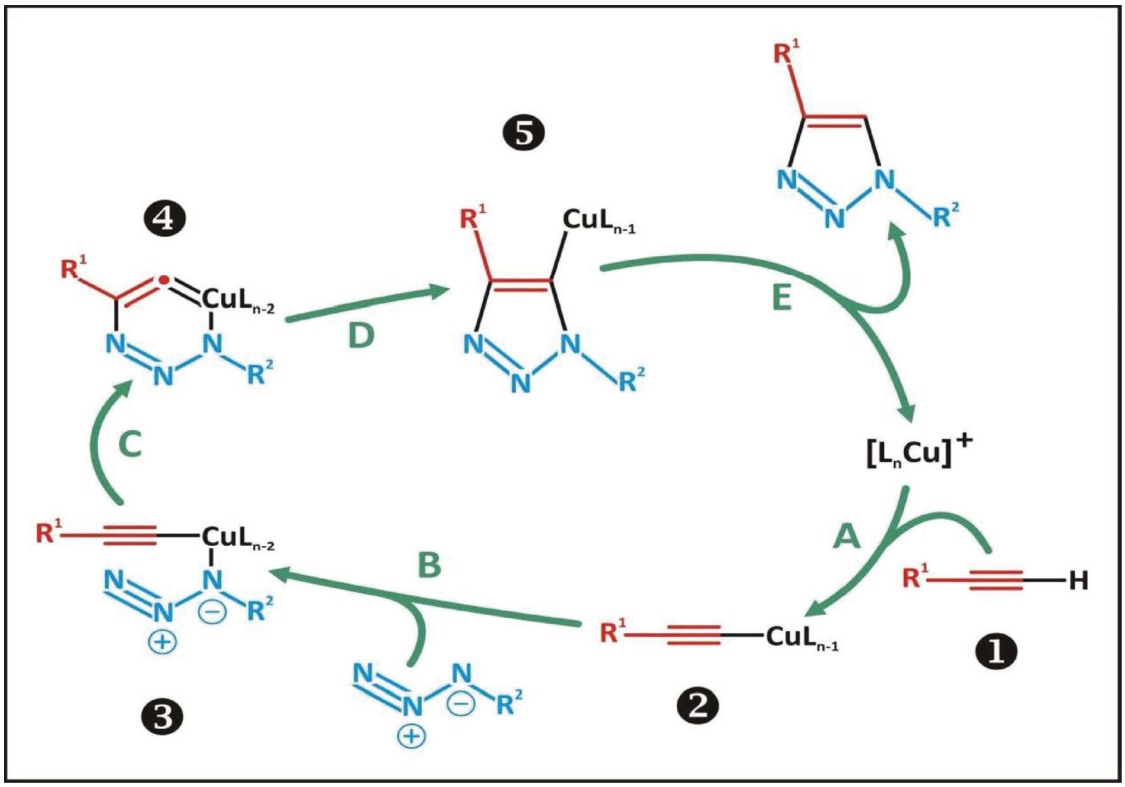


Figure IV.3
Figure catalytique de la CuAAC proposé en 2002 par K.B. Sharpless

La première étape consiste en l'addition du cuivre(I) sur l'alcyne après élimination du proton terminal. La régiospécificité de la CuAAC s'explique par le caractère dipolaire de l'azoture. Celui-ci va venir se coordonner au cuivre exclusivement via l'atome N(1) riche en électrons qui porte la chaîne alkyle. Le complexe d'acétylure de cuivre (I) formé interagit avec l'azoture, activant ainsi l'attaque nucléophile du carbone sur l'atome d'azote terminal afin de former un cycle avec le métal. Il s'ensuit une contraction du cycle (élimination réductrice) pour former le complexe triazoture de cuivre. Enfin, le triazole attendu est généré par le protonolyse, entraînant la libération du cuivre qui peut rentrer dans un nouveau cycle catalytique.

IV. 2. 2. 3. Applications de la cycloaddition CuAAC :

Le concept de la chimie click fut initialement développé pour la synthèse de molécules à intérêt pharmacologique et l'efficacité et l'adaptabilité de la réaction de CuAAC lui a ouvert de nombreux autres domaines tels que la chimie supramoléculaire des dendrimères et des polymères ou encore la chimie des sucres et des structures glycosylées multivalentes.

La réaction de CuAAC a été rapportée aussi comme un outil pertinent pour l'immobilisation de ligand sur un support solide, notamment pour la préparation de puces à ADN. Davaraj et al [26] ont

développé 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 (figure IV.4)

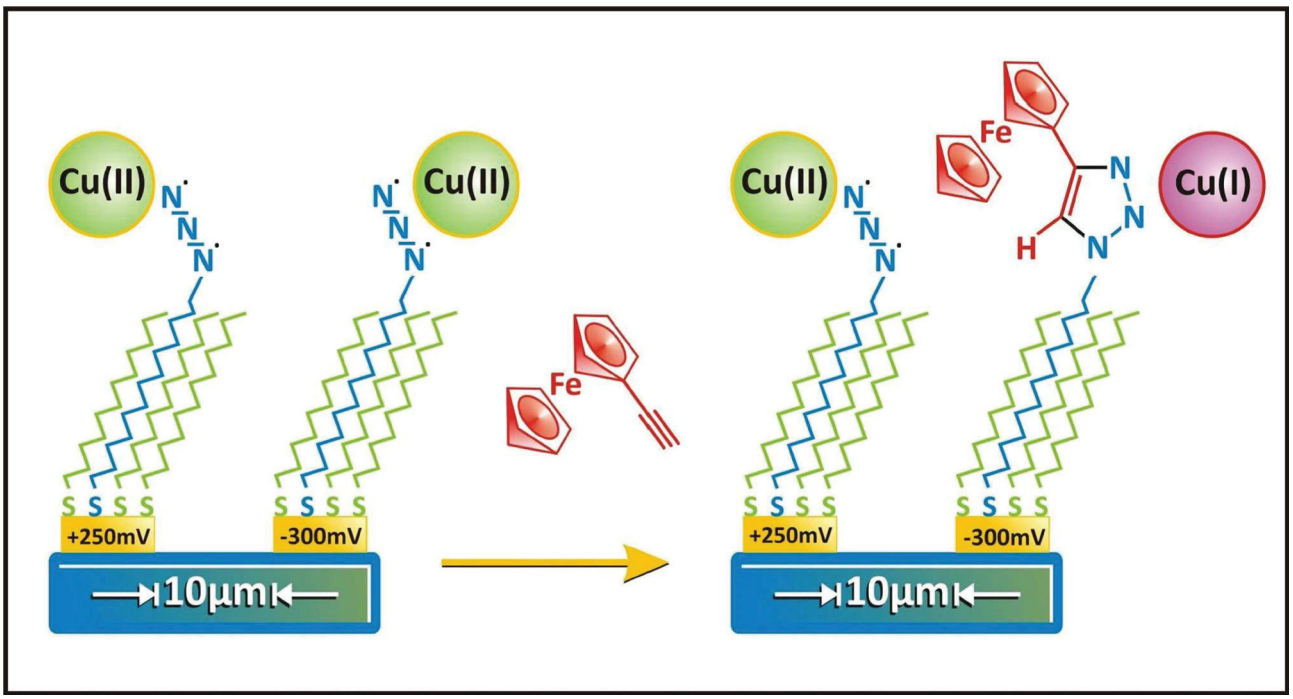


Figure IV.4
Application de la "click" pour l'immobilisation d'une sonde ferrocène sur de l'or

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 al [27] ont fonctionnalisé des électrodes avec un polymère conducteur PEDOT modifié par un groupement azoture. L'application d'un potentiel négatif leur a permis d'immobiliser sélectivement deux fluorophores distincts.

Canete et al [28] ont utilisé cette méthode pour la fabrication de puces à ADN. La sonde immobilisée est un oligonucléotide modifié par un groupement bleu de méthylène.

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 Volammétrie impilsionnelle différentielle (DPV). L'hybridation de la cible entraîne la diminution du signal DPV.

Cette méthode d'immobilisation de biomolécules sur surface d'or semble très prometteuse et sera donc retenue pour la fixation de la biotine sur la surface d'or.

Une fois la biotine bien immobilisée sur la surface d'or, elle peut être utilisée pour fixer la streptavidine, sachant que la streptavidine est très utilisée en biologie moléculaire pour sa très forte affinité avec la biotine, la constante de dissociation (Kd) du complexe biotine-streptavidine est de l'ordre de ~ 1×10^{-15} mol/L, se classant parmi les plus fortes interactions non-covalentes connues dans la nature. C'est la raison pour laquelle nous allons décrire brièvement ces deux protéines et l'internet que représente ce système dans la conception des biocapteurs.

IV. 3. Description de l'interaction entre la biotine et la streptavidine :

IV. 3. 1. La biotine

La biotine [29] ou la vitamine H est une molécule hydrosoluble de masse molaire 244 Da. Sa structure chimique est présentée dans la figure IV. Elle est constituée d'un cycle tétrahydrothiophène porteur d'une chaîne latérale à cinq atomes de carbone. Elle possède un centre de chiralité, déterminant pour la reconnaissance de la streptavidine. 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) et des sucres. Elle est le cofacteur des carboxylases qui catalysent l'addition d'un groupe CO_2 à différents substrats [30-32]. 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 [33]. Cette affinité ne baisse pas de façon significative quand le groupement carboxylique de la biotine est fonctionnalisé [34]. 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 [35]. Ce fait est à la base de l'ingénierie développée autour du système (strept) avidine biotine depuis une trentaine d'années[33].

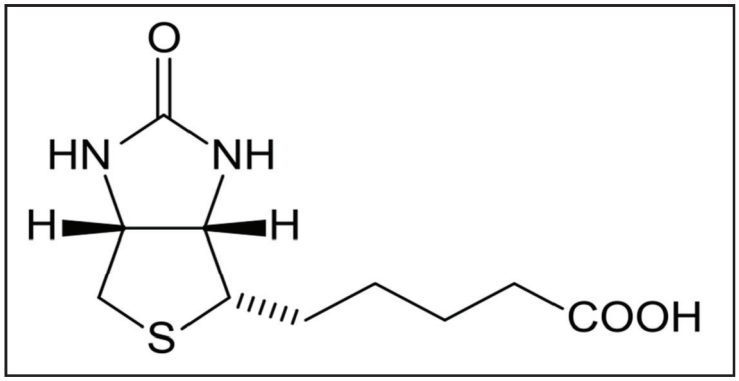


Figure IV.5
Structure de la biotine

IV. 3. 2. La Streptavidine

La streptavidine [36] est l'équivalent bactérien de l'avidine [37] et elle est produite naturellement par Streptomyces avidinii. Comme l'avidine, il s'agit d'une protéine homotétramérique tétravalente à quatre unités de biotine. La masse molaire de la streptavidine est d'environ 60000 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 [38].

IV. 3. 3. Système biotine/streptavidine

La biotine peut se fixer à la streptavidine beaucoup plus fortement qu'un anticorps à son antigène. L'affinité exceptionnellement élevée entre ces deux molécules est décrite par une constante de dissociation de 10^{-15} [35, 39]. Cette caractéristique explique pourquoi ces deux molécules ont été très étudiées en tant que modèle théorique d'interaction impliquant une protéine et un ligand [35, 40], et utilisées à grande échelle en biologie moléculaire pour former des liaisons spécifiques et quasiment irréversibles entre des macromolécules biologiques [41]. La biotine et la streptavidine sont également plus faciles à produire et donc moins chères que des anticorps.

La streptavidine dispose de 4 sous-unités peptidiques, et elle peut donc interagir avec 4 molécules de biotine simultanément. La biotine est maintenue dans le site récepteur de la streptavidine par un très grand nombre de liaisons hydrogène qui, collectivement, produisent un lien extrêmement stable [41]. Le site de fixation de la biotine est constitué d'acides aminés polaires et aromatiques. Avant l'interaction, la cavité formée par des boucles polypeptidiques est ouverte. Les acides aminés impliqués dans l'immobilisation sont situés en surface de la molécule, en contact avec le solvant. Le site récepteur de la biotine est alors occupé par plusieurs molécules d'eau. La formation du complexe biotine-streptavidine implique le déplacement des molécules d'eau, l'agencement de

multiples liaisons hydrogène entre les acides aminés et la biotine, et enfin le repliement des boucles polypeptidiques pour enfermer la biotine dans la streptavidine [41].

L'affinité streptavidine/biotine occupe une place remarquable dans le classement d'affinité entre des combinaisons protéines-ligands : 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 [42] 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 modifications chimiques 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 système d'analyse, et la catalyse énanatiosélective par des métalloenzymes artificielles [43-46].

Dans le cadre de ce travail, nous avons développé une stratégie d'électro-adressage sur surface d'or compatible avec la production de biopuces pour multi-détection. Cette électro-fonctionnalisation est réalisée via une cycloaddition dipolaire 1,3 de type Huisgen, déjà prédéfini « Click Chemistry ». Cet adressage est dirigé par le Bis(DTPA) hexynyl constitué de deux groupements dithiol phosphate et d'un groupement hexynyle. Ce composé a été synthétisé par synthèse supportée, à partir d'un réactif dithiol phosphoramidite (DTPA) et d'un hexynyl phosphoramidite. Le Bis(DTPA) hexynyl est ensuite greffé sur une surface d'or, par la suite, nous avons fixé un oligonucléotide (N_3-PEG3-Biotine) sur la surface d'or déjà modifiée par électro-adressage par chrono-coulométrie. Le contrôle du greffage a été fait par spectroscopie d'impédance montrant la variation d'impédance lors de l'électro-adressage à -300 mV. Ces électrodes modifiées ont été utilisées pour la fixation de la streptavidine. Le contrôle négatif est effectué par mesure d'impédance. Cette approche permet une immobilisation contrôlée et compatible avec tout type de bio-sondes.

Des nanoparticules Rhodamine recouvertes de streptavidine fluorescentes ont été également greffées de façon spécifique sur la surface d'or biotinylé afin de confirmer la réaction de « click » en utilisant la microscopie à fluorescence.

La plate-forme de streptavidine obtenue a été utilisée pour détecter l'albumine sérique humaine (HSA). Les concentrations minimales détectables sont de 10 pg/ml et la saturation de la surface est obtenue avec des concentrations supérieures à 100 ng/ml.

