Nouveaux marqueurs électroactifs pour le développement de biocapteurs environnementaux

Michel Gaillard

▶ **To cite this version:**

Michel Gaillard. Nouveaux marqueurs électroactifs pour le développement de biocapteurs environnementaux. Chimie organique. Université de Perpignan, 2023. Français. NNT : 2023PERP0054 . tel-04525286

HAL Id: tel-04525286
https://theses.hal.science/tel-04525286

Submitted on 28 Mar 2024

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

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

THÈSE DE DOCTORAT

NOUVEAUX MARQUEURS ÉLECTROACTIFS POUR LE DÉVELOPPEMENT DE BIOCAPTEURS ENVIRONNEMENTAUX

Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur
en **Chimie** de **l'Université de Perpignan Via Domitia**

École Doctorale n°305 – Énergie et développement (E2)

Présentée par **Michel GAILLARD**

Dirigée par **Thierry NOGUER**
et **Nicolas INGUIMBERT**

Soutenue publiquement **le 22 Décembre 2023** devant le jury composé de :

Chantal GONDRAN Professeure, Université de Grenoble Alpes	Rapporteure
Mònica CAMPÀS Chargée de recherches, IRTA La Ràpita	Rapporteure
Beatriz PRIETO-SIMÓN Professeure, Université Rovira i Virgili, Tarragone	Examinatrice
Carole CALAS-BLANCHARD Professeure, LBBM-BAE, Université de Perpignan Via Domitia	Présidente du jury Examinatrice
Thierry NOGUER Professeur, LBBM-BAE, Université de Perpignan Via Domitia	Directeur de thèse
Nicolas INGUIMBERT Professeur, CRIOBE, Université de Perpignan Via Domitia	Co-Directeur de thèse

Comité de suivi individuel

Le **comité de suivi individuel** (CSI) est déterminé par l'article 11 de l'arrêté du 26 août 2022 modifiant l'arrêté du 25 mai 2016 : *« Un comité de suivi individuel du doctorant veille au bon déroulement du cursus en s'appuyant sur la charte du doctorat et de la convention de formation ».*

Le rôle du comité de suivi individuel est d'assurer un accompagnement du doctorant pendant toute la durée du doctorat au regard de la charte de la convention de formation.

Pour la préparation de cette thèse, le comité de suivi individuel a été composé de :

Chantal GONDRAN Professeure, Université de Grenoble	Membre spécialiste de la discipline ou en lien avec le domaine de thèse
Wolfgang LUDWIG Professeur, CEFREM, Université de Perpignan Via Domitia	Membre non-spécialiste extérieur au domaine de recherche du travail de thèse
Anthony ROMIEU Professeur, Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne	Membre extérieur à l'établissement dans lequel s'est déroulée la thèse

Les comités de suivi individuel se sont déroulés :

- **Le 10 Juillet 2019**
- **Le 4 Septembre 2020**
- **Le 7 Septembre 2022**

REMERCIEMENTS

Pour toutes ces années de thèse, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu, accompagné et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je remercie la Région Occitanie et l'Université de Perpignan pour le financement de cette thèse.

J'adresse mes remerciements à mes directeurs de thèses Mr Thierry NOGUER et Mr Nicolas INGUIMBERT pour m'avoir donné cette chance de pouvoir travailler sur ce sujet de thèse, et d'avoir répondu avec calme et patience à mes questions quotidiennes. Merci pour votre gentillesse, et votre compréhension tout au long de ces dernières années.

Merci aux membres du comité de CSI, Mme Chantal GONDRAN, Mr Anthony ROMIEU et Mr Wolfgang LUDWIG qui ont pris le temps d'étudier, questionner et guider mon travail.

Je remercie aussi les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail. Merci à Mme Chantal GONDRAN et Mme Mònica CAMPÀS pour avoir consenti d'être les rapporteurs de cette thèse. Mes remerciements aussi à Mme Carole CALAS-BLANCHARD et Mme Beatriz PRIETO-SIMON de prendre part à mon jury de thèse.

Je n'oublie pas tous les membres du laboratoire BAE anciens comme nouveaux, je n'aurais pas rêvé meilleurs collègues. Merci à Ahmad, Anaïs, Aude, Amani, Clémence, Sondes, Elise, Lynn, Hugo, Guillaume, Cholé, Vitalys pour la bonne ambiance et les rigolades. J'exprime aussi ma gratitude à Georges, Gaëlle, Virginie, Carole, Lise, Lionel, Florence et aux deux Christophe pour leur soutien et leurs conseils. Enfin merci à mes collègues du laboratoire CRIOBE : Delphine, Claire, Laurine, Mélanie, Djibo et Slimane.

Merci à ma famille et mes proches pour leur soutien continuel.

Malgré tous les malheurs, les soucis et les problèmes rencontrés, je suis content d'avoir pu réaliser ce travail (bien que ça aurait pu mieux se passer !)

À mes parents, ***Edith et Jean-Philippe GAILLARD****, et à mon frère* ***Anthony GAILLARD****, pour l'amour qu'ils m'ont toujours donné et leurs encouragements durant mes études.*

Je ne peux pas exprimer à quel point vous m'êtes importants et combien je suis chanceux d'avoir une telle famille. Merci d'être toujours présent pour moi. Merci de m'avoir supporté et soutenu durant tous ces moments difficiles. Merci des sacrifices réalisés pour mon bien-être.

Je vous dédie ce modeste travail.

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS 11
LISTE DES FIGURES 13
LISTE DES TABLEAUX 21
INTRODUCTION GÉNÉRALE 23

CHAPITRE 1 : ÉTAT DE L'ART, BIOCAPTEURS ET MARQUEURS 27
1) INTRODUCTION 28
2) GÉNÉRALITÉS SUR LES BIOCAPTEURS 28
2.1) DÉFINITION 28
2.2) BIORÉCEPTEUR ET BIORECONNAISSANCE 30
2.2.1) ÉLÉMENTS CATALYTIQUES 30
2.2.2) ÉLÉMENTS D'AFFINITÉ 31
2.3.3) TECHNIQUES D'IMMOBILISATION 35
2.3) TRANSDUCTEURS 36
2.4) PROBLÉMATIQUE DU MARQUAGE 38
3) BIOCAPTEURS ÉLECTROCHIMIQUES À BASE D'OLIGONUCLÉOTIDES 39
3.1) PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT 39
3.2) MARQUEURS CONVENTIONNELS 43
3.2.1) ENZYMES 43
3.2.1.1) PEROXYDASE DE RAIFORT (HRP) 44
3.2.1.2) PHOSPHATASE ALCALINE (ALP) 44
3.2.2) NANOMATÉRIAUX 45
3.2.2.1) QUANTUM DOTS 45
3.2.2.2) NANOPARTICULES MÉTALLIQUES 47
3.2.2.3) NANOMATÉRIAUX DE CARBONE 48
3.2.3) MARQUEURS RÉDOX 49
3.2.3.1) MOLÉCULES RÉDOX 49
3.2.3.2) COMPLEXES MÉTALLIQUES 52
3.2.4) COMPARAISON DES MARQUEURS 54

3.3) COMPLEXES MÉTALLIQUES DE TYPE DOTA ET NOTA 56
3.3.1) DOTA 56
3.3.2) NOTA 57

CHAPITRE 2 : SYNTHÈSE DES COMPLEXES MÉTALLIQUES ET ÉTUDE DE LEURS PROPRIÉTÉS ÉLECTROCHIMIQUES 59
1) INTRODUCTION 60
2) RÉSULTATS ET DISCUSSIONS 61
2.1) COMPLEXATION DES LIGANDS DOTA ET NOTA 61
2.2) ÉTUDE ÉLECTROCHIMIQUE DES COMPLEXES OBTENUS 66
2.2.1) TECHNIQUE ÉLECTROCHIMIQUE 66
2.2.2) SÉLECTION DES COMPLEXES 67
2.3) CARACTÉRISATION ÉLECTROCHIMIQUE DES COMPLEXES Fe(III)DOTA / Fe(III)-NOTA 70
3) PARTIE EXPÉRIMENTALE 76
3.1) RÉACTIFS ET SOLVANTS 76
3.2) APPAREILLAGE ET SUPPORTS DE MESURES 76
3.3) PARAMÈTRES DES MESURES EN UV-VIS, FTIR, MS, CV 78
3.4) PRÉPARATION DES COMPLEXES MÉTALLIQUES 79
4) CONCLUSION 82

CHAPITRE 3 : INSERTION DES COMPLEXES MÉTALLIQUES DANS DES BIOCAPTEURS 83
1) INTRODUCTION 84
2) GÉNOCAPTEUR POUR LA DÉTECTION DE BACTÉRIES DE TYPE *VIBRIO* 84
2.1) PRÉSENTATION DE LA CIBLE *VIBRIO* 85
2.2) RÉSULTATS ET DISCUSSIONS 86
2.2.1) ÉTUDE DE LA CONCEPTION DU CAPTEUR 86
2.2.1.1) SÉLECTION DES OLIGONUCLÉOTIDES 87
2.2.1.2) MESURES DE SPECTROSCOPIE D'IMPÉDANCE ÉLECTROCHIMIQUE 87
2.2.1.3) RÉSULTATS ATTENDUS 90

2.2.2) RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX 93
2.2.3) ESSAIS AVEC LE BLEU DE MÉTHYLÈNE (MB) 107
2.2.4) PRÉTRAITEMENT ET IMMOBILISATION DE LA CIBLE 111
2.2.4.1) PRÉTRAITEMENT DE LA CIBLE 111
2.2.4.2) MÉTHODES D'IMMOBILISATION ALTERNATIVES 114
2.3) CONCLUSION 121
3) APTACAPTEURS POUR LA DÉTECTION DE CIBLES CHIMIQUES 122
3.1) DÉFINITION DES CIBLES 122
3.1.1) 17β-ESTRADIOL (E2) 122
3.1.2) OCHRATOXINE A (OTA) 123
3.1.3) AFLATOXINE M1 (AFM1) 123
3.2) CONCEPTIONS DES APTACAPTEURS 124
3.2.1) CONJUGAISON APTAMÈRE-COMPLEXE 125
3.2.2) CHOIX DES APTAMÈRES 126
3.3) RÉSULTATS ET DISCUSSION APTACAPTEURS 127
3.3.1) MARQUAGE DES APTAMÈRES PAR LES COMPLEXES 127
3.3.1.1) RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX 128
3.3.1.2) OPTIMISATION DU COUPLAGE 133
3.3.2) DÉVELOPPEMENT DES APTACAPTEURS 142
3.3.2.1) APTAMÈRES ANTI-OTA MARQUÉS AU Fe(III)NODAGA 144
3.3.2.2) APTAMÈRES ANTI-E2 MARQUÉS AU MB 146
3.3.2.3) APTAMÈRES ANTI-OTA MARQUÉS AU MB 150
3.3.2.4) APTAMÈRES ANTI-AFM1 MARQUÉS AU MB 151
3.3.3) BILAN DÉVELOPPEMENT D'APTACAPTEURS 153
3.3.4) ÉTUDE DES INTERACTIONS APTAMÈRES-CIBLES 153
3.3.4.1) ÉTUDE DES INTERACTIONS APTAMÈRES-OTA 154
4) PARTIE EXPÉRIMENTALE 157
4.1) RÉACTIFS ET SOLVANTS 157
4.2) APPAREILLAGE ET SUPPORTS DE MESURE 158
4.3) PROTOCOLE DE CONCEPTION DES BIOCAPTEURS 159
4.4) COMPLEXATION DU LIGAND NODAGA-MALÉIMIDE 160

4.5) CONJUGAISON APTAMÈRES-COMPLEXE 161

4.6) ANALYSES DES INTERACTIONS MOLÉCULAIRES EN SOLUTION 162

5) CONCLUSION 163

CONCLUSION GÉNÉRALE 164

RÉFÉRENCES 168

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AFM1 : Aflatoxine M1

ALP : Phosphatase Alcaline

ARN : Acide RiboNucléique

Capa : Capacité au sommet du demi-cercle

CV : Voltampérométrie Cyclique

D : Coefficient de Diffusion

DCE : Directive Cadre sur l'Eau

DPV : Voltampérométrie à Impulsion Différentielle

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DOTA : Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique

EDTA : Acide Éthylène Diamine Tétraacétique

EIS : Spectroscopie d'Impédance Électrochimique

ESI : Ionisation par Electro-Spray

f ° : Fréquence au sommet du demi-cercle

FAM : Fluoresceine Amidite

FTIR : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

GCE : Électrode de Carbone Vitreux

GOx : Glucose Oxydase

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

HRP : Peroxydase de Raifort

IARC : Centre International de Recherche sur le Cancer

ICMUB : Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne

K_d : Constante de dissociation

k^0 : Constante hétérogène de transfert d'électron

LC-HRMS : Chromatographie Liquide-Spectrométrie de Masse à Haute Résolution

LNA : Acide Nucléique Bloqué

LSV : Voltampérométrie à Balayage linéaire

MIP : Polymère à Empreinte Moléculaire

MB : Bleu de Méthylène

MS : Spectrométrie de Masse

MST : Thermophorèse à Micro-Échelle

NOTA : Acide 1,4,7-triazacyclononane-N, N, N-triacétique

OTA, OTB, OTC : Ochratoxine A, B et C

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaine

PDA : Photo Diode Array

PNA : Acide Nucléique Peptidique

QDs : Quantum Dots, Points Quantiques

R_{ct} : Résistance du Transfert de Charge

R_p : Résistance de polarisation

R_s : Résistance solution

Rt : Temps de rétention

SELEX : Évolution Systématique des Ligands par enrichissement EXponentiel

SPE : Électrode Sérigraphiée

SPCE : Électrode de Carbone Sérigraphiée

STEP : STation d'ÉPuration des eaux usées

SWV : Voltampérométrie à ondes carrées

UICPA : Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée

UV-VIS : UltraViolet-VISible

WE : Électrode de Travail

Y_0 : Magnitude de l'admittance

Z' : Impédance Réelle

-Z'' : Impédance Imaginaire

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation schématique d'un biocapteur 29
Figure 2: Fonctionnement général des récepteurs catalytiques 30
Figure 3: Représentation schématique de différents biocapteurs d'affinité 31
Figure 4: Représentation schématique de la méthode de sélection d'aptamères SELEX 33
Figure 5 : Structures comparatives d'oligonucléotides d'ADN, de LNA et de PNA 34
Figure 6: Représentation schématique de différentes techniques d'immobilisation des biorécepteurs 35
Figure 7 : Exemples du fonctionnement sans marquage et par impédance d'un génocapteur **(A)** et d'un aptacapteur **(B)** 40
Figure 8 : Exemples de designs d'aptacapteurs électrochimiques avec marqueurs non covalents : marqueurs interagissant avec le complexe aptamère-cible **(A)**, marqueurs interagissant avec des brins d'acide nucléique **(B)**, marqueurs intercalés **(C)** 41
Figure 9 : Exemples de designs d'aptacapteurs électrochimiques avec marqueurs covalents : détection en sandwich **(A)**, détection avec changement de conformation de type « signal ON » et « signal OFF » **(B)**, détection avec déplacement du brin non marqué **(C)**, détection avec déplacement du brin marqué **(D)** 43
Figure 10: Représentation schématique de la structure d'un quantum dot avec coquille et différents exemples de modification de surface 46
Figure 11 : Structure d'un nanotube de carbone et du graphène 49
Figure 12: Réactions d'oxydoréduction des composés redox : bleu de méthylène **(A)** anthraquinone **(B)** thionine **(C)** bleu de Nil **(D)** 51
Figure 13: Structure du ferrocène 52
Figure 14: Structure générale d'une base de Schiff **(A)** et exemples de structures de bases monodentées **(B)** bidentées **(C)** tridentées **(D)** tetradentées **(E)** pentadentées **(F)** hexadentées **(G)** 53
Figure 15: Formules du ligand macrocycle DOTA **(A)** et de ses analogues fonctionnalisés avec du NHS **(B)** et du maléimide **(C)** 56
Figure 16: Formule du ligand macrocycle NOTA 57
Figure 17: Exemples de fonctionnalisation des ligands DOTA et NOTA avec le NODAGA-maléimide **(A)**, le DOTA-tris(tBu)ester NHS ester **(B)**, et le NOTA-NHS ester **(C)** 60
Figure 18: Cristaux du complexe Fe(III)-NOTA 62
Figure 19 : Spectres UV-Visible des ligands DOTA **(A)** et NOTA **(B)** dans l'eau à pH 5 à différentes concentrations 0,5 – 2,0 mM 63

Figure 20 : Spectres UV-VIS obtenus pour les complexes métalliques de cuivre-DOTA et cuivre-NOTA **(A)** cobalt-DOTA et cobalt-NOTA **(B)** nickel-DOTA et nickel-NOTA **(C)** fer-DOTA et fer-NOTA **(D)** à 0,5 mM en solution aqueuse à pH 5 65
Figure 21: Schémas des variations de potentiel utilisées en voltampérométrie cyclique (CV) et le voltampérogramme typique d'un système réversible..... 67
Figure 22: Voltampérogrammes obtenus pour les complexes métalliques de cuivre-DOTA et cuivre-NOTA **(A)** cobalt-DOTA et cobalt-NOTA **(B)** nickel-DOTA et nickel-NOTA **(C)** fer-DOTA et fer-NOTA **(D)** à 1 mM dans KCl 0,1 M à pH 5 69
Figure 23: Le système à trois électrodes : électrode de travail en carbone vitreux **(A)**, électrode de référence Ag/AgCl **(B)** et contre-électrode à embout de platine **(C)** 77
Figure 24: Représentation schématique détaillée des SPCEs utilisées et produites par le laboratoire LBBM-BAE..... 78
Figure 25: Représentation théorique du biocapteur désiré..... 85
Figure 26: Représentation et caractéristiques d'un diagramme de Nyquist de l'impédance électrochimique 88
Figure 27: Exemple de simulation de circuit équivalent superposé aux données mesurées expérimentalement par le logiciel NOVA version 2.1.3 METROHM..... 90
Figure 28: Représentation des étapes de la conception du capteur 90
Figure 29: Spectre d'impédance de plusieurs SPCEs nues (courbes noires) 91
Figure 30: Spectre d'impédance d'une SPCE modifiée avec couche de diazonium (courbe violette)..... 91
Figure 31: Spectre d'impédance d'une SPCE activée avec EDC/NHS (courbe verte)..... 92
Figure 32: Spectre d'impédance d'une SPCE après immobilisation d'oligonucléotides (courbe bleue) 92
Figure 33: Spectre d'impédance d'une SPCE après hybridation avec ADN cible (courbe rouge) 93
Figure 34: Spectres d'impédance des premiers tests de conception de biocapteur Vibrio, réalisés sur trois électrodes (**E1, E2, E3**). Courbe noire = électrode nue, courbe violette = réduction de diazonium, courbe bleue = immobilisation des sondes capture, courbe rouge = détection de la cible. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 1000-0,1 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,13 V 94
Figure 35: Spectres d'impédances d'électrodes SPCE non fonctionnalisées chauffés à 46°C sous environnement humide. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M,

fréquence entre 1000-0,1 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,13 V 96
Figure 36: Spectres d'impédance des électrodes fonctionnalisées avec Vib 25 (**E1, E2, E3**) et Vib 35 (**E4, E5, E6**). Courbe noire = électrode nue, courbe violette = réduction de diazonium, courbe bleue = immobilisation des sondes capture, courbe rouge = détection de la cible. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 1000-0,1 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,13 V 97
Figure 37: Spectres d'impédance des électrodes fonctionnalisées avec la sonde Vib 25 à une concentration de 1 µM et mises en présence d'ADN cible à des concentrations de 0,1 µM (**E1, E2, E3**) et 0,01 µM (**E4, E5, E6**). Courbe noire = électrode nue, courbe violette = réduction de diazonium, courbe bleue = immobilisation des sondes capture, courbe rouge = détection de la cible. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 1000-0,1 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,13 V 99
Figure 38: Deux groupes d'électrodes pour les mesures : le groupe Essai **(A)** où la cible est présente, et le groupe Témoin **(B)** où la cible est absente..... 101
Figure 39: Spectres d'impédance de la sonde Vib 25 avec l'optimisation de détection en présence de la cible. Courbe bleue = immobilisation des sondes capture, courbe rouge = détection de la cible. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 1000-0,1 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,13 V 102
Figure 40: Schéma des variations de potentiel appliqués en DPV et le voltampérogramme caractéristique..... 107
Figure 41: Schéma théorique d'hybridation entre l'oligonucléotide immobilisé et l'ADN cible marqué en 5' avec MB **(A)** ; Voltampérogramme DPV obtenu après incubation de l'ADN cible marqué au MB **(B)**, mesure de -0,6 à 0,5 V dans le tampon DPV (KCl 0,1 M / Na_2HPO_4 0,1 M / KH_2PO_4 0,1 M) ; application d'un potentiel de -0,6 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,005 V, amplitude de 0,025 V, intervalle de 0,5 s, modulation du temps de 0,05 s..... 108
Figure 42: Schéma théorique électrode SPCE non fonctionnalisée **(A)** ; Voltampérogramme DPV obtenu à partir d'une électrode SPCE non fonctionnalisée **(B)**, mesure de -0,4 à 0,3 V dans un tampon DPV (KCl 0,1 M / Na_2HPO_4 0,1 M / KH_2PO_4 0,1 M) ; application d'un potentiel de -0,4 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,005 V, amplitude de 0,025 V, intervalle de 0,5 s, modulation de temps de 0,05 s..... 108

Figure 43: Schéma théorique hybridation entre oligonucléotide immobilisé et l'ADN cible marqué en MB 3' **(A)** ; Voltampérogramme DPV après incubation solution d'ADN cible marqué au MB **(B)**, mesure de -0,6 à 0,3 V avec un tampon DPV (KCl 0,1 M / Na_2HPO_4 0,1 M / KH_2PO_4 0,1 M) ; application d'un potentiel de -0,6 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,005 V, amplitude de 0,025 V, intervalle de 0,5 s, modulation de temps de 0,05 s 109

Figure 44: Schéma théorique hybridation entre oligonucléotide et cible marqué en MB 3' puis immobilisation **(A)** ; Voltampérogramme DPV après immobilisation solution Vib 25 et ADN cible marqué au MB **(B)**, mesure de -1,2 à 0,5 V avec tampon DPV (KCl 0,1 M / Na_2HPO_4 0,1 M / KH_2PO_4 0,1 M) ; application d'un potentiel de -1,2 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,005 V, amplitude de 0,025 V, intervalle de 0,5 s, modulation de temps de 0,05 s..... 110

Figure 45: Schéma théorique d'hybridation entre oligonucléotide marqué avec MB 3' immobilisé et l'ADN cible **(A)**. Voltampérogramme DPV avant/après incubation solution d'ADN cible avec Vib 25 marqué avec MB 3' **(B)**, mesure de -0,8 à 0,3 V en utilisant un tampon DPV (KCl 0,1 M / Na_2HPO_4 0,1 M / KH_2PO_4 0,1 M) ; application d'un potentiel de -0,8 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,005 V, amplitude de 0,025 V, intervalle de 0,5 s, modulation de temps de 0,05 s. Courbe bleue = immobilisation des sondes capture, courbe rouge = détection de la cible..... 110

Figure 46 : Schéma théorique d'une hybridation incorrecte entre oligonucléotide immobilisé et l'ADN cible 111

Figure 47: Spectres d'impédance des tests de tampons contenant 0,01 % de SDS et d'EDTA. Courbe bleue = immobilisation des sondes capture, courbe rouge = détection de la cible. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 2000-0,05 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,12 V 112

Figure 48: Schéma théorique du biocapteur avec immobilisation par adsorption physique.. 115

Figure 49: Spectres d'impédance obtenus après immobilisation par adsorption de la sonde Vib 35 à différentes concentrations 0,01 µM **(A)**, 0,1 µM **(B)** et 1 µM **(C)**. Courbe noire = électrode nue, courbe bleue = après adsorption des sondes de capture). Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 2000-0,05 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,12 V..... 115

Figure 50: Spectres d'impédance de l'immobilisation par adsorption pour les groupes Essai (**colonne de gauche**) et Témoin (**colonne de droite**) avec des concentrations similaires en

sonde Vib 35 et en ADN cible : 0,01 µM (**A1** et **A2**), 0,1 µM (**B1** et **B2**) et 1 µM (**C1** et **C2**). Courbe bleue = immobilisation des sondes capture, courbe rouge = détection de la cible. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 2000-0,05 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,12 V 116
Figure 51: Schéma théorique du biocapteur avec immobilisation par liaison streptavidine-biotine 117
Figure 52: Spectres d'impédance avec immobilisation streptavidine-biotine du Vib 35-7T. Courbe verte = dépôt de streptavidine, courbe bleue = immobilisation sondes capture, courbe rouge = détection de cible. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 2000-0,03 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,12 V .. 117
Figure 53: Spectres d'impédances théoriques du biocapteur avec immobilisation par liaison or-thiol. Courbe noire = électrode nue, courbe bleue = immobilisation des sondes capture, courbe grise = blocage avec MCH 118
Figure 54: Schéma de la conception du capteur par immobilisation or-thiol 119
Figure 55: Schéma théorique du biocapteur avec utilisation de DTT et spectres d'impédance de comparaison des immobilisations avec et sans DTT. Courbe noire = électrode nue, courbe verte = immobilisation du DTT et des sondes capture, courbe bleue = immobilisation sondes capture. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 2000-0,1 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,13 V 120
Figure 56: Structure chimique du 17β-estradiol (E2) 122
Figure 57: Structure chimique de l'ochratoxine A (OTA) 123
Figure 58: Structures chimiques de l'aflatoxine B1 (AFB1) et l'aflatoxine M1 (AFM1) 124
Figure 59: Le complexe métallique Fe(III)NODAGA-maléimide 125
Figure 60: Différentes réactions possibles lors d'un couplage thiol-maléimide 125
Figure 61: Chromatogramme obtenu pour Fe(III)NODAGA-maléimide 128
Figure 62: Spectre de masse ESI- du pic de masse 567 obtenu à Rt = 2 min 129
Figure 63: Spectre de masse ESI- du pic de masse 595 obtenu à Rt = 2,5 min 129
Figure 64: Spectre de masse ESI- du pic de masse 540 obtenu à Rt = 5 min 130
Figure 65: Chromatogramme obtenu pour l'échantillon NH_2-Anti-E2-SH + Complexe 131
Figure 66: Spectres de masse ESI- du pic de masse 2257 obtenu à Rt = 5,8 min. En bleu, les espèces chargées de l'aptamère NH_2-Anti-E2-SH non conjugué 131
Figure 67: Chromatogramme obtenu pour l'échantillon NH_2-Anti-OTA-SH + Complexe... 132

Figure 68: Spectres de masse ESI- du pic de masse 2024 obtenu à Rt = 5,8 min. En rouge, les espèces chargées de l'aptamère NH_2-Anti-OTA-SH conjugué au complexe 132
Figure 69: Chromatogramme obtenu pour l'échantillon Anti-AFM1+ Complexe 133
Figure 70: Chromatogramme obtenu pour l'échantillon SH-Anti-E2-FAM + Complexe..... 135
Figure 71: Spectre de masse ESI- du pic de masse 2339 obtenu à Rt = 5,8 min. En bleu, les espèces chargées de l'aptamère SH-Anti-E2-FAM non conjugué..... 135
Figure 72: Chromatogramme obtenu pour l'échantillon SH-Anti-OTA-FAM + Complexe. 136
Figure 73: Spectre de masse ESI- du pic de masse 2017 obtenu à Rt = 5,8 min. En bleu, les espèces chargées de l'aptamère SH-Anti-OTA-FAM non conjugué et en rouge, les espèces chargées de l'aptamère SH-Anti-OTA-FAM conjugué au complexe Fe(III)NODAGA137
Figure 74: Chromatogramme obtenu pour l'échantillon NH_2-Anti-E2-SH + NODAGA 138
Figure 75 : Spectre de masse ESI- du pic de masse 2239 obtenu à Rt = 5,5 min. En bleu, les espèces chargées de l'aptamère NH_2-Anti-E2-SH non conjugué et en rouge, les espèces chargées de l'aptamère NH_2-Anti-E2-SH conjugué au ligand NODAGA 138
Figure 76: Chromatogramme obtenu pour l'échantillon NH_2-Anti-OTA-SH + NODAGA.. 139
Figure 77 : Spectre de masse ESI-et isotopique du pic de masse 2334 obtenu à Rt = 5,6 min. En bleu, les espèces chargées de l'aptamère NH_2-Anti-OTA-SH non conjugué et en rouge, les espèces chargées de l'aptamère NH_2-Anti-OTA-SH conjugué au ligand NODAGA.... 139
Figure 78: Chromatogramme obtenu pour le couplage NH_2-Anti-OTA-SH + NODAGA à 1 mM et 80°C..... 141
Figure 79 : Spectre de masse ESI- du pic de masse 2015 obtenu à Rt = 5,5 min. En bleu, les espèces chargées de l'aptamère NH_2-Anti-OTA-SH non conjugué et en rouge, les espèces chargées de l'aptamère NH_2-Anti-OTA-SH conjugué au ligand NODAGA..... 141
Figure 80: Schéma des variations de potentiel appliqués en SWV et le voltampérogramme caractéristique..... 142
Figure 81: Représentation schématique des types de systèmes de signaux possibles. Courbe bleue = signal des aptamères marqués immobilisés, courbe rouge = signal en présence de la cible 143
Figure 82: Résultats attendus pour le groupe Essai **(A)** et le groupe Témoin **(B)** 144
Figure 83: SWV (avec correction de la ligne de base) du complexe métallique Fe(III)NODAGA-maléimide. Mesures de -0,6 à 0,4 V dans PBS 0,1 M à pH 7, application d'un potentiel de -0,6 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,005 V, une modulation d'amplitude de 0,01 V et une fréquence de 25 Hz 144
Figure 84: SWV (avec correction de la ligne de base) obtenu pour l'aptacapteur basé sur l'aptamère NH_2-Anti-OTA-Fe(III)NODAGA (pour le groupe Essai et le groupe Témoin).

Courbe bleue = aptamères marqués avec le complexe immobilisés, courbe rouge = signal après l'incubation de l'OTA. Mesures de -0,6 à 0,4 V dans PBS 0,1 M à pH 7, application d'un potentiel de -0,6 V durant 5 s avant mesure, une modulation d'amplitude de 0,01 V et une fréquence de 25 Hz 145

Figure 85: SWV (avec correction de la ligne de base) des aptamères NH_2-Anti-E2-MB immobilisés sur SPCEs. Mesures de -0,6 à 0,1 V dans le tampon PBS 0,1 M à pH 7, application d'un potentiel de -0,6 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,005 V, une modulation d'amplitude de 0,01 V et une fréquence de 25 Hz 147

Figure 86: SWV (avec correction de la ligne de base) des aptamères NH_2-Anti-E2-MB immobilisés sur SPCEs après optimisations de mesure et protocole. Mesures de -0,7 à 0 V dans le tampon PBS 0,1 M à pH 7,5, application d'un potentiel de -0,7 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,001 V, une modulation d'amplitude de 0,01 V et une fréquence de 50 Hz 148

Figure 87: SWV (avec correction de la ligne de base) obtenu avec l'aptamère NH_2-Anti-E2-MB immobilisé sur SPCEs (pour les groupes Essai et Témoin). Courbe bleue = réponse des aptamères marqués immobilisés, courbe rouge = signal après incubation de la cible. Mesures de -0,7 à 0 V dans le tampon PBS 0,1 M à pH 7,5, application d'un potentiel de -0,7 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,001 V, une modulation d'amplitude de 0,01 V et une fréquence de 50 Hz 149

Figure 88: Histogramme des variations d'intensité de pic (Δi) mesurées avec l'aptamère Anti-E2-MB immobilisé, pour les groupes Essai et Témoin (n = 3 électrodes)..... 149

Figure 89: SWV (avec correction de la ligne de base) obtenu avec l'aptamère NH_2-Anti-OTA-MB immobilisé sur SPCEs (pour les groupes Essai et Témoin). Courbe bleue = Réponse des aptamères marqués immobilisés, courbe rouge = signal après incubation de la cible. Mesures de -0,7 à 0 V dans le tampon PBS 0,1 M à pH 7,5, application d'un potentiel de -0,7 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,001 V, une modulation d'amplitude de 0,01 V et une fréquence de 50 Hz 150

Figure 90: Histogramme des variations d'intensité de pic (Δi) mesurées avec l'aptamère Anti-OTA-MB immobilisé, pour les groupes Essai et Témoin (n = 3 électrodes)..... 151

Figure 91: SWV (avec correction de la ligne de base) avant et après étape finale d'ajout de cible (pour groupe Essai et Témoin) du conjugué NH_2-Anti-AFM1-MB. Courbe bleue = réponses des aptamères marqués immobilisés, courbe rouge = signal après l'incubation de la cible. Mesures de -0,7 à 0 V dans le tampon PBS 0,1 M à pH 7,5, application d'un potentiel de -0,7 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,001 V, une modulation d'amplitude de 0,01 V et une fréquence de 50 Hz 152

Figure 92: Histogramme des variations d'intensité de pic (Δi) obtenu avec l'aptamère Anti-AFM1-MB immobilisé, pour les groupes Essai et Témoin (n = 3 électrodes) 152
Figure 93: Courbes de variation de fluorescence enregistrées pour différents rapports de mélange de molécules cibles et de ligands **(A)**, et courbe pour la détermination du K_d **(B)** 154
Figure 94: Analyses par MST des interactions entre l'aptamère SH-Anti-OTA-FAM et la cible OTA. Scans de la fluorescence pour chaque capillaire **(A)**, courbes de variation de fluorescence **(B)** et courbe du K_d **(C)** 155
Figure 95: Analyses par MST des interactions entre l'aptamère Fe(III)NODAGA-Anti-OTA-FAM et la cible OTA. Scans de la fluorescence pour chaque capillaire **(A)**, courbes de variation de fluorescence **(B)** et courbe du K_d **(C)** 156
Figure 96 : Courbes révélant les valeurs de K_d pour les deux formes d'aptamères présent dans l'échantillon (courbes orange) 157
Figure 97: Protocole de préparation des échantillons permettant une dilution en cascade de l'analyte en présence d'une quantité constante de l'aptamère cible pour les analyses en MST 163

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des marqueurs utilisés dans les biocapteurs électrochimiques 55

Tableau 2: Potentiel d'oxydoréduction standard des ions métalliques utilisés pour la synthèse des complexes métalliques utilisant les ligands DOTA et NOTA 62

Tableau 3: Éléments de circuits équivalents et les paramètres leur correspondant..... 89

Tableau 4: Paramètres du circuit équivalent de trois électrodes (**E1**, **E2**, **E3**), pour l'étape d'immobilisation des oligonucléotides (1 µM de Vib 25) et pour la détection d'ADN cible (1µM) 95

Tableau 5: Paramètres du circuit équivalent pour l'étape d'immobilisation des oligonucléotides (1µM) et pour la détection d'ADN cible (1µM). L'étape d'immobilisation a été réalisée avec les sondes Vib 25 (**E1, E2, E3**) et Vib 35 (**E4, E5, E6**) 98

Tableau 6: Paramètres du circuit équivalent pour l'étape d'immobilisation des oligonucléotides (1µM de Vib 25) et pour la détection d'ADN cible. La détection a été réalisée en présence de 0,1 µM (**E1, E2, E3**) et 0,01 µM (**E4, E5, E6**) d'ADN cible 100

Tableau 7: Effet de la température d'incubation sur les paramètres des spectres d'impédance obtenus pour l'étape d'immobilisation des oligonucléotides (1µM de Vib 25) et pour la détection d'ADN cible (1µM). Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 5000/2000-0,1 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,13 V .. 104

Tableau 8: Effet des concentrations de Vib 25 et d'ADN cible sur les paramètres des spectres d'impédance obtenus pour l'étape d'immobilisation des oligonucléotides et pour la détection d'ADN cible. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 5000/2000-0,1 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,13 V 106

Tableau 9: Paramètres des spectres d'impédance pour l'immobilisation par affinité streptavidine-biotine. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 2000-0,03 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,12 V 118

Tableau 10: Paramètres des spectres d'impédance obtenus pour l'immobilisation or-thiol de la sonde SH-Vib 35 sur une électrode d'or (DROPSENS). Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 2000-0,1 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,10 V 119

Tableau 11: Formules et masses exactes du complexe Fe(III)NODAGA-maléimide 126
Tableau 12: Formules et masses exactes des aptamères choisis et leurs cibles complémentaires 126
Tableau 13: Moyennes et écart-types du signal Δi obtenu avec les aptamères NH_2-Anti-OTA-Fe(III)NODAGA pour chaque groupe d'étude 145
Tableau 14: Formules des oligonucléotides et aptamères utilisés..... 157
Tableau 15: Modifications réalisées aux extrémités 5' et 3' des oligonucléotides et aptamères utilisés..... 158
Tableau 16: Gradient chromatographique pour les analyses en LC-HRMS 162

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'eau est l'une des ressources les plus importantes de la Terre. Toutefois, l'accès à une eau potable ou de bonne qualité n'est pas équitablement réparti. Dans un contexte d'accroissement de la population mondiale, cela n'est pas sans poser de problème pour maintenir l'intégrité des écosystèmes, une agriculture de qualité et le bien-être des populations [1]. Depuis plus de 50 ans, les ressources en eau sont affectées par de multiples contaminants provenant de rejets médicamenteux (hormones, antibiotiques…), de polluants (plastiques, pesticides…) ou encore d'agents pathogènes (bactéries, toxines…) [2,3]. Bien que présents à faibles doses, leur persistance dans l'environnement est la source de différentes pressions s'exerçant sur les écosystèmes. De plus, les effets conjugués des rejets produits par l'industrie, l'agriculture intensive, ainsi que l'impact de l'urbanisme et l'augmentation de la population mondiale, contribuent au fil des années à accroître les problèmes liés à la l'utilisation de cette ressource. Afin d'en assurer une meilleure gestion et contrer cette pollution, des dispositifs existent comme les stations d'épuration (STEP) qui mettent en place divers traitements des eaux usées. Cependant, ces traitements restent insuffisants pour « purifier » complètement l'eau traitée. Plus que jamais le problème de la pollution environnementale est un sujet sociétal d'importance majeure, et la ressource hydrique peut être considérée comme un des piliers d'un écosystème en bonne santé dont il faut assurer le maintien, l'assainissement, le suivi qualitatif et le partage.

C'est ainsi que, pour la protection des ressources en eau, des directives européennes ont été établies. La Directive Cadre sur l'Eau ou DCE (2000/60/CE) [4] est la pièce majeure de la politique de gestion de l'eau en Europe. Cette directive impose aux États membres de mettre en place des plans de gestion de l'eau pour protéger les bassins hydrographiques constitués des cours d'eau, des zones d'eaux souterraines et des eaux côtières. Elle cherche, via des suivis réguliers, à vérifier la non-dégradation des ressources et milieux, le bon état des masses d'eau, la réduction progressive des pollutions et le respect des normes dans les milieux naturels. La DCE établit aussi des listes des contaminants prioritaires qu'il est nécessaire de surveiller. Il s'agit essentiellement de produits pharmaceutiques, de pesticides et de métaux lourds.

La détection et la quantification des polluants présents dans le milieu naturel fait généralement appel à des techniques analytiques conventionnelles comme la chromatographie liquide ou gazeuse, couplée à la spectrométrie de masse. Néanmoins, du fait de la durée des analyses, de leur coût élevé, mais aussi de la taille et non portabilité des appareils employés, elles sont souvent limitées à des utilisations sur des plateformes d'analyses spécialisées et ne permettent pas de suivi continu sur le terrain. Pour pallier à ces insuffisances, des biocapteurs peuvent être utilisés comme une alternative. En effet, les biocapteurs sont définis comme étant des dispositifs d'analyse simples, peu coûteux, capables de détecter l'analyte dont on souhaite assurer le suivi,

sans nécessité de prétraitement du milieu. De plus, ils ont la possibilité de réaliser des mesures plus rapides, d'être portables et idéalement implantables sur le terrain.

La petite taille ainsi que le faible coût des biocapteurs en font des outils très attractifs, bien que leur développement rencontre des contraintes liées à leur structure. Un biocapteur est constitué d'un élément biologique ou biorécepteur permettant la reconnaissance de l'analyte ciblé au sein d'un échantillon complexe. Cet élément biologique peut être de nature différente selon le capteur envisagé : anticorps, enzyme, ADN… La formation du complexe analyte/biorécepteur se traduit par une modification physico-chimique retranscrite par un transducteur en un signal mesurable. La mesure de ce signal peut être de différentes natures, et reposer sur des principes électrochimiques, optiques, thermiques ou massiques. Pour amplifier le signal, l'emploi de marqueurs tels des nanoparticules, des enzymes, des quantum dots (points quantiques) ou encore des molécules possédant des propriétés redox, contribue à améliorer les capacités de détection des transducteurs.

Depuis quelques années maintenant, les recherches menées au laboratoire LBBM-BAE se focalisent sur le développement de biocapteurs électrochimiques, qui combinent l'utilisation de biomolécules de reconnaissance et des méthodes électrochimiques de détection. Un intérêt particulier est consacré depuis quelques années à l'utilisation de molécules redox comme marqueurs électrochimiques de biomolécules, plus spécifiquement certains complexes métalliques habituellement utilisés comme sondes pour l'imagerie médicale et la bio-détection [5,6]. Cependant, malgré un grand nombre de travaux publiés dans le domaine de la bio-détection électrochimique, les complexes métalliques ne sont que rarement utilisés dans la conception de biocapteurs.

Ce travail de thèse s'est donc focalisé sur l'utilisation de complexes métalliques comme marqueurs électrochimiques pour le développement de biocapteurs. Dans un premier temps, des complexes métalliques ont été synthétisés à partir de ligands DOTA/NOTA, puis caractérisés par différentes méthodes électrochimiques (voltampérométrie cyclique, voltampérométrie à impulsion différentielle…) afin de définir leurs particularités en termes de réversibilité, de potentiels d'oxydation/réduction et de densité de courant [5]. Les complexes présentant les meilleures caractéristiques ont été sélectionnés comme potentiels marqueurs en vue de la conception de différents capteurs. Les molécules de reconnaissance choisies comme supports de ce marquage ont été des oligonucléotides. Ces derniers peuvent être utilisés aussi bien au sein de capteurs à ADN, basés sur l'hybridation d'acides nucléiques, que d'aptacapteurs, basés sur la reconnaissance de molécules cibles par des oligonucléotides spécifiquement sélectionnés. Ces biomolécules offrent plus d'avantages en termes de stabilité

que les anticorps ou les enzymes, habituellement utilisés dans des capteurs sensibles aux changements de pH et de température. Plus précisément, nous nous sommes intéressés dans ce travail à la détection d'ADN de bactéries du genre *Vibrio*, qui avait fait l'objet d'une précédente thèse [7], ainsi qu'à la détection par des aptamères de trois composés d'intérêt : l'ochratoxine A, le 17β-estradiol et l'aflatoxine M1. Dans une démarche similaire, des chercheurs du laboratoire ont précédemment décrit un aptacapteur, où des complexes métalliques salen/salan ont été fixés à des aptamères par liaison thiol-maléimide [8,9]. Les recherches menées dans cette thèse ont été largement inspirés de ces travaux.

Ce manuscrit de thèse est ainsi divisé en trois chapitres. Le premier chapitre consiste en une revue de la littérature, nécessaire à la compréhension du projet de thèse. Il débute avec une introduction générale sur les biocapteurs, les différents types de marquage utiles dans la transduction du signal, ainsi que l'utilisation de complexes métalliques comme élément de marquage des biocapteurs. Dans le chapitre suivant sont décrits les résultats expérimentaux concernant les synthèses des complexes métalliques de type DOTA et NOTA utilisés dans ce projet. Nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur leur caractérisation électrochimique, afin de définir les conditions optimales de leur utilisation dans un biocapteur. Le dernier chapitre est axé sur l'application de ces marqueurs à la construction de biocapteurs, et plus précisément sur leur greffage sur des oligonucléotides et des aptamères. Les résultats obtenus sont discutés de façon critique pour cerner et définir les pistes d'amélioration possibles, en conclusion générale de ces recherches.

CHAPITRE 1 : ÉTAT DE L'ART, BIOCAPTEURS ET MARQUEURS

1) INTRODUCTION

Afin de mieux appréhender le travail de recherche réalisé, nous expliquons dans ce chapitre certaines notions relatives aux biocapteurs. Nous revenons plus précisément sur leur composition, sur leur fonctionnement ainsi que sur les différents types de marqueurs existants.

2) GÉNÉRALITÉS SUR LES BIOCAPTEURS

Le concept de biocapteurs a été initié au siècle précédent avec les travaux pionniers de Leland Clark, docteur en biochimie à l'Université de Rochester. En 1962, il réussit à créer un capteur électrochimique mesurant la concentration de glucose dans le sang par le couplage d'une électrode à oxygène avec une membrane enzymatique renfermant de la glucose oxydase [10]. Ses recherches ont marqué le début du développement des biocapteurs, et ont facilité la vie de millions de personnes diabétiques qui ont pu suivre l'évolution de leur glycémie et ainsi mieux gérer leur diabète.

Le terme "Biocapteur" a été introduit en 1977, mais c'est seulement après que l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) établit la définition propre des biocapteurs [11]. Aujourd'hui, les biocapteurs ne se cantonnent plus seulement à la détection du glucose puisque de nouveaux dispositifs, utilisés pour une plus large gamme d'applications, ont vu le jour. En effet, ils servent par exemple au suivi d'analytes variés comme certains allergènes, mycotoxines, métaux lourds avec des débouchées dans l'industrie agroalimentaire, dans la médecine et dans le contrôle de l'état sanitaire des écosystèmes [12,13]. Le suivi de polluants dans l'environnement fait partie des applications visées par certaines industries et laboratoires de recherche universitaire, acteurs clés du développement des biocapteurs.

2.1) DÉFINITION

Selon l'IUPAC, un biocapteur est un dispositif intégré fournissant des informations spécifiques quantitatives ou semi-quantitatives, par le biais d'un élément de reconnaissance d'origine biologique en contact direct avec un élément de transduction [14,15]. Pour schématiser, un biocapteur est une combinaison de deux éléments : un biorécepteur qui assure la reconnaissance d'un analyte/cible spécifique, et un transducteur physique permettant de traduire la reconnaissance de la cible en un signal mesurable, ce dernier pouvant être ensuite amplifié et/ou traité. La formation d'un complexe entre le biorécepteur et la cible se traduit par différentes modifications physico-chimiques (pH, échanges d'électrons, transferts de masses ou de chaleur…) qui sont mesurées par le transducteur. Le traitement informatique du signal permet

de définir les informations généralement recherchées telles que la présence ou l'absence de la cible, la concentration de cette cible ou encore son affinité pour le biorécepteur (Figure 1).

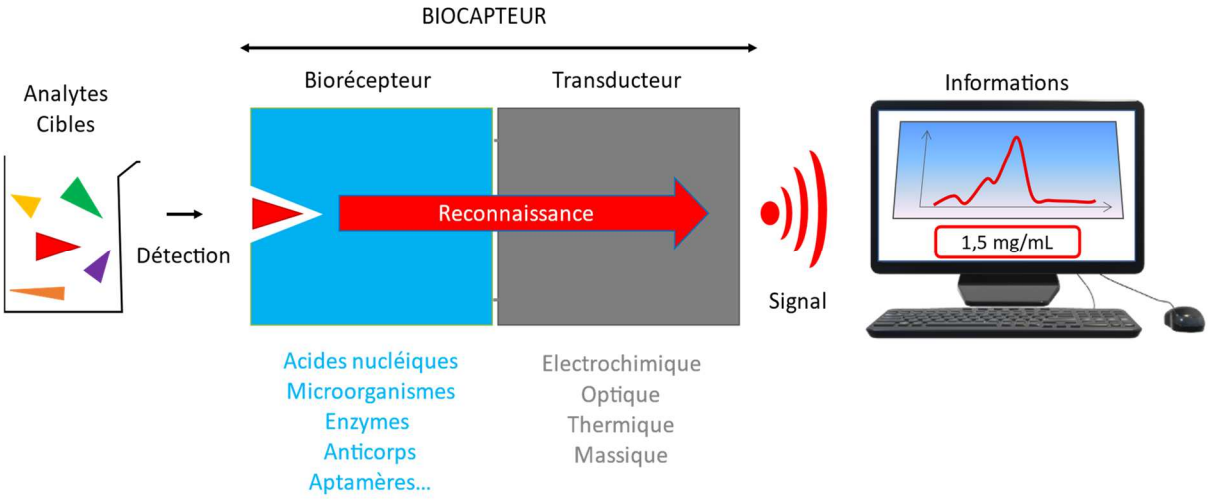


Figure 1: Représentation schématique d'un biocapteur

Afin d'améliorer la détection du signal, les propriétés du biocapteur et son environnement de mesure doivent être optimisés. Les performances des biocapteurs peuvent être exprimées par les principaux paramètres suivants :

- **La sélectivité :** se définissant comme la capacité à distinguer une cible précise dans un échantillon complexe, potentiellement constitué de nombreuses autres substances. Elle est notamment influencée par la spécificité de la réaction entre l'élément biologique et la cible ;
- **La limite de détection :** correspondant à la quantité minimale de cible pouvant être détectée par le biocapteur. Dans certains cas, pour satisfaire à des normes ou seuils autorisés, un capteur doit fonctionner avec des concentrations très faibles de cible, de l'ordre du nM ou du pM. La limite de détection est conditionnée par la sensibilité du capteur ;
- **La stabilité :** impliquant que les mesures du biocapteur restent précises et linéaires et ne soient pas perturbées par des éléments extérieurs (température, temps d'incubation, dégradation…) ;
- **La répétabilité :** signifiant l'obtention de résultats identiques par le même opérateur, dans le cas d'une expérience donnée. Cette notion est en relation avec la reproductibilité, qui concerne des résultats obtenus par des opérateurs différents avec le même matériel (par exemple dans deux laboratoires différents).

2.2) BIORÉCEPTEUR ET BIORECONNAISSANCE

Les biocapteurs se différencient des capteurs chimiques ou physiques car ils comportent un biorécepteur de forte affinité pour l'analyte que l'on souhaite quantifier [16]. Cette détection se fonde essentiellement sur les interactions biomoléculaires entre le récepteur et l'analyte. Suivant le type d'interactions, les éléments de bioreconnaissance (récepteurs) sont généralement divisés en deux catégories : les éléments catalytiques et les éléments d'affinité [17].

2.2.1) ÉLÉMENTS CATALYTIQUES

Parmi les biocapteurs catalytiques il est possible de distinguer deux classes selon le type d'éléments employés. La première classe met en jeu des phénomènes catalytiques entre enzymes et substrats. Le principe de fonctionnement repose sur la transformation de l'analyte/substrat pour créer un ou plusieurs produits (Figure 2). C'est cette transformation qui est détectée et suivie [18–20]. Les enzymes constituent, sans aucun doute, le biorécepteur le plus utilisé dans le développement de biocapteurs. L'attrait pour les enzymes résulte de la diversité des réactions qu'elles sont capables de catalyser, de la capacité à les exprimer et de disposer de quantités suffisantes sous forme pure. Par ailleurs, la possibilité de les modifier pour adapter leurs propriétés à leur cible, étend leur domaine d'utilisation. La connaissance précise de leurs mécanismes d'action, leur stabilité relative et les faibles coûts nécessaires pour les produire ont favorisé leur emploi dans les biocapteurs [20]. Les enzymes nécessitent, toutefois, de prendre des précautions lors de leur manipulation, car elles sont sensibles à leur environnement (pH, température…). Elles sont également limitées dans leur utilisation pour la détection de composés comme des substrats ou des inhibiteurs enzymatiques, ce qui réduit fortement le choix des substances potentiellement détectables par de tels systèmes.

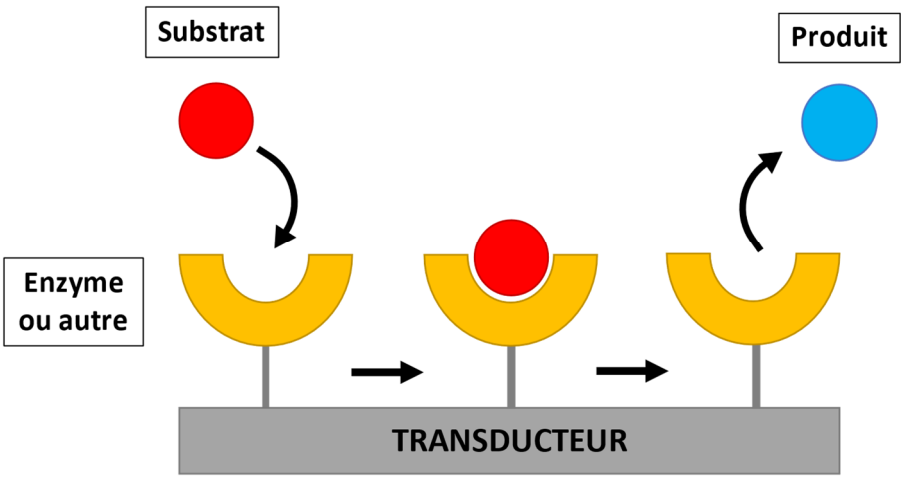


Figure 2: Fonctionnement général des récepteurs catalytiques

La seconde classe de biorécepteurs catalytiques est celle des micro-organismes, tels que les champignons, les bactéries ou encore les fragments de tissus organiques et cellulaires. Ils sont capables de métaboliser un substrat en un produit. Cette réaction conduit à une libération d'énergie mais aussi à la libération d'une molécule résiduelle, qu'il est possible d'analyser. Les capteurs comprenant ce type d'éléments sont moins performants que ceux à base d'enzymes, car les micro-organismes contiennent de nombreuses enzymes. La présence d'un grand nombre d'enzyme implique que de multiples réactions peuvent survenir et interférer avec la prise de mesure [21,22].

2.2.2) ÉLÉMENTS D'AFFINITÉ

Les biocapteurs basés sur une reconnaissance de l'analyte par bioaffinité se différencient des précédents du fait qu'aucune réaction de transformation catalytique n'a lieu. Les biorécepteurs d'affinité sont généralement des anticorps ou des composés synthétiques comme des aptamères. Ces biorécepteurs sont présentés dans les paragraphes suivants.

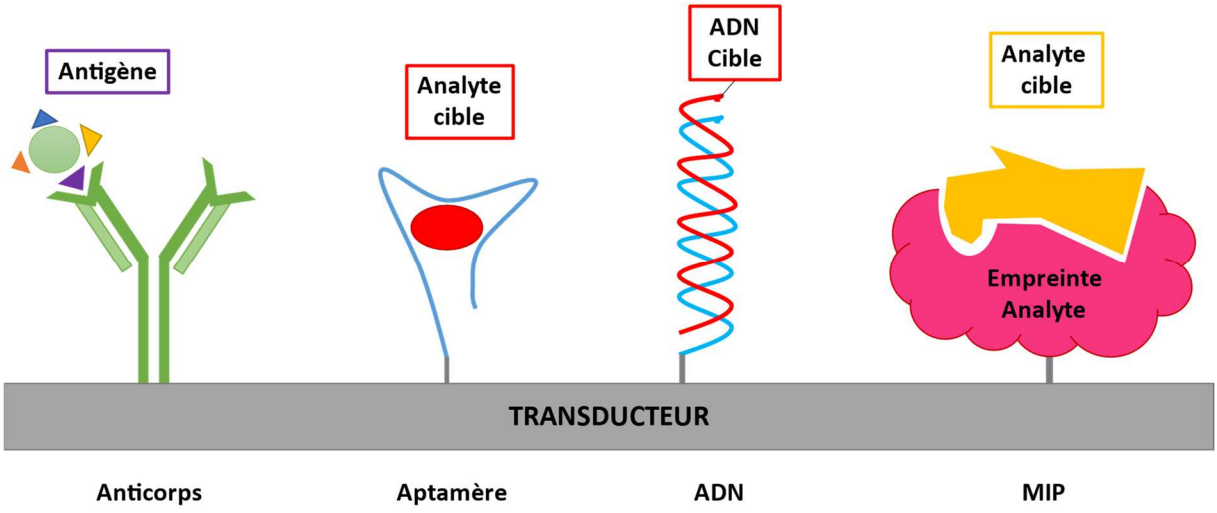


Figure 3: Représentation schématique de différents biocapteurs d'affinité

- **Anticorps**

Les anticorps sont des protéines immunoglobulines produites par un organisme en réponse à un agent pathogène. L'anticorps reconnaît généralement un déterminant antigénique exprimé à la surface du pathogène. Les anticorps se caractérisent par un arrangement tridimensionnel particulier des chaînes protéiques, souvent schématisés en forme de Y. Un anticorps comprend deux chaînes lourdes et deux chaînes légères liées entre elles par des ponts disulfures et se terminant par une région variable, appelée paratope. Cette région est responsable de la reconnaissance de l'épitope, une partie spécifique de l'antigène. La facilité relative de la

production des anticorps, leur forte sélectivité et affinité en font les biorécepteurs les plus utilisés dans la conception d'immunocapteurs (Figure 3).