IV. 4. Matériels et méthodes

IV. 4. 1. Solutions et réactifs :

Le conjugué Azide-PEG3-biotine a été acheté auprès de Jena Science (Saint-Martin-d'Hères, France), sa structure est la suivante :

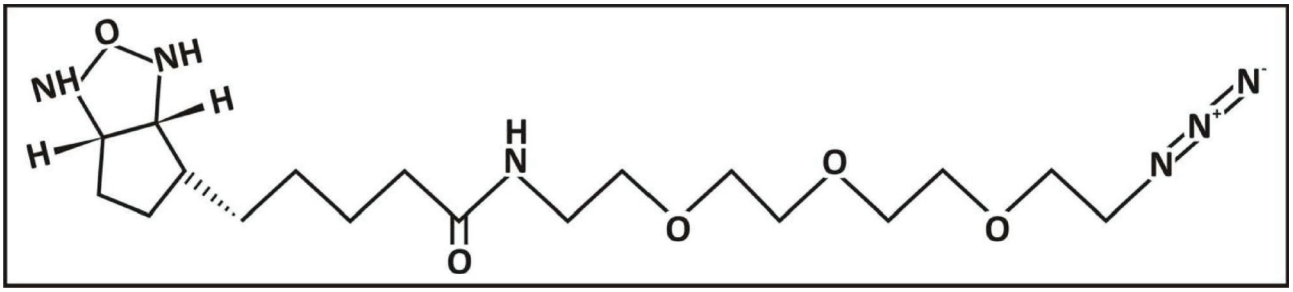


Figure IV.6
Structure du composé azide-PEG3-Biotine.

Tris(((1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl))amine (TBTA), Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP, HCl), streptavidine, l'albumine sérique bovine(BSA), ainsi que tous les autres réactif chimiques ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Les nanoparticules de silice à cœur rhodamine fonctionnalisées à la streptavidine ont été achetées chez Nano-H (Saint Quentin Fallavier, France). La protéine d'albumine sérique humaine biotinylée (HSA) a été obtenus auprès de Abacam (Paris, France). La Dithiol phosphoramidite (DTPA) et toutes les phosphoramidites ont été achetées chez Glen Research (Sterling, Virginie, USA).
Le dérivé du Bis (DTPA) hexynyl a été synthétisé en utilisant un synthétiseur 394 ARN / ADN (Applied Biosystems, Foster City, USA) en utilisant un protocole décrit dans un précédent article [47].

Toutes les solutions aqueuses ont été préparées à partir d'eau déionisée par un système Milli-Q (Millipore, Belford, MA).

IV.4.2. Équipement

Une cellule électrochimique conventionnelle en plexiglas à trois électrodes de volume 5 ml (Verre Equipements, Collonges au Mont d'Or, France), a été utilisée dans une cage de Faraday. La contre-électrode est une plaque de platine (aire de 0,54 cm^2) et l'électrode de travail est une électrode en or (aire de surface 0,19 cm^2).

Pour la réalisation des mesures relatives à la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE), l'électrode de référence utilisée est une électrode au calomel saturé (SCE), tandis qu'un fil de platine a été utilisé pour la réalisation de la réaction click. Toutes les analyses pour la réalisation de la chimie click ont été réalisées dans un tampon phosphate (PBE : 20 mM phosphate de sodium et 250 mM de perchlorate de sodium pH= 6,4).

Toutes les mesures électrochimiques ont été effectuées en utilisant un potentiostat-Galvanostat PGZ 402-voltalab 80 assisté par un logiciel volta Master 4.

Toutes les mesures de la spectroscopie d'impédance électrochimique ont été réalisées en présence du couple redox $[Fe (CN) 6]^{3-/4-}$ dans un tampon phosphate salin (PBS) (10 mM de phosphate de sodium, 2,7 mM de chlorure de potassium et 137 mM chlorure de sodium, pH 7,4). Les mesures ont été effectuées dans une gamme de fréquences de 100 kHz à 100 MHz, à un potentiel appliqué de -200 mV avec une amplitude de 10 mV. Toutes les solutions ont été désoxygénées par un flux d'argon avant utilisation.

IV. 4. 3. Autres techniques de caractérisation

Les images de microscopie optique de fluoresence sont prises sur un appareil Zeiss Axioplan 2 Imaging, équipé de lentilles de grossissement X10 et X 40 et d'une caméra monochromatique.

Les analyses TEM ont été réalisées avec un Philips CM120 fonctionnant à 80 kV (Centre de microscopie de l'Université Lyon1).

IV. 4. 4. Synthèse supporté des dérivés bis (DTPA) :

Cette partie de synthèse a été effectuée par Micaël Ripert thésard à l'ISA qui a effectué toute la synthèse et la caractérisation du dérivé Bis (DTPA) hexynyl.

Le dérivé bis (DTPA)héxynyle est constitué de deux groupements1,2-dithiane-4-ol-5-phosphate et d'un groupement héxynyle. Une colonne DTPA-CPG (1µmol) a été utilisée 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. La phase aqueuse est ensuite séchée sous vide puis le produit recueilli et caractérisé par ESI-MS, puis directement utilisé comme élément d'ancrage. SM (ESI-) : 525,0 ($[M-H]^-$). 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 quantifier le bis(DTPA)héxynyle décroché de la CPG par spectrophotométrie UV. (quantification à 260 nm, ε_{260} = 8700$L^-mol^{-1}.cm^{-1}$). Un rendement global de synthèse de 80% été estimé de cette façon. SM (ESI-) : 829,00 ($[M^{3-}+2H]^-$). Formule brute : $C_{24}H_{36}N_2O_{16}P_3S_4^-$. Masse calculée 829,7, masse trouvée 829,0.

IV. 4. 5. Nettoyage et activation de la surface l'or :

Le nettoyage de l'électrode d'or se fait par une première étape de sonication dans une solution d'acétone pendant 15 min. Elle est ensuite plongée dans une solution de piranha (H_2SO_4/H_2O_2 70 :30 v/v) durant 5 minutes, rincée à l'eau ultra pure puis placé dans la cellule de mesure. La cellule est reliée au potentiostat, la surface d'or est alors activée en milieu basique [48] en imposant une série de balayages en potentiels (de -500mV à -1500m V), ce qui permet de produire de l'hydrogène à la surface par l'électrolyse de l'eau dans la soude (0.5M). L'or change d'état de surface et devient sous sa forme réduite Au(0). La stabilisation des pics de réduction indique la fin du nettoyage et que toute les impuretés sont désorbées figure IV.7.

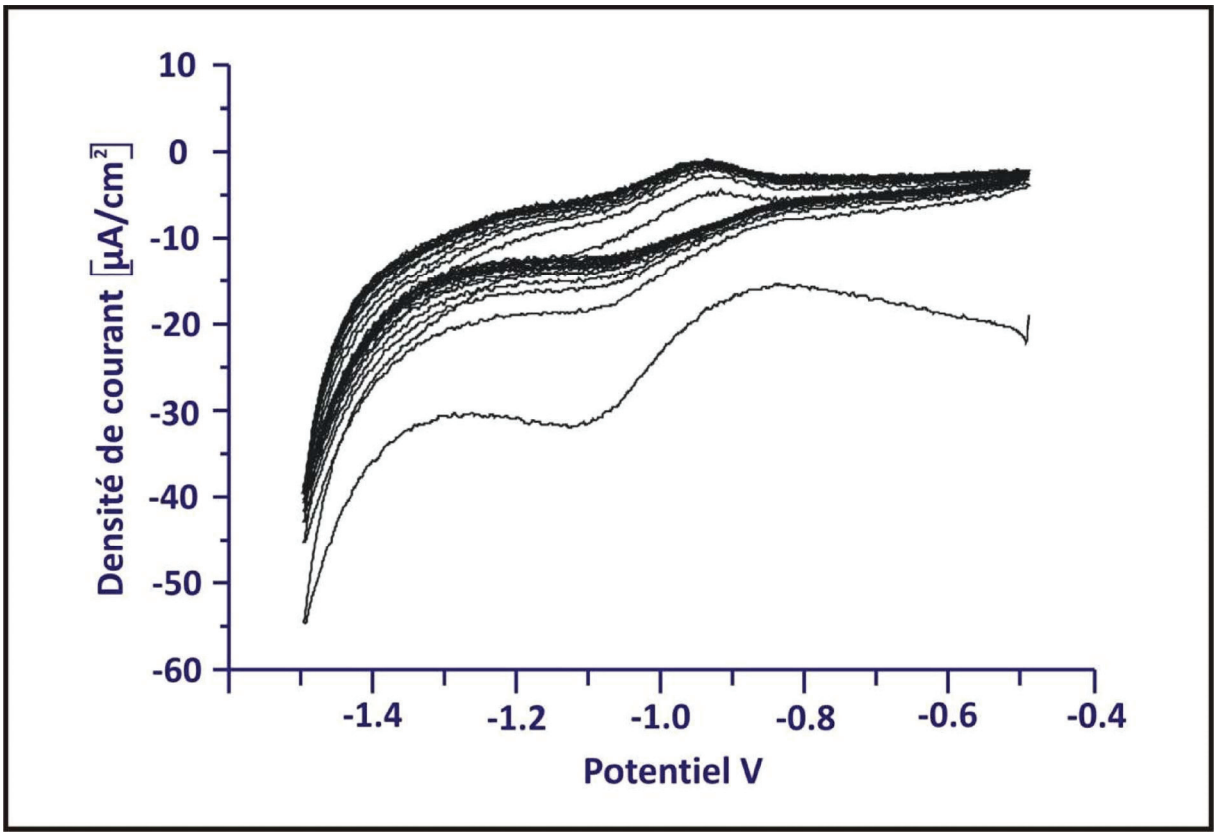


Figure IV.7 Nettoyage de l'or dans la soude (0,5 M).

IV. 4. 6. Fonctionnalisation de la surface d'or par le bis(DTPA)héxynyle

Avant la chimisorption du bis(DTPA)héxynyle sur la surface d'or, il est nécessaire de réduire les alkylthiols. La reduction est effectuée en utilisant 1µl de chlorhydride de tris(2-carboxyéthyl) phosphine (TCEP/ HCl, 160 mM dans l'eau) et 5 µl de bis(DTPA)héxynyle (0.8 mM dans l'eau) [49].

Après 2 h 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 bis(DTPA)héxynyle (40 µM) et TCEP/ HCl, 1,6 mM au tampon contrôlé par le tampon de greffage, selon un protocole decrit par Ricci et al [50]. La solution est mise directement en contact avec l'or fraîchement activée. La chimisorption est obtenue sur une période de 3 jours. Au terme de cette période, l'électrode est rincée avec de l'eau distillée, puis la passivation de la plaque est effectuée en laissant tremper la plaque d'or dans 150 µl d'une solution de mercaptopropanol à 1 mM, pendant 1 heure à température ambiante.

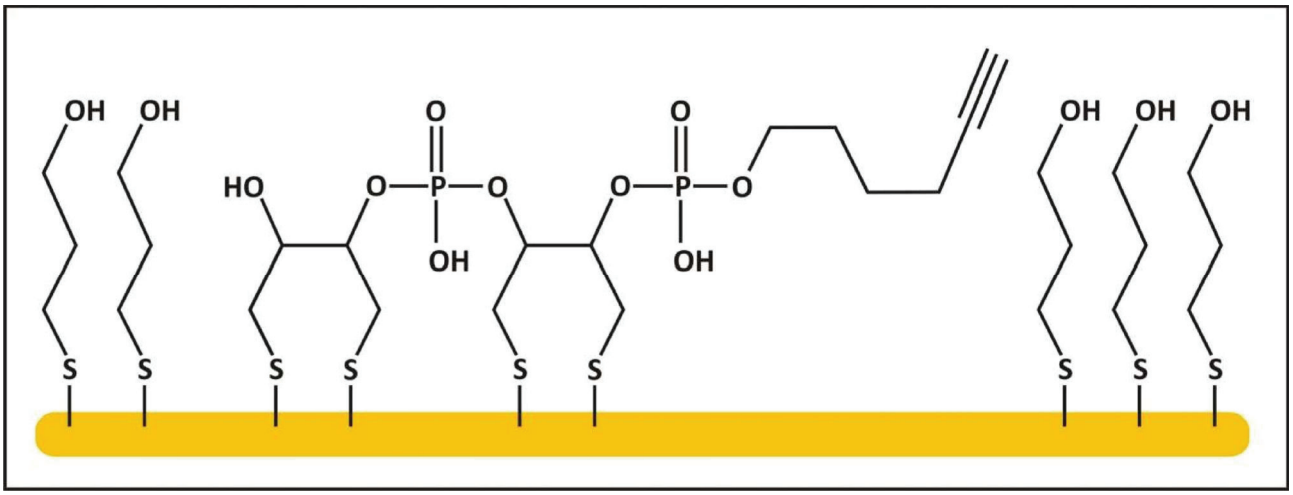


Figure IV.8
Electrode d'or fonctionnalisée avec du bis (DTPA)-hexynyle et passivée avec du mercaptopropanol.

IV. 4. 7. Stratégie de « click » du dérivé biotinylé et reconnaissance de la streptavidine

IV. 4. 7. 1. Greffage du dérivé biotinylé par la réaction « click » :

Apres 3 jours de greffage du bis(DTPA)héxynyle sur l'électrode d'or, cette dernière est immédiatement utilisée pour réaliser la réaction « click » avec l'azide-PEG-3Biotine. Le dérivé Azide-PEG3-biotine a été fixé sur la terminaison alcyne pour donner le substitué 1,2,3-triazole. La procédure est similaire à ce qui a été decrit par Devaraj et al [51] et Ripert et al [52]. L'électrode modifiée est rincée puis incubée dans 4 mL d'une solution de 10 µM de TBTA, 10µM de CuSO4 et 10 µM de biotine azide dans un mélange de DMSO/PBE (50 :50 v/v). 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 « click » avec le dérivé biotine. Il a été décidé, alors, d'utiliser la chronocoulometrie pour appliquer le potentiel adéquat pour la réduction du $CuSO_4$ *in situ*. Pour ce faire, un potentiel de – 300 mV *vs. Ag/AgCl* a été appliqué à l'électrode de travail durant 3 h a fin de permettre la réduction de Cu(II) en Cu(I) en présence de TBTA. 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.

IV.4.7.2.Interaction Streptavidine / biotine sur une surface d'or fonctionnalisée :

L'interaction entre la molécule biotine et la protéine streptavidine est souvent utilisée pour l'immobilisation de biomolécules. En effet, la forte affinité entre ces deux composés (Kd ~ 10^{-15} M) génère une liaison quasiment irréversible, de stabilité presque comparable à celle d'une liaison covalente, qui n'est affectée ni par les valeurs de pH et de température, ni par les solvants organiques, enzymes protéolytiques ou autres agents dénaturants. C'est dans cette optique que la straptavidine a été utilisée pour voir l'efficacité de l'immobilisation de la biotine. Une fois la réaction de click achevée, les électrodes d'or fonctionnalisées par la biotine sont rincées puis 100 µl de 1 mg/ml de solution de streptavidine ont été incubées pendant 30 mn à température ambiante. La spectroscopie d'impédance a été utilisée pour suivre l'évolution de la résistance de transfert de charge après la formation du complexe biotine-streptavidine.

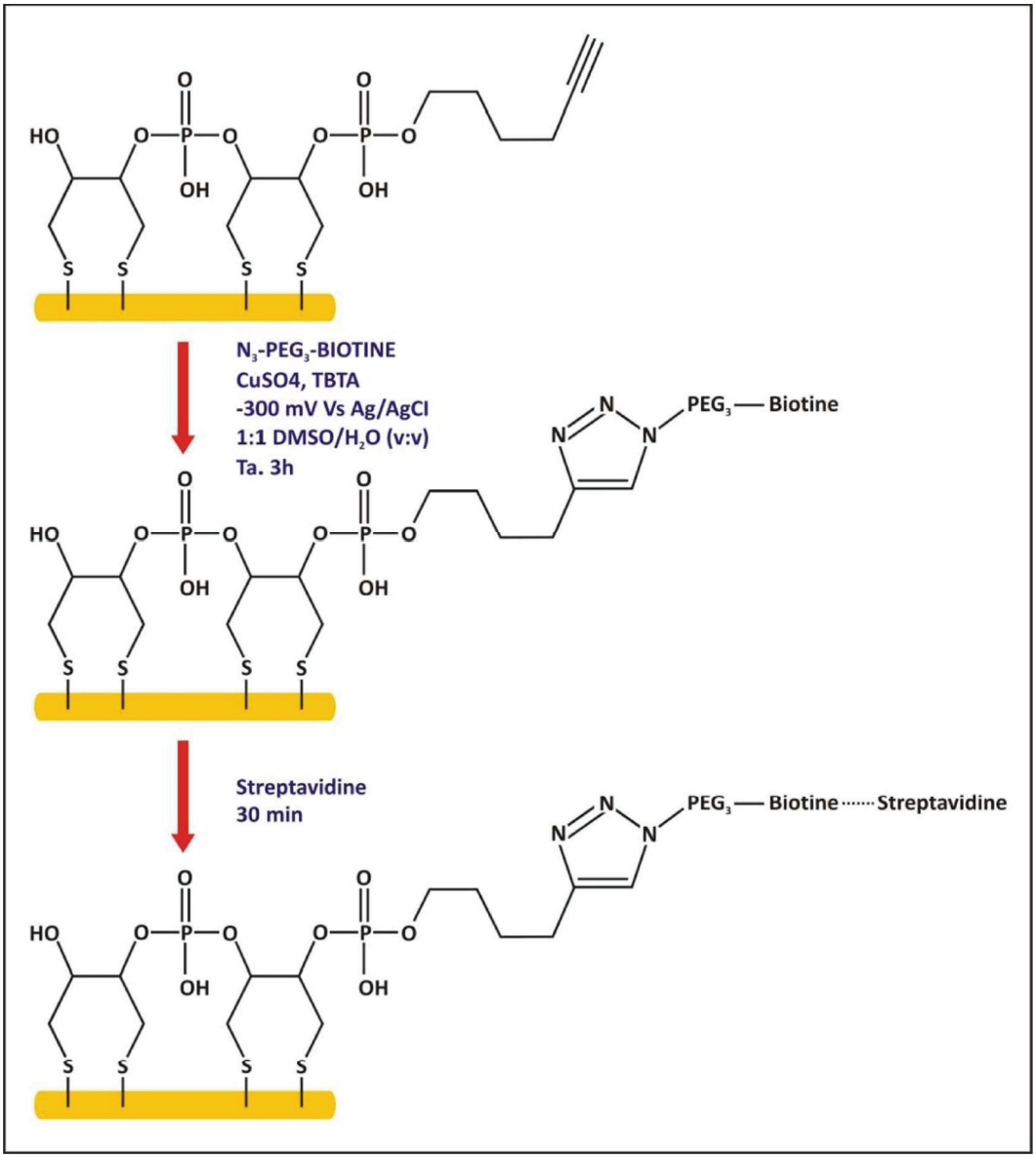


Figure IV.9 Stratégie de greffage de biotine sur or, suivi de la reconnaissance de la streptavidine.

IV. 4. 8. Etude de la reconnaissance biotine/Nanoparticules fonctionnalisées à la strepatavidine par microscopie à fluorescence :

Cette étude a été réalisée afin de valider l'électro-adressage via la réaction de « click ». En effet 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 [53]. L'électrode est ensuite lavée à l'eau distillée. 100 µl de nanoparticules de silice à cœur rhodamine fonctionnalisées à la streptavidine (0,15 10^{10} NP/ml) ont été déposées sur l'électrode pendant 30 min. Les électrodes sont ensuite soigneusement rincées et séchées sous flux d'azote pour être ensuite observées par microscopie à fluorescence.

Les échantillons ont été observés en lumière de fluorescence rhodamine à une longueur d'onde d'excitation de 550 (± 25) nm à travers un filtre passe-bande. La Fluorescence des échantillons a été observée à travers un filtre passe-bande 605 (± 70) nm.

Par ailleurs, les NPs particules ont été caractérisées avant d'être utilisées par microscopie électronique en transmission (TEM) en utilisant un microscope électronique Philips CM120 opérant à 80 Kv. Une goutte de solution de NPs a été placée sur une grille de cuivre et séchée à température ambiante avant l'analyse par TEM. Les clichés obtenus sont représentées sur la figure IV.10. Ces clichés ont été faits au centre technologique des microfluidiques, plateforme de l'université Claude Bernard Lyon1. Les images TEM montre bien que les nanoparticules sont bien dispersées et non agrégées. La taille moyenne est estimée à 121,1 nm ± 5nm.

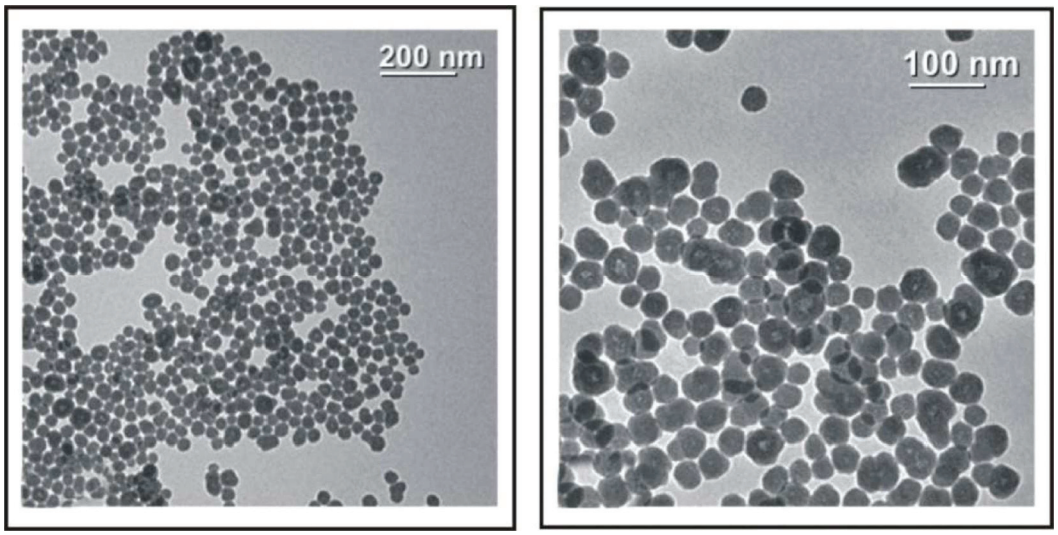


Figure IV.10
Clichés TEM des NPs fonctionnalisées à la streptavidine

Le potentiel Zeta est ensuite mesuré à l'aide d'un Zétasizer NanoZS, il a été estimé à -23.7 mV témoignant d'une charge globale de surface négative des nanoparticules en solution. La taille moyenne de NP a été estimée à 121,1 nm ± 5 nm, en accord avec les observations de TEM.

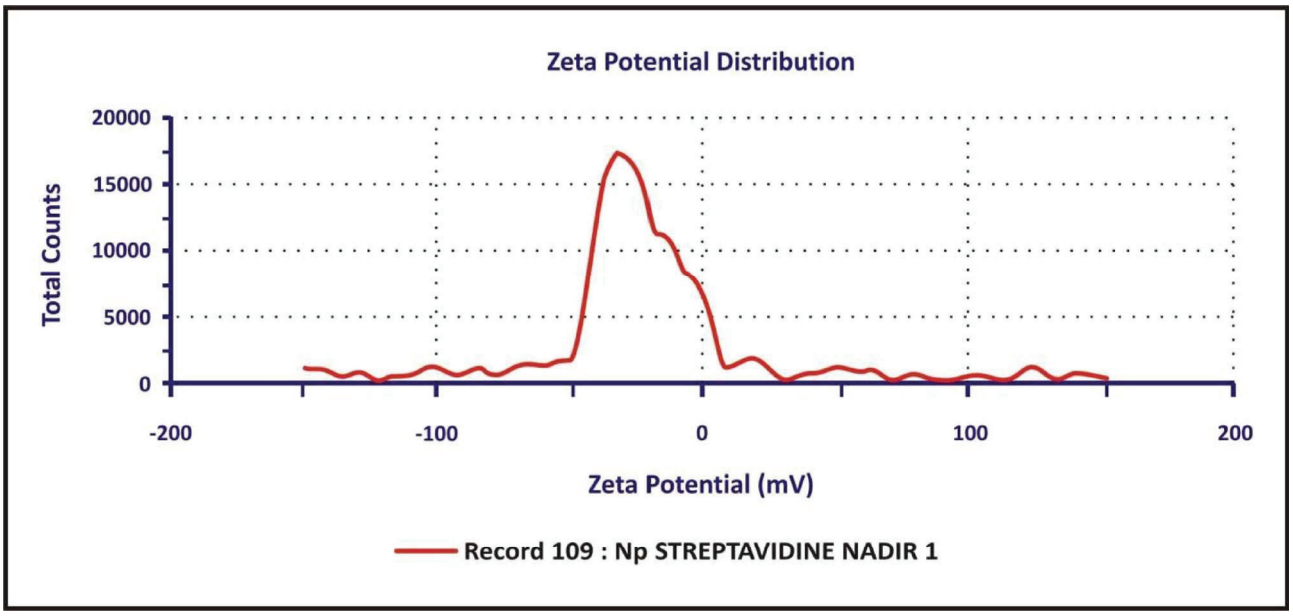


Figure IV.11
Distribution du potentiel Zeta des NP fonctionnalisées à la streptavidine.

IV. 4. 9. Immobilisation de la HSA biotinylée

Après immobilisation de la streptavidine sur la surface d'or, il est décidé d'utiliser cet édifice moléculaire pour la détection d'une protéine marquée biotine, sachant que la streptavidine dispose de 4 sites peptidiques, donc, elle peut interagir avec 4 molécules de biotine simultanément. Notre choix s'est porté sur l'albumine sérique humaine (HSA) biotinylée.

Les mesures d'impédance électrochimique faradiques permettent la détection directe de la HSA dans la plage de concentration de 10^{-8}-10^{-4} mg/ml, dans du PBS 10 mM. Le temps d'incubation pour chaque concentration était de 30 min.

IV. 5. RESULTATS ET DISCUSSIONS

IV. 5. 1. Caractérisation électrochimique de la surface d'or nu :

Un des intérêts de la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) est la modélisation des diagrammes de Nyquist en circuit électrique équivalent. La décomposition des courbes en plusieurs composants électriques (résistance, capacité) permet d'expliquer les phénomènes de transferts de masse, de transfert d'électron ou de diffusion à la surface des électrodes modifiées.

La mesure d'impédance a été obtenue à un potentiel égal à -200 mV avec une faible amplitude de 10 mV et dans une gamme de fréquences varie de 100 KHz à 50 KHz. L'électrolyte utilisé est un tampon 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.

Le diagramme d'impédance de Nyquist de l'or nu obtenu en présence $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ est représenté sur la figure IV.12. La courbe montre un demi-cercle mal défini (Rct faible) associé une droite qui correspond à l'impédance de Warburg, peut être facilement modélisé avec le circuit équivalent de Randles en utilisant Zplot / Zview (cf figureIV.13). Le demi-cercle correspond au transfert de charge et la droite représente le transfert de masse. La valeur de la Rct égale à 1,03 KOhm.cm^{-2} calculée avec un écart type relatif de 1%.

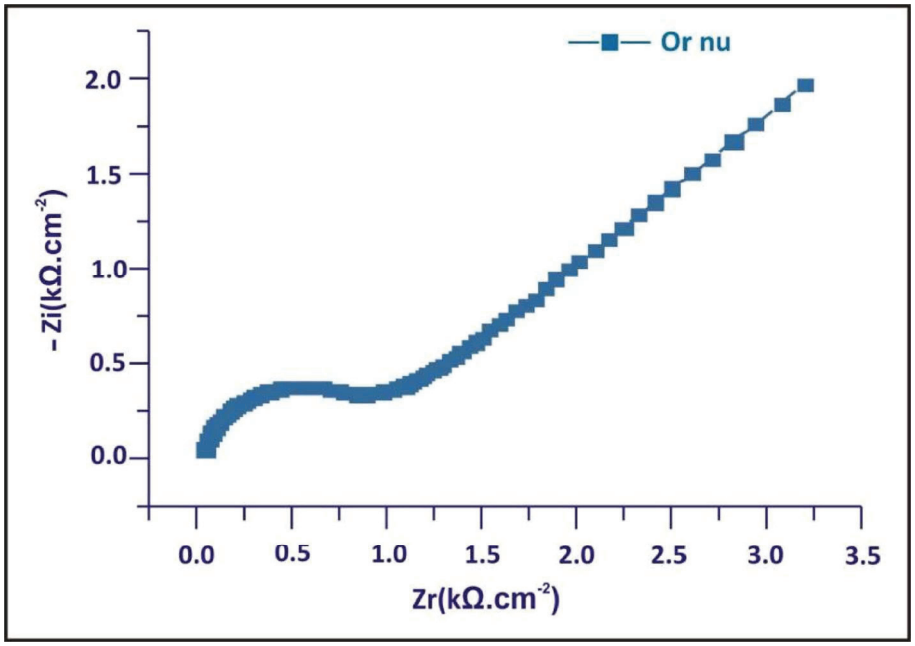


Figure IV.12
Diagramme de Nyquist pour l'or nu

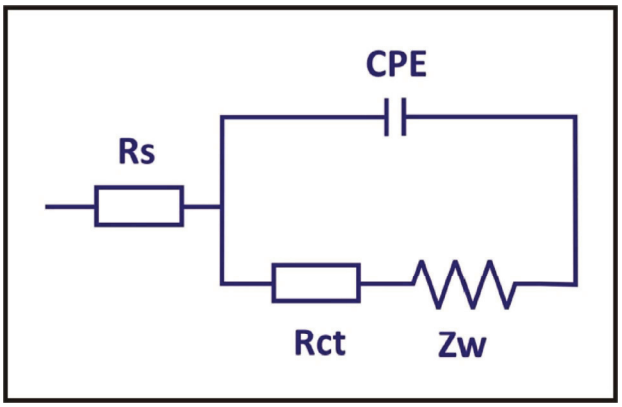


Figure IV.13 :
Circuit équivalent pour l'or nu

IV. 5. 2. Caracterisation par impédance des surfaces fonctionnalisées par la biotine et reconnaissance de la streptavidine

Après la fonctionnalisation par le greffage du bis(DTPA)héxynyle, le diamètre du demi-cercle du diagramme d'impédance augmente de manière très significative (cf figure IV.14b) et la droite de Warburg n'est plus observée. La valeur de Rct passe alors de 1.03 KOhm.cm^{-2} pour l'or nu à 32.2 KOhm.cm^{-2} montrant une baisse significative du transfert de charge électronique due à la densité des monocouches alkylthiol immobilisées sur la surface.