Aujourd'hui, ce ne sont pas moins de 300 entreprises qui commercialisent près de deux millions d'anticorps que l'on peut classer en deux sous types : les anticorps monoclonaux qui sont très spécifiques car ils ne reconnaissent qu'un seul épitope de l'antigène, et les anticorps polyclonaux présentant une spécificité plus faible, mais pouvant se lier à plusieurs épitopes [9]. Les anticorps ont cependant de nombreux inconvénients. Contrairement à d'autres biomolécules, il faut près de six mois pour leur production. Cette dernière est coûteuse et difficile avec comme résultat final, un lot d'une qualité souvent variable et de conservation limitée. Ils sont aussi sensibles aux variations environnantes comme la température, le pH ou encore le type de solvant employé.

Par ailleurs, il faut noter que l'essor récent des nanocorps, issus d'anticorps de camélidés, a permis de s'affranchir partiellement des inconvénients liés aux anticorps conventionnels [23,24]. En effet, les nanocorps sont dix fois plus petits, ce qui leur permet de se fixer sur les antigènes cryptiques, peu accessibles. Ils présentent une meilleure stabilité chimique et thermique, une solubilité plus importante, et peuvent être plus facilement conjugués à des molécules d'intérêt thérapeutique ou analytique [25]. Un autre avantage important des nanocorps est leur facilité de production par génie génétique.

- **Oligonucléotides**

Les oligonucléotides sont constitués de courts segments d'ADN ou d'ARN simple brin qui entrent également dans la conception de biocapteurs. Ces oligonucléotides peuvent être utilisés dans des systèmes de reconnaissance basés sur l'hybridation (ADN-ADN ou ADN-ARN) ou sur la reconnaissance spécifique de molécules cibles. Ainsi, les aptamères sont de simples brins d'ADN ou d'ARN constitués généralement de 10 à plus de 100 nucléotides pouvant se replier en structures tridimensionnelles bien définies. Ces molécules ont un fort potentiel au niveau de la recherche, du fait de leur capacité à se lier à quasiment tout type de cible (petites molécules, bactéries, peptides, acides nucléiques, protéines, cellules…). Les aptamères sont synthétisés chimiquement puis sélectionnés *in vitro* par une méthode itérative appelée SELEX (évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel) [26,27] (Figure 3).

Le principe du SELEX est de sélectionner des aptamères à partir d'une banque d'oligonucléotides préétablie en les exposant à la molécule souhaitée (Figure 4). Les aptamères qui ont la capacité de se lier à cette cible sont séparées des autres oligonucléotides présents puis

amplifiés par PCR (réaction de polymérisation en chaîne). Ce procédé génère ainsi un nouveau groupe conséquent d'aptamères, qui est ensuite soumis une nouvelle fois au cycle de sélection. À l'issue de multiples cycles successifs de SELEX, les aptamères présentant les meilleures affinités pour la cible sont retenus.

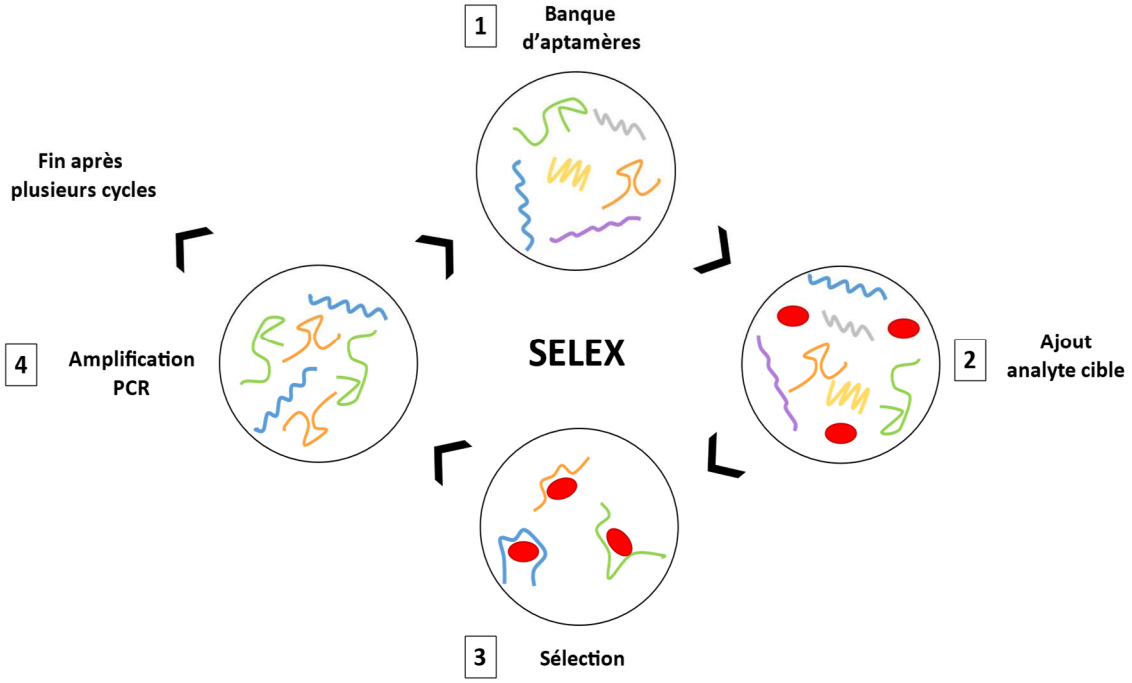


Figure 4: Représentation schématique de la méthode de sélection d'aptamères SELEX

Les aptamères possèdent de nombreux avantages par rapport aux anticorps du fait de leur meilleure stabilité chimique, leur résistance aux températures élevées, et leur facilité de production par synthèse en phase solide une fois sélectionnés. Un autre intérêt majeur des aptamères est lié à la possibilité de les modifier, en introduisant différents groupes fonctionnels permettant leur immobilisation sur différents supports ou leur marquage à des fins de détection. En fonction du type de marqueur utilisé (enzyme, fluorochrome...), les aptamères peuvent être incorporés dans des biocapteurs à détection optique ou électrochimique.

Il est aussi possible d'utiliser des analogues de nucléotides comme les LNA (acides nucléiques bloqués) et les PNA (acides nucléiques peptidiques). Il s'agit d'oligonucléotides synthétiques qui ont été modifiés pour accroître leur affinité/spécificité envers leurs brins d'ADN/ARN complémentaires et ainsi, améliorer leurs caractéristiques physicochimiques (solubilité, résistance à la température) [17,28–31]. Les acides nucléiques bloqués (LNA) diffèrent des oligonucléotides classiques par la présence d'un pont méthylène entre l'hydroxyle en position 2' et l'atome de carbone en 4' du ribose (Figure 5). Ils présentent une grande capacité

d'hybridation et une très forte stabilité thermique ; leur utilisation est particulièrement intéressante pour des applications où l'hybridation à de courtes séquences est nécessaire [31].

Les acides nucléiques peptidiques (PNA) sont des analogues dans lesquels les liaisons phosphodiesters sont remplacées par une chaîne pseudo-peptidique (Figure 5). Du fait de cette structure, les molécules de PNA ne sont pas chargées et s'apparient aux séquences d'acides nucléiques avec une remarquable affinité et une très forte spécificité. De plus, les PNA présentent une forte stabilité et une excellente résistance aux protéases et aux nucléases [32,33].

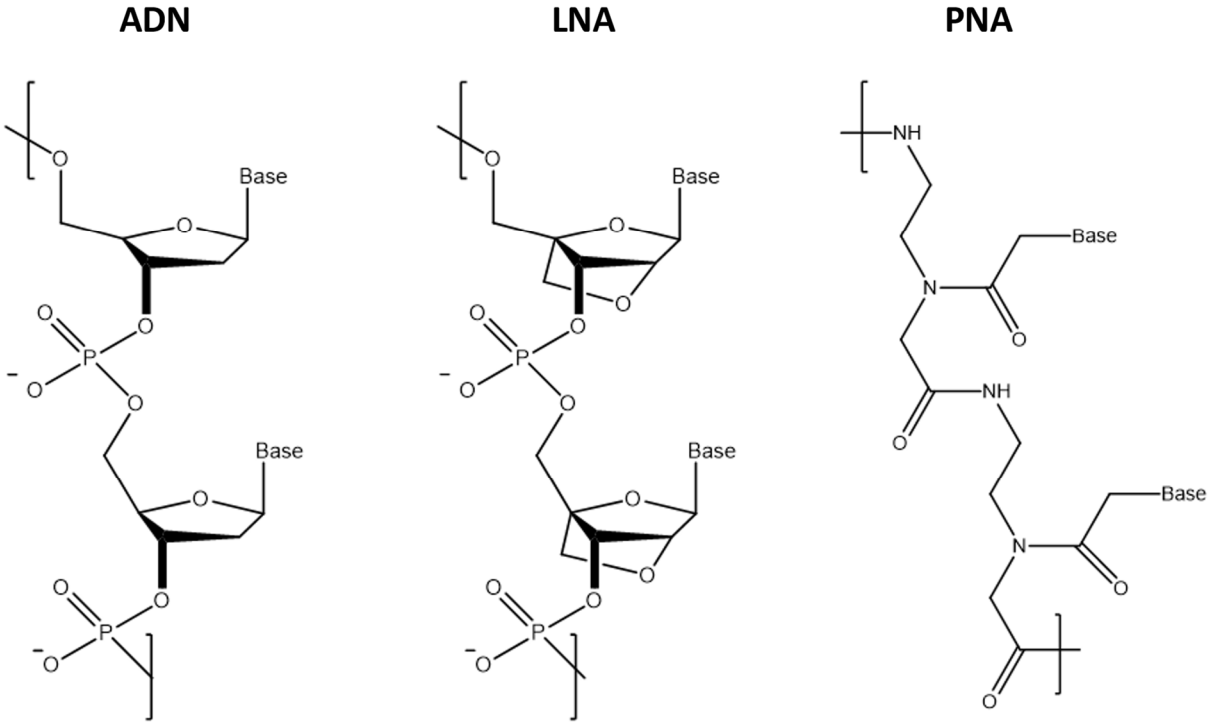


Figure 5 : Structures comparatives d'oligonucléotides d'ADN, de LNA et de PNA

- **Polymère à Empreinte Moléculaire (MIP)**

Les MIPs sont des matrices polymériques synthétiques comprenant des sites de reconnaissance artificiels qui imitent les récepteurs naturels. L'empreinte moléculaire est conçue en préparant le polymère en présence de l'analyte que l'on souhaite détecter. Ce « moule » de l'analyte dispose des caractéristiques d'un site de liaison complémentaire par sa taille, sa forme et la présence de groupements fonctionnels ayant des interactions faibles avec l'analyte (Figure 3). Contrairement aux polymères biologiques tels que les protéines et les oligonucléotides, les MIPs peuvent être obtenus à faible coût et sont très stables chimiquement. En revanche, ils sont généralement beaucoup moins performants que les anticorps et les aptamères en termes de spécificité et de sélectivité. D'importants efforts de recherche sont actuellement consacrés à l'amélioration des propriétés de reconnaissance des MIPs, notamment par l'utilisation de monomères originaux [34,35].

Les biorécepteurs constituent une partie essentielle des biocapteurs. Cependant, leur performance globale dépend aussi de la qualité de leur transducteur qui doit être capable de transmettre le signal détecté, sans perte ni détérioration. L'immobilisation des biorécepteurs sur le transducteur peut également affecter les performances des biocapteurs. Ces différents aspects sont abordés dans la sous-section suivante.

2.3.3) TECHNIQUES D'IMMOBILISATION

Le biorécepteur doit être fixé à la surface du capteur afin de favoriser la transduction du signal issu de la reconnaissance spécifique. Cette immobilisation doit être réalisée dans des conditions préservant l'intégrité du biorécepteur et, donc sa capacité de reconnaissance de la cible étudiée [36]. Les principales méthodes développées sont les suivantes (Figure 6) :

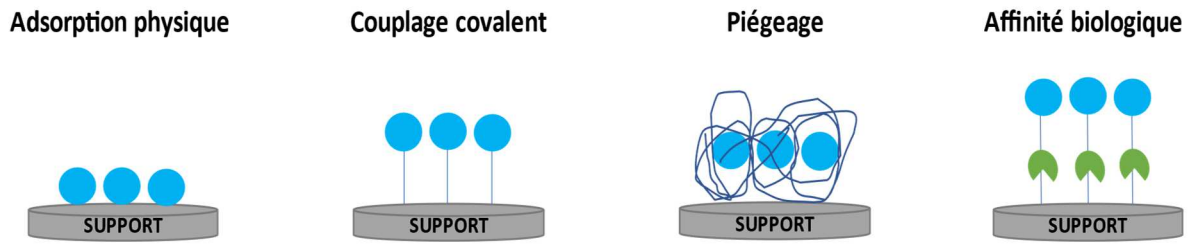


Figure 6: Représentation schématique de différentes techniques d'immobilisation des biorécepteurs

- **L'adsorption physique :** Il s'agit de la technique la plus simple car elle nécessite peu de réactif et n'implique pas d'agent de couplage. Les biorécepteurs sont déposés à la surface du transducteur et l'adsorption se fait de façon passive. Les caractéristiques physicochimiques du biorécepteur (caractère hydrophobe) et du support (rugosité, porosité…) conditionnent l'efficacité de l'adsorption. Les interactions de type *Van der Waals*, ioniques, polaires, hydrogènes, qui s'établissent entre la surface et le biorécepteur, permettent son maintien sans création de liaisons covalentes [37]. L'un des problèmes de cette méthode est qu'il n'est pas possible de savoir comment les biorécepteurs sont positionnés à la surface et s'ils demeurent accessibles pour reconnaître la cible. De plus, les changements de pH, de salinité, de solvant lors des étapes de lavage peuvent conduire à une désorption du biorécepteur [38];

- **Le piégeage :** C'est une technique qui repose sur le confinement du biorécepteur au sein d'une structure tridimensionnelle. Cette structure ou matrice de piégeage peut utiliser différents matériaux comme des gels insolubles et organiques, des polymères ou des matériaux composites [39,40]. Une fois déposée sur le transducteur, la matrice piège les

biorécepteurs mécaniquement sans liaisons chimiques. Les matériaux sont normalement assez poreux pour permettre les interactions avec les analytes, tout en assurant la rétention des récepteurs ;

- **L'immobilisation par affinité :** Cette technique utilise différentes affinités entre des biomolécules complémentaires pour assurer l'immobilisation des biorécepteurs. La reconnaissance anticorps-antigène ou celle de l'enzyme et du substrat sont des exemples de ces affinités. Il est aussi possible de fonctionnaliser le biorécepteur pour créer l'affinité souhaitée. Ainsi, des molécules fonctionnalisées par des groupements comme la biotine sont souvent retrouvées dans le commerce. Le couplage avidine-biotine est couramment utilisé dans le marquage de molécules d'intérêt ; de nombreux travaux ont été à l'origine du succès de cette technique [41,42].

- **Le couplage covalent :** L'immobilisation par liaisons covalentes est réalisée par une fonctionnalisation au préalable de la surface du transducteur. En effet, selon la nature de la surface (or, carbone, platine…), des groupements fonctionnels sont activés afin d'être couplés à ceux situés sur les biorécepteurs. Des fonctions amines, carboxyliques ou encore esters sont souvent mises à contribution [21,43,44]. L'avantage de cette technique provient de la stabilité de la liaison créée entre le récepteur et le support. Les liaisons covalentes apportent une forte immobilisation des biorécepteurs ainsi qu'une augmentation de la durée de vie du biocapteur.

Nous avons pu voir dans cette sous-section les différentes techniques d'immobilisation avec leurs avantages et inconvénients. Certaines d'entre elles sont simple d'utilisation mais ne permettent pas une bonne immobilisation ou sélectivité ; d'autres obtiennent une bonne immobilisation mais les récepteurs peuvent être dénaturés par les réactifs employés. Ainsi, le choix de la technique d'immobilisation dépend de la nature des biorécepteurs et de l'application visée. Pour cette thèse, le couplage covalent a été privilégié car il confère une plus grande stabilité au biocapteur, et se trouve être plus versatile en raison des multiples fonctionnalisations disponibles pour fixer les récepteurs.

2.3) TRANSDUCTEURS

Les biorécepteurs sont une partie importante d'un biocapteur. Toutefois, la performance d'un biocapteur se caractérise avant tout par une bonne concordance entre le biorécepteur et le

transducteur. Ce dernier permet la transformation du signal de reconnaissance de la cible en un signal mesurable. Le transducteur est choisi en fonction du type de signal, résultant de l'interaction entre le biorécepteur et l'analyte ciblé. C'est lui qui détermine la nature de la détection, la stabilité ou encore la reproductibilité des mesures. Chaque transducteur possède sa propre méthode de transduction, ce qui amène à classer les biocapteurs en différentes catégories, représentatives du phénomène physico-chimique mis en jeu.

- **Transducteurs optiques**

Les transducteurs optiques permettent de mesurer des phénomènes d'absorption, de fluorescence, de luminescence, ou de résonance de plasmons de surface [45–47]. Ils sont généralement constitués de réseaux de fibres optiques dont la configuration dépend du mode de détection utilisé. Les biocapteurs colorimétriques sont les capteurs optiques les plus largement étudiés en raison de la facilité de détection par changement de coloration lors de l'ajout d'analyte cible durant les mesures [48].

- **Transducteurs piézoélectriques**

Les transducteurs piézoélectriques sont capables de détecter les variations infimes de masse en employant les caractéristiques piézoélectriques du matériau utilisé (quartz…). Le principe de fonctionnement se base sur la mesure des changements de fréquence d'oscillation d'un cristal piézoélectrique en fonction de la masse déposée à la surface du cristal [49]. Leur inconvénient est qu'ils présentent une faible sélectivité à cause de l'influence d'interactions non spécifiques. Ils nécessitent également des conditions de mesures très stables, ce qui rend difficile leur application sur le terrain d'analyse. L'exemple le plus connu de ce genre de capteur est la microbalance à cristal de quartz, sur laquelle de nombreuses études ont été menées [50,51].

- **Transducteurs thermiques**

Les transducteurs thermiques permettent de mesurer l'échange de chaleur lors d'une réaction chimique [52]. Ils utilisent la variation de chaleur dégagée due à la réaction biochimique entre biorécepteurs et analytes. Pour ce faire, les instruments généralement utilisés sont des microcalorimètres ou des résistances thermiques. Les points positifs de ce type de biocapteur sont leur rapidité de réponse, leur fiabilité de mesure et leur insensibilité aux produits dérivés de la réaction ainsi qu'aux propriétés de l'analyte. Cependant, ils ne sont applicables qu'à un nombre limité de réactions. D'autre part, leur coût est assez élevé du fait de la complexité du système à mettre en place [53].

- **Transducteurs électrochimiques**

Les transducteurs électrochimiques sont les plus populaires. Ces dispositifs permettent la transduction de réactions chimiques en signaux électriques mesurables [15,54]. L'intérêt pour ces capteurs vient de leur facilité d'utilisation, simplicité de construction et leur faible coût [53]. Ils sont généralement construits sur un dispositif à trois électrodes :

- Une électrode de travail sur laquelle le biorécepteur est immobilisé ;
- Une électrode de référence servant à fixer le potentiel ;
- Une contre électrode permettant le passage du courant dans le système pour minimiser celui passant par l'électrode de référence.

Ces capteurs sont classés en trois grandes catégories selon les méthodes de mesures utilisées [55,56] :

- Les biocapteurs potentiométriques mesurant la différence de potentiel ;
- Les biocapteurs ampérométriques mesurant l'intensité d'un courant d'oxydation ou de réduction à un potentiel donné ;
- Les biocapteurs conductimétriques mesurant les changements de conductivité du milieu étudié.

Les méthodes de mesure/détection les plus utilisées mettent en jeu des techniques de ampérométriques comme la (chrono)ampérométrie, la voltampérométrie à ondes carrées (SWV) ou encore la voltampérométrie à pulsation différentielles (DPV).

2.4) PROBLÉMATIQUE DU MARQUAGE

Une manière supplémentaire de classer les biocapteurs est de savoir s'ils fonctionnent ou non avec une amplification du signal de détection. Les capteurs n'ayant pas recours à un marquage, qualifiés de « label-free sensors », mettent à profit les propriétés physicochimiques des analytes (poids moléculaire, taille, charge, impédance…) pour détecter leur présence dans un échantillon étudié. La détection se fait généralement par des techniques optiques ou électrochimiques [57,58]. Ils constituent la classe la plus simple et la moins coûteuse de biocapteur, car aucune modification chimique préalable de l'élément de bioreconnaissance ou de l'analyte n'est nécessaire. Toutefois, ils présentent un seuil de détection limité et un champ d'application restreint, car ils s'appuient sur les propriétés physicochimiques des partenaires entrant en

interaction. Ces limitations conduisent à la nécessité d'utiliser des marqueurs dans les biocapteurs.

Les capteurs avec amplification de signal se caractérisent par la présence de marqueurs, ils sont souvent qualifiés de « label-based sensors ». Les marqueurs sont des composés qui produisent ou renforcent un signal de détection. Cette amélioration du signal de reconnaissance permet d'étendre la gamme de détection du capteur, et de favoriser la quantification de la substance cible [59–61]. Les marqueurs sont parfois utilisés sous leur forme libre, mais ils sont le plus souvent attachés de manière covalente au biorécepteur ou à la molécule cible. Ils peuvent être de natures différentes, et donc être combinés à de nombreuses techniques de détection telles que la fluorescence [58,62] et l'électrochimie [63,64], mais aussi la chimiluminescence [58,65] et la radioactivité [66,67]. L'utilisation de composés marqués implique des étapes de modification fastidieuses et coûteuses. Heureusement, ces inconvénients peuvent être corrigés par une optimisation rigoureuse des étapes de conception des capteurs.

Les biocapteurs utilisant des marqueurs sont préférés aux biocapteurs sans marqueurs car ils présentent une grande diversité et sont plus modulables. Ce travail de thèse a donc pour objectif de mettre au point une méthode de marquage électrochimique simple et performante, adaptable à de nombreux biocapteurs d'affinité.

3) BIOCAPTEURS ÉLECTROCHIMIQUES À BASE D'OLIGONUCLÉOTIDES

3.1) PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT

L'utilisation d'oligonucléotides dans les capteurs électrochimiques fait l'objet de nombreuses recherches, avec des applications dans le contrôle de l'agroalimentaire/environnement ainsi que dans la surveillance de résidus polluants présents dans les cours d'eau.
Chez ces biocapteurs, le biorécepteur est constitué d'oligonucléotides ou d'aptamères capables de reconnaître spécifiquement l'analyte complémentaire par hybridation (génocapteurs) ou par affinité (aptacapteurs). Ces simples brins d'ADN adoptent des conformations particulières qui dépendent des conditions expérimentales engagées, et de leur structure intrinsèque [68]. Dans le cas des aptacapteurs, la détection est basée sur le changement conformationnel induit par la fixation de l'analyte sur l'aptamère [69]. Cette détection peut dans certains cas être réalisée sans marquage, mais ce dernier est souvent nécessaire afin d'améliorer la sensibilité de la détection. Il est alors possible de procéder à une détection directe ou indirecte (par compétition).

Similairement aux label-free sensors, les génocapteurs/aptacapteurs électrochimiques sans marquage s'appuient sur les propriétés physicochimiques de la cible, et sur les changements du signal induits par sa fixation à la surface du transducteur. Il est alors possible de mesurer, par exemple, le changement de résistance de transfert d'électrons à la surface. Ce sont alors des mesures de spectroscopie d'impédance électrochimique qui sont effectuées, en présence d'un médiateur électrochimique soluble tel que le couple ferri/ferrocyanure $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ (Figure 7). D'autres techniques électrochimiques peuvent être utilisées pour évaluer ce transfert d'électrons, comme la voltampérométrie.

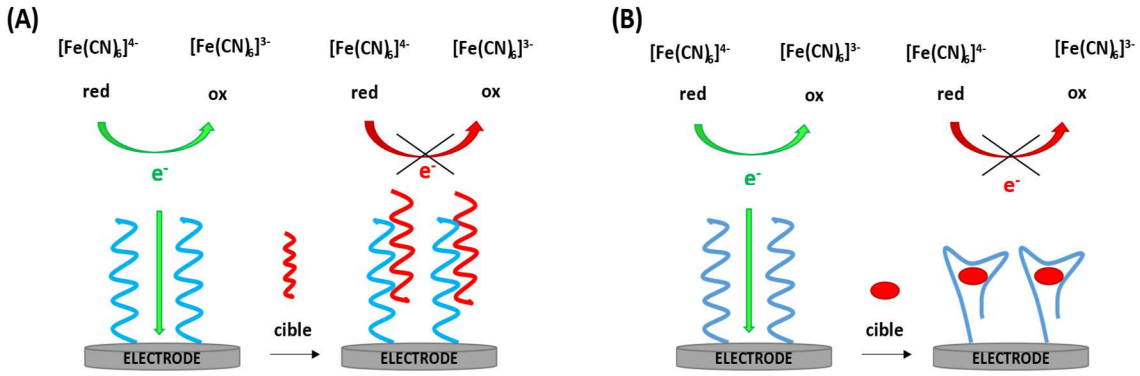


*Figure 7 : Exemples du fonctionnement sans marquage et par impédance d'un génocapteur **(A)** et d'un aptacapteur **(B)***

L'utilisation d'oligonucléotides marqués par un composé électroactif est pertinente afin d'améliorer le signal résultant de la fixation de la cible. Celle-ci peut induire, selon les cas, une apparition/augmentation (signal ON) ou bien une disparition/diminution (signal OFF) du courant mesuré. Ces variations de signaux dépendent de la structure ainsi que des éléments impliqués dans la conception du capteur. Plus précisément, selon la nature du biorécepteur et le marquage employé (covalent ou non), différentes conceptions de biocapteurs sont possibles [70]. Dans le cas d'utilisation de marqueurs non covalents (marqueurs redox principalement), ces derniers sont fixés indirectement sur le capteur. Ils s'intercalent ou interagissent avec les biorécepteurs par des interactions électrostatiques.

Tang et al [71] par exemple, ont mis en place un aptacapteur électrochimique à base de bleu de méthylène (MB) pour la détection de la dopamine. Une électrode a donc été recouverte d'un film de sphères creuses de carbone (hollow carbon sphere), fonctionnalisées pour immobiliser les aptamères à leur surface. Intercalé dans les aptamères, le MB améliore la sensibilité du capteur En effet, la présence du MB permet de générer un signal mais aussi de doubler par interaction π-π, l'absorption de molécules de dopamine au niveau des aptamères (Figure 8A). Un autre aptacapteur, décrit par *Feng et al* en 2008, exploite les interactions entre marqueurs et acides nucléiques pour la reconnaissance de molécules d'adénosine [72]. Précisément, un

aptamère spécifique de l'adénosine est hybridé avec une sonde ADN immobilisée à la surface du capteur. Des marqueurs électroactifs de MB viennent ensuite interagir avec ce nouveau complexe double brin et générer un signal. Lors de l'ajout de la cible sur le capteur, le complexe se dissocie et l'aptamère spécifique se lie à l'adénosine. En conséquence, la quantité de MB qui été piégée diminue, induisant une baisse du signal mesuré (Figure 8B).

Dans la même optique de fonctionnement, un aptacapteur a été élaboré fonctionnant sur le piégeage de MB parmi les séquences d'aptamères [73]. Ce capteur présentant un complexe aptamère-sonde ADN, piège des molécules de MB. Un échange d'électron s'opère entre le marqueur et la surface d'électrode, générant ainsi un signal. Lorsque le capteur est en présence de sa cible, le changement de conformation des aptamères libère les molécules de MB, et le brin d'ADN complémentaire. Le signal mesuré diminue alors jusqu'à complètement s'éteindre (Figure 8C).

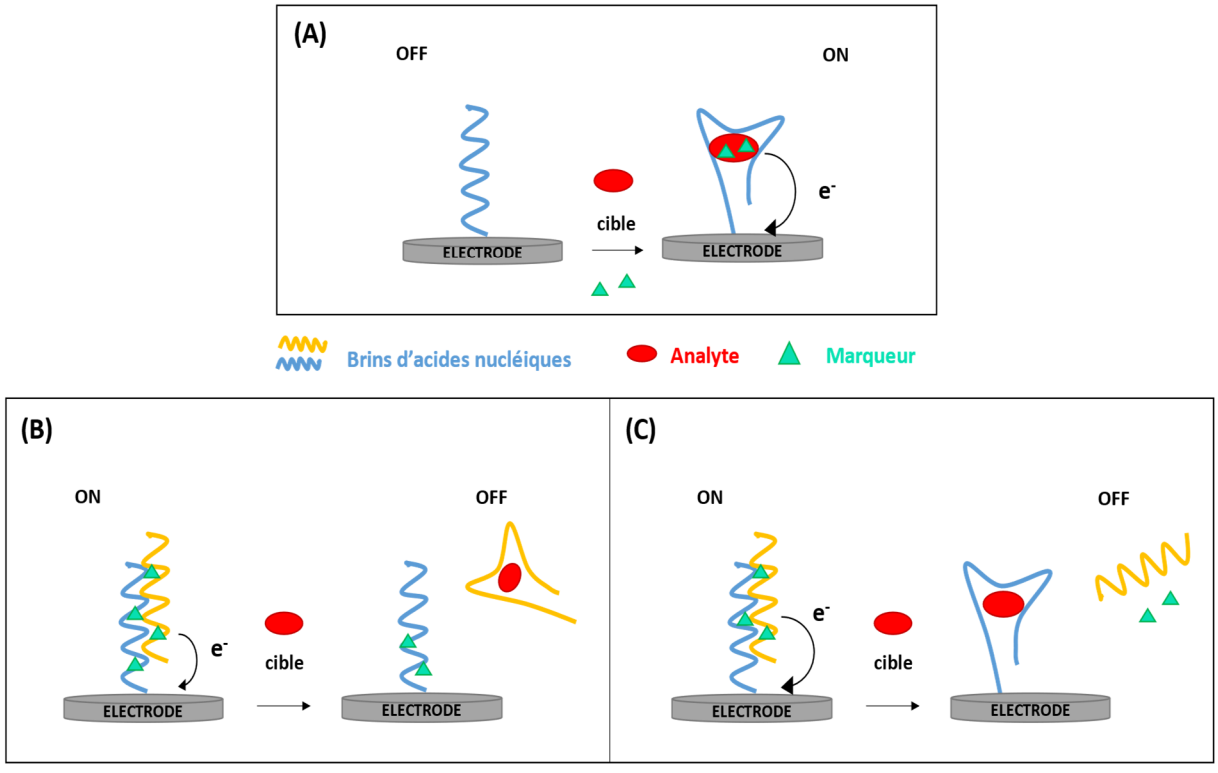


Figure 8 : Exemples de designs d'aptacapteurs électrochimiques avec marqueurs non covalents : marqueurs interagissant avec le complexe aptamère-cible ***(A)****, marqueurs interagissant avec des brins d'acide nucléique* ***(B)****, marqueurs intercalés* ***(C)***

La seconde catégorie correspond aux biocapteurs utilisant des marqueurs permettant de réaliser la mesure et parfois d'amplifier le signal. Ces marqueurs peuvent être des enzymes, des nanoparticules, des nanomatériaux ou encore des composés redox directement conjugués à l'oligonucléotide/brin complémentaire. Le marquage covalent d'oligonucléotides se fait généralement aux extrémités des aptamères en 5' ou 3' via des groupements espaceurs fonctionnalisés. L'espaceur peut être constitué d'une chaîne carbonée dont le rôle est d'éloigner

le marqueur de la zone de liaison de l'aptamère afin de ne pas gêner le repliement de ce dernier autour de la cible. Les groupements permettant de lier l'aptamère et le marqueur sont très variés. Ils sont généralement de réactivité complémentaire pour réaliser la conjugaison. Les couples de réactifs les plus employés sont le maléimide/thiol ; alcyne/azide ; ester de NHS/amine. Les systèmes de détection, eux, se basent sur différents principes de fonctionnement comme le changement de conformation de l'aptamère induit par la liaison à sa cible, le déplacement de brin ou encore la capture de la cible en sandwich.

Pour exemple, un aptacapteur électrochimique de type sandwich pour les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* a été reporté par *Abedi et al.* [74]. Sur des électrodes sérigraphiées, des aptamères ont été immobilisés en tant que sondes capture. Une fois la cible hybridée aux sondes capture, un aptamère marqué avec des nanoparticules d'argent vient la prendre en sandwich, et produire un signal (Figure 9A).

En 2016, *Wu et al* [75] se servent des propriétés de changement de conformation d'un aptamère pour le suivi dans l'environnement d'un polychlorobiphényle, le PCB77. Le capteur utilisé met en œuvre un aptamère conjugué à un marqueur électroactif de ferrocène pour amplifier le signal. En présence de PCB77, l'aptamère se replie pour piéger les molécules cibles. Se faisant, le marqueur de ferrocène se rapproche de la surface de l'électrode déclenchant ainsi un échange d'électron entre les deux (Figure 9B).

Une autre étude, réalisée par *Zuo et al,* décrit un aptacapteur employant la stratégie du déplacement de brin d'ADN pour la reconnaissance d'adénosine triphosphate (ATP) [76]. Un aptamère marqué par du ferrocène est hybridé avec un brin complémentaire sur une électrode d'or. En présence de cible ATP, le brin complémentaire est libéré de l'aptamère, qui lui se replie sur sa nouvelle cible. Le marqueur de ferrocène se rapproche alors de la surface de l'électrode, facilitant un transfert d'électrons. Cela provoque l'apparition de signaux électrochimiques mesurables pour la quantification de l'ATP (Figure 9C). Ce principe de fonctionnement peut aussi s'appliquer dans le cas inverse, comme dans les travaux de *Yoshizumi et al* en 2008 [77] où, cette fois, le déplacement de brin fait diminuer le signal électrochimique (Figure 9D).

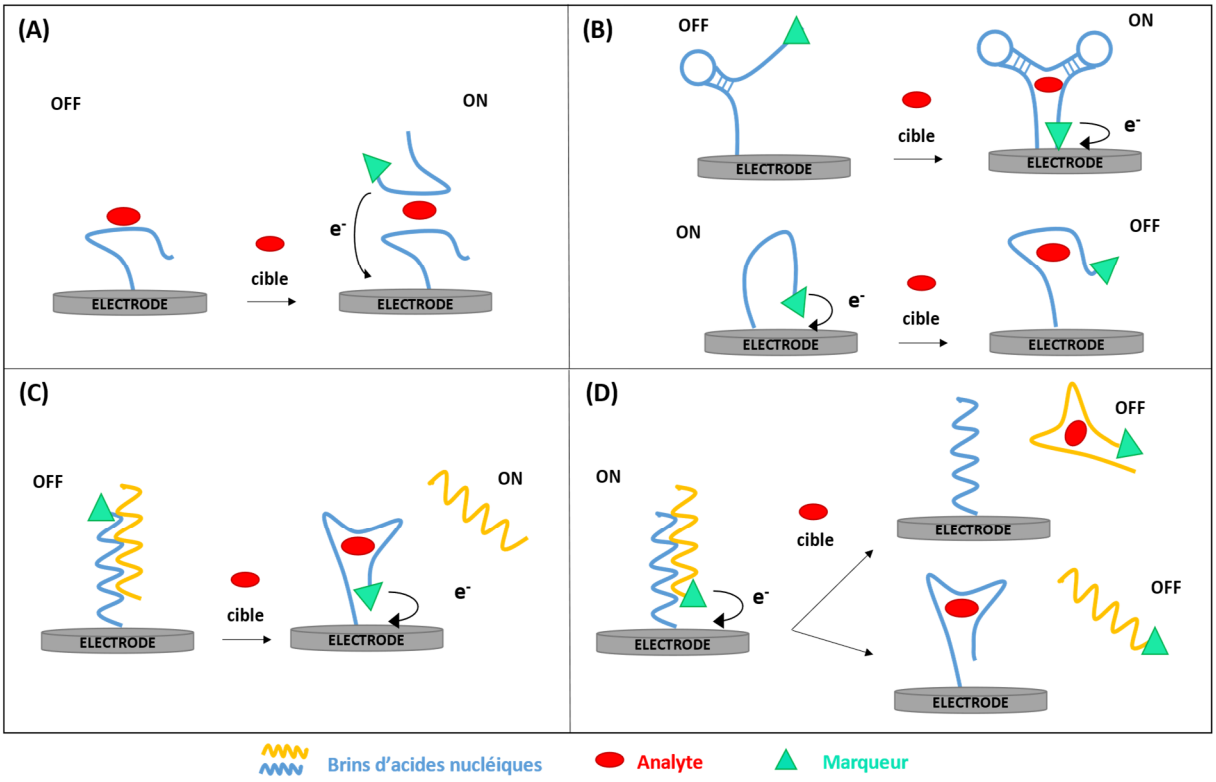


*Figure 9 : Exemples de designs d'aptacapteurs électrochimiques avec marqueurs covalents : détection en sandwich **(A)**, détection avec changement de conformation de type « signal ON » et « signal OFF » **(B)**, détection avec déplacement du brin non marqué **(C)**, détection avec déplacement du brin marqué **(D)***

3.2) MARQUEURS CONVENTIONNELS

Les méthodes de marquage utilisées dans le développement de capteurs électrochimiques mettant en jeu des oligonucléotides sont extrêmement variées. Elles dépendent du type de capteur (génocapteur ou aptacapteur), de la nature de la cible et également des caractéristiques du transducteur que l'on envisage d'utiliser. Nous nous sommes focalisés ici sur les principaux types de composés utilisés comme marqueurs.

3.2.1) ENZYMES

Les enzymes, initialement utilisées dans des capteurs enzymatiques pour la détection de substrats et d'inhibiteurs, ont également été utilisées comme éléments de marquage. Elles le sont toujours aujourd'hui, malgré l'apparition de nouveaux marqueurs fluorescents et le développement des nanomatériaux [10]. Les marqueurs enzymatiques sont très prisés en raison de leur polyvalence, de leur remarquable capacité d'amplification du signal, de la possibilité de les associés à de nombreuses macromolécules et à de différentes techniques de détections (fluorescence, luminescence, électrochimie, colorimétrie…) [78,79]. Bien que l'activité des enzymes soit affectée par la température, le pH, l'humidité et certains produits chimiques, elles

restent des catalyseurs intéressants pour la construction de biocapteurs. En effet, les enzymes ont été très utilisées pour le développement d'immunocapteurs optiques ou électrochimiques, dont le principe est inspiré du modèle des immunoessais à marquage enzymatique (ELISA). La peroxydase de Raifort (HRP) et la phosphatase alcaline (ALP) sont parmi les enzymes principalement utilisées comme marqueurs. La stabilité de ses enzymes, leur propriété d'amplification du signal, ainsi que leur capacité à générer des produits facilement détectables en font des composés d'intérêts [80,81].

3.2.1.1) PEROXYDASE DE RAIFORT (HRP)

En 1989, *Tatsuma et al* [82] ont rapporté la première utilisation de l'HRP sur des électrodes modifiées d'oxyde d'étain pour la détection de glucose et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L'HRP est une enzyme isolée des racines de raifort (*Amoracia rusticana*). Appartenant au groupe des ferriprotoporphyrines des peroxydases, elle se décrit comme un polypeptide à chaîne unique contenant quatre ponts disulfure. Cette enzyme est souvent impliquée dans la construction de biocapteurs à H_2O_2 de par sa capacité de catalyser l'oxydation de substrats organiques ou non, par réaction avec le H_2O_2 [78,79,83]. Elle peut être conjuguée à plusieurs types de protéines comme des anticorps ou de l'avidine, ce qui en fait un bon matériau pour l'utilisation de méthodes électrochimiques et pour la modification d'électrode. *Shen et al* [84] ont par ailleurs développé un biocapteur électrochimique pour la détection de la thrombine, basé sur un complexe d'aptamère/nanoparticules d'or/HRP. Dans ce capteur, un brin d'ADN hybridé au complexe d'aptamère/nanoparticules d'or/HRP, est immobilisé sur une électrode d'or. En présence de la cible thrombine, le complexe se dissocie du brin d'ADN pour venir se lier à la cible par l'aptamère. En conséquence, la quantité de HRP présente à la surface de l'électrode diminue, ce qui induit une baisse de signal électrochimique.

L'HRP est le marqueur enzymatique le plus recherché, car il s'agit de l'enzyme la plus petite et la plus stable parmi les plus utilisés dans la construction de biocapteurs.

3.2.1.2) PHOSPHATASE ALCALINE (ALP)

L'ALP est une enzyme qui catalyse la déphosphorylation (élimination des groupements phosphate) des biomolécules et des acides nucléiques nécessaires au maintien du métabolisme des organismes vivants. Cette enzyme est devenue un moyen indispensable pour le suivi de nombreuses maladies (tumeurs, cancers, diabète…) de par sa présence dans chaque partie du corps humain (tissus intestinaux, rénaux, osseux…) [79,85,86]. Souvent utilisée dans le domaine médical, elle est aussi employée dans les biocapteurs. *Papamichael et al* [87] ont justement décrit

un aptacapteur pour la détection d'immunoglobuline E (IgE). Le système fonctionne avec des électrodes où sont immobilisés des aptamères spécifiques à l'IgE. Ces aptamères sont conjugués à un marqueur phosphatase alcaline-extravidine. Après hybridation de l'aptamère à la cible, l'activité de l'enzyme est mesurée par voltampérométrie.

3.2.2) NANOMATÉRIAUX

Au cours des dernières années, les nanomatériaux sont devenus de plus en plus importants dans la recherche et le développement de biocapteurs. En effet, les nanomatériaux évoluent à une échelle de taille plus petite, leurs propriétés (masse, volume, transfert…) différant des matériaux communs. Dans certains cas ils peuvent être avantageux comme marqueurs pour amplifier les signaux de détection dans les capteurs. Voici quelques exemples de familles de nanomatériaux, à savoir les quantum dots, les nanoparticules ou encore les nanomatériaux de carbone.

3.2.2.1) QUANTUM DOTS

Les quantum dots ou points quantiques (QDs) sont des assemblages d'atomes formant des nanocristaux semi-conducteurs. La taille de ces semi-conducteurs est comprise entre 2 et 10 nm ; ils possèdent des propriétés optiques et électriques uniques, supérieures à certains marqueurs classiques [86]. De nombreux types de QDs se distinguent en fonction de leur taille, leur forme, leur noyau et les ligands qu'ils emploient. Il est cependant possible de les classer selon leurs structures. Deux familles existent : les quantum dots à cœur (core-type QDs) et les quantum dots à cœur-coquille (shell-core types QDs) (Figure 10).

Chaque QD possède un cœur qui établit ses propriétés principales. Deux catégories d'éléments composent ces cœurs [88,89]. La première catégorie comprend les éléments du groupe III (bore, aluminium) à V (azote, phosphore) du tableau périodique. La deuxième catégorie correspond aux éléments du tableau périodique du sous-groupe II (zinc, cadmium) ainsi que les éléments principaux du groupe VI (sélénium, oxygène) [90]. Les cœurs les plus rencontrés incluent du cadmium, de l'indium ou du carbone généralement enfermé par des chalcogénures (séléniures, tellurures ou encore sulfures).
La famille des QDs à cœur-coquille a émergé en raison de l'instabilité et de la détérioration des QDs à cœur. L'addition d'une coquille protectrice placée autour du cœur remédie effectivement à certains des inconvénients cités. Cette coquille permet de protéger le cœur des QDs tout en

réduisant leur toxicité, de diminuer leur capacité oxydative et d'augmenter leur résistance au blanchiment. Elle sert également de surface de liaison à diverses molécules (ions métalliques, anticorps, ligands peptidiques, polymères et MIP) qui améliorent ou modifient les propriétés des QDs. Ces fonctionnalisations de surface leur attribue une meilleure stabilité, solubilité et leur permet d'avoir des interactions spécifiques avec plusieurs facteurs environnementaux [88,91–93].

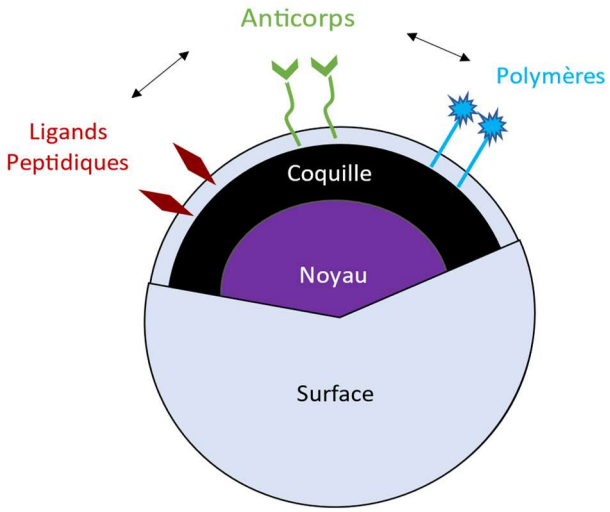


Figure 10: Représentation schématique de la structure d'un quantum dot avec coquille et différents exemples de modification de surface

Les propriétés physicochimiques des QDs en font des matériaux d'intérêt comme marqueurs dans les biocapteurs [94,95]. Les capteurs basés sur ces nanomatériaux offrent une sensibilité et une sélectivité élevées pour détecter divers analytes.

La fluorescence des QDs est certainement la propriété la plus utilisée dans les biocapteurs optiques car contrairement aux fluorophores classiques, ils présentent une forte résistance au blanchiment et un rendement quantique élevé. Dans la conception de biocapteurs électrochimiques, les QDs conduisent à l'amélioration de techniques analytiques : ils peuvent augmenter l'efficacité du transfert d'électrons et la densité du signal électrochimique du système, pour ainsi fournir des signaux nets et résolus en voltampérométrie [96]. *Zhu et al* [97] décrivent de telles performances avec un aptacapteur électrochimique de type sandwich, utilisé pour la détection d'un biomarqueur de cellules tumorales, à savoir EpCAM (molécule d'adhérence des cellules épithéliales). Un aptamère, greffé sur une électrode d'or, reconnaît le biomarqueur tumoral EpCAM. Après hybridation avec la cible, un second aptamère conjugué à des particules de silice enrobées de QDs prend en sandwich la cible et vient amplifier le signal de détection. Les résultats des mesures en voltampérométrie montrent que ce capteur présente une détection basse de 10 aM dans une gamme de concentration allant de 10 aM à 100 pM. De

plus, la spécificité de la méthode rend l'aptacapteur adapté aux mesures dans des échantillons à matrices plus complexes.

3.2.2.2) NANOPARTICULES MÉTALLIQUES

Les nanoparticules (NPs) métalliques sont des éléments de taille inférieure à 10 nm ayant pour caractéristiques une synthèse facile, une petite taille, une bonne conductivité électrique et un excellent transfert d'électrons [62]. Elles font l'objet de nombreuses recherches pour les biocapteurs en raison de leurs propriétés uniques (optiques, électriques ou même dans certains cas catalytiques). Les NPs peuvent être utilisées comme agent de modification des électrodes pour augmenter le transfert des électrons et la surface active. Elles peuvent aussi être employées directement comme marqueurs redox et catalyseurs afin d'amplifier le signal de détection [98,99].

- **Nanoparticules d'or (AuNPs)**

Les AuNPs sont les éléments préférés parmi les nanoparticules métalliques. En effet, leur affinité envers la fonction thiol (SH) présente dans les protéines/anticorps/aptamères, facilite leur conjugaison aux biorécepteurs. Par ailleurs, les AuNPs présentent des propriétés optiques et électroniques qui en font des marqueurs attractifs dans la conception de biocapteur [81,100]. Une de ces propriétés est d'amplifier le signal, *Naghshbandii et al* [101] ont justement développé un biocapteur pour la fumonisine B1 (FB1) utilisant les AuNPs. Dans cette étude, des AuNPs ont été électrodéposées sur une électrode sérigraphiée pour immobiliser l'aptamère spécifique à FB1 et améliorer le signal de détection. Le système complet obtient une limite de détection de 0,14 ng/mL ; aucune différence significative dans la précision n'a été trouvée entre l'aptacapteur et les méthodes classiques HPLC (chromatographie liquide à haute performance).
Les AuNPs possèdent aussi des propriétés colorimétriques qui sont notamment exploitées par *Ying Jiang et al* [102] dans un aptacapteur pour la détection de protéines d'exosomes. Pour cela, différents panels de complexes d'aptamères et AuNPs sont placés dans des solutions dopées en sels. Une fois en présence de diverses protéines d'exomes, les aptamères se dissocient des AuNPs pour se lier à la surface des cibles. En parallèle, les AuNPs libres se regroupent entre elles. Cette agrégation entraîne un changement de couleur mesuré en absorbance, ce qui génère des motifs pour le profilage des protéines.

- **Nanoparticules d'argent (AgNPs)**

Les AgNPs sont également intéressantes d'un point de vue électro-catalytique. Elles possèdent des caractéristiques quantiques (grande surface spécifique…) et sont facilement oxydées ; elles peuvent également amplifier/produire des signaux significatifs à de faibles potentiels [98]. Pour

exemple de leurs capacités, un capteur électrochimique pour la détection d'avidine a été reporté par *Geagea et al* [103]. Ce travail utilise un nouveau marqueur expérimental composé d'AgNPs recouvertes de polymères zwitterioniques biotinylés. Ces polymères améliorent la stabilité et assurent la reconnaissance de la cible, alors que l'oxydation des AgNPs augmente le signal de détection. Dans ce capteur, la cible avidine se fixe sur une électrode d'or par biotinylation, puis les marqueurs expérimentaux sont ajoutés et réalisent une capture en sandwich. Lors de la mesure en voltampérométrie, le signal d'oxydation des AgNPs est détecté.

3.2.2.3) NANOMATÉRIAUX DE CARBONE

Les nanomatériaux de carbone sont des éléments très étudiés qui existent sous différentes formes : nanotubes de carbone (CNTs), graphène, quantum dots ou encore nanodiamants. Ils présentent une conductivité thermique et électrique supérieure à celle d'autres matériaux. De plus, la grande variété de techniques pour fonctionnaliser ces structures carbonées en fait des candidats intéressants pour le développement de biocapteur [99]. Bien que normalement utilisés comme plateformes pour l'immobilisation de divers biorécepteurs, les nanomatériaux de carbone peuvent aussi être employés en tant que marqueurs de détection dans certains cas.

- **Nanotube de carbone (CNT)**

Un CNT est généralement décrit comme une feuille de graphène enroulée en tube (Figure 11). Ce sont des molécules cylindriques creuses constituées d'un arrangement hexagonal d'atomes de carbone hybridés sp^2 [104]. Selon le nombre de feuillets qu'ils possèdent, ils sont considérés soit comme des nanotubes de carbone monofeuillet (SWCNT) ou soit comme des nanotubes de carbone multifeuillets (MWCNT). Les CNTs sont très prometteurs dans le développement de biocapteurs électrochimiques en raison de leur grande stabilité chimique et de leur excellente conductivité électrique [105]. Ils peuvent faciliter le transfert d'électrons vers les électrodes et également fonctionner comme amplificateurs de signal.

En 2011, *Guo et al* [106] proposent un biocapteur électrochimique pour la thrombine utilisant des complexes aptamère-SWCT comme marqueurs. Ce système fonctionne sur une électrode d'or modifiée par une couche d'acide mercaptohexadécanoïque pour bloquer tout transfert d'électrons. L'ajout simultané de la cible thrombine et du complexe marqueur provoque la dissociation de l'aptamère et du SWCNT. L'aptamère s'hybride alors à la cible et le SWNT s'associe à la couche isolante de l'électrode. Cette association SWNT-électrode permet une liaison entre électrode et médiateurs chimiques pour générer un courant redox plus important lors des mesures. La limite de détection de ce capteur est de 50 pM.

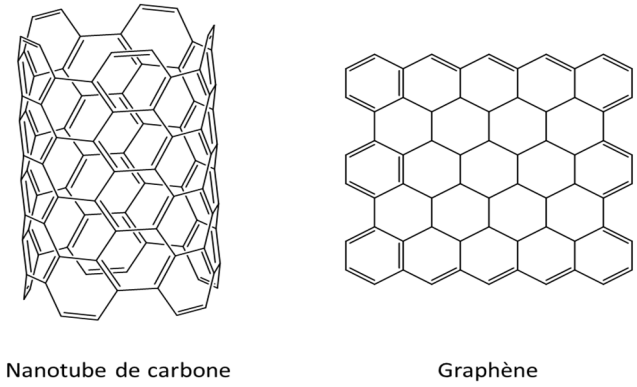


Figure 11 : Structure d'un nanotube de carbone et du graphène

- **Graphène**

Similairement à la structure des CNTs, le graphène est constitué d'un simple feuillet d'atomes de carbones (Figure 11) ; à la différence que ces carbones sont arrangés selon un motif hexagonal en deux dimensions. Le graphène, ainsi que ses dérivés, peuvent être employés dans certains cas comme marqueurs redox pour l'amélioration du signal de détection. *Bonanni et al* [107] ont d'ailleurs construit un biocapteur électrochimique utilisant une forme oxydée du graphène, comme marqueur direct pour la détection de polymorphismes de l'ADN. Ce capteur se compose principalement d'une sonde ADN fixée sur une électrode de carbone sérigraphiée. Sur cette dernière, des tests d'hybridation sont réalisés avec plusieurs types de cibles : un brin d'ADN complémentaire à la sonde, un brin d'ADN non complémentaire et un brin d'ADN polymorphe. Après ces tests, le capteur est mis en contact avec l'oxyde de graphène qui vient se conjuguer à l'électrode. Selon la présence de brins d'ADN hybridés ou non à la surface de l'électrode, le signal de réduction de l'oxyde de graphène varie lors des mesures. Ces variations spécifiques de signaux électrochimiques permettent ainsi de différencier le brin polymorphe des autres brins d'ADN étudiés.

3.2.3) MARQUEURS RÉDOX

3.2.3.1) MOLÉCULES RÉDOX

Les composés redox sont d'excellents marqueurs pour les applications dans les biocapteurs électrochimiques. Ces marqueurs amplifient le signal électrochimique et permettent d'obtenir une réponse directe lors d'analyses. Ils peuvent être employés sous leurs formes propres ou encore en tant que polymères. La molécule redox la plus communément utilisée pour le marquage dans les capteurs électrochimiques est le bleu de méthylène.

- **Bleu de méthylène (MB)**

Le bleu de méthylène est un colorant dérivé des phénothiazines ayant des propriétés redox. C'est une molécule stable de faible coût avec un potentiel d'oxydoréduction se situant entre -0,5 et -0,2 V Ag/AgCl [108,109]. Ces potentiels sont idéaux dans le sens où ils sont proches de zéro volt : la molécule est donc facile à oxyder/réduire sans qu'elle présente beaucoup de risques lors de mesures en voltampérométrie.