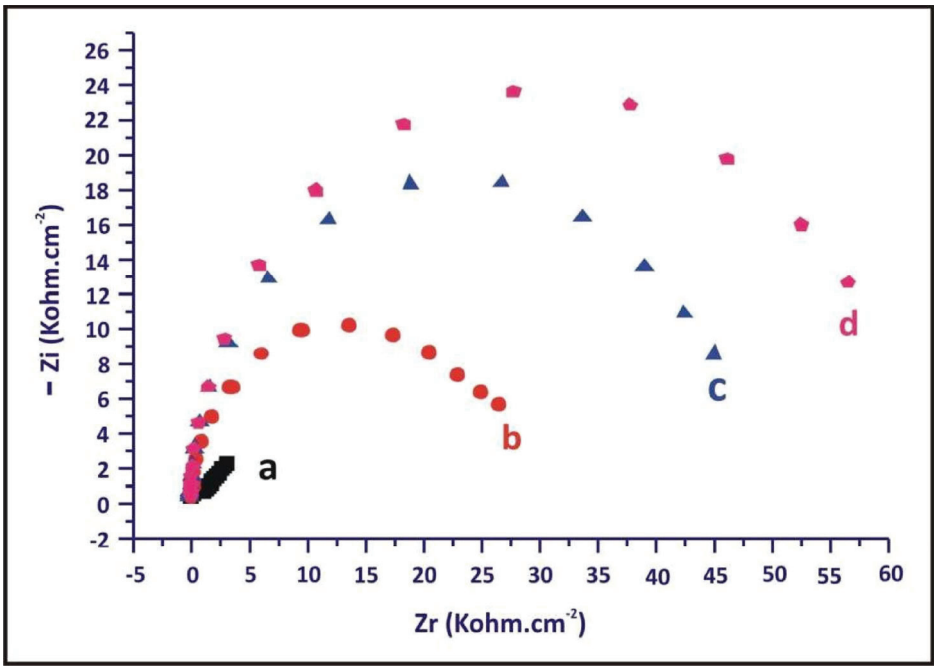


Figure IV.14
Diagramme de Nyquist d'une électrode d'or

a) non fonctionnalisée
b) fonctionnalisée par le Bis(DTPA)héxynyle et le mercaptopropanol
c) après réaction « click » avec l'azide-PEG3-Biotine
d) après incubation de la streptavidine

Ensuite les expériences ont été menées sur la formation *in situ* de Cu(I) des espèces active de $CuSO_4$ pour catalyser la réaction click. La réduction du sulfate de cuivre a été obtenue par chronocoulométrie en présence du TBTA [54] et en appliquant un potentiel égale à -300 mV par rapport à l'électrode de référence Ag/AgCl. Le diagramme de Nyquist obtenus après la réaction « click » électrocatalysée sur surface d'or est montré sur la figure IV.14c. On observe une augmentation considérable de la résistance de transfert de charges : 47,0 KOhm.cm^{-2} soit 49 % de croissance.

Cette augmentation de l'épaisseur de la monocouche témoigne ainsi du succès de la réaction de « click » ce qui est en accord avec les résultats obtenus par M. Ripert qui a déterminé un rendement de 94,7%, dans ces conditions expérimentales [52].

Le test négatif a été réalisée par l'application d'un potentiel positif à +300 mV dans les mêmes conditions de la réaction « click ». Le diagramme de Nyquist obtenu est présenté sur la Figure IV.15 c. Il montre une légère augmentation de la valeur de la résistance de transfert de charge (6%). Cette variation peut être considérée comme négligeable. Ce premier contrôle, nous permet de conclure que la réaction «click» se réalise seulement à potentiel appliqué de -300 mV [52] et que la chimie « click » est bien compatible pour l'electro-addressage de biomolécules sur surface d'or pour la fabrication de biopuce en appliquant le bon potentiel sur l'électrode qu'on souhaite fonctionnaliser et on protégeant les autres électrodes en appliquant un potentiel de signe opposé.

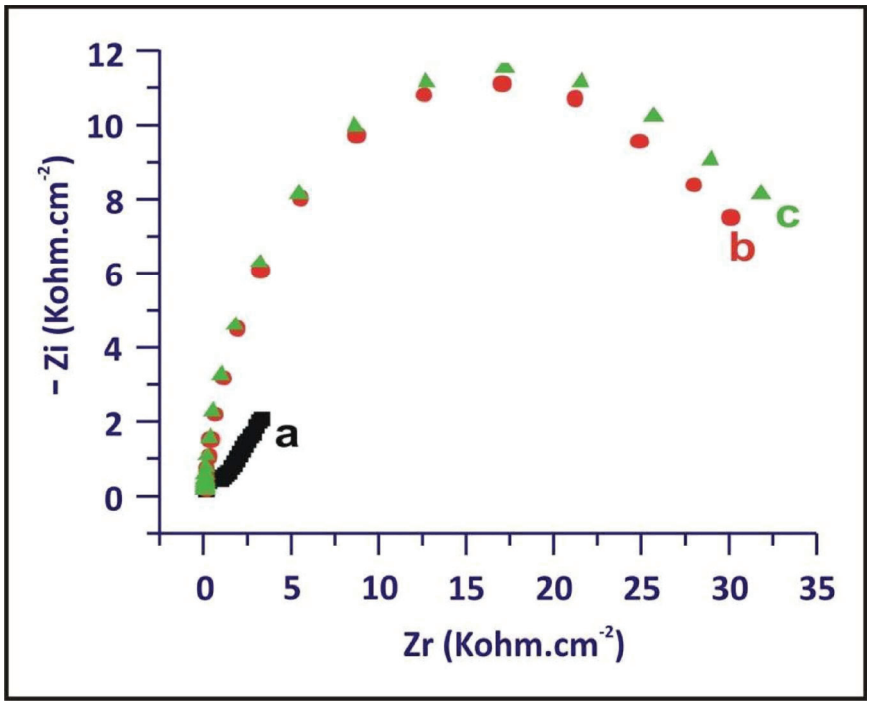


Figure IV.15
Diagramme de Nyquist d'une électrode d'or

a) non fonctionnalisée
b) fonctionnalisée par le Bis(DTPA)héxynyle et le mercaptopropanol
c) après click à + 300 mV de l'azide-PEG3-Biotine

Après l'incubation de la streptavidine pendant 30 min et formation du complexe de reconnaissance sur la surface d'or, une augmentation importante du demi-cercle du diagramme du Nyquist qui témoigne d'une augmentation de la résistance de transfert de charge R_{ct} = 61.1 Kohm.cm^{-2} soit 30 % de croissance Figure IV.14 d. Cet accroissement de l'épaisseur de la couche confirme la formation du complexe streptavidine/biotine sur la surface d'or.

Toutefois l'évolution de la résistance enregistrée n'est pas à la hauteur de l'augmentation de la couche de surface, la taille de la streptavidine étant de 50 A°. Cette observation peut être potentiellement liée aux propriétés conductrices de cette proteine.

IV. 5. 3. Visualisation de la réaction « click » par microscopie à fluorescence :

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 BSA et 0.1% massique de tween) une demi-heure à température ambiante pour éviter tout phénomène d'adsorption non spécifique sur or [53]. L'électrode est ensuite lavée à l'eau distillée, les nanoparticules sont déposées sur l'électrode afin de former le complexe biotine/streptavidine sur la surface. La rhodamine est excitée par une longueur d'onde d'excitation adéquate. 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 FigureIV.16.

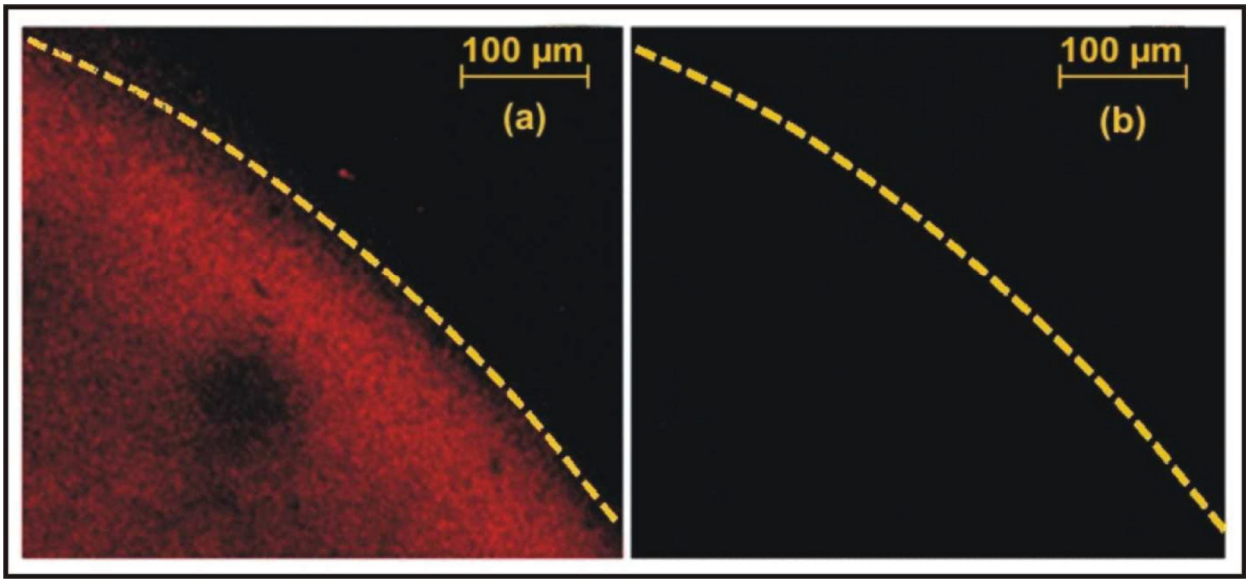


Figure IV.16.
Electrodes d'or observées par fluorescence au microscope optique après la réaction de « click » et reconnaissance des nanoparticules fluorescentes de streptavidine. **La réaction de « click » est électrocatalysée à un potentiel de : (a)-300 mV (b) +300mV**

Deux régions distinctes sont clairement visibles sur la figure. IV.16a : la première ou 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. 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.IV. 16b. 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.

IV.5.4. Caractérisation par SIE de l'immobilisation de HSA :

Les mesures d'impédance pour différentes concentrations en HSA, allant de 10^{-8} à 10^{-4} mg.mL $^{-1}$ sont donnés sur la Figure.IV.17. Les mesures ont été réalisées en appliquant un potentiel égal à -200 mV dans une gamme de fréquence 100 kHz-100 mHz dans une solution de 10 mM de PBS en présence du couple redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$.

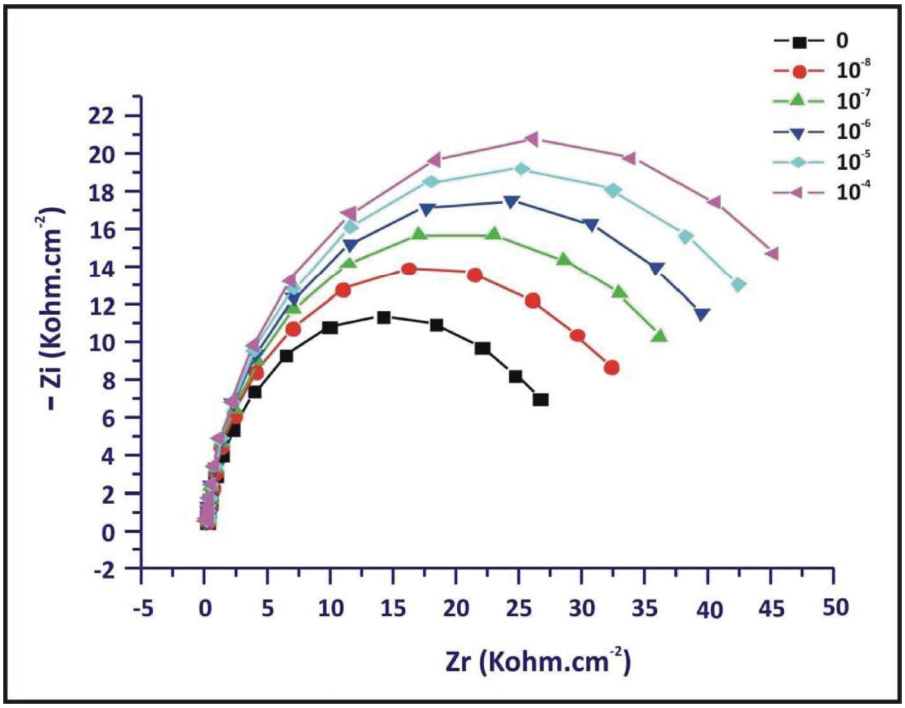


Figure.IV.17
Diagramme de Nyquist à différentes concentrations de HSA.

La variation de résistance de transfert de charge ΔRtc est définie comme ΔRtc= Rtc_0-Rtc, où Rtc_0 représente la valeur de la résistance de transfert de charge après interaction avec la streptavidine, et Rtc étant la valeur prise après l'immobilisation de la HSA. La variation de la valeur absolue de ΔRtc s'accroît linéairement avec l'augmentation de la concentration en HSA (Figure.IV.18.). Cette linéarité est obtenue dans une gamme de 10^{-8}mg.mL^{-1} à 10^{-5}mg.mL^{-1}. Les données expérimentales correspondent à l'équation de droite Rtc = 1.17+4,309 log [HSA]. La limite de détection est de 10 pg.mL^{-1}. La saturation de la surface est obtenue avec des concentrations supérieures à 100 pg.mL^{-1}.

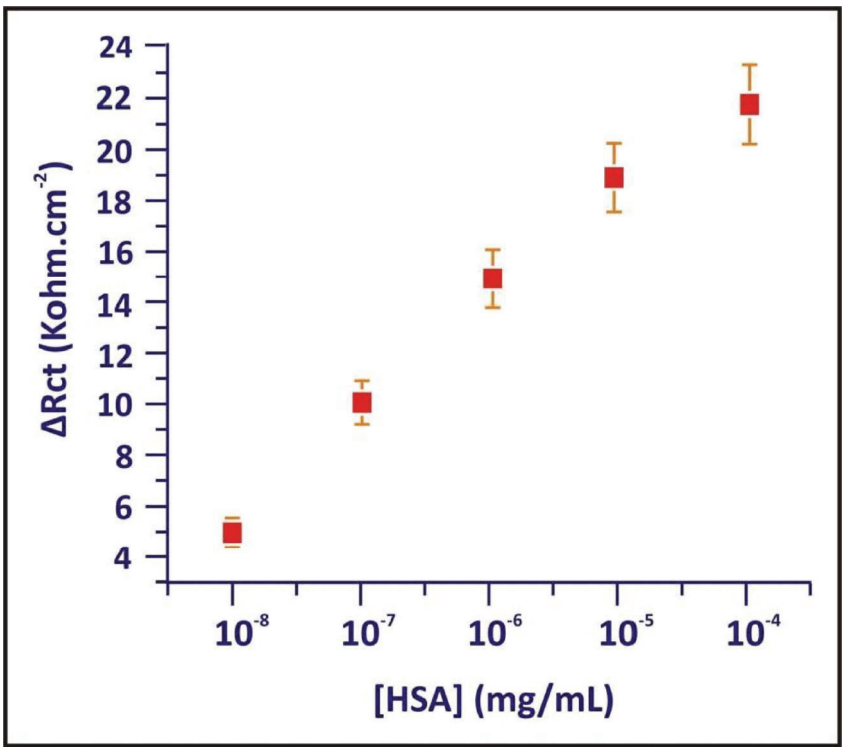


Figure.IV.18
Variations de la Rtc en fonction de [HSA]

CONCLUSION

Dans ce chapitre nous avons développé une stratégie d'électro-adressage de biomolécules sur surface d'or. Cette électrofonctionnalisation est réalisée via une cycloaddition dipolaire 1, 3 de type Huisgen entre un alcyne immobilisé sur la surface et un dérivé azoture.

L'électrocatalyse se produit en appliquant un potentiel adéquat pour générer l'espèce Cu(I) responsable de la catalyse. La production de cette espèce est obtenue en réduisant du sulfate de cuivre en présence d'un ligan TBTA.
Nous avons démontré par des mesures d'impédance que la réaction de « click » ne se produit que lorsque le potentiel appliqué est égal à – 300 mV.

Nous avons également confirmé l'efficacité de la chimie " click " par visualisation en utilisant la microscopie à fluorescence.

Cette méthode est bien compatible pour la fabrication de biopuce, elle permet permet l'electro-addressage d'une sonde spécifique sur une seule électrode d'une part et d'éviter l'adressage non spécifique en maintenant les autres électrodes sous un potentiel positif (+300 mV).

Les structures obtenues ont permis la détection du sérum albumine humaine biotinylé à partir d'une concentration de 10 pg/ml.

REFERENCES – CHAPITRE VI

[1] J. R. Jr.Siqueira, M. H. Abouzar, A. Poghossian, V. Zucolotto, O. N. Jr.Oliveira, and M. J. Schoening, "Penicillin biosensor based on a capacitive field-effect structure functionalized with a dendrimer/carbon nanotube multilayer," *Biosens Bioelectron* vol. 25, pp. 497-501, 2009.

[2] S. Centi, S. Tombelli, M. Minunni, and M. Mascini, "Aptamer-based detection of plasma proteins by an electrochemical assay coupled to magnetic beads.," *Anal. Chem.,* vol. 79, pp. 1466-1473, 2007.

[3] O. Y. Saiapina, V. M. Pyeshkova, O. O. Soldatkin, V. G. Melnik, B. A Kurç, A. Walcarius, S. V. Dzyadevych, and N. Jaffrezic-Renault, "Conductometric enzyme biosensors based on natural zeolite clinoptilolite for urea determination " *Mat Sci Eng C-Mater* vol. 31, pp. 1490-1497., 2011.

[4] N. Meini, C. Farre, C. Chaix, R. Kherrat, S. Dzyadevych, and N. Jaffrezic-Renault., " A sensitive and selective thrombin impedimetric aptasensor based on tailored aptamers obtained by solid-phase synthesis " *Sensors and Actuators B,* vol. 166- 167, pp. 715- 720, 2012.

[5] J. S. Daniels and N. Pourmand, "Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges " *Electroanal,* vol. 19, pp. 1239-1257, 2007.

[6] M. I. Prodromidis, "Impedimetric immunosensors " *Electrochimica Acta,* vol. 55, pp. 4227-4233, 2010.

[7] Anthony P. F. Turner, Isao Karube, George S. Wilson, and "Biosensors: Fundamentals and Applications,," *Oxford University Press, Oxford, ,* 1987

[8] C. Farre, N. Spinelli, A. Bouchet, C. Marquette, B. Mandrand, F. Garnier, and C. Chaix, "Synthesis and electropolymerization studies of water-soluble pyrrole-ferrocene derivatives towards biochip device application," *Synthetic Met,* vol. 157, pp. 125-133., 2007.

[9] A.l. Bouchet, C. Chaix, C.A. Marquette, L.J. Blum, and B. Mandrand, "Cylinder-shaped conducting polypyrrole for labelless electrochemical multidetection of DNA," *Biosens Bioelectron* vol. 23, pp. 735-740., 2007.

[10] T. Livache, A. Roget, E. Dejean, C. Barthet, G. Bidan, and R. Teoule., "Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group.," *Nucleic Acids Res* vol. 22, pp. 2915-2921, 1994.

[11] I. Hafaid, S. Chebil, H. Korri-Youssoufi, F. Bessueille, A. Errachid, Z. Sassi, Z. Ali, A. Abdelghani, and N. Jaffrezic-Renault, "Effect of electrical conditions on an impedimetric immunosensor based on a modified conducting polypyrrole," *Sensor AND Actuat B-Chem,,* vol. 144 pp. 323-331, 2010.

[12] B.P. Corgier, A. Laurent, P. Perriat, L.J. Blum, and C.A. Marquette, "A versatile method for direct and covalent immobilization of DNA and proteins on biochips.," *Angew Chem Int Edit* vol. 46, pp. 4108- 4110., 2007.

[13] B.P. Corgier, F. Li, L.J. Blum, and C.A. Marquette, "On-chip chemiluminescent signal enhancement using nanostructured gold-modified carbon microarrays.," *Langmuir* vol. 23, pp. 8619-8623., 2007.

[14] B.P. Corgier, S. Bellon, M. Anger-Leroy, L.J. Blum, and C.A. Marquette, "Protein-diazonium adduct direct electrografting onto SPRi-biochip.," *Langmuir,* vol. 25, pp. 9619-9623., 2009.

[15] H.C. Kolb , M.G.Finn , and K. B. Sharpless."Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions," *Angew Chem Int Edit,* vol. 40, pp. 2004-2021, 2001.

[16] W. L. Rust, S. W. Carper, and G. E. Plopper, "The Promise of Integrins as Effective Targets for Anticancer Agents," *Journal of Biomedicine and Biotechnology,* vol. 2, pp. 124-130, 2002.

[17] H. Jin and J. Varner, "Integrins: roles in cancer development and as treatment targets," *Br J Cancer,* vol. 90, pp. 561-565, 2004.

[18] C. W. Tornøe, C. Christensen, and M. Meldal, "Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides," *The Journal of Organic Chemistry,* vol. 67, pp. 3057-3064, 2013/03/06 2002.

[19] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, and K. B. Sharpless, "A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes," *Angewandte Chemie International Edition,* vol. 41, pp. 2596-2599, 2002.

[20] P. L. Golas, N. V. Tsarevsky, B. S. Sumerlin, and K. Matyjaszewski, "Catalyst Performance in "Click" Coupling Reactions of Polymers Prepared by ATRP: Ligand and Metal Effects," *Macromolecules,* vol. 39, pp. 6451-6457, 2013/03/06 2006.

[21] R. Haubner, "αvβ3-integrin imaging: a new approach to characterise angiogenesis?," *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging,* vol. 33, pp. 54-63, 2006.

[22] L. Zhang, X. Chen, P. Xue, H. H. Y. Sun, I. D. Williams, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, and G. Jia, "Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Alkynes and Organic Azides," *Journal of the American Chemical Society,* vol. 127, pp. 15998-15999, 2013/03/06 2005.

[23] A. Matter, "Tumor angiogenesis as a therapeutic target," *Drug Discovery Today,* vol. 6, pp. 1005-1024, 2001.

[24] A. Vonlaufen, G. Wiedle, B. Borisch, S. Birrer, P. Luder, and B. A. Imhof, "Integrin αvβ3 Expression in Colon Carcinoma Correlates with Survival," *Mod Pathol,* vol. 14, pp. 1126-1132, 2006.

[25] E. Ruoslahti, "The RGD story: a personal account," *Matrix Biology,* vol. 22, pp. 459-465, 2003.

[26] N.K. Devaraj, P.H. Dinolfo, C.E.D. Chidsey, and J.P. Collman, "Selective functionalization of independently addressed microelectrodes by electrochemical activation and deactivation of a coupling catalyst. ," *J Am Chem Soc,* vol. 128, pp. 1794-1795., 2006.

[27] T.S. Hansen, A.E. Daugaard, H. S., and N.B.Larsen, "Spatially Selective Functionalization of Conducting Polymers by "Electroclick" Chemistry.," *Advanced Materials,* vol. 21, pp. 4483-4486, 2009.

[28] S. J. P. Canete., W.Yang., and R.Y. Lai., "Folding-based electrochemical DNA sensor fabricated by "click" chemistry. ," *Chem. Commun.,* vol. 32, pp. 4835-4837, 2009.

[29] V. du Vigneaud, K.Hofmann, D. B. Melville, and P. György, "Isolation of biotin (vitamin H) from liver. ," *Journal. Biological. Chemitry,* vol. 140, pp. 643-651, 1941.

[30] P. V.Attwood and J. C.Wallace, "Chemical and catalytic mechanisms of carboxyl transfer reactions in biotin-dependent enzymes.," *Accounts of Chemical Research* vol. 35, pp. 113-120, 2002.

[31] S.Jitrapakdee and J. C.Wallace, "The biotin enzyme family: Conserved structural motifs and domain rearrangements. ," *Current Protein & Peptide Science* vol. 4, pp. 217-229, 2003.

[32] B. J.Nikolau, J. B.Ohlrogge, and E. S.Wurtele, "Plant biotin-containing carboxylases.," *Archives of Biochemistry and Biophysics* vol. 414, pp. 211-22., 2003.

[33] N. M.Green, "Avidin," *Advanced Protein Chemistry* vol. 29, pp. 85-133, 1975.

[34] M. Wilchek, and E. A. Bayer, "Foreword and introduction to the book (strept)avidin-biotin system. ," *Biomolecular Engineering,* vol. 16, 1999.

[35] N. M.Green, "Avidin and streptavidin.," *Methods in Enzymology* vol. 184, pp. 51-67, 1990.

[36] O. H Laitinen, V. P. Hytonen, H. R. Nordlund, and M. S. Kulomaa, "Genetically engineered avidins and streptavidins. Cellular and Molecular Life," *Sciences* vol. 63, pp. 2992-3017, 2006.

[37] A. T.Marttila, O. H.Laitinen, K. J.Airenne, T.Kulik, E. A.Bayer, M.Wilchek, and M. S.Kulomaa, "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,* vol. 467, pp. 31-36, 2000.

[38] C. E.Argarana, I. D.Kuntz, S.Birken, R.Axel, and C. R.Cantor, Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene., *Nucleic Acids Research,* vol. 14, pp. 1871-1882., 1986.

[39] L.Chaiet and F.J. Wolf, "The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by streptomycetes.," *Biochem.Biophys,* vol. 106, p. 1964.

[40] T.Lazaridis , A.Masunov, and F. Gandolfo. "Contributions to the binding free energy of ligands to avidin and streptavidin.," *Proteins.,* vol. 47, pp. 194-208, 2002.

[41] P.C.Weber, D.H.Ohlendorf , J.J.Wendoloski , and F.R.Salemme. "Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin.," *Science.,* vol. 243, pp. 85-88., 1989.

[42] S.Ostergaard, P. H.Hansen, M.Olsen, and A.Holm, "Novel avidin and streptavidin binding sequences found in synthetic peptide libraries.," *FEBS Letters,* vol. 362, pp. 306-308, 1995.

[43] E. P.Diamandis and T. K.Christopoulos, "The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology," *Clinical Chemistry,* vol. 37, pp. 625-636, 1991.

[44] M. H. Qureshi and S. L. Wong, "Design, production, and characterization of a monomeric streptavidin and its application for affinity purification of biotinylated proteins. ," *Protein Expression and Purification,* vol. 25, pp. 409-415. , 2002.

[45] E.Morag, E.A.Bayer, and M.Wilchek, "Reversibility of biotin-binding by selective modification of tyrosine in avidin.," *Biochemical Journal,* vol. 316, pp. 193-199, 1996.

[46] E.Morag, E. A.Bayer, and M.Wilchek, "Immobilized nitro-avidin and nitro-streptavidin as reusable affinity matrices for application in avidin-biotin technology.," *Analytical Biochemistry,* vol. 243, pp. 257-263, 1996.