Synthétisé pour la première fois en 1877, le MB a rapidement trouvé des applications en médecine et une application majeure en tant que marqueur dans les biocapteurs au début des années 2000. En effet, en matière de biocapteur, le MB est retrouvé principalement dans le marquage d'oligonucléotides et d'aptamères. Le MB est d'ordinaire attaché à l'une des extrémités des oligonucléotides (5' ou 3'). Les changements de conformation de brin d'ADN marqué avec le MB sont induits en présence de l'analyte ; la position du MB varie, faisant apparaitre ou disparaitre un signal électrochimique. *Catanante et al* [110] ont développé un aptacapteur électrochimique, basé sur le repliement d'aptamères anti-ochratoxine A (OTA), marqués avec du bleu de méthylène. Dans cette étude, différentes stratégies d'immobilisation des aptamères ont été testées pour augmenter la sensibilité des mesures. Ces stratégies comprennent la formation d'une couche de diazonium sur les électrodes et l'utilisation d'espaceurs à longue chaîne de carbone sur les aptamères. Ce capteur montre son efficacité avec des valeurs de limite de détection de 0,01 ng/ml et de limite de quantification de 0,03 ng/ml.

La position du marqueur MB, lorsqu'il est lié à l'oligonucléotide, est aussi importante : elle influe sur le transfert d'électron entre le MB et l'électrode à la suite de l'hybridation avec la cible. Une étude de *Wang et al* [111], sur un aptacapteur électrochimique pour l'aflatoxine B1, prouve bien l'importance de la position du marqueur sur le brin d'ADN. Dans ce travail, un aptamère spécifique de l'aflatoxine marqué avec le MB est immobilisé sur une électrode d'or, et change de conformation en présence de l'analyte. Une série de tests est réalisée avec l'aptamère marqué au MB sur différents sites : aux extrémités et sur les thymines internes. Les mesures en voltampérométrie montrent au final une forte augmentation du signal de détection de l'AFB1, meilleure lorsque le marqueur est lié à certaines thymines de l'aptamère qu'au niveau des extrémités 5' et 3'.

Le bleu de méthylène (Figure 12A) est une référence en électrochimie dans les biocapteurs, mais d'autres molécules redox existent et sont encore employées [112].

- **Autres molécules redox**

- L'anthraquinone (Figure 12B) et ses dérivés constitue une classe importante d'espèces redox en raison de leur richesse en électrons π et de leurs couples redox réversibles de quinone/hydroquinone [113,114]. L'anthraquinone a notamment servi de marqueur pour la détection d'ADN viral dans un biocapteur électrochimique décrit par *Kongpeth et al* [115]. Ce capteur est constitué d'une électrode modifiée avec un polymère chargé positivement, et d'une sonde PNA marquée à l'anthraquinone, également chargée positivement. L'hybridation du PNA à l'ADN cible complémentaire modifie les charges des éléments, ce qui entraîne l'apparition d'un signal. Le capteur montre une excellente spécificité et sensibilité, avec une limite de détection inférieure au nM.
- La thionine (Figure 12C) est un colorant redox artificiel stable, dérivé des phénothiazines, ayant une bonne réversibilité électrochimique et une capacité de transfert d'électrons rapide [116,117]. Elle améliore également les capacités des nanotubes de carbone via une forte interaction avec eux [118].
- Le bleu de Nil ou Nile blue (Figure 12D), est un colorant de la famille des phénoxazines aux propriétés très prometteuses en tant que catalyseur redox. Combiné à des nanotubes de carbone ou déposé à la surface d'électrodes [119,120], il permet d'améliorer les performances des biocapteurs électrochimiques à des fins de détection [121].

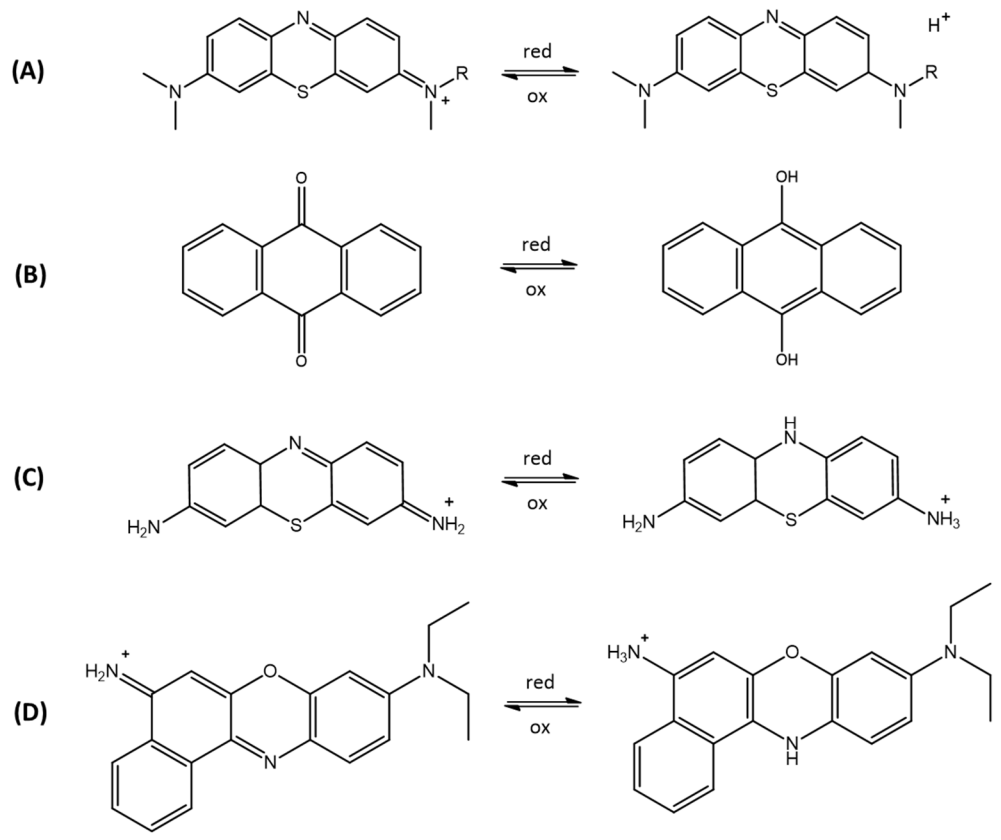


*Figure 12: Réactions d'oxydoréduction des composés redox : bleu de méthylène **(A)** anthraquinone **(B)** thionine **(C)** bleu de Nil **(D)***

3.2.3.2) COMPLEXES MÉTALLIQUES

Les complexes métalliques sont souvent considérés comme entrant dans la catégorie des molécules redox en raison de l'oxydoréduction des métaux qu'ils abritent. Depuis quelques décennies, les complexes métalliques ont été employés comme alternatives aux marqueurs classiques, car chacun d'entre eux est unique. Le métal utilisé et la nature du ligand confèrent aux complexes leurs propriétés. De plus, les combinaisons possibles entre métaux et ligands sont nombreuses, ce qui se traduit par la possibilité de disposer d'un large panel de complexes, exploitables par exemple pour développer des tests multiplexés. Différentes méthodes de détection peuvent aussi être envisagées, par électrochimie, fluorescence, luminescence ou encore électro-chimiluminescence [122–124].

- **Ferrocène**

Le ferrocène est un composé organométallique de la classe des métallocènes. Cette molécule est composée d'un atome de fer à l'état d'oxydation +2 pris en sandwich entre deux cycles de cyclopentadiényle de conformation décalée (Figure 13).

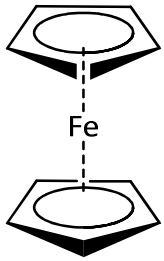


Figure 13: Structure du ferrocène

Le ferrocène constitue une base pour la synthèse de nombreux dérivés obtenus par fonctionnalisation des cyclopentadiènes. Ces composés trouvent des applications dans le domaine médical, où les propriétés lipophiles du ferrocène facilitent la pénétration dans les membranes cellulaires des molécules bioactives [125]. Souvent considéré comme le « prototype » des complexes métalliques, le ferrocène est l'un des complexes les plus employés pour le marquage d'anticorps ou d'oligonucléotides dans les biocapteurs [126–129]. *Sui et al* [130] en ont fait la démonstration avec le développement d'un capteur photo-électrochimique pour la détection de chloramphénicol. Des nanofeuilles de nitrure de carbone de type graphite ont été utilisées comme matériau pour produire un photo-courant. Des aptamères marqués au ferrocène ont ensuite été immobilisés sur ces nanofeuilles, comme moyen de reconnaissance et donneur d'électrons. Lorsque la cible entre en contact avec le capteur, les aptamères se détachent des

nanofeuilles pour venir s'y lier. Ainsi durant la mesure du photo-courant, une diminution de signal est observée. Cette méthode montre une limite de détection basse de 0,22 pM.

Bien que souvent étudié dans la détection par hybridation d'ADN, le ferrocène et ses dérivés peuvent aussi être utilisés pour la reconnaissance et la quantification de petites molécules.

En 2008, *Ferapontava et al* [131] ont décrit un aptacapteur d'ARN ciblant la théophylline dans du sérum. Un aptamère ayant à son extrémité une sonde redox de ferrocène est immobilisé sur une électrode en or. En présence de la théophylline, l'aptamère passe d'une forme linéaire à une conformation fermée, provoquant ainsi une augmentation du transfert d'électrons entre la sonde redox et l'électrode.

- **Bases de Schiff**

Les bases de Schiff sont des composés organiques issus de la condensation d'une amine primaire avec un aldéhyde ou une cétone, pour donner des groupements imines. Les bases de Schiff constituent une classe importante de ligands en chimie de coordination : ces bases peuvent servir de ligands mono-, bis-, tris-, tétra-, penta- ou hexadentés pour les métaux [132,133] (Figure 14). Les sites de fixations pour les atomes métalliques correspondent aux atomes d'oxygène et d'azote ; généralement, plus ces atomes sont présents, plus le complexe formé est stable.

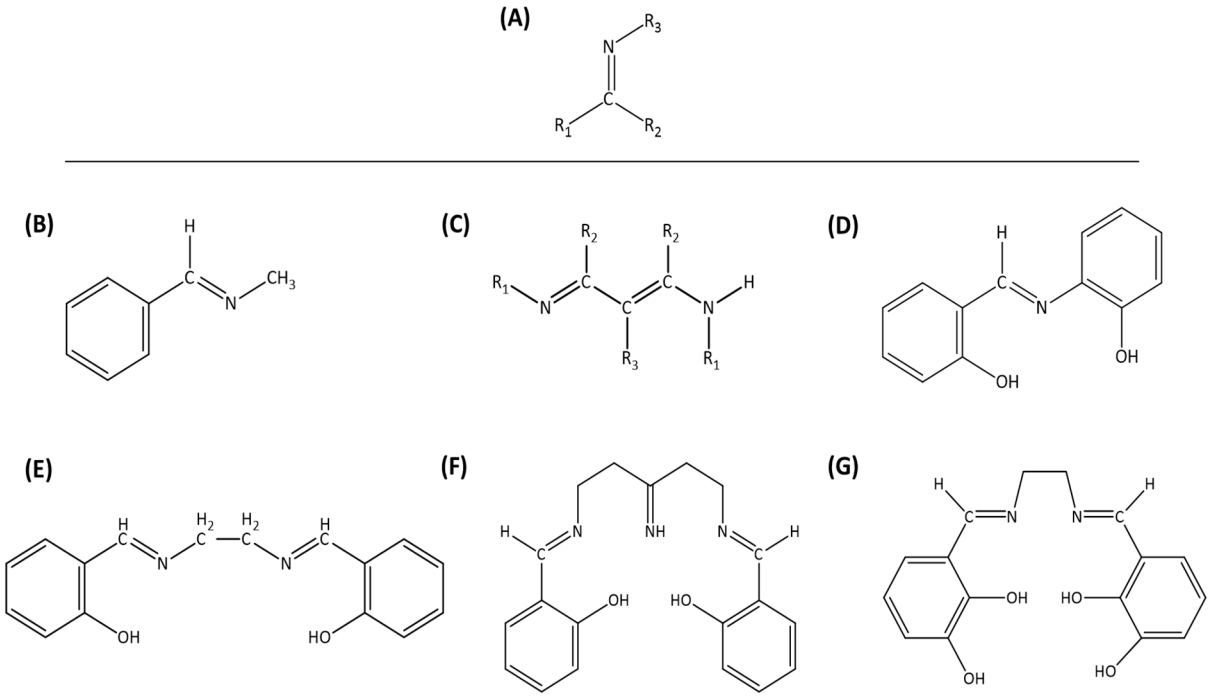


*Figure 14: Structure générale d'une base de Schiff **(A)** et exemples de structures de bases monodentées **(B)** bidentées **(C)** tridentées **(D)** tetradentées **(E)** pentadentées **(F)** hexadentées **(G)***

Les bases de Schiff et les complexes métalliques qui en résultent sont peu coûteux et faciles à synthétiser. Similairement à d'autres composés, ils sont modifiables en vue d'une meilleure conjugaison à des protéines [134]. Dans les biocapteurs, les complexes bases de Schiff peuvent être utilisés comme composants d'électrodes. *Parsaei et al* [135] ont d'ailleurs réalisé des modifications chimiques d'une pâte de carbone, à l'aide de nanosphères de magnétite et d'un complexe cobalt (II)-base de Schiff, pour former des électrodes. Ces électrodes ont ensuite servi à la reconnaissance des nitrites dans l'eau. Leur fonctionnement repose la détection du signal d'oxydation des nitrites, signal amélioré par les modifications réalisées sur l'électrode. Au final, ce type de capteur électrochimique démontre de nombreux avantages tels que la simplicité de préparation de l'électrode, sa durabilité, et une faible limite de détection pour la détermination des nitrites dans les échantillons d'eau.

Les complexes de bases de Schiff peuvent aussi servir dans le marquage d'analytes. Dans un travail effectué par notre laboratoire [136], des complexes d'oxovanadium dérivés du salen/salan ont été synthétisés comme marqueurs redox. Ces complexes ont été utilisés dans un immunocapteur pour la détection de l'estradiol. Le processus de détection se base sur une compétition entre des molécules d'estradiol non modifiées, et des molécules d'estradiol marquées avec les complexes métalliques d'oxovanadium, pour venir se lier aux anticorps immobilisés à la surface d'électrodes sérigraphiées. Au final, le dispositif permet la détection de l'estradiol à des concentrations allant de 4 ng/L à 5 µg/L.

- **Autres complexes métalliques**

En dehors du ferrocène et des bases de Schiff, d'autres complexes à base de métaux de transition (ruthénium, cuivre, fer, nickel, manganèse, zinc, or…) sont retrouvés dans de nombreux travaux sur la biodétection. Cependant, ces complexes sont le plus couramment utilisés dans le marquage en fluorescence ou luminescence de protéines. Les complexes les plus populaires sont ceux à base de ruthénium. Ils sont souvent retrouvés dans les études liées aux interactions avec des protéines, en raison de leurs caractéristiques attrayantes (facilité de préparation, absorption/émission intense…) [137,138].

3.2.4) COMPARAISON DES MARQUEURS

Le tableau suivant présente un résumé des avantages et inconvénients de l'utilisation des marqueurs discutés précédemment.

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des marqueurs utilisés dans les biocapteurs électrochimiques

Marqueurs	Avantages	Inconvénients
QDs	• Large diversité de modification de surface réalisable • Sondes duales présentant des propriétés électrochimiques et optiques • Améliorent la vitesse de transfert des électrons • Fort rendement quantique	• Coût élevé de synthèse • Toxicité pour les cellules vivantes de certains éléments entrant dans la composition des QDs • Faible stabilité • Agrégation quand placés dans des cellules vivantes
Enzymes	• Forte spécificité et sélectivité avec détection de très petites quantités d'analytes • Grande variété d'enzymes • Combinaisons possibles avec plusieurs techniques de détection (colorimétrique, électrochimique, fluorescence…) • Différentes méthodes de conjugaison possibles	• Possible perte d'activité enzymatique • Instabilités liées à l'environnement (pH, température…) • Grande taille pouvant interférer avec certaines fonctions dans le cas de protéines
Nanoparticules métalliques	• Excellente stabilité face à la dénaturation ; • Synthèse facile • Facilité de bioconjugaison • Combinaisons possibles avec plusieurs techniques de détection (colorimétrique, électrochimique, fluorescence…) • Faibles coûts	• Toxicité
Nanomatériaux de carbone	• Bonne conductivité électrique et thermique	• Impuretés du carbone • Agglomérations
Molécules Redox	• Différentes méthodes de conjugaison possibles • Moins toxiques que certains marqueurs fluorescents	• Sensibilité au pH • Sensibilité aux attaques nucléophiles et les forts potentiels positifs/négatifs
Complexes Métalliques	• Combinaisons possibles avec plusieurs techniques de détection (chimiluminescence, électrochimique, fluorescence…) • Différentes méthodes de conjugaison possibles • Formes uniques des complexes (coordinations, géométrie…) • Charges des métaux variables (positif, neutre, négatif…)	• Les métaux libres peuvent interférer avec les mesures/processus dans certains cas • Problèmes de solubilité et stabilité dans l'eau selon les complexes

3.3) COMPLEXES MÉTALLIQUES DE TYPE DOTA ET NOTA

Les complexes métalliques issus des ligands DOTA et NOTA ont joué un rôle clé dans ce travail de thèse. C'est pourquoi dans cette section, nous verrons en détail les différents aspects, propriétés et applications potentielles de ces composés.

3.3.1) DOTA

Synthétisé pour la première fois en 1976, le DOTA (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique) est un ligand macrocyclique. Il possède une structure cyclique contenant quatre atomes d'azote qui supportent un groupement dérivé de l'acide acétique (Figure 15). Le DOTA est modifiable de multiples façons pour la conjugaison directe à des biomolécules. Des versions dérivées avec une partie maléimide ou une extrémité NHS ont ainsi été reportées [139–141].

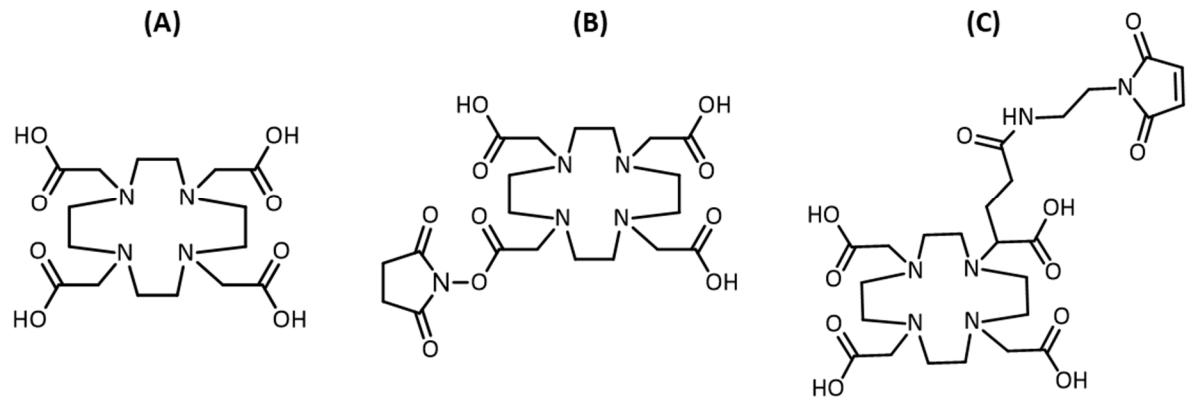


*Figure 15: Formules du ligand macrocycle DOTA (**A**) et de ses analogues fonctionnalisés avec du NHS (**B**) et du maléimide (**C**)*

Le DOTA est un agent chélateur bifonctionnel apte à complexer des métaux, mais aussi à se lier à des molécules, par réaction d'une de ses fonctions acides [142]. En tant que ligand polydenté, il vient s'envelopper autour de différents cations métalliques pour former ces complexes métalliques. Bien que DOTA possède huit sites de coordination : quatre au niveau de l'azote et quatre au niveau des oxygènes de la fonction carboxylique, ce qui justifie la notation N4O4. La configuration des complexes qu'il peut former dépend du nombre de coordination des cations métalliques [143,144]. En effet, pour la majorité des métaux comme le zinc ou le fer, le DOTA lie le métal par ses quatre groupes amine, par deux de ses carboxylates et parfois, par une molécule d'eau. Il fonctionne donc comme un ligand hexadenté ou heptadenté. Pour les métaux tels que les lanthanides, le DOTA est un ligand octadenté ou nonadenté, venant lier le cation avec ses

quatre groupes amine et ses quatre carboxylates. Dans certains cas, il se lie en plus avec des molécules d'eau [145,146].

Étudié depuis les années 80, le DOTA est considéré aujourd'hui comme l'un des agents chélatants les plus importants en radiomarquage. Suite à la découverte de ses propriétés, différentes applications dans de nombreux domaines lui sont associées. Dans le domaine de la géologie, *Byegård et al* [147] ont prouvé l'intérêt des complexes de DOTA, comme marqueurs à haute stabilité et non absorbants, pour suivre l'évolution des eaux souterraines. Cependant, ce type de travaux n'a pas été poursuivi [148]. A l'inverse, d'excellents résultats ont été obtenus dans le domaine médical. L'exemple le plus connu est celui du DOTAREM (acide gadotérique), un complexe DOTA-gadolinium couramment utilisé comme agent de contraste IRM, en raison de ses propriétés paramagnétiques. L'application des complexes de DOTA continue aussi dans le traitement et diagnostic de cancer [149–151]. Le DOTA montre donc une grande affinité pour divers types d'isotopes radioactifs métalliques [152] et pour les peptides. Ces affinités amènent à leur emploi dans certaines formes de radiothérapies et de diagnostics. *Breenan et al* [153] de même que *Romero et al* [154] décrivent l'utilisation, lors de TEP-scan (tomographie par émission de positrons), de complexes gallium-DOTA-peptide comme marqueurs dans la détection de tumeurs malignes. *Paganelli et al* [155,156] évaluent l'efficacité de la radiothérapie au lutétium-DOTATATE sur des tumeurs neuroendocrines gastro-intestinales avancées. Ce complexe dérivé du DOTA cible les récepteurs de la somatostatine qui se trouvent dans de nombreuses tumeurs. Les résultats de l'étude montrent que le composé s'est avéré être une option thérapeutique efficace chez les patients atteints de telles tumeurs.

3.3.2) NOTA

Le NOTA (acide 1,4,7-triazacyclononane-N, N, N-triacétique) est un ligand macrocyclique constitué d'un cycle à trois atomes d'azote lié à trois groupements carboxyliques (Figure 16). Comme le DOTA, il peut être fonctionnalisé au niveau des carboxyles, par différents groupements, pour faciliter son insertion sur diverses biomolécules.

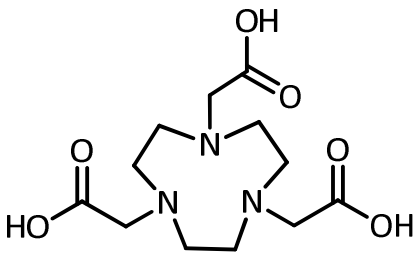


Figure 16: Formule du ligand macrocycle NOTA

Le NOTA est un ligand hexadenté (N3O3). Cependant dans l'étude de *Adeowo et al* [157], deux configurations sont rapportées à la suite de la complexation du NOTA avec des métaux alcalins, tels que le lithium et le sodium. La première configuration décrit une coordinence de six provenant des trois atomes d'azote et aussi des trois atomes d'oxygène. Le cation métallique est bien enfermé dans la cage des groupements amine du NOTA. La seconde configuration montre une coordinence de quatre, issue des deux carboxyles et deux atomes d'azote avec un noyau métallique légèrement excentré de la molécule. La complexation d'un métal au ligand NOTA peut aussi être affectée par la présence d'eau : une molécule d'eau peut devenir l'un des coordinats lors de la complexation.

Selon la nature du métal, il est préférable d'utiliser le NOTA car les complexes formés sont plus stables que ceux issus du DOTA qui possède plus de sites de coordination [158]. La complexation des ions métalliques est donc réalisée plus rapidement. En raison de ces caractéristiques, les chélateurs bifonctionnels à base de NOTA ont été étudiés pour le radiomarquage et le développement de médicaments radiopharmaceutiques. La complexation est généralement réalisée avec des isotopes de petite taille, comme le gallium et le cuivre, en raison de la grandeur de la cage d'azote du NOTA [159,160] Ces complexes sont utilisés pour la conception de sondes et l'amélioration clinique d'outils d'imagerie de TEP. *Xu et al* [161] ont synthétisé un conjugué de NOTA, de cetuximab et de cuivre pour la reconnaissance d'un récepteur du facteur de croissance épidermique présent dans des tumeurs solides. La stabilité du composé a été évaluée *in vitro* et *in vivo*, et son utilisation en imagerie par micro-TEP a prouvé sa fixation aux récepteurs de tumeurs. Des résultats similaires ont été obtenus par *Lee et al* [162] où un complexe de gallium est employé avec succès pour réaliser une TEP rénale.

CHAPITRE 2 : SYNTHÈSE DES COMPLEXES MÉTALLIQUES ET ÉTUDE DE LEURS PROPRIÉTÉS ÉLECTROCHIMIQUES

1) INTRODUCTION

Ce projet de thèse, centré sur l'utilisation de « nouveaux » marqueurs électrochimiques, nous a conduit à rechercher dans la littérature les complexes métalliques existants compatibles avec la conception d'un biocapteur. Ces complexes métalliques doivent donc répondre à un certain nombre d'exigences propres aux biocapteurs. En effet, un biocapteur doit être facile à miniaturiser et robuste. Ainsi, les complexes métalliques servant de marqueurs se doivent d'avoir un comportement électrochimique favorable (signal à forte intensité et une simple oxydoréduction réversible se réalisant le plus proche de zéro volt) tout en étant stables dans les conditions d'analyse (en présence de matrices complexes, sans aucun risque de relargage du métal). Ces exigences nous ont amenés à sélectionner deux ligands macrocycliques, l'acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique (DOTA) et l'acide 1,4,7-triazacyclononane-N, N, N-triacétique (NOTA) comme bases pour le développement de ces marqueurs. En effet, leur complexation avec divers métaux tels que le cuivre, le fer, le manganèse, le gallium et l'yttrium a été étudiée depuis les années 80. Plusieurs études en cristallographie ont recensé des complexes stables formés avec de nombreux métaux de transition de première rangée dans les états d'oxydation +2 et +3 [144,146,163]. De plus, les complexes formés avec des ions radionucléides sont toujours grandement utilisés dans le domaine de l'imagerie médicale comme agents de contraste [149,150,161], prouvant ainsi leur versatilité et leur robustesse. Par ailleurs, les ligands DOTA et NOTA peuvent être fonctionnalisés au niveau des bras carboxyles par des maléimides ou sous forme d'esters de tert-butyle pour faciliter leur insertion sur des protéines et aptamères qui servent d'éléments de reconnaissance dans les biocapteurs (Figure 17).

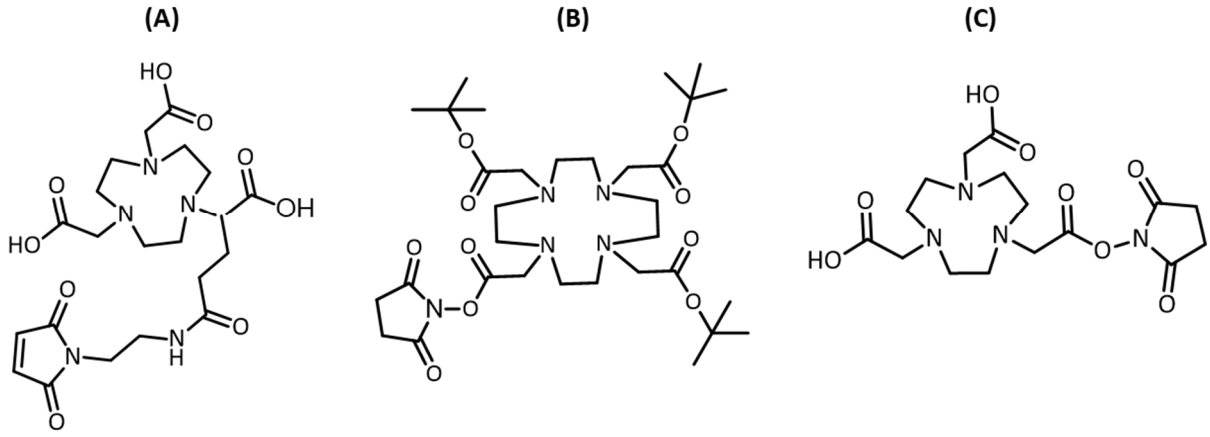


*Figure 17: Exemples de fonctionnalisation des ligands DOTA et NOTA avec le NODAGA-maléimide (**A**), le DOTA-tris(tBu)ester NHS ester (**B**), et le NOTA-NHS ester (**C**)*

Les complexes issus des ligands DOTA et NOTA ont été au centre de nombreuses recherches. Cependant, d'une façon assez surprenante, ces complexes métalliques n'ont pas été mis à profit dans le développement de biocapteurs. De même en électrochimie, un petit nombre de travaux ont été effectués [145,163–165] rapportant des données concises et très générales sur certains complexes. Nous souhaitons dans ce travail de thèse approfondir et exemplifier l'utilisation de ces ligands en tant que marqueurs électrochimiques.