[47] P. Liepold, T. Kratzmuller, N. Persike, M. Bandilla, M. Hinz, H. Wieder, H. Hillebrandt, E. Ferrer, and G.Hartwich, "Electrically detected displacement assay (EDDA): a practical approach to nucleic acid testing in clinical or medical diagnosis.," *Anal Bioanal Chem,* vol. 391, pp. 1759-1772, 2008.

[48] H. Aoki; and H. Tao, "Label-and marker-free gene detection based hybridization-induced comformational flexibility changes in ferrocene-PNA conjugate probe. ," *Analyst,* vol. 132, pp. 784-791, 2007.

[49] J. A. Burns, J. C. Butler, J. Moran, and G. M. Whitesides, "Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl) phosphine," *J. Org. Chem* vol. 56, pp. 2648-2650, 1991.

[50] F.Ricci, R.Y.Lai, A.J.Heeger, K.W. Plaxco, and J.J. Sumner, "Effect of molecular crowding on the response of an electrochemical DNA sensor.," *Langmuir* vol. 23, pp. 6827-6834, 2007.

[51] S.J.Canete and R.Y. Lai, "Fabrication of an electrochemical DNA sensor array via potential-assisted "click" chemistry.," *Chem Commun* vol. 46, pp. 3941-3943, 2010.

[52] M.Ripert, C.Farre, and C.Chaix, "Selective functionalization of Au electrodes by electrochemical activation of the "click" reaction catalyst " *Electrochim Acta,* vol. 91, pp. 82-89, 2013.

[53] A.C.Faure , C.Hoffmann , R.Bazzi , F.Goubard, E.Pauthe , C.A.Marquette , L.J. Blum , P. Perriat , S. Roux , and O. Tillement. . "Functionalization of luminescent aminated particles for facile bioconjugation. ," *bioconjugation. ACS Nano* vol. 2, pp. 2273-2282, 2008.

[54] S.Y.Ku, K.T.Wong, and A.J. Bard, "Surface patterning with fluorescent molecules using click chemistry directed by scanning electrochemical microscopy. ," *J Am Chem Soc,* vol. 130, pp. 23

CHAPITRE V

UTILISATION DES PROTEINES DE PHAGES POUR LA DETECTION DE BACTERIES

CHAPITRE V

UTILISATION DE PROTEINES DE PHAGES POUR LA DETECTION DE BACTERIES

V. Utilisation de protéines de phages pour la détection de bactérie

V.1 Introduction

La détection des pathogènes bactériens représente le premier maillon dans les stratégies préventives et thérapeutiques. L'espèce humaine abrite un microbiote estimé a quelques dizaines de milliards, qui représentent généralement la flore commensale, responsable même d'une ligne défensive primordiale soutenant les autres modalités de la réponse immunitaire. Cependant, certains agents bactériens présentent de vraies menaces à la santé humaine et animale. Leurs voies de transmission ainsi que leurs potentiels pathogènes sont diversifiés. Leur petite taille ainsi que leur pouvoir adaptatif et résistif aux agressions de l'environnement en font un danger répandu qui peut s'exprimer une fois que les conditions sont favorables.

L'espèce bactérienne *E. coli* fait partie des bactéries commensales qui colonisent le tractus intestinal humain, ceci ne l'empêche pas d'être responsable d'une large gamme de maladies qui affectent les espèces humaines et animales. Actuellement, *E.coli* pathogène compte six pathotypes intestinaux et deux pathotypes extra-intestinaux reconnus par la communauté scientifique [1-3]. Ces différents pathotypes *E.coli* conduisent à un large éventail de maladies essentiellement digestives et urinaires. Les infections à *E.coli* représentent des impacts économiques et épidémiologiques de grande ampleur.

De nos jours des normes rigoureuses de la sécurité bactérienne sont imposées comme solution préventive pour réduire les menaces de contamination. De nombreuses méthodes sont utilisées pour la détection bactérienne, la non-cultivabilité de plusieurs espèces bactériennes,

et la nécessité d'identifier exactement le pathotype, définissent le choix de ces méthodes. La polymérisation en chaîne PCR reste l'outil le plus sophistiqué pour la détection des pathotypes spécifiques, méthode qui n'est pas applicable dans les laboratoires de routine. La culture bactérienne et le comptage de colonies ont été plus largement utilisés, et nécessitent 24 h avant de donner des résultats pour l'espèce *E. coli* et peut nécessiter jusqu'à 7 jours pour d' autres souches bactériennes [4].

Les biocapteurs ont récemment été considérés comme des alternatives attrayantes pour les plates-formes de détection de pathogènes conventionnels existants. Ils permettent une détection hautement sensible, spécifique et en temps réel.
Dans ce contexte, nous décrivons un biocapteur électrochimique de type impédimétrique innovant et spécifique pour la détection de pathogènes basé sur l'utilisation de protéines de queue de phage comme biorécepteur de reconnaissance.

Les bactériophages (phages) représentent l'une des entités biologiques les plus abondantes dans la nature et sont reconnus depuis longtemps pour leur utilisation potentielle comme agents thérapeutiques [5]. Ces virus bactériens peuvent entrer dans la bactérie, s'y multiplier en exploitant ses processus synthétiques et métaboliques, puis en sortir en provoquant sa lyse. Tous ces virus contiennent un seul type d'acide nucléique : ARN ou ADN, protégé par une capside protéique dont le rôle est aussi la fixation sur les récepteurs bactériens [6-8].
Les bactériophages reconnaissent les récepteurs bactériens par leurs protéines de pointe de la queue. Cette bio-reconnaissance est hautement spécifique et a été employée pour le typage de bactéries. Ce niveau élevé de spécificité et de sélectivité ouvre des pistes pour le développement de technologies de détection de pathogènes spécifiques et pour la création de plates-formes de biocapteurs. La fixation des phages par des liaisons chimiques sur la surface de transducteur est pertinente pour le développement d'un système de détection cohérent et stable.

Dans le cadre de ce travail, nous utilisons une protéine de phage recombinante comme élément de bio-reconnaissance pour la détection d'un sérotype particulier d'*Escherichia coli* ,*E.coli* O157:H7. Nous proposons d'immobiliser cette protéine à la surface de l'électrode d'or par un lien covalent en utilisant le système monocouche auto-assemblée puis nous utilisons la spectroscopie d'impédance comme technique de détection. Dans le paragraphe suivant, nous ferons le point sur la modification de la surface d'or par des monocouches auto-assemblées.

V.2. Modification de l'or par des monocouches –auto-assemblées (SAMS) :

L'or est l'un des matériaux conducteurs les plus utilisés de par sa résistance à l'oxydation [9] et de par ses capacités à réagir avec un grand nombre de molécules. C'est notamment le cas des thiols (ou mercaptans), des composés à base de soufre (formule générale R-SH), pour lesquels il présente une grande affinité [10]. Ces interactions sont à la base des méthodes de fonctionnalisation et modification de surface sur le principe de monocouches auto-assemblées (ou SAMs pour « *self assembly monolayers* »). On notera que les SAMs ne sont pas spécifiques aux surfaces d'or puisqu'elles peuvent se former sur d'autres surfaces métalliques tels que l'argent [11], le cuivre [12], le palladium [13] ou encore le platine [14].

L'autre avantage des surfaces d'or, c'est qu'elles se caractérisent aisément par des méthodes optiques notamment (ellipsométrie, spectroscopie infrarouge, mesure d'angle de contact…) et la résonance de plasmons de surface, ce qui permet de suivre les modifications apportées en surface de manière précise. C'est pour cela que le couple support d'or SAM est souvent à la base de l'élaboration de biocapteurs. En effet les SAMs peuvent être conçues et modifiées pour lier de l'ADN, des protéines, ou encore des cellules [15]. D'un point de vue chimique, les premières structures étudiées ont été les n-alcanethiols : $HS-(CH_2)n-_1CH_3$ [16]. Par la suite, ce composé est resté la structure d'étude de référence même si des terminaisons très variées ont été introduites (dithiol, alcool, acide carboxylique, noyau benzénique), du fait de leurs nombreuses propriétés et applications potentielles. En effet, les alcanethiols sont facilement adsorbés à partir d'une solution ou en phase vapeur afin de réaliser la monocouche auto-assemblée.

La formation de SAMs par immersion de la surface d'or dans une solution d'alcanethiol est la méthode la plus utilisée car très facile à mettre en oeuvre. Le thiol est alors généralement mis en solution dans de l'éthanol ou un mélange eau-éthanol à des concentrations comprises entre 1 et 10 mM pendant 12 heures à 48 heures, pour atteindre une bonne organisation moléculaire. Les temps longs d'assemblage tendent à donner des structures cristallines compactes. Cette couche, lorsqu'elle est saturée, est composée de chaînes de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres de longueur, séparées d'environ 5 Å et inclinées d'un angle de 30 degrés par rapport à la normale à la surface (figure V.1) .

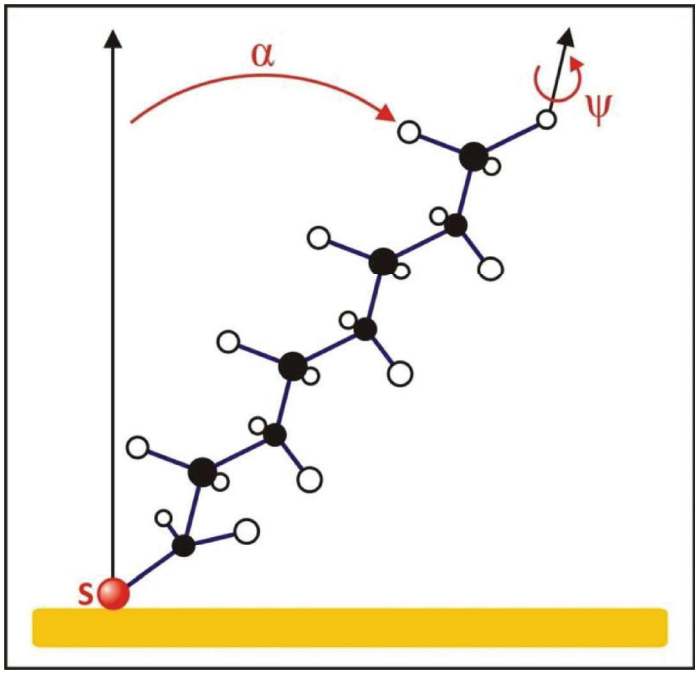


Figure V.1
Représentation schématique d'une molécule d'alcanethiol auto-assemblée montrant l'angle d'inclinaison de la chaîne alcane par rapport à la surface d'or (d'après [17])

Il est aussi important de minimiser l'exposition du substrat à l'oxygène, durant le processus d'assemblage, afin de limiter l'oxydation des thiols en sulfures ou en autres espèces oxygénées. Les SAMs sont réputées être stables au contact de l'air et de l'éthanol, mais elles se désorbent à des températures supérieures à 60°C ou quand elles sont irradiées par une source de lumière en présence d'oxygène. D'une manière générale, les réactions chimiques réalisées une fois la monocouche construite sont possibles tant qu'elles ne détruisent pas celle-ci et qu'il n'y a pas de gêne stérique au niveau de ses groupements fonctionnels. La gêne stérique peut-être réduite en utilisant une monocouche mixte : les groupes chimiques seront portés par une chaîne thiolée plus longue ce qui la placera au-dessus de la couche sous-jacente. Les monocouches mixtes peuvent être avantageuses puisqu'elles permettent d'espacer les groupes réactifs et ainsi facilitent les nouvelles réactions et l'immobilisation de molécules.

V.3 Matériel et méthodes

V.3.1 Matériel

Les deux bactéries *E.coli 0157 :H7*, *E.coli 7308009*, ont été fournies par la societé bioMérieux France. La proteine de phage ECO-Bp1 est fournie par Hyglos (Allemagne). Cette protéine de phage est spécifique à *E.COLI 0157 :H7* et la bactérie *E.COLI 7308009* va servir comme test négatif (spécificité).

L'acide 16-mercaptohexadecanoique (MHA), le tampon phosphate salin (PBS), le N- (3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide (EDC), le N-hydroxysuccinimide (NHS), le ferrocyanure de potassium (K4Fe(CN)6), le ferricyanure de potassium (K3Fe(CN)6), l'éthanolamine, l'acide sulfurique et le peroxyde d'hydrogène (30%) ont été achetés chez Sigma Aldrich, (France). L'éthanol a été obtenu chez Fluka (pureté> 99%).

V.3.2 Protocole de nettoyage

Toutes les manipulations ont été menées dans des conditions d'asepsie afin d'empêcher la contamination du milieu par des microorganismes (parasite, bactéries). Le matériel utilisé a été bien lavé puis autoclavé dans un autoclave à 100 °C. Le milieu de travail a toujours été nettoyé avec de l'eau de javel avant et après manipulation.

Nous avons utilisé les mêmes électrodes d'or fournie par le LAAS (Toulouse). Ces électrodes d'or ont été nettoyées et activées en suivant le protocole décrit dans le chapitre III section, III. 3. 4. Nettoyage et activation de la surface l'or

V.3.3 Cultures bactériennes.

Les deux souches de bactéries ont été fournies conservées dans un gel de gélose. Un repiquage des bactéries a été nécessaire afin d'obtenir un nombre correct pour les analyses et récupérer les bactéries en forme active. Le repiquage des bactéries a été fait par la culture des bactéries dans un milieu nutritif (LB milieu riche) à 37° sous agitation douce pendant 24 H. Par la suite, on a prélèvé un volume de chaque culture bactérienne pour être centrifugé pendant 20 min à 5000 r/tpm. Les culots ont ensuite été récupérés dans 1 ml de PBS.

Le dénombrement des bactéries a été fait dans un milieu de culture solide.

Le milieu de culture constitué d'agar solide dilué dans l'eau physiologique a été coulé à chaud sur le fond des boîtes de pétri. Ce milieu apporte aux micro-organismes toutes les substances nécessaires à leur développement. Une fois le milieu refroidi, différentes dilutions de bactéries ont été préparées préalablement, pour être placées par la suite dans des boîtes de Pétri. Les boites de Pétri sont ensuite placées à 37° pendant 24 heures. Cette température est favorable au développement des bactéries, celles-ci formant des colonies, ce qui va nous permettre de les dénombrer.