Ce chapitre concerne donc la caractérisation des propriétés redox des complexes métalliques DOTA et NOTA en vue de leur future intégration dans les biocapteurs en tant que marqueurs électrochimiques. La première partie de ce chapitre est consacrée à la synthèse des complexes métalliques, mettant en jeu des métaux classiques comme le fer, le cuivre, ou encore le nickel. Les ions métalliques issus de ces métaux existent à des degrés d'oxydation différents, leur conférant ainsi une activité en électrochimie. Parallèlement, une étude préliminaire en voltampérométrie est réalisée afin de sélectionner, parmi ces métaux, ceux présentant les meilleures réponses en électrochimie. Dans la seconde partie de ce chapitre, nous avons comparé en voltampérométrie cyclique, les caractéristiques électrochimiques des complexes sélectionnés à celles de composés couramment utilisés dans le domaine de l'électrochimie et des biocapteurs.

2) RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

2.1) COMPLEXATION DES LIGANDS DOTA ET NOTA

La complexation des ligands DOTA et NOTA a été effectuée avec les cations métalliques suivants : le cuivre II ($CuCl_2$), le fer III ($FeCl_3$), le nickel II ($NiCl_2$) et le cobalt II ($Co(NO_3)_2$. Le choix de ces métaux répond à différents critères. Le premier est lié au coût final du biocapteur qui doit demeurer le plus faible possible pour des applications environnementales. Ainsi, des métaux comme le gadolinium et le gallium souvent retrouvés dans les études relatives aux complexes DOTA/NOTA, ont été écartés car leur prix au gramme était entre 20 et 200 fois supérieur à celui de ces métaux plus communs. L'autre critère pris en compte est de disposer de métaux ayant une gamme étendue de potentiel d'oxydoréduction (Tableau 2).

Tableau 2: Potentiel d'oxydoréduction standard des ions métalliques utilisés pour la synthèse des complexes métalliques utilisant les ligands DOTA et NOTA

Couple Redox	**Fe^{3+} / Fe^{2+}**	**Cu^{2+} / Cu**	**Cu^{2+}/ Cu^{+}**	**Fe^{3+}/ Fe**	**Ni^{2+}/ Ni**	**Co^{2+}/ Co**	**Fe^{2+}/ Fe**
Potentiel Redox E° (V)	0,77	0,342	0,159	-0,037	-0,257	-0,28	-0,447

Les expériences de complexation ont été réalisées en se basant sur différents protocoles de synthèse décrits dans la littérature pour les DOTA et NOTA [145,146,163,166,167]. La solubilité limitée des ligands DOTA et NOTA dans les solvants organiques impose de les utiliser en solution aqueuse ou hydroalcoolique. Les sels métalliques utilisés sont généralement solubles dans les mêmes conditions. La complexation se déroule par l'addition d'une solution de ligand à une solution du cation métallique en proportion équimolaire. Le mélange est ensuite porté à reflux, et assez rapidement, un changement de coloration s'opère. L'isolement des complexes métalliques par cristallisation après refroidissement de la solution a pu être obtenu pour les associations cuivre-DOTA, nickel-DOTA, cobalt-DOTA et fer-NOTA (Figure 18). Les autres complexes, à savoir cuivre-NOTA, nickel-NOTA, cobalt-NOTA, et fer-DOTA ont été obtenus après lyophilisation du mélange réactionnel. Dans ce cas, il a été nécessaire de laver le solide obtenu à l'éthanol pour éliminer les impuretés.

Figure 18: Cristaux du complexe Fe(III)-NOTA

La structure des complexes a été confirmée par une étude en spectroscopie UV-VIS mais aussi en spectrométrie de masse (MS). Pour réaliser ces analyses, des solutions aqueuses à pH proche de 5 ont été préparées à des concentrations allant de 0,5 à 2 mM.

Les analyses UV-visible des ligands non complexés montrent que le ligand DOTA (Figure 19A) absorbe légèrement dans le proche UV (200-300 nm) comme noté dans la littérature [168], alors que le ligand NOTA ne montre aucun pic significatif d'absorbance (Figure 19B). En conséquence, les modifications spectrales observées proviendront uniquement du changement de la géométrie de coordination après complexation des cations métalliques.

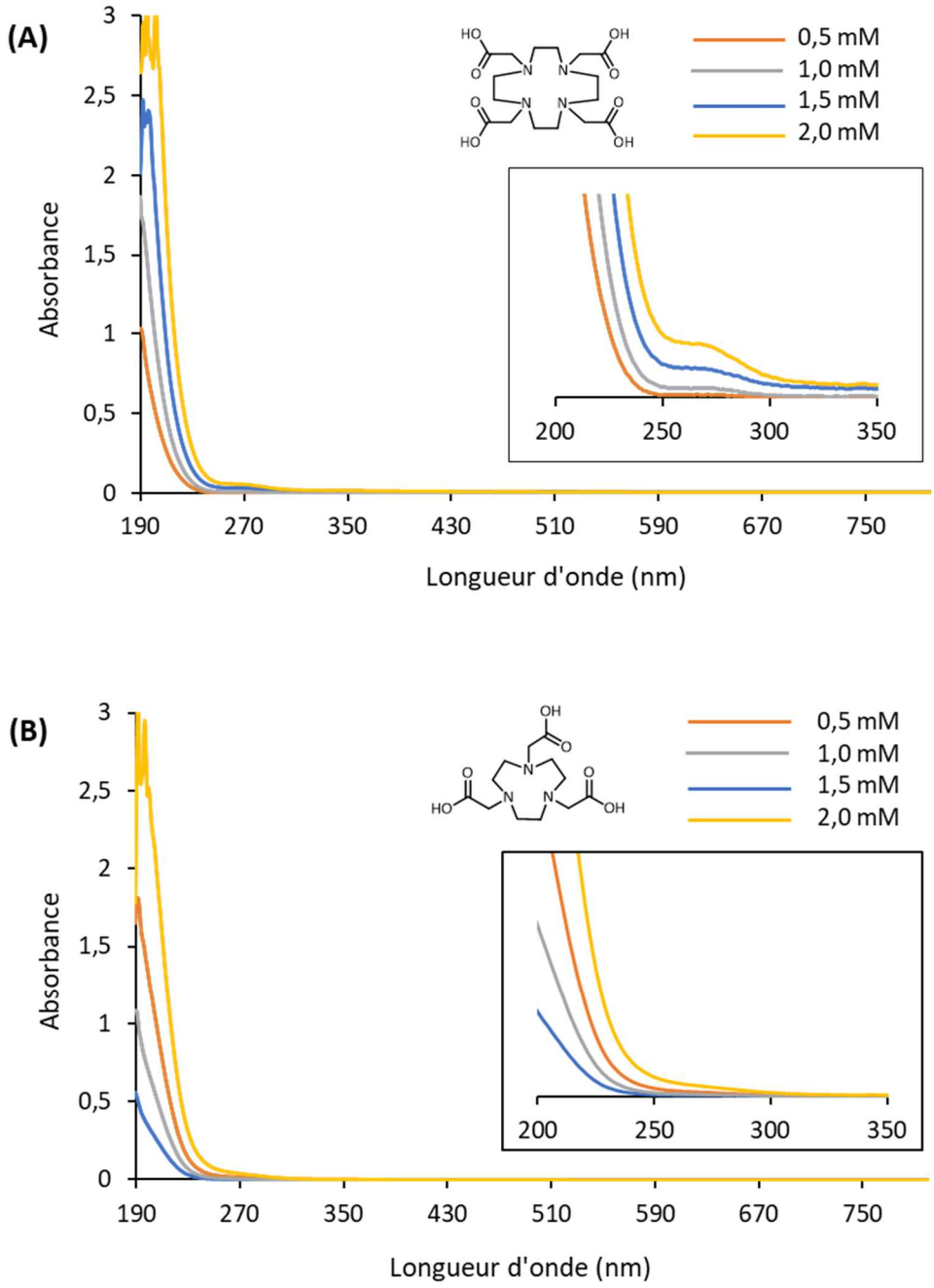


*Figure 19 : Spectres UV-Visible des ligands DOTA (**A**) et NOTA (**B**) dans l'eau à pH 5 à différentes concentrations 0,5 – 2,0 mM*

La complexation des deux ligands DOTA et NOTA avec le cuivre se traduit par l'apparition d'un pic d'absorption intense vers 265 nm, de même qu'une légère absorption autour des 740 nm (Figure 20A). En comparant avec le sel $CuCl_2$, le pic intense semble correspondre à un transfert de charge ligand-métal. En effet, les chlorures métalliques présentent une légère absorption UV qui est fortement modifiée, après complexation par le ligand. Cela se traduit par l'apparition des bandes d'absorption correspondant à un transfert de charge entre le ligand et le métal.

Pour les complexes de cobalt et de nickel, nous avons observé une plus faible absorbance que pour les autres complexes aux mêmes concentrations. Une concentration de 2 mM a été nécessaire pour bien distinguer les pics d'absorbance des complexes. Précisément, le complexe Co(II)-DOTA ne présente qu'un pic vers 520 nm similaire à celui du sel $Co(NO_3)_2$, alors que le Co(II)-NOTA montre deux nouveaux pics vers 380 et 520 nm (Figure 20B). Sur les spectres des complexes de nickel (Figure 20C), un pic est présent vers 350-400 nm pour chaque composé ainsi que deux pics autour de 550 nm [164].

Les spectres UV-VIS du Fe(III)-DOTA et Fe(III)-NOTA paraissent, au premier abord, similaires. Toutefois, le pic d'absorption à 260 nm est mieux défini pour le Fe(III)-NOTA, alors que celui du Fe(III)-DOTA apparaît plus élargi (Figure 20D). L'élargissement de ce pic peut être interprété comme la résultante de l'existence de deux espèces différentes en solution. La première espèce ayant une absorption à 260 nm serait comparable au Fe(III)-NOTA dans laquelle le fer est chélaté par un maximum de six ligands [145,163]. La seconde espèce serait représentative d'un cas rare dans lequel le fer est complexé par sept ligands : le fer est lié à quatre atomes d'azote et seulement trois atomes d'oxygène laissant le dernier oxygène libre de se lier à des molécules d'eau [144,146]. Cette particularité se traduit par une absorption vers 300 nm.

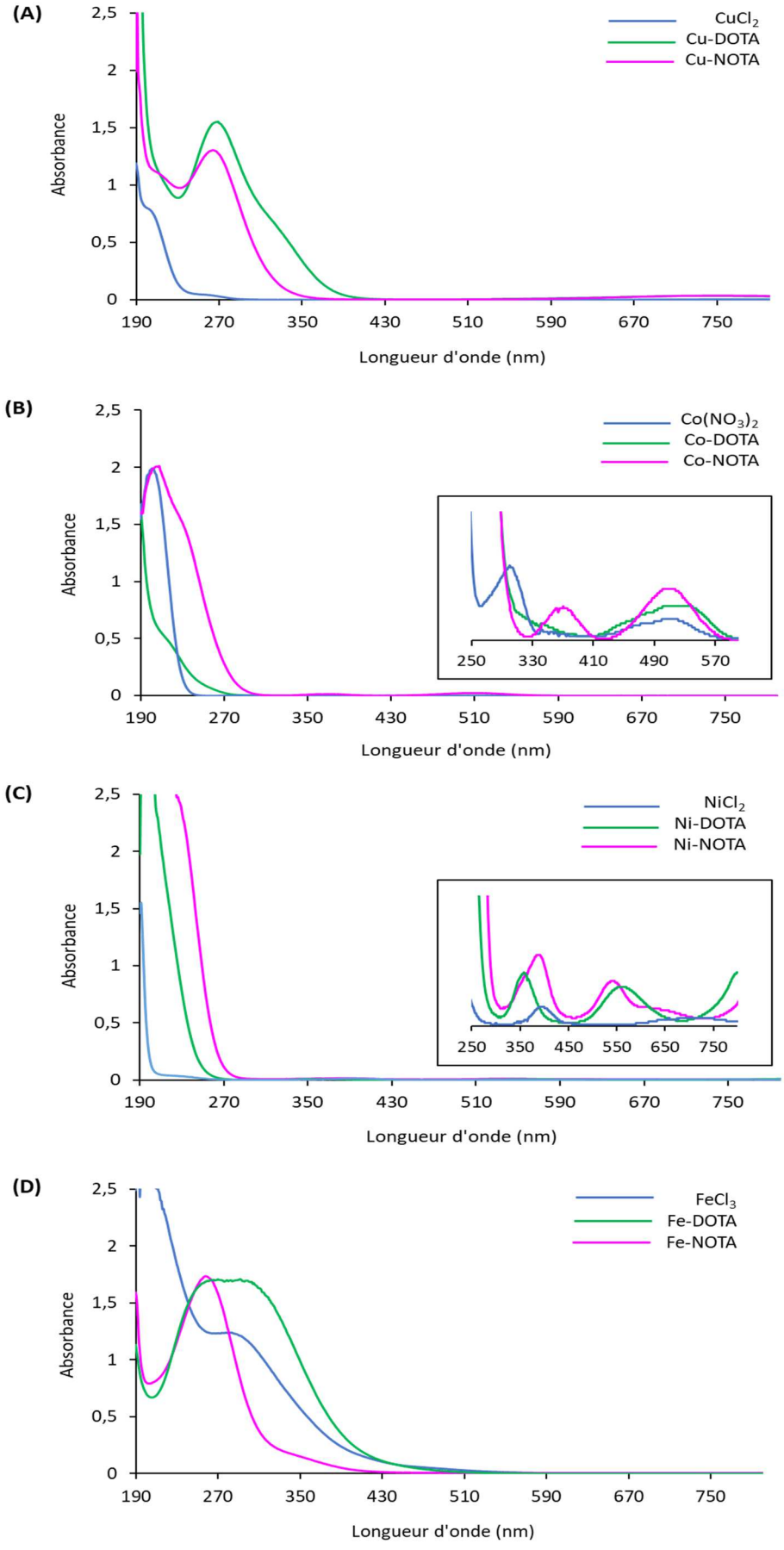


*Figure 20 : Spectres UV-VIS obtenus pour les complexes métalliques de cuivre-DOTA et cuivre-NOTA **(A)** cobalt-DOTA et cobalt-NOTA **(B)** nickel-DOTA et nickel-NOTA **(C)** fer-DOTA et fer-NOTA **(D)** à 0,5 mM en solution aqueuse à pH 5*

2.2) ÉTUDE ÉLECTROCHIMIQUE DES COMPLEXES OBTENUS

2.2.1) TECHNIQUE ÉLECTROCHIMIQUE

Dans le but de caractériser les performances de nos complexes, des études de leurs propriétés électrochimiques ont été réalisées par voltampérométrie.

La voltampérométrie a été développée par *Jaroslav Heyrovsky* à la suite de la découverte de la polarographie en 1922. Il s'agit d'une technique de mesure de courants électriques en fonction d'une variation de potentiel entre électrodes. Ces courants sont produits par l'oxydoréduction des composés utilisés lors de la mesure. L'avantage de la voltampérométrie est sa grande sensibilité mais aussi sa capacité à détecter simultanément plusieurs analytes ayant des pics d'oxydation et/ou de réduction différents.

Les mesures de voltampérométrie, mettent en œuvre un potentiostat permettant d'appliquer les potentiels, ainsi qu'une cellule électrochimique constituée d'un système à trois électrodes :

- Une électrode de travail (WE) à la surface de laquelle se produit la détection et les réactions redox ;
- Une électrode dite de référence (RE) qui permet d'imposer le potentiel à l'électrode de travail ;
- Une contre électrode (CE) qui permet de mesurer le courant généré au potentiel appliqué [169].

La voltampérométrie est une technique générale qui a ensuite été modifiée pour en améliorer les performances. Les techniques dérivées se différencient les unes des autres, par la façon dont le potentiel est appliqué sur les électrodes. Celle utilisée dans ce chapitre pour la caractérisation des complexes est la voltampérométrie cyclique.

La voltampérométrie cyclique (CV), ou voltammétrie cyclique, est une technique qui mesure à vitesse constante l'apparition d'un courant en réponse à une variation de potentiel. Elle est appelée cyclique car le potentiel varie répétitivement entre deux points précis, ces répétitions étant des cycles d'oxydoréduction. La CV a été décrite théoriquement pour la première fois en 1938 par *Randles*, c'est la technique la plus utilisée comme première approche dans l'étude d'espèces redox, parce qu'elle fournit rapidement une large gamme d'informations sur l'analyte étudié (potentiels redox, diffusion, transfert d'électrons…) [170,171]. Les données obtenues à partir de ces mesures sont représentées en traçant l'intensité du courant en fonction du potentiel appliqué. Le voltampérogramme d'une espèce redox se traduit par deux pics : un pic

représentant l'oxydation (positif) et l'autre la réduction (négatif) (Figure 21). Ces pics anodiques (a) ou cathodiques (c) se caractérisent par leur intensité (ip) à un potentiel défini (Ep). Les caractéristiques de ces pics redox et leur représentation varient en fonction de nombreux paramètres comme la vitesse de balayage (scan rate), la nature du composé analysé, ou encore le type d'électrode utilisé.

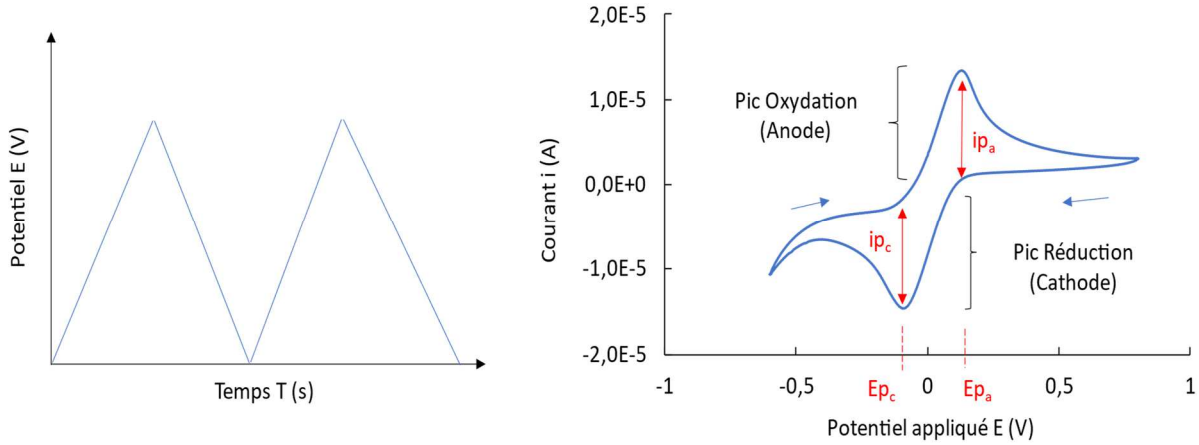


Figure 21: Schémas des variations de potentiel utilisées en voltampérométrie cyclique (CV) et le voltampérogramme typique d'un système réversible

2.2.2) SÉLECTION DES COMPLEXES

Après avoir synthétisé les complexes métalliques, nous avons réalisé une étude préliminaire par CV permettant de sélectionner les complexes les plus adaptés à la conception d'un biocapteur. Les complexes ont été étudiés en préparant des solutions à 1 mM, dans du KCl 0,1 M à pH 5, qui ont ensuite été déposées sur des électrodes sérigraphiées produites au laboratoire. Les mesures ont été prises à des potentiels compris entre -1,5 et 1 V, avec des ajustements en fonction du métal complexé.

Les voltampérogrammes ont été enregistrés à une vitesse de balayage de 100 $mV.s^{-1}$ permettant d'observer les réactions d'oxydoréduction du complexe métallique étudié à la surface des électrodes (Figure 22). Les ligands DOTA et NOTA sous forme libre ont aussi été étudié en électrochimie, cependant n'étant pas électroactifs, leurs voltampérogrammes n'ont pas été inclus.

Les complexes à base de cuivre (Figure 22A) montrent de multiples pics d'oxydation et réduction. Ces derniers correspondent aux transformations successives et réversibles du cuivre (0) en cuivre (I) puis en cuivre (II), vers -0,75 V et -0,2 V respectivement pour les pics d'oxydation du Cu(II)-DOTA. Ces pics sont observés également chez le $CuCl_2$ et Cu(II)-NOTA

vers 0 et 0,2 V. Sur le complexe de NOTA, l'intensité des pics est amplifiée d'un facteur 3 par rapport aux sels de cuivre.
Le complexe Co(II)-DOTA montre un pic de réduction de faible intensité vers -0,2 V ainsi qu'un pic d'oxydation vers 0,8 V. Pour le complexe formé avec le ligand NOTA, une oxydoréduction est présente, caractérisée par des pics de faible intensité centrés pour l'oxydation à 0,5 V et pour la réduction à -0,6 V (Figure 22B).

Le complexe de nickel Ni(II)-DOTA ne présente pas une électroactivité sur la gamme choisie, alors que le complexe Ni(II)-NOTA décrit une belle oxydoréduction à un potentiel compris entre 0,8 et 1,2 V (Figure 22C).

Le chlorure ferrique montre un pic de réduction à -0,2 V que l'on retrouve également chez les deux complexes de fer (III), à -0,1 et -0,2 V respectivement pour les complexes avec DOTA et NOTA. Une oxydation est observable à 0,1 V pour le complexe DOTA et à 0,025 V pour le NOTA (Figure 22D). La présence de ces pics d'oxydoréduction se traduit par une forme de voltampérogramme caractéristique d'un système réversible. Le complexe métallique Fe(III)-NOTA présente des intensités de pic supérieures à celles du Fe(III)-DOTA.

Cette étude préliminaire a permis de comparer le comportement en électrochimie des complexes métalliques DOTA/NOTA synthétisés. La présence de plusieurs vagues d'oxydoréduction pour les complexes de cuivre, de potentiel d'oxydoréduction à des voltages trop élevés, ou de trop grandes amplitudes incompatibles avec des milieux biologiques chez le nickel et le cobalt, nous ont amené à écarter ces trois composés de la suite de nos travaux. Les complexes métalliques Fe(III)-DOTA et Fe(III)-NOTA ont donc été choisis pour la suite des recherches, car leur comportement en électrochimie est compatible avec la conception d'un biocapteur. En effet, ces complexes démontrent en CV une oxydoréduction de forte intensité à des potentiels faibles proches de 0 V.

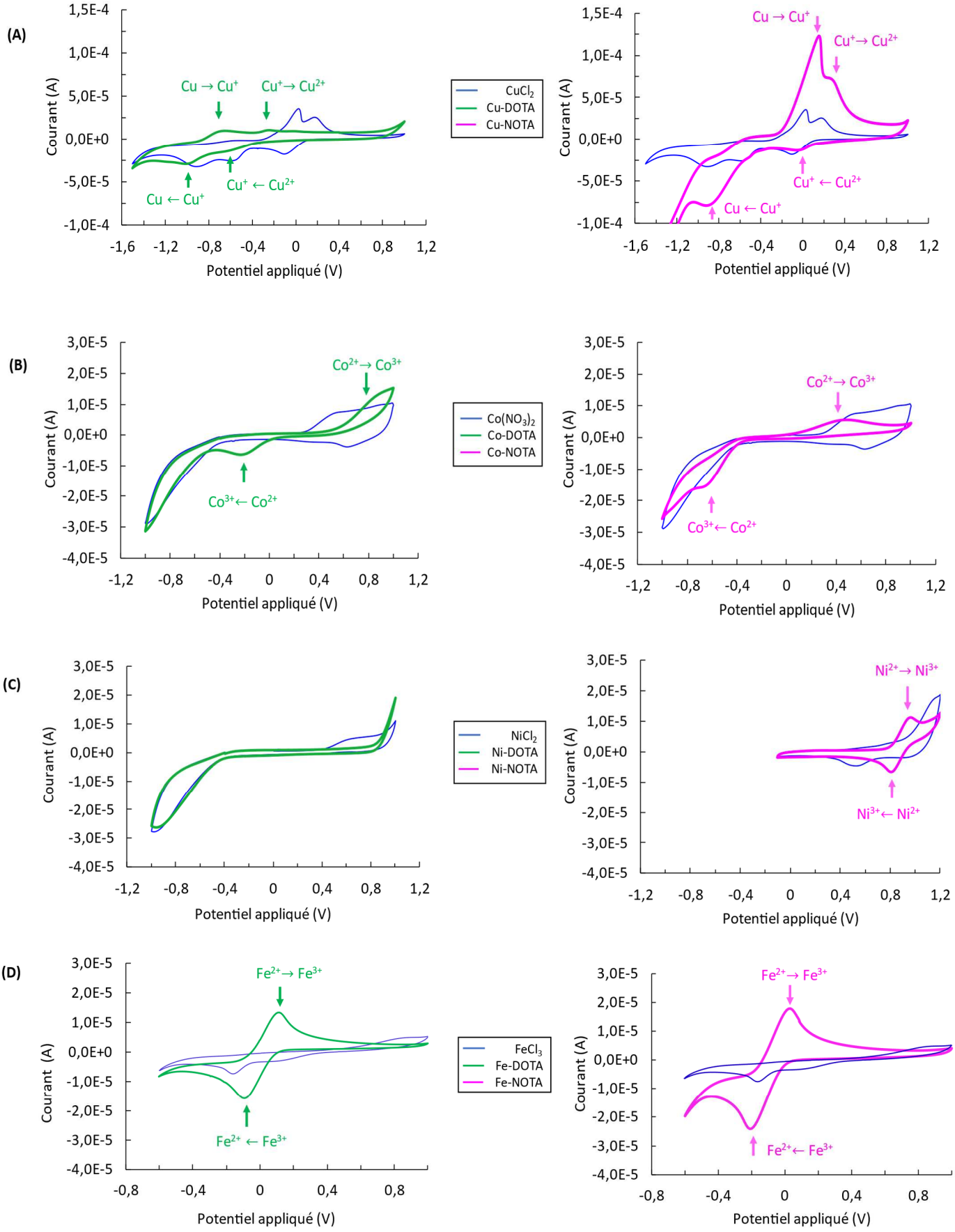


*Figure 22: Voltampérogrammes obtenus pour les complexes métalliques de cuivre-DOTA et cuivre-NOTA **(A)** cobalt-DOTA et cobalt-NOTA **(B)** nickel-DOTA et nickel-NOTA **(C)** fer-DOTA et fer-NOTA **(D)** à 1 mM dans KCl 0,1 M à pH 5*

2.3) CARACTÉRISATION ÉLECTROCHIMIQUE DES COMPLEXES Fe(III)DOTA / Fe(III)-NOTA

Les caractéristiques électrochimiques de ces deux complexes de fer (III) ont été comparées à celles du ferricyanure $(Fe(CN)_6)^{3-}$ ainsi qu'à celles d'un dérivé du ferrocène soluble dans l'eau, le ferrocèneméthanol (FcOH). Ces derniers sont couramment utilisés en électrochimie et dans la conception de biocapteurs comme médiateurs ou marqueurs électrochimiques. L'étude comparative de ces composés électrochimiques a conduit à une publication dans *Journal of the Electrochemical Society.*

Fe(III)-DOTA/Fe(III)-NOTA Complexes: Attractive Alternative Markers for Future Electrochemical Biosensors

Michel Gaillard, Hussein Kanso, Franck Denat, Carole Calas-Blanchard, Nicolas Inguimbert, Thierry Noguer

---

Ma contribution à cette publication a été la réalisation de l'ensemble des manipulations qui constituent la partie expérimentale ainsi que le traitement des données qui s'en est suivi. La première version complète de la publication a été produite par mes soins puis corrigée par mes encadrants.

Journal of The Electrochemical Society, 2020 167 117502
1945-7111/2020/167(11)/117502/5/$40.00 © 2020 The Electrochemical Society ("ECS"). Published on behalf of ECS by IOP Publishing Limited

Fe(III)-DOTA/Fe(III)-NOTA Complexes: Attractive Alternative Markers for Future Electrochemical Biosensors

Michel Gaillard,[1,2] Hussein Kanso,[1,2,3] Franck Denat,[4] Carole Calas-Blanchard,[1,2] Nicolas Inguimbert,[5] and Thierry Noguer[1,2,z]

[1] *Laboratoire Biocapteurs-Analyse-Environnement (BAE) Université de Perpignan Via Domitia, 66860, Perpignan, France*
[2] *Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes, USR 3579 Sorbonne Universités (UPMC) Paris 6 et CNRS Observatoire Océanologique, 66650, Banyuls-sur-Mer, France*
[3] *Faculté des Sciences, Univ. Libanaise Section V, Nabatieh, Liban*
[4] *Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, UMR 6302, CNRS, Université Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France*
[5] *UPSL Research University, EPHE-UPVD-CNRS, USR 3278 CRIOBE, Université de Perpignan Via Domitia, 66860 Perpignan, France*

Metallic complexes of macrocycles chelators 1,4,7-triazacyclononane-N,N,N-triacetic acid (NOTA) and 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA) were synthetized with iron (III) giving Fe(III)-DOTA and Fe(III)-NOTA complexes. They were studied in comparison of ferricyanide and ferrocenemethanol on cyclic voltammetry with glassy carbon working electrode (GC) and screen-printed carbon electrode (SPCE). Diffusion coefficients and heterogeneous electron transfer rate constants were determined with Randles-Sevcik and Nicholson-Lavagnini methods. Using SPCE. The average values of diffusion coefficient and transfer rate constant were respectively of 1.34×10^{-6} cm^2 s^{-1} and 1.01×10^{-3} cm s^{-1} for Fe(III)-DOTA, and 4.32×10^{-6} cm^2 s^{-1} and 1.14×10^{-3} cm s^{-1} for Fe(III)-NOTA. Interestingly, characteristics of the synthetized complexes on SPCE compete advantageously with those of ferricyanide and ferrocenemethanol, making Fe(III)-DOTA and Fe(III)-NOTA potential markers for future biosensors development.
© 2020 The Electrochemical Society ("ECS"). Published on behalf of ECS by IOP Publishing Limited. [DOI: 10.1149/1945-7111/ab9e80]

Manuscript submitted March 2, 2020; revised manuscript received June 5, 2020. Published June 30, 2020.

Supplementary material for this article is available online

Used since the 1980s', the macrocycles chelators 1,4,7-triazacyclononane-N,N,N-triacetic acid (NOTA) and 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA), are generally attached to the medical imaging domain.[1–3] These molecules are interesting in terms of metal complexation due to their amine and carboxylic groups that wraps around metals providing stable metal complexes (Fig. 1). It is believable that this kind of complexes could perform nicely in cyclic voltammetry as markers for biosensors. Indeed, some of them are already functionalized with maleimide or NHS ester and are useful for direct conjugation to biomolecules that serves as recognition element in biosensors.[4–6]

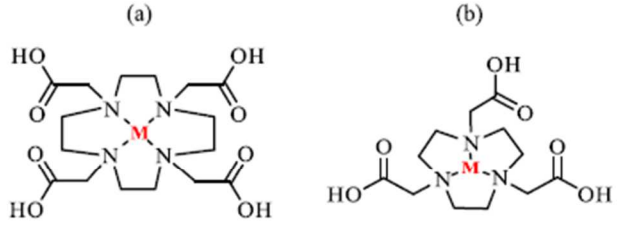


Figure 1. (a) DOTA and (b) NOTA structural forms complexed with a metal M.

Paradoxically, only a few studies have been published so far describing their electrochemical properties, in particular the diffusion coefficient and the heterogeneous electron transfer rate constant:[7]

- The diffusion coefficient (D) is an indicator of the speed of diffusion of the redox species as they enter or leave the electrode surface;[8,9]
- The heterogeneous electron transfer rate constant k^0 corresponds to the speed of electron transfer between electroactive species and the electrode.[10,11]

[z]E-mail: noguer@univ-perp.fr

The most common way to calculate these parameters is to perform cyclic voltammetry experiments in the presence of these redox species at different scanning speeds. Calculation of the diffusion coefficient can be calculated through Randles-Sevcik equations, which can be simplified at 25 °C as follows:[11–14]

$$Ip_{reversible} = 2.69 \times 10^5 A\, D^{1/2} n^{3/2} C\, \upsilon^{1/2} \quad [1]$$

$$Ip_{quasi\text{-}reversible} = 2.65 \times 10^5 A\, D^{1/2} n^{3/2} C\, \upsilon^{1/2} \quad [2]$$

$$Ip_{irreversible} = 2.99 \times 10^5 A\, D^{1/2} n^{3/2} (\alpha n')^{1/2} C\, \upsilon^{1/2} \quad [3]$$

where Ip is the peak current intensity, A is the electroactive area of the electrode, D is the diffusion coefficient of the electroactive species, n is the number of electrons transferred during the electrochemical reaction, υ is the potential scan rate, α the transfer rate, n' the number of electron transferred before the rate determining step, and C is the concentration of electroactive species. The value of D can be thus calculated by plotting Ip vs $\upsilon^{1/2}$.

Heterogeneous electron transfer rate constant is generally calculated by determining the peak-to-peak separation (ΔEp). The Nicholson method is classically employed for that purpose.[15] In this method, ψ, a dimensionless parameter indicating if the electrochemical system is reversible ($20 \geqslant \psi > 7$) or quasi-reversible ($\psi \leqslant 7$), is plotted against ΔEp and the reciprocal of the square root of υ to produce curves allowing k^0 calculation according to Eq. 4.

$$\Psi = k^0 [\pi DnF\upsilon/(RT)]^{-1/2} \quad [4]$$

where F is the Faraday constant, R is the molar gas constant and T is the temperature. While this method is a reference, it is only usable if the peak separation does not exceed 212 mV. Fortunately, other procedures[16,17] that complete or differ from Nicholson's are available, like the one described by Lavagnini and coworkers. This method is based on Nicholson equation (Eq. 4) but uses another formula to calculate ψ parameter (Eq. 5) with the values of ΔEp for each scan rate.[18] The slope of ψ against $[\pi DnF/(RT)]^{-1/2}\, \upsilon^{-1/2}$ plot

allows calculating heterogeneous electron transfer rate constant k^0 of the electrochemical species studied. This method allows enlarging the ΔEp limits of Nicholson method and thus facilitates its application.

$$\Psi = (-0.6288 + 0.021\Delta Ep)/(1 - 0.0017\Delta Ep) \quad [5]$$

This work aims determining D and k^0 values of Fe(III)-DOTA and Fe(III)-NOTA complexes using screen-printed carbon electrodes that are particularly suitable for biosensor development.[19–21] Randles-Sevcik equation and the combined method of Nicholson-Lavagnini are used to accomplish this objective. The calculated parameters are compared to those of the ferricyanide reference redox couple as well as a ferrocene water soluble derivative, hydroxymethylferrocene, also known as ferrocenemethanol (FcOH).

Material and Method

Chemicals and physicals measurement.—Potassium ferricyanide $K_3[Fe(CN)_6]$, iron chloride (III) ($FeCl_3$), sodium hydroxide (NaOH) and hydrochloric acid (HCl) were purchased from *Sigma-Aldrich* (France). NOTA and DOTA chelators were supplied by *Chematech* (France). Ferrocenemethanol was obtained from *Alfa Aesar* (*USA*). PBS/KCl buffer was prepared containing 102.7 mM KCl, 10 mM Na_2PO_4, 1.8 mM KH_2PO_4 and 137 mM NaCl.

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).—Measurements were done on a NICOLET IS5 THERMO SCIENTIFIC spectrometer with the OMNIC software. Fe(III)-NOTA and Fe(III)-DOTA were analyzed through KBr pellets between 4000 and 400 cm^{-1} with 16 scans.

Mass spectrometry (MS).—Mass analysis were carried out on a THERMO SCIENTIFIC, an ACCELA HPLC coupled to a LCQ FLEET equipped with an electrospray ionization (ESI) source and a 3D ion trap analyzer. Solutions of Fe(III)-NOTA and Fe(III)-DOTA were prepared in distilled water at a concentration of 1 mM.

Cyclic voltammetry (CV).—The electrochemical measurements were realized using an AUTOLAB PGSTAT100 potentiostat/galvanostat with the NOVA 2.1.4 software. Screen-printed carbon electrodes (SPCE) were manufactured by BAE laboratory with a DEK248 screen-printing system in a three-electrode configuration including a graphite working electrode (4 mm diameter), an Ag/AgCl reference electrode (16 mm × 1.5 mm straight path) and a graphite counter electrode (16 mm × 1.5 mm curved path). Before experiments, the screen-printed electrodes were pretreated with 0.5 M H_2SO_4 in 0.1 M KCl. 6 consecutives scans were realized for each SPCE at 100 mV s^{-1}, in the potential range −1.5 V to 1 V.

A PALMSENS CHI 104 glassy carbon working electrode (GC) with 3 mm diameter was also used, in association with a METROHM platinum counter electrode and an Ag/AgCl reference electrode.

Solutions of $K_3[Fe(CN)_6]$, Fe(III)-NOTA, Fe(III)-DOTA, and FcOH, were prepared in PBS containing 0.1 M KCl to obtain a concentration of 1 mM at pH 7. Cyclic voltammetry experiments were performed using 100 μl of each solution deposited on the surface of SPCE, and the glassy carbon electrode is immersed in 10 ml of the solution. Measurements were performed in triplicate at the following scan rates: 5; 10; 15; 25; 50; 75; 100; 150 mV s^{-1}.

Ultraviolet-visible (UV–vis).—Measurements were done on a UV-1800 SHIMADZU UV-spectrophotometer with the UVPROBE 2.33 software. Solutions of $FeCl_3$, Fe(III)-NOTA, Fe(III)-DOTA, DOTA and NOTA were prepared in distilled water to obtain a concentration of 0.1 mM. UV–vis spectra were measured from 190 to 600 nm in quartz cuvettes, at a pH close to 5.

Synthesis of iron complexes.—Synthesis of the complexes were performed accordingly to described procedures.[7,22–25]

Fe(III)-DOTA.—50 mg of DOTA (0.124 mmol) and 20 mg of $FeCl_3$ (0.124 mmol) were separately dissolved in 10 ml of distilled water. The chelate solution was added dropwise to the metal solution and turned to a yellow solution. The reaction mixture was refluxed and stirred for 3 hours. After one night at room temperature the compound failed to crystallize. Solvent was eliminated by lyophilisation. The recovered solid was washed with ethanol three times and dried at room temperature to deliver 42.9 mg (73.6%) of the desired complexe. FTIR (KBr pellet): 1635.21 cm^{-1} (C=O, COOM). UV–vis: λ_{max} = 240–320 nm. Calculated mass for $C_{16}H_{25}FeN_4O_8$ (457.1). Found: 457.93 m z^{-1} ($M + H^+$); 479.95 m z^{-1} ($M + Na^+$); 914.78 m z^{-1} ($2M + H^+$); 936.77 m z^{-1} ($2M + Na^+$).

Fe(III)-NOTA.—35 mg of NOTA (0.115 mmol) and 18.72 mg $FeCl_3$ (0.115 mmol) were separately dissolved in 9 ml of distilled water. The chelate solution was added dropwise to the metal solution giving an intense yellow solution. The reaction mixture was refluxed and stirred for 3 hours. After one night at room temperature the compound crystallizes. After filtration, the crystals were washed with water and ethanol and dried. Mass = 25.7 mg, 62.2%. FTIR (KBr pellet): 1664.76 cm^{-1} (C=O, COOM). UV–vis: λ_{max} = 260 nm. Calculated mass for $C_{12}H_{18}O_6N_3Fe$ (356.0). Found: 356.80 m z^{-1} ($M + H^+$); 378.89 m z^{-1} ($M + Na^+$); 712.57 m z^{-1} ($2M + H^+$); 734.52 m z^{-1} ($2M + Na^+$); 1068.34 m z^{-1} ($3M + H^+$); 1090.31 m z^{-1} ($3M + Na^+$).

Results and Discussion

Characterization of Fe(III)-DOTA and Fe(III)-NOTA complexes.—Fe(III)-DOTA and Fe(III)-NOTA were analyzed by mass spectrometry, Fourier transform infrared spectroscopy, UV–vis spectrometry and also cyclic voltammetry. A comparison was made with free iron salt ($FeCl_3$) and unchelated DOTA and NOTA. CV experiments at 100 mV s^{-1} were carried out using screen-printed carbon electrodes for convenience in a 1 mM solution of 0.1 M KCl around pH 5, to avoid hydroxylation of $FeCl_3$. As shown in Supplement S1 (available online at stacks.iop.org/JES/167/117502/mmedia), free DOTA and NOTA did not display any electroactivity, while $FeCl_3$ only showed a reduction peak at −0.2 V vs Ag/AgCl. By opposition Fe(III)-NOTA and Fe(III)-DOTA complexes showed clear oxidoreduction peaks relatively with respective half-wave potentials ($E_{1/2}$) of −0.0872 and 0,0158 V. Even though the solution were at the same concentration, the metallic complexes exhibit by far a superior intensity, with Fe(III)-NOTA superior to Fe(III)-DOTA.

Mass spectrometry allowed confirming that the metallic complexes were properly synthetized. Precisely, the correct masses were found in ESI positive for the DOTA and NOTA complexes and their adducts (Supplement S2). For the DOTA complex the mass for ions $M + H^+$ and $2M + H^+$ were found at 457 and 914 m z^{-1}. Adducts ions with sodium and potassium were also found at 479 ($M + Na^+$), 496 ($M + K^+$) and 936 m z^{-1} ($2M + Na^+$). Results were similar for the NOTA complex, with masses at 356 ($M + H^+$), 712 ($2M + H^+$), 1068 m z^{-1} ($3M + H^+$) for protonated molecules and 378 ($M + Na^+$), 734 ($2M + Na^+$), 750 ($2M + K^+$) and 1090 ($3M + Na^+$) for adducts. The base chelator was still in presence as it was found at 909 m z^{-1} ($3M + H^+$). Theses masses are in good agreement with a deprotonation of three carboxylic acids of both chelators engaged in the formation of the complexes.

FTIR spectra of Fe(III)-DOTA and Fe(III)-NOTA are presented in Supplement S3. For both products, the following peaks were observed: a broad peak between 3500 and 2800 cm^{-1} corresponding to free OH and NH/CH coupling, an intense peak at 1680–1630 cm^{-1} assigned to C=O and metal complexation; as well as multiple peaks from 1400 to 1000 cm^{-1} related to C–O and C–N stretching.

As expected from their structure, DOTA and NOTA chelators did not exhibit any significant absorbance in UV–vis (Supplement S4) $FeCl_3$ shows a characteristic peak around 296 nm[26,27] as well as

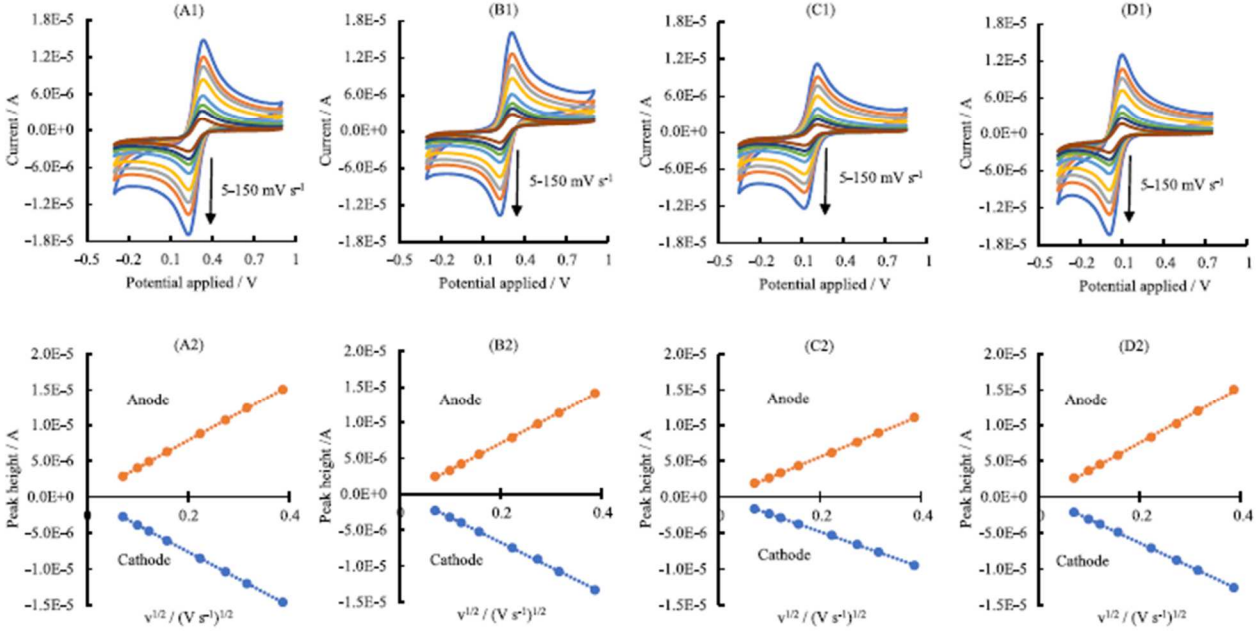


Figure 2. Cyclic voltammograms obtained on GC electrodes for (A1) $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$, (B1) $[FcOH]^{0/+}$, (C1) $[Fe(III)\text{-}DOTA]^{-/0}$, (D1) $[Fe(III)\text{-}NOTA]^{-/0}$. (A2), (B2), (C2), (D2): Respective plots of anodic and cathodic peak height (Ip) vs square root of scan rate ($v^{1/2}$).

Fe(III)-NOTA[28] with an intensive peak at 260 nm. Fe(III)-DOTA displays a broader peak extending from 240 to 320 nm. This peak can be interpreted as a combination of two peaks: one at 260 nm and another at around 300 nm. The first peak at 260 nm may be attributed to a complex where the iron is bound to a maximum of 6 atoms,[28,29] as observed for Fe(III)- NOTA, while the peak at 300 nm may represent another form where the iron is linked to 5 or 4 atoms.[26,30,31]

Electrochemical studies.— *Determination of diffusion coefficient on glassy carbon working electrode.*—Defining if a compound undergoes reversible, quasi-reversible or irreversible oxidoreductive reaction is an important issue that will define the suitable equation to calculate the electrochemical parameters of compounds. This is illustrated by the Randles-Sevcik equations, where new parameters may be involved depending of the reaction nature (Eqs. 1–3). The main factors governing the reversibility of an electrochemical system can be prioritized as follows:[11–13,32,33]

- The peak separation must be completely independent of the scan rate changes. Any variation of ΔEp with the scan rate indicates quasi-reversible or irreversible reaction systems;
- Getting a straight curve by plotting the peak current against the square root of the scan rate indicates that the system is diffusion controlled: the speed of reaction depends on the transport of the reactant through the solution.
- Anodic and cathodic peak currents ratio should be close to unity: |Ip_cathode|/ Ip anode $\approx$ 1.

Other clues can help like the value of heterogeneous electron transfer rate constant k^0. Unfortunately, this constant was unknown for the studied systems. It is also known that the peak separation value must be equal to 59 mV but this ideal value is difficult to obtain because of the nature of electrode and the ohmic potential drop, or because of the resistance of the solution. These issues were circumvented by using a three-electrode system and an elevated concentration of electrolyte, which allows decreasing uncompensated resistance enough to be neglected.

A classical glassy carbon working electrode with well-known active surface was used to define the most suitable equation to be applied. The behavior of each compound was studied at different scanning speeds to determine their respective diffusion coefficient (Fig. 2 and Table I). Taking into account their future application in biosensors, the electrochemical measurements where performed in PBS at physiologic pH (pH 7) with increased KCl for conductivity. For all the tested compounds, the measured peaks intensities were of the same order of magnitude, ranging from $\pm 1.0 \times 10^{-5}$ to $\pm 1.7 \times 10^{-5}$ A (Figs. 2A1–2D1). As shown in Fig. 2, the separation between anodic and cathodic peaks ΔEp was not affected by the scan rate, demonstrating the electrochemical reversibility of the system. Half-wave potential values were 0.281, 0.270, 0,062 and 0.164 V for ferricyanide, ferrocenemethanol, Fe(III)-NOTA and Fe (III)-DOTA respectively. A linear relation was obtained by plotting anodic and cathodic peak intensities vs the square root of scan rate, indicating that the process is diffusion-controlled (Figs. 2A2–2D2). Moreover, the reversibility of the process was highlighted by the values of current ratio ($Ip_{cathode}/Ip_{anode}$) close to unity (Table I). The

Table I. Average diffusion coefficients (D) and current ratio of the analyzed compounds measured using a glassy carbon working electrode in PBS/ KCl (T = 25 °C, pH = 7).

Compounds	Average diffusion coefficient ($cm^2\ s^{-1}$)	Literature diffusion coefficient ($cm^2\ s^{-1}$)	$Ip_{cathode}/Ip_{anode}$
Ferricyanide	$(4.00 \pm 0.1) \times 10^{-6}$	7.6×10^{-6} [14,34]	0.965 ± 0.007
FcOH	$(3.54 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	7.8×10^{-6} [35,34]	0.953 ± 0.013
Fe(III)-DOTA	$(2.01 \pm 0.3) \times 10^{-6}$	Not found	0.868 ± 0.012
Fe(III)-NOTA	$(3.61 \pm 0.6) \times 10^{-6}$	Not found	0.841 ± 0.013

ratios observed for DOTA and NOTA complexes were slightly lower, with respective values of 0.867 and 0.841. However, these systems were still considered as reversible due to the facts that the scan rate did not affect the peak separation, and that plotting *Ip* vs $\upsilon^{1/2}$ plots resulted in straight curves.

This conclusion allowed us determining the diffusion coefficients (*D*) using the adequate Eq. 1. The *D* values obtained for oxidation and reduction peaks were very similar (see Supplement S5), so that the results were presented as average values (Table I). The average D values of the studied compounds were of the same order, ranging from 3.5×10^{-6} to 4.0×10^{-6} $cm^2\ s^{-1}$, except for Fe(III)-DOTA which present a lower value of 2.0×10^{-6} $cm^2\ s^{-1}$. The calculated *D* values for $[Fe(CN)_6]^{3-}$ and FcOH were slightly lower than those described in literature,[35–39] although they were of the same order of magnitude. Such comparison was impossible for Fe(III)-NOTA and Fe(III)-DOTA due to the lack of available and reliable data.[7] All these results tend to prove that the synthetized metallic complexes display electrochemical properties comparable or even or superior to those of the reference redox species ferricyanide and ferrocenemethanol.

Determination of diffusion coefficient and heterogeneous transfer rate on screen-printed carbon electrodes.—The electrochemical behavior of the studied compounds was modified when using carbon screen-printed carbon electrodes (SPCE), probably due to the different nature of electrode material. As shown in Figs. 3E1–3H1, the peak separation ΔEp tend to expand when increasing the scan speed, demonstrating a quasi-reversible tendency for all the studied compounds. At the maximum scan rate of 150 mV s^{-1}, the peak separation was +415 mV for the model compound ferricyanide (Fig. 3E1), while lower values of +210, +160 and + 250 mV were respectively observed for Fe(III)-NOTA (Fig. 3F1), Fe(III)-DOTA (Fig. 3G1) and FcOH (Fig. 3H1. Fe(III)-NOTA and Fe(III)-DOTA displayed better characteristics, with respective $E_{1/2}$ values of −0.0576 and 0.0483 V, whereas ferricyanide and ferrocenemethanol showed higher $E_{1/2}$ values of 0.129 and 0.169 V, respectively. When examining the intensity of the oxidation peaks, the best results were obtained for FcOH and Fe(III)-NOTA, with their own intensities of 2.7×10^{-5} and 2.2×10^{-5} A, while ferricyanide and Fe(III)-DOTA showed lower signals of 1.7×10^{-5} and 1.2×10^{-5} A, respectively. Similar results were obtained for reduction peaks.

The diffusion coefficients obtained from the experiments with glassy carbon electrode allowed calculating the electroactive area of the SPCE. Nevertheless, the electroactive area of each SPCE was unique due to inherent versatility of manufacturing process. Indeed, SPCE have a non-uniform/unpolished surface that may vary due to surface contaminants, carbon ink and binder homogeneity.[10,40,41] For that reason, the electrodes area was determined using Eq. 2, taking into account the previously determined diffusion coefficients. An average value of 9.42 mm^2 was found, which is a bit lower than the geometric area (12.56 mm^2). According to this result, average diffusion coefficients were determined for SPCE through peak height vs $\upsilon^{1/2}$ graphs (Figs. 3E2–3H2) and reported in Table II (redox diffusion coefficients are in Supplement S6). Advantageously the heterogeneous electron transfer rates were found by plotting Ψ vs $[\pi DnF/(RT)]^{-1/2}\ \upsilon^{-1/2}$ (Figs. 3E3–3H3). As shown in Table II, the diffusion coefficients obtained using SPCE were in the same order than those achieved with the glassy carbon electrode, but some differences appeared for the studied compounds. Specifically, an increase in D value was observed for Fe(III)-NOTA and FcOH while a decrease of this parameter was shown for Fe(III)-DOTA and ferricyanide.

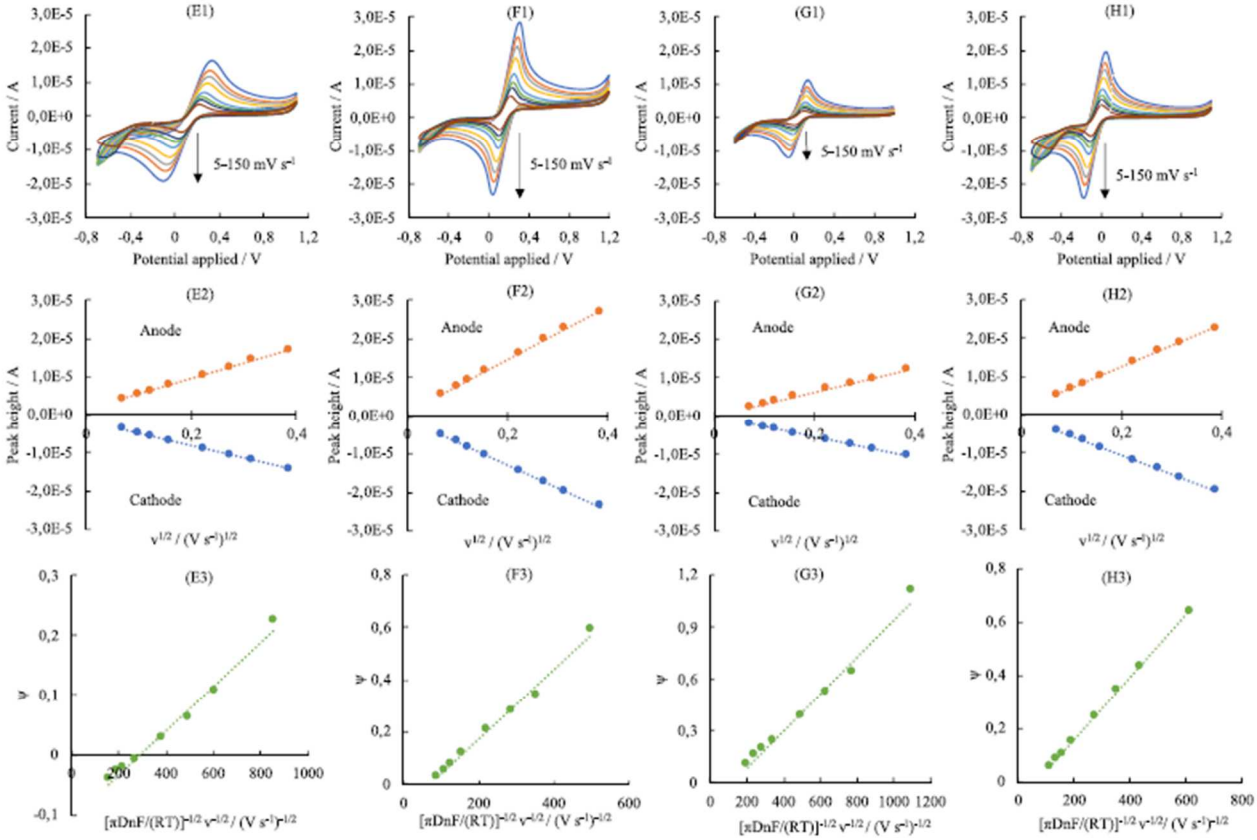


Figure 3. Cyclic voltammograms obtained on SPCE for ((E1) $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$, (F1) $[FcOH]^{0/+}$, (G1) $[Fe(III)\text{-}DOTA]^{-/0}$, (H1) $[Fe(III)\text{-}NOTA]^{-/0}$. (E2), (F2), (G2), (H2): Respective plots of anodic and cathodic peak height (Ip) vs the square root of scan rate ($\upsilon^{1/2}$). (E3), (F3), (G3), (H3): Respective plots of Ψ values vs $[\pi DnF/(RT)]^{-1/2}\ \upsilon^{-1/2}$.