V.3.4 Elaboration du biocapteur

Apres nettoyage et activation de l'électrode d'or**,** celle-ci a été rincée avec de l'éthanol puis incubée dans une solution d'acide 16-mercaptohexadecanoique (MHA) à 10 mM dissous dans de l'éthanol pendant une nuit, à une température de 4 °C afin de former la couche auto-assemblée. Les monocouches résultantes ayant des fonctions carboxyliques, ces dernières ont été activées par un mélange [EDC/NHS] de concentration 0,1M/0,1M dans de l'éthanol pendant une heure à température ambiante. L'électrode modifiée a ensuite été rincée avec du PBS. Puis on a déposé 100 µl de solution de protéines de phage de concentration 30 µg/ml toujours à température ambiante pendant une heure et demie. A la fin, on a procédé à la désactivation des fonctions carboxyliques qui n'ont pas réagi, avec de l'éthanolamine pendant 30 min figure(V.2) , l'électrode a été rincée avec du PBS pour être utilisée par la suite pour la détection de *E.Coli E157:H7* à différentes concentrations.

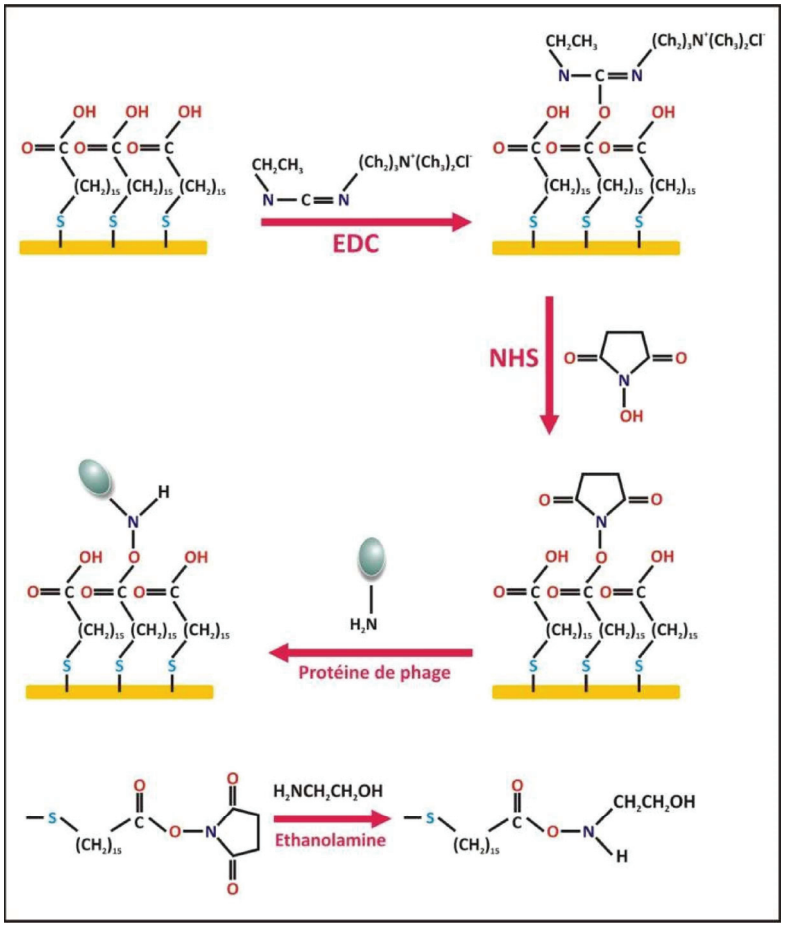


Figure V.2
étapes d'élaboration du biocapteur

V.4 RESULTATS ET DISCUSSION

V.4.1 Caracterisation par voltamétrie cyclique

La voltamétrie cyclique a été largement utilisée pour caractériser les monocouches et bicouches auto-assemblées sur les surfaces de supports solides. Ces études ont montré que la réaction électrochimique impliquant des ions redox dissous peut être fortement atténuée voire même supprimée par la présence de couches organiques [18-20].

Cette technique consiste à soumettre l'électrode de travail à une rampe de potentiel (balayage triangulaire) et à mesurer le courant résultant. Le potentiel appliqué varie entre deux valeurs E1 et E2 avec une vitesse de balayage v.

La figure V.3 montre des mesures de CV pour l'électrode d'or nu (figure V.3 a), de l'or modifié par une monocouche de MHA (figure V.3 b), et de l'or modifié par une première couche de MHA suivi d'un dépôt de protéines de phage et une saturation avec du thiolamine (figure V.3 c).

Les voltammogrammes cycliques enregistrés pour le couple redox $[Fe(CN_6)]^{3-/4-}$ dissous dans du tampon PBS à 10 mM, pour les différentes étapes de fonctionnalisation, ont été réalisés en effectuant un balayage de potentiel entre -0,6 et 0,6 V (par rapport à l'électrode de référence) avec une vitesse de balayage de l'ordre de 100 mV/s .

La courbe de l'électrode d'or nu est typique d'un procédé d'oxydo-réduction réversible contrôlée par la diffusion de l'espèce électroactive au sein de la solution. Les pics d'oxydoréduction (0,277 V, 0,089V) sont relativement grands en raison du fort taux d'échange avec l'électrode d'or nu.

La modification de l'électrode d'or avec l'acide 16-mercaptohexadecanoique entraîne une forte diminution de la réponse ampérométrique caractérisée par la disparition des pics d'oxydoréduction, ce qui confirme la formation d'une monocouche de MHA bloquante au transfert de charge.

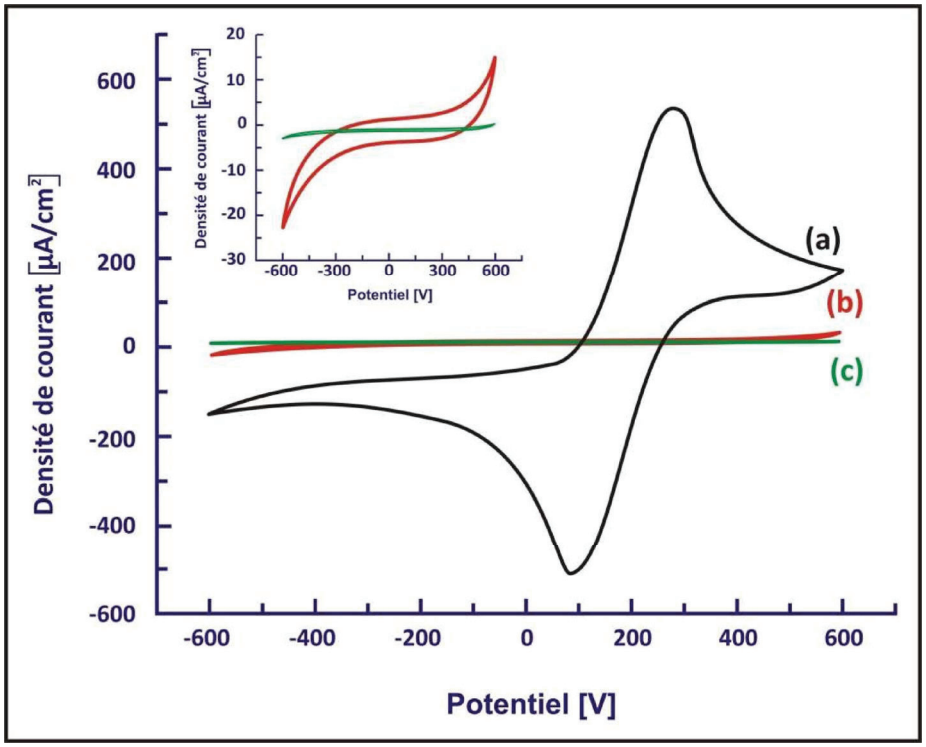


Figure V. 3
voltamogramme d'une électrode d'or nue (a), modifiée avec du MHA(b), modifiée avec du MHA+ protéine de phage+ thiolamine(c).

V.4.2 Réponse du biocapteur :

La figure V.4 représente la réponse de capteur élaboré en vue de la détection de la bactérie *E.coli 0157 :H7*.

Les mesures d'impédance électrochimiques sont obtenues à 0 mV avec un potentiel sinusoïdal surimposé de faible amplitude (10 mV) et dans une gamme de fréquence allant de 100 kHz à 50 mHz. L'électrolyte utilisé est un tampon constitué de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 10 mM, de phosphate de sodium 10 mM, de chlorure de potassium 2,7 mM et de chlorure de sodium 137 mM, à un pH de 7,4.

La première courbe correspond à la mesure de l'impédance avant incubation des bactéries. Ensuite, le biocapteur a été incubé dans une solution de PBS contenant 10 UFC/mL pendant 30 min. Après ce temps d'incubation, le biocapteur est bien lavé avec du PBS, puis on procède à la première mesure de l'impédance électrochimique. Cette opération est répétée pour les différentes concentrations, la gamme de concentration étudiée allant de 10 UFC/mL jusqu'à 10^6 UFC/mL dans l'ordre croissant.

Les mesures d'impédance montrent bien que la résistance de transfert de charge (Rtc) augmente avec l'augmentation de la concentration en bactéries. Cette augmentation est certainement due à l'adsorption spécifique des bactéries sur les protéines des phages ce qui induit une augmentation de l'impédance électrochimique.

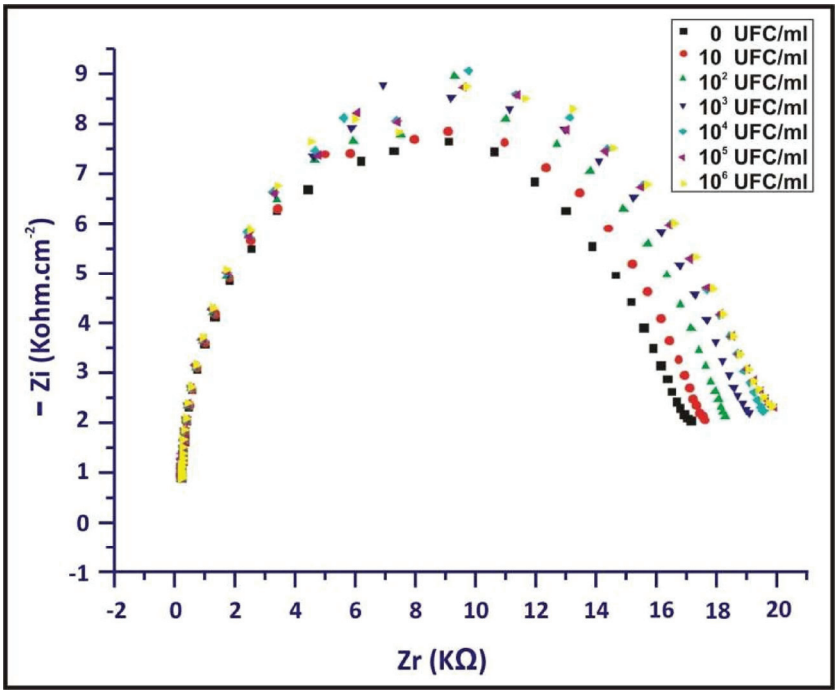


Figure V.4
Diagrammes de Nyquist avant et après incubation de E.coli 0157 :H7.

Le comportement électrique de ce système électrochimique, les modifications apportées à l'interface électrode/électrolyte, peut être modélisé par un circuit électrique équivalent (figure V.5).

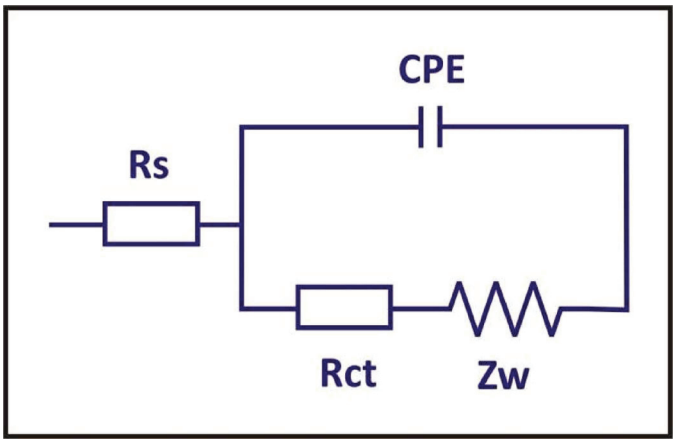


Figure V.5
Circuit électrique équivalent de type Randles

La figure V.6 montre bien que la courbe modélisée est bien superposée sur la courbe expérimentale, par conséquent le modèle choisi est bien satisfaisant.

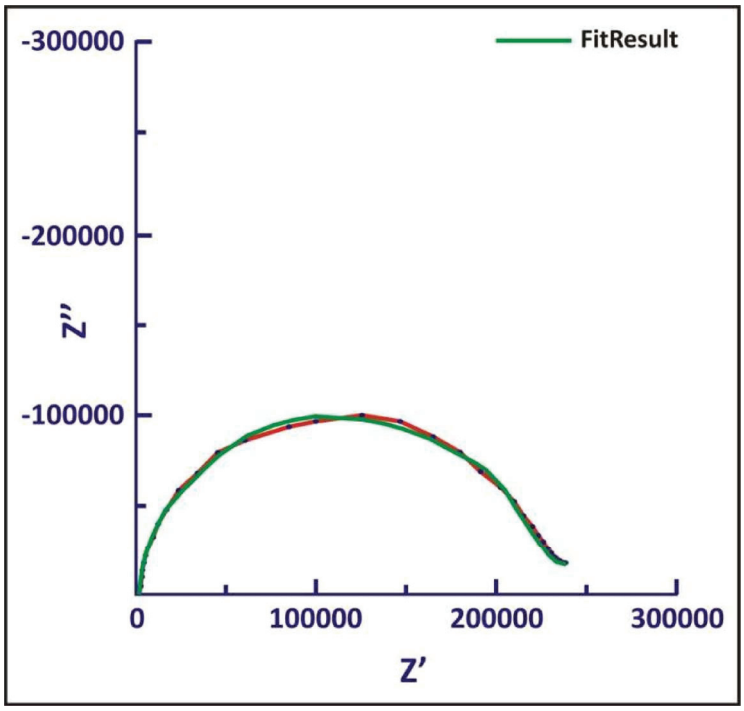


Figure V.6
Exemple de fit basé sur le cicuit équivalent de Randle modélisé avec Zplot/ Zview

V.4.3 Courbe de calibration :

La variation de la résistance de transfert de charge en fonction de la concentration en bactéries est obtenue selon la relation :

$$\Delta Rtc = Rtc_0 - Rtc \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (1).$$

Ou

Rtc0 : correspond à la valeur de résistance de transfert de charge avant ajout de la *E.coli 0157 :H157*.

Rtc : correspond à la valeur de résistance de transfert de charge après chaque incubation de *E.coli 0157 :H157*.

Le tracé de cette variation (figure V.7) montre que la réponse impédimetrique du biocapteur élaboré est une relation linéaire entre la variation de Rtc et les valeurs logarithmiques des concentrations de *E.coli 0157 :H7*. Cette linéarité est obtenue dans une gamme de 10 à 10^4 UFC/mL avec un coefficient de corrélation de 0,96. La limite de détection est de 10 UFC/mL avec une sensibilité égale à 7,244 $\Omega.ufc^{-1}mL$. La droite de linéarité Y= 2,397+ 7,244 log [*E0157 :H7*].

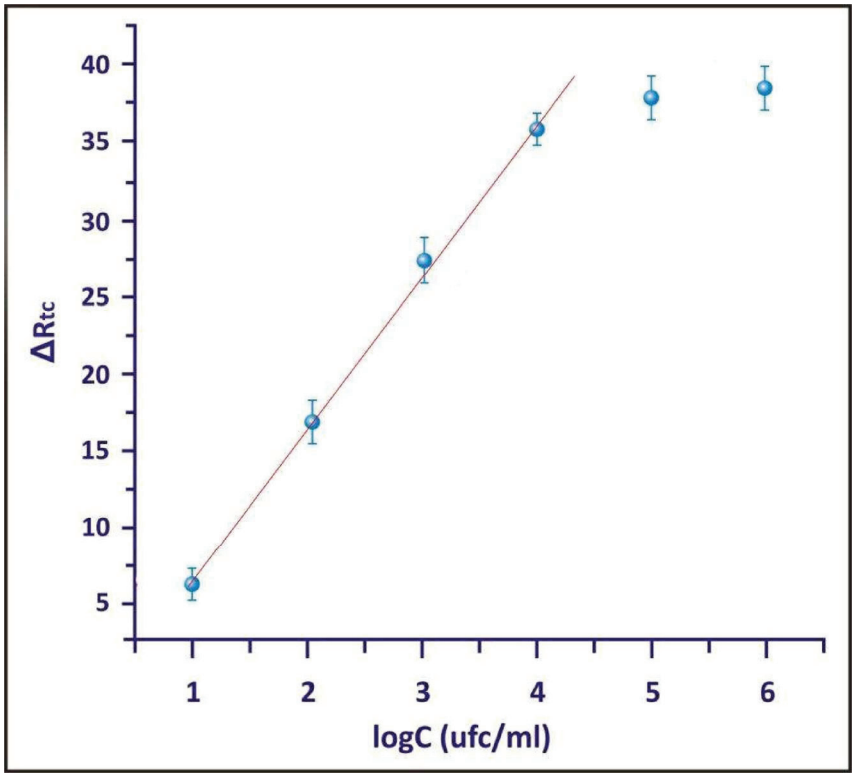


Figure V.7
Courbe de calibration du biocapteur impédimétrique

V.4.4 Etude de la spécificité du biocapteur :

Afin d'étudier la spécificité de ce biocapteur, nous avons utilisé une autre bactérie (*E.coli 7308009*) comme témoin.

De la même façon que précédemment, nous avons immobilisé les protéines de phages sur l'électrode d'or via une monocouche de MHA suivi d'une saturation de la surface avec du thiolamine. Puis on a étudié de manière semblable l'interaction entre les protéines de phage et la bactérie *E.coli 7308009*.

La figure V.8 montre la réponse du biocapteur avec les deux souches de bactérie. On remarque que la variation de la résistance de transfert de charge est plus importante et très significative dans le cas de *E.coli 0157 :H7*. Dans le cas de *E.coli 7308009*, aucune variation de la Rtc n'a été observée au cours des différentes incubations des différentes concentrations. Ceci est dû certainement à la grande spécificité des protéines de phages vis-à-vis d'une seule souche de bactérie.

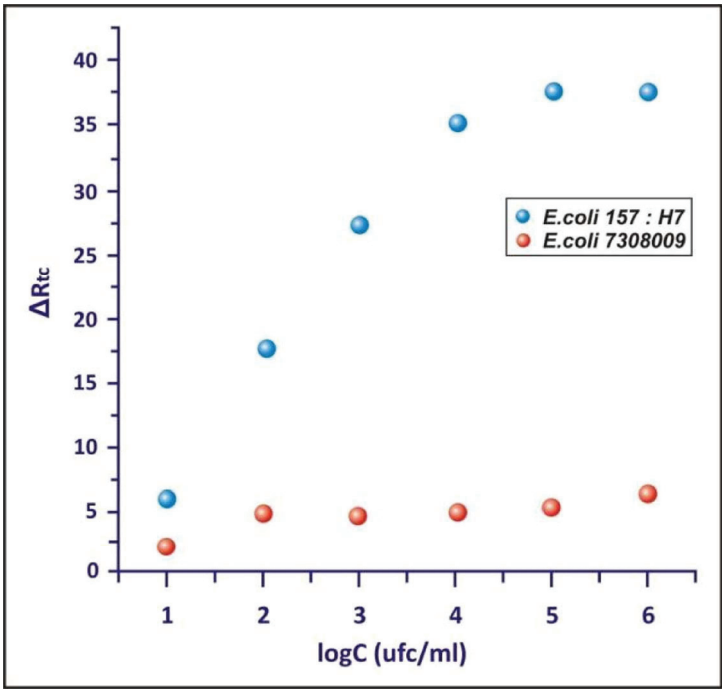


Figure V.8
Courbes de calibration du biocapteur pour les souches E.coli O157 :H7 et E.coli 7308009.

Ces résultats montrent bien que le biocapteur élaboré en utilisant des protéines de phages est sensible et spécifique à la souche de bactérie *E.coli 0157:H7*.

CONCLUSION

Tout au long de cette étude, nous avons mis l'accent sur l'utilité d'utiliser les protéines de phages comme élément de bio-reconnaissance de bactéries pathogènes.

Cette protéine a été immobilisée à la surface du transducteur en or via une monocouche auto-assemblée d'acide 16-mercaptohexadecanoique (MHA). Ce biocapteur présente une très bonne sensibilité, spécificité et une bonne reproductibilité.

La limite de détection est de 10 UFC/mL dans une gamme linéaire de 10 à 10^4 UFC/mL avec un coefficient de corrélation de 0,96.

Le test de spécificité (témoin) a été réalisé en injectant plusieurs concentrations d'espèces non spécifiques. Les résultats obtenus montrent bien la spécificité des phages pour un seul type de souche de bactérie et l'intérêt apporté ces derniers années à ces entités biologiques.

REFERENCES – CHAPITRE V

[1] J.P.Nataro. and J.B. Kaper., "Diarrheagenic Escherichia coli.," *Clin. Microbiol. Rev.,* vol. 11, pp. 142-201., 1998.

[2] J.P.Nataro., T.Steiner., and R.L. Guerrant., "Enteroaggregative Escherichia coli. ," *Emerg. Infect. Dis.,* vol. 4, pp. 251-261, 1998.

[3] J. B.Kaper., J. P.Nataro. , and H. L. Mobley. , "Pathogenic Escherichia coli," *Nat. Rev. Microbiol,* vol. 2, pp. 123-140, 2004.

[4] H.Ayçiçek, A. H., A.Küçükkaraaslan, M. Baysallar, and A. C.Başustaoğlu, "Assessment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers," *Food Control* vol. 15, pp. 253-259, 2004.

[5] H. Brussow and R. Hendrix:, "Phage genomics: small is beautiful," *Cell,* vol. 108, pp. 13-16, 2002.

[6] E. Thomassen, G. Gielen, M. Schütz, G. Schoehn, J. P. Abrahams, S. Miller, and M. J. v. Raaij., "The Structure of the Receptor-binding Domain of the Bacteriophage T4 Short Tail Fibre Reveals a Knitted Trimeric Metal-binding Fold.," *Journal of Molecular Biology,* vol. 331, pp. 361-373, 2003.

[7] C. J. R and J.B. March, " Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials " vol. 24, pp. 212-218, 2006.

[8] J. Wang, M. Hofnung, and A. Charbit., " The C-Terminal Portion of the Tail Fiber Protein of Bacteriophage Lambda Is Responsible for Binding to LamB, Its Receptor at the Surface of Escherichia coli K-12. ," *Journal of Bacteriology* vol. 182, pp. 508-512, 2000.

[9] M.A. Chesters and G.A. Somorjai, "The chemisorption of oxygen, water and selected hydrocarbons on the (111) and stepped gold surfaces.," *Surface Science* vol. 52, pp. 21-28, 1975.

[10] R.G. Nuzzo and D.L. Allara, "Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. ," *Journal of the American Chemical Society,* vol. 105, pp. 4481-4483., 1983.

[11] K. Bandyopadhyay, K.S. Mayya, K. Vijayamohanan, and M. Sastry, "Spontaneously organized molecular assembly of an aromatic organic disulfide on silver/platinum alloy surfaces: an angle dependent X-ray photoemission investigation.," *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena,* vol. 87, pp. 101-107., 1997.

[12] B.V. Appa Rao, M.Y. Iqbal, and B. Sreedhar, "Electrochemical and surface analytical studies of the self-assembled monolayer of 5-methoxy-2-(octadecylthio)benzimidazole in corrosion protection of copper. ," *Electrochimica Acta,* vol. 55, pp. 620-631, 2010.

[13] J.C. Love, D.B. Wolfe, R. Haasch, M.L. Chabinyc, K.E. Paul, G.M. Whitesides, and R.G. Nuzzo, "Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates on Palladium.," *Journal of the American Chemical Society* vol. 125, pp. 2597-2609, 2003.

[14] Z. Li, S.-C. Chang, and R.S. Williams, "Self-Assembly of Alkanethiol Molecules onto Platinum and Platinum Oxide Surfaces.," *Langmuir* vol. 19, pp. 6744-6749., 2003.

[15] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, and G.M. Whitesides, "Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology.," *Chemical Reviews* vol. 105, pp. 1103-1170., 2005.

[16] X. Cui, D. Jiang, P. Diao, J. Li, R. Tong, and X. Wang, "Assessing the apparent effective thickness of alkanethiol self-assembled monolayers in different concentrations of $Fe(CN)6^{3-}/Fe(CN)6^{4-}$ by ac impedance spectroscopy.," *Journal of Electroanalytical Chemistry* vol. 470, pp. 9-13., 1999.

[17] G. Decher, "An Introduction to Ultrathin Organic Films from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly. Von A. Ulman. ," *Angewandte Chemie* vol. 104, pp. 498-499., 1992.
[18] F.Auer, B.Sellergren, A.Swietlow, and A.Offenhauser, "Self-assembled layers of bisbenzamidines on gold, ," *Langmuir,* vol. 16, pp. 5936-5944., 2000.
[19] S.Chen and K.Huang, "Ion-induced interfacial dynamics of phospholipid monolayers,," *Anal.Chem.,* vol. 72, pp. 2949-2956, 2000.
[20] Z.Wu, J.Tang, Z.Cheng, X.Yang, and E.Wang, "Ion channel behavior of supported lipid bilayer membrane on a glass carbon electrode, ," *Anal.Chem.,* vol. 72, pp. 6030-6033, 2000.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Les biocapteurs font l'objet d'une activité intense sur le plan de la recherche académique et la recherche industrielle. Les besoins sont énormes dans de nombreux domaines (santé, environnement, sécurité, diagnostic médical, contrôle de process dans l'industrie agroalimentaire) et le marché est très prometteur.

L'objectif général de ce travail était d'étudier différents biocapteurs impédimétriques en utilisant différents biorécepteurs et différentes techniques d'immobilisation.

Dans un premier temps, nous sous sommes intéressés à une nouvelle classe de biorécepteur à savoir les aptamères. Ces aptamères ont été utilisés en diagnostic *in vivo* que *in vitro*. Leur potentiel en tant que nouvel outil diagnostique, rivalisant et complétant celui apporté par les anticorps, est en constante évolution. Notre choix s'est porté sur deux aptamères spécifiques pour la thrombine le 20-mer et le 29-mer. Ces deux aptamères ont été immobilisés à la surface de l'électrode d'or par simple chimisorption par l'intermédiaire des 4 fonctions thiol ancrées à leurs extrémités. Les deux aptasensors présentent une grande sensibilité, spécificité et stabilité pour la détection de la thrombine. La limite de détection est de 3,1 ng/ml (80 pmol/l) pour les deux aptamères, le second aptamère (29-mer) a montré une sensibilité plus élevée que le premier.

La deuxième partie de ce travail a été consacrée à la modification de la surface de l'électrode en or en utilisant une méthode de chimie de surface très originale, la chimie «click». La mise en œuvre de la cycloaddition dipolaire 1, 3 de type Huisgen entre un alcyne immobilisé sur la surface et un dérivé azoture, catalysée par le cuivre (I) permet d'immobiliser la molécule d'intérêt (biotine) de manière covalente. Nous avons démontré, par des mesures d'impédance, que la réaction de " click " ne se produit que lorsque le potentiel appliqué est égal à – 300 mV. Nous avons également confirmé l'efficacité de la chimie " click " par visualisation en utilisant la microscopie à fluorescence.

Cette méthode est bien adaptée pour la fabrication de biopuce, elle permet l'electro-addressage d'une sonde spécifique sur une seule électrode et d'éviter l'adressage non spécifique en maintenant les autres électrodes sous un potentiel positif (+300mV).

Les structures obtenues nous ont permis la détection de l'albumine du sérum humain biotinylée à partir d'une concentration de 10 pg/ml.

Enfin, dans la dernière partie de ce travail, nous nous sommes intéressés au développement d'un biocapteur impédimétrique pour la détermination de bactéries (*E. coli* 0157:H7). Ce biocapteur utilise des protéines de phage comme élément biologique de reconnaissance. Ces protéines ont été immobilisées à la surface de l'électrode d'or par l'intermédiaire d'une monocouche auto assemblée (SAM) d'alcanethiol. Les résultats trouvés montrent une bonne sensibilité du biocapteur élaboré avec une limite de détection de 10 UFC/mL.

PERSPECTIVES

Au-delà des résultats présentés dans le cadre de ce travail, différentes perspectives méritent d'être envisagées. Des études par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier SNIFTIRS (Subtractively Normalized Interfacial Fourier Transform Infrared spectroscopy) ou PM-IRRAS (Polarization Modulation Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy) permettraient une caractérisation plus avancée de la structure et de la morphologie des biocapteurs élaborés.

Il serait très important de miniaturiser le système d'analyse utilisé tout au long de ce travail et de travailler dans un système microfluidique.

Il serait intéressant de poursuivre ce travail par l'étude des performances de ces capteurs en utilisant des échantillons réels.