Table II. Average diffusion coefficients (D) and heterogeneous electron transfer rate (k^0) of the analyzed compounds, measured using a screen-printed carbon electrode in PBS/KCl (T = 25 °C, pH = 7).

Compounds	Average diffusion coefficient *(D)* ($cm^2\ s^{-1}$)	Heterogeneous electron transfer rate constant (k^0) ($cm\ s^{-1}$)
Ferricyanide	$(2.22 \pm 0.5) \times 10^{-6}$	$(3.67 \pm 0.1) \times 10^{-4}$
FcOH	$(6.52 \pm 1.0) \times 10^{-6}$	$(1.28 \pm 0.04) \times 10^{-3}$
Fe(III)-DOTA	$(1.34 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	$(1.01 \pm 0.06) \times 10^{-3}$
Fe(III)-NOTA	$(4.32 \pm 0.5) \times 10^{-6}$	$(1.14 \pm 0.1) \times 10^{-3}$

Heterogeneous electron transfer rate constants k^0 were determined using the combined method of Nicholson-Lavagnini (Eqs. 4 and 5), based on the average value of diffusion coefficients. The values calculated for Fe(III)-NOTA, Fe(III)-DOTA and FcOH were relatively close to each other, ranging from 1.01×10^{-3} to 1.28×10^{-3} cm s^{-1}, while for $[Fe(CN)_6]^{3-}$ the value was in the 10^{-4} cm s^{-1} order. Data acquired for FcOH and $[Fe(CN)_6]^{3-}$ are in accordance with those described in literature on SPCE, which report values ranging from 3.7×10^{-5} to 6.5×10^{-3} cm s^{-1} for $[Fe(CN)_6]^{3-}$[14,42] and $(6.8 \pm 2.1) \times 10^{-3}$ cm s^{-1} for FcOH.[34]

Conclusions

Fe(III)-DOTA and Fe(III)-NOTA complexes were successfully obtained and their main parameters like diffusion coefficients and heterogeneous electron transfer rate constants were determined on screen-printed carbon electrodes using Randles-Sevcik and Nicholson-Lavagnini methods. Comparison of the results with ferricyanide and ferrocenemethanol allowed concluding that DOTA and NOTA iron complexes display at least similar properties to those of reference redox species, particularly concerning parameters like intensity, peak separation, oxidoreduction range or even heterogeneous electron transfer rate. Due to its characteristics similar to those of ferrocenemethanol, Fe(III)-NOTA appeared to be a good candidate for electrochemical labeling applications, and more specifically for the development of electrochemical immunosensors, where either the antibody or the target can be labeled, depending on the format of the assay.[20,43] Similar applications will be found in aptasensors development, where a selected nucleotidic aptamer can be labeled using electrochemical compounds, allowing the direct detection of a specific target molecule.[44]

Although less attractive from an electrochemical aspect, Fe(III)-DOTA should not be discarded due to its affordability compared to Fe (III)-NOTA. This compound displays even better characteristics than ferricyanide in terms of peak separation and heterogeneous electron transfer rate constants. Therefore, DOTA and NOTA iron complexes have suitable characteristic in terms of electrochemistry that made them attractive and competitive alternatives for their use in the biosensor field.

Acknowledgments

The authors are grateful for the assistance of ICMUB in providing the chelators DOTA and NOTA. Michel Gaillard thanks Region Occitanie and University of Perpignan for PhD granting. All analyses were performed using the facilities of the "Biodiversité et Biotechnologies Marines" platform at the University of Perpignan (Bio2Mar, http://bio2mar.obs-banyuls.fr).

ORCID

Carole Calas-Blanchard https://orcid.org/0000-0003-3929-9241
Nicolas Inguimbert https://orcid.org/0000-0002-0309-9048
Thierry Noguer https://orcid.org/0000-0003-2078-954X

References

1. C. Bernhard, C. Goze, Y. Rousselin, and F. Denat, *Chem. Commun.*, **46**, 8267 (2009).
2. V. Tolmachev, C.-B. Yim, J. Rajander, A. Perols, A. E. Karlström, M. Haaparanta-Solin, T. J. Grönroos, O. Solin, and A. Orlova, *Contrast Media Mol. Imaging*, **2017** 8565802 (2017).
3. D. Satpati, R. Sharma, H. D. Sarma, and A. Dash, *Chem. Biol. Drug Des.*, **91**, 781 (2018).
4. C. L. Tenório-Daussat, R. A. Hauser-Davis, T. D. Saint'Pierre, A. Tholey, and D. Schaumlöffel, *Microchem. J.*, **118**, 238 (2015).
5. C. Wängler, M. Schäfer, R. Schirrmacher, P. Bartenstein, and B. Wängler, *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 3864 (2011).
6. C. Canovas, M. Moreau, C. Bernhard, A. Oudot, M. Guillemin, F. Denat, and V. Goncalves, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 10646 (2018).
7. T. L. Hatfield, R. J. Staples, and D. T. Pierce, *Inorg. Chem.*, **49**, 9312 (2010).
8. D. Pletcher, *A First Course in Electrode Processes* (Royal Society of Chemistry, United Kingdom) 2nd ed., 62 (2009).
9. B. Trémillon, *Electrochimie analytique et réactions en solution Tome 1. Réactions en solution* (Elsevier Masson, France) (1993).
10. E. P. Randviir, *Electrochim. Acta*, **286**, 179 (2018).
11. P. Zanello, *Inorganic Electrochemistry: Theory, Practice and Application* (Royal Society of Chemistry, United Kingdom) (2007).
12. A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* (Wiley Textbooks, United States of America) 2nd ed. (2000).
13. D. A. C. Brownson and C. E. Banks, *The Handbook of Graphene Electrochemistry* (Springer, United Kingdom) (2014).
14. R. O. Kadara, N. Jenkinson, and C. E. Banks, *Sens. Actuators B Chem.*, **138**, 556 (2009).
15. R. S. Nicholson, *Anal. Chem.*, **37**, 1351 (1965).
16. U. Eisner and E. Gileadi, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, **28**, 81 (1970).
17. R. J. Klingler and J. K. Kochi, *J. Phys. Chem.*, **85**, 1731 (1981).
18. I. Lavagnini, R. Antiochia, and F. Magno, *Electroanalysis*, **16**, 505 (2004).
19. A. Alawad, G. Istamboulié, C. Calas-Blanchard, and T. Noguer, *Sens. Actuators B Chem.*, **288**, 141 (2019).
20. H. Kanso, L. Barthelmebs, N. Inguimbert, and T. Noguer, *Anal. Chem.*, **85**, 2397 (2013).
21. N. Paniel, G. Istamboulié, A. Triki, C. Lozano, L. Barthelmebs, and T. Noguer, *Talanta*, **162**, 232 (2017).
22. C. A. Chang, L. C. Francesconi, M. F. Malley, K. Kumar, J. Z. Gougoutas, M. F. Tweedle, D. W. Lee, and L. J. Wilson, *Inorg. Chem.*, **32**, 3501 (1993).
23. D. A. Dixon, M. Shang, and A. G. Lappin, *Inorganica Chim. Acta*, **290**, 197 (1999).
24. B. Alirezapour, M. J. Rasaee, A. R. Jalilian, S. Rajabifar, Mohammadnejad, M. Paknejad, E. Maadi, and S. Moradkhani, *Nucl. Med. Biol.*, **43**, 73 (2016).
25. A. F. Shoair, A. A. El-Bindary, N. A. El-Ghamaz, and G. N. Rezk, *J. Mol. Liq.*, **269**, 619 (2018).
26. M. A. Rahim, H. Ejima, K. L. Cho, K. Kempe, M. Müllner, J. P. Best, and F. Caruso, *Chem. Mater.*, **26**, 1645 (2014).
27. Y. Jiang, L. Yang, C. M. Bohn, G. Li, D. Han, N. S. Mosier, J. T. Miller, H. I. Kenttämaa, and M. M. Abu-Omar, *Org. Chem. Front.*, **2**, 1388 (2015).
28. K. Wieghardt, U. Bossek, P. Chaudhuri, W. Herrmann, B. C. Menke, and J. Weiss, *Inorg. Chem.*, **21**, 4308 (1982).
29. N. Viola-Villegas and R. P. Doyle, *Coord. Chem. Rev.*, **253**, 1906 (2009).
30. A. C. Wright, S. J. Clarke, C. K. Howard, P. Bingham, S. Forder, D. Holland, D. Martlew, and H. E. Fischer, *Phys. Chem. Glas.*, **55**, 243 (2014).
31. D. L. Wertz and M. L. Steele, *Inorg. Chem.*, **19**, 1652 (1980).
32. N. Aristov and A. Habekost, *World J. Chem. Educ.*, **3**, 115 (2015).
33. N. Elgrishi, K. J. Rountree, B. D. McCarthy, E. S. Rountree, T. T. Eisenhart, and J. L. Dempsey, *J. Chem. Educ.*, **95**, 197 (2018).
34. G. W. Bishop, B. K. Ahiadu, J. L. Smith, and J. D. Patterson, *J. Electrochem. Soc.*, **164**, B23 (2017).
35. P. Sun and M. V. Mirkin, *Anal. Chem.*, **78**, 6526 (2006).
36. A. Dutta, D. L. DuBois, J. A. S. Roberts, and W. J. Shaw, *Proc. Natl Acad. Sci.*, **111**, 16286 (2014).
37. J. Luo, A. Sam, B. Hu, C. DeBruler, X. Wei, W. Wang, and T. L. Liu, *Nano Energy*, **42**, 215 (2017).
38. K. E. Heusler, *Berichte Bunsenges. Für Phys. Chem.*, **73**, 1098 (1969).
39. P. Fanjul-Bolado, D. Hernández-Santos, P. J. Lamas-Ardisana, A. Martín-Pernía, and A. Costa-García, *Electrochim. Acta*, **53**, 3635 (2008).
40. H. Kanso, M. B. González García, L. F. Llano, S. Ma, R. Ludwig, P. Fanjul Bolado, and D. H. Santos, *Biosens. Bioelectron.*, **93**, 298 (2017).
41. A. García-Miranda Ferrari, C. W. Foster, P. J. Kelly, D. A. C. Brownson, and C. E. Banks, *Biosensors*, **8**, 53 (2018).
42. A. P. Washe, P. Lozano-Sánchez, D. Bejarano-Nosas, and I. Katakis, *Electrochim. Acta*, **91**, 166 (2013).
43. M. Kondzior and I. Grabowska, *Sensors*, **20**, 2014 (2020).
44. A. B. Jrad, H. Kanso, D. Raviglione, T. Noguer, N. Inguimbert, and C. Calas-Blanchard, *Chem. Commun.*, **55**, 12821 (2019).

3) PARTIE EXPÉRIMENTALE

3.1) RÉACTIFS ET SOLVANTS

Le ferricyanure de potassium $K_3[Fe(CN)_6]$, le chlorure de fer (III) ($FeCl_3$), l'hydroxyde de sodium (NaOH) et l'acide chlorhydrique (HCl) ont été achetés auprès de SIGMA-ALDRICH. Les agents de chélation NOTA et DOTA ont été fournis par CHEMATECH (France). Le ferrocèneméthanol a été obtenu auprès d'ALFA AESAR (USA).
Une solution tampon phosphate PBS/KCl a été préparée contenant 102,7 mM de KCl, 10 mM de Na_2PO_4, 1,8 mM de KH_2PO_4 et 137 mM de NaCl. Le tampon de prétraitement pour les électrodes est constitué d'une solution aqueuse de H_2SO_4 à 0,5 M contenant 0,1 M de KCl.

3.2) APPAREILLAGE ET SUPPORTS DE MESURES

Les mesures d'absorbance ont été effectuées sur un spectrophotomètre UV-1800 SHIMADZU et retraitées avec le logiciel l'UVPROBE 2.42. Les analyses de masse ont été réalisées sur un appareillage de marque THERMO FISHER SCIENTIFIC comprenant une chaîne HPLC ACCELA couplé à un spectromètre de masse de type LCQ FLEET équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI) et d'un analyseur 3D ion trap. Les spectres FTIR ont été pris sur un spectromètre NICOLET IS5 THERMO FISHER SCIENTIFIC avec le logiciel OMNIC version 9.2.86 THERMO FISHER SCIENTIFIC. Les mesures électrochimiques ont été effectuées à l'aide d'un potentiostat/galvanostat AUTOLAB PGSTAT100 avec le logiciel NOVA version 2.1.3 METROHM.

Afin d'analyser les propriétés électrochimiques des complexes métalliques, des électrodes ont été choisies comme transducteurs électrochimiques pour appréhender leurs caractéristiques. Nous avons utilisé pour ce travail des systèmes à trois électrodes incluant une électrode à carbone vitreux et des électrodes sérigraphiées.

- **Électrode à carbone vitreux (Glassy Carbon Electrode ou GCE)**

Les électrodes à carbone vitreux sont celles qui sont les plus utilisées, principalement du fait de leur versatilité et de la facilité de modification de leur surface.
Le système à trois électrodes employé (Figure 23) contient une électrode de travail en carbone vitreux PALMSENS CHI 104 (3 mm de diamètre) en association avec une contre-électrode en platine METROHM et une électrode de référence Ag/AgCl METROHM

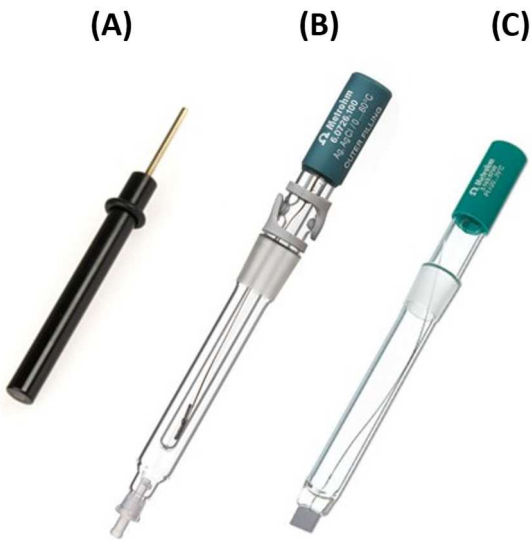


Figure 23: Le système à trois électrodes : électrode de travail en carbone vitreux ***(A)****, électrode de référence Ag/AgCl* ***(B)*** *et contre-électrode à embout de platine* ***(C)***

- **Électrodes de carbone sérigraphiées (Screen-Printed Carbon Electrodes ou SPCEs)**

Le screen-printing (sérigraphie) est une technique qui permet la production rapide et en masse d'électrodes à faible coût, pouvant ensuite servir au développement de biocapteurs. Les électrodes sérigraphiées sont fabriquées en déposant sur un support non conducteur comme du plastique ou de la céramique, plusieurs couches d'encres conductrices à base de différents matériaux, le carbone et l'or étant les plus utilisés. La grande versatilité de ce type d'électrodes est leur atout majeur, car elles peuvent être modifiées et adaptées précisément pour chaque type d'analyse. C'est ainsi qu'il est possible d'ajouter toutes sortes de composés, tels que des métaux ou des enzymes aux couches d'encres qui les constituent.

Les SPCEs utilisées dans nos recherches (Figure 24), ont été fabriquées au laboratoire LBBM-BAE à l'aide d'un système à sérigraphier DEK248, dans une configuration à trois électrodes incluant une électrode de travail en graphite (diamètre 4 mm), une électrode de référence Ag/AgCl (16 mm × 1,5 mm) et une contre-électrode incurvée en graphite (16 mm × 1,5 mm).

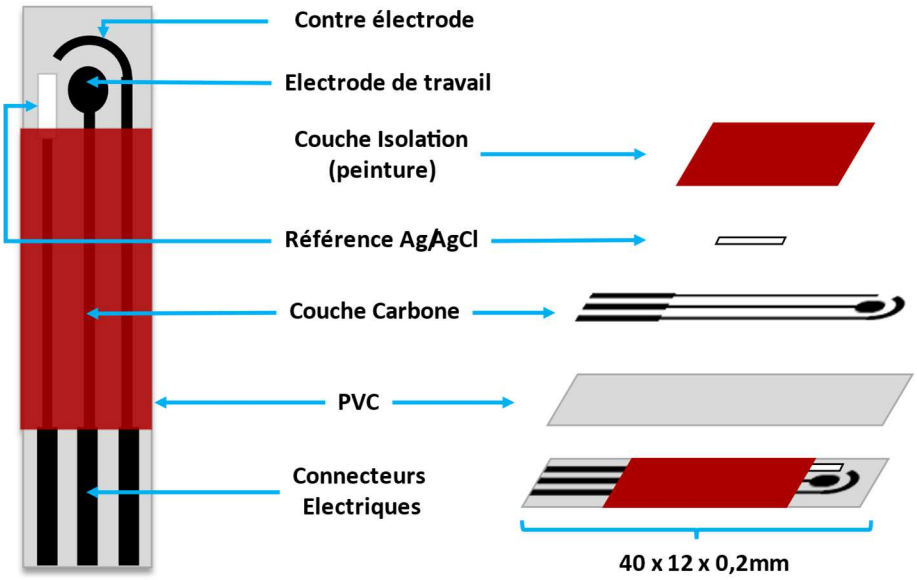


Figure 24: Représentation schématique détaillée des SPCEs utilisées et produites par le laboratoire LBBM-BAE

Ces SPCEs ont déjà prouvé leur utilité et leur efficacité par le passé, elles sont à la base de la conception de très nombreux biocapteurs, notamment ceux développés dans notre laboratoire [172,173].

3.3) PARAMÈTRES DES MESURES EN UV-VIS, FTIR, MS, CV

Les diverses mesures utilisées pour étudier la formation des complexes et définir les plus appropriées à une utilisation en électrochimie, ont été réalisées selon les paramètres suivants :

- Les complexes métalliques ont été analysés en FTIR sur pastilles de KBr entre 4000 et 400 cm^{-1} durant 16 scans ;
- En spectroscopie UV-visible, ils ont été préparés dans de l'eau distillée pour obtenir une concentration de 0,5 à 2 mM. Les spectres ont été mesurés à partir de 190 à 1100 nm dans des cuves en quartz, à un pH proche de 5 ;
- Pour la spectrométrie de masse, les solutions de complexes ont été préparées dans de l'eau distillée puis analysés en ESI (positif) ;
- Pour la voltampérométrie cyclique, les complexes métalliques ont été préparés dans des solutions de KCl à 0,1 M pH 5 pour obtenir des concentrations allant de 1 à 2 mM.

L'étude en CV de caractérisation des complexes métalliques choisis s'est déroulée en fonction des préparations décrites par la suite.

L'électrode de carbone vitreux a été polie avec une poudre d'alumine de 5 microns lavée à l'eau distillée et séchée au méthanol pour éliminer l'accumulation de produits de réaction redox provenant de précédentes expériences. Les SPCEs ont été prétraitées pour éliminer efficacement les liants organiques de la surface des électrodes. Le prétraitement a été réalisé avec une solution de 0,5 M de H_2SO_4 dans 0,1 M KCl, en appliquant six scans successifs en voltampérométrie cyclique entre -1,5 et 1 V à une vitesse de 100 $mV.s^{-1}$.
Les solutions de complexes métalliques ont été préparées à pH 7 dans du PBS contenant 0,1 M de KCl pour obtenir une concentration de 1 mM. Les mesures en voltampérométrie cyclique ont été réalisées en immergeant l'électrode de carbone vitreux dans 10 mL de la solution, et dans le cas des SPCEs en déposant 100 µL de chaque solution sur leur surface. Les mesures ont été effectuées en triplicat pour chacune des vitesses de balayage suivantes : 5 ; 10 ; 15 ; 25 ; 50 ; 75 ; 100 ; 150 $mV.s^{-1}$.

3.4) PRÉPARATION DES COMPLEXES MÉTALLIQUES

Les complexes métalliques à base de DOTA / NOTA ont été synthétisés car ils ne sont pas disponibles dans le commerce. Les modes opératoires suivants sont le résultat d'optimisations de divers protocoles de complexation décrits dans la littérature [146,163,166,174].

- **Fe(III)-DOTA**

50 mg de DOTA (0,124 mmol) et 20 mg de $FeCl_3$ (0,124 mmol) ont été dissous séparément dans 10 mL d'eau distillée. La solution de ligand a été ajoutée au goutte à goutte à la solution de métal**,** le mélange est d'une couleur jaune. Le mélange réactionnel est porté à reflux sous agitation pendant trois heures. Après une nuit à température ambiante, le composé n'a pas cristallisé. Le solvant a ensuite été éliminé par lyophilisation. Le solide récupéré a été lavé à l'éthanol trois fois et séché à température ambiante pour fournir 42,9 mg (73,6 %) du complexe souhaité. FTIR (pastille de KBr) : 1635,21 cm^{-1} (C=O, COOM) avec M = métal. UV–vis : λ_{max} = 240–320 nm. Masse calculée pour $C_{16}H_{25}N_4O_8Fe$ (457,1 g/mol). Masses trouvées : 457,9 m/z ($M + H^+$) ; 479,9 m/z ($M + Na^+$) ; 914,7 m/z ($2M + H^+$) ; 936,7 m/z ($2M + Na^+$).

- **Fe(III)-NOTA**

35 mg de NOTA (0,115 mmol) et 18,72 mg $FeCl_3$ (0,115 mmol) ont été dissous séparément dans 9 mL d'eau distillée. La solution de ligand a été ajoutée goutte à goutte à la solution de métal donnant une solution jaune intense. Le mélange réactionnel a ensuite été porté au reflux et agité pendant trois heures. Après une nuit à refroidir à température ambiante, le composé a

cristallisé. Après filtration, les cristaux ont été lavés avec de l'eau et de l'éthanol puis séchés. Masse du complexe = 25,7 mg (62.2 %). FTIR (pastille de KBr) : 1664,76 cm^{-1} (C=O, COOM). UV–vis : λ_{max} = 260 nm. Masse calculée pour $C_{12}H_{18}O_6N_3Fe$ (356,0 g/mol). Masses trouvées : 356,8 m/z ($M + H^+$) ; 378,8 m/z^{-1} ($M + Na^+$) ; 712,5 m/z ($2M + H^+$) ; 734,5 m/z ($2M + Na^+$) ; 1068,3 m/z ($3M + H^+$) ; 1090,3 m/z ($3M + Na^+$).

- **Cu(II)-DOTA**

50 mg de DOTA (0,1236 mmol) ont été dissous dans 10 mL d'eau distillée. 16,6 mg de $CuCl_2$ (0,1236 mmol) ont été dissous dans 10 mL d'eau distillée. La solution de DOTA a été ajoutée au goutte à goutte rapide dans un ballon contenant la solution de métal, donnant une couleur bleue plus intense. Le mélange a ensuite été mis sous agitation à reflux durant trois heures. Après réaction, des cristaux ont commencé à se former en surface et au fond du ballon. Après une nuit à température ambiante, la solution a été filtrée et les cristaux lavés à l'eau et à l'éthanol puis séchés.

Masse du complexe = 38 mg (63 %). λ_{max} = 268 et 733 nm. Masse calculée pour $C_{16}H_{25}N_4O_8Cu$ (464,09 g/mol). Masses trouvées : 464,8 m/z ($M + H^+$) ; 486,7 m/z ($M + Na^+$) ; 928,6 m/z ($2M + H^+$) ; 950,6 m/z ($2M + Na^+$).

- **Cu(II)-NOTA**

50 mg de NOTA (0,1648 mmol) ont été dissous dans 10 mL d'eau distillée. Puis 22,2 mg $CuCl_2$ (0,1648 mmol) en solution dans 10 mL ont été ajoutés par goutte à goutte, donnant une solution de couleur bleue de plus en plus intense Le mélange est porté à reflux durant trois heures. Après une nuit à température ambiante, le produit ne cristallisant pas, la solution a été congelée puis lyophilisée.

Masse = 48,3 mg (87%). λ_{max} = 265 et 748 nm. Masse calculée pour $C_{12}H_{18}O_6N_3Cu$ (363,05 g/mol). Masses trouvées : 363,8 m/z ($M + H^+$) ; 385,9 m/z ($M + Na^+$) ; 726,6 m/z ($2M + H^+$) ; 748,7 m/z ($2M + Na^+$).

- **Ni(II)-DOTA**

50 mg de DOTA (0,1236 mmol) ont été dissous dans 5 mL d'eau distillée. 20 mg de $NiCl_2$ $6H_2O$ (0,1236 mmol) ont été dissous dans 5 mL d'eau distillée. La solution de DOTA a été ajouté au goutte à goutte rapide dans un ballon contenant la solution de métal, et le mélange a été mis sous agitation à reflux durant trois heures, induisant un changement de couleur du vert au violet et l'apparition d'un précipité violet. Le précipité a ensuite été séparé de la solution par

centrifugation et le tout congelé et lyophilisé. Le solide récupéré a enfin été lavé à l'éthanol et séché.

Masse du complexe = 32 mg (53 %). λ_{max} = 382 et 540 nm. Masse calculée pour $C_{16}H_{25}N_4O_8Ni$ (459,1 g/mol). Masses trouvées : 460,0 m/z ($M + H^+$) ; 482,1 m/z ($M + Na^+$) ; 919,9 m/z ($2M + H^+$) ; 942,0 m/z ($2M + Na^+$).

- **Ni(II)-NOTA**

50 mg de NOTA (0,1648 mmol) ont été dissous dans 5 mL d'eau distillée. Puis 39,18 mg $NiCl_2$. 6 H_2O (0,1648 mmol) en solution dans 5 mL d'eau ont été ajoutés par goutte à goutte, provoquant un changement de coloration du vert au violet. Le mélange a ensuite été porté à reflux durant trois heures. Aucun précipité ou cristal n'est apparu après une nuit à température ambiante, la solution a donc été congelée puis lyophilisée.

Masse = 38 mg (64%). λ_{max} = 357 et 560 nm. Masse calculée pour $C_{12}H_{18}O_6N_3Ni$ (358,05 g/mol). Masses trouvées : 358,74 m/z ($M + H^+$) ; 380,9 m/z ($M + Na^+$) ; 738,6 m/z ($2M + Na^+$).

- **Co(II)-DOTA**

50 mg de DOTA (0,1236 mmol) ont été dissous dans 5 mL d'eau distillée. 36 mg de $Co(NO_3)_2$ $6H_2O$ (0,1236 mmol) ont été dissous dans 5 mL d'eau distillée. La solution de DOTA a été ajoutée goutte à goutte dans un ballon contenant la solution de métal. Le mélange a ensuite été mis sous agitation et à reflux durant trois heures, provoquant un changement de couleur et l'apparition d'un précipité rouge foncé. Le précipité a été ensuite séparé de la solution par centrifugation et le tout congelé et lyophilisé. Le solide récupéré a enfin été lavé à l'éthanol et séché.

Masse du complexe = 28 mg (36 %) : λ_{max} = 511 nm. Masse calculée pour $C_{16}H_{25}N_4O_8Co$ (460,1 g/mol). Masses trouvées : 460,9 m/z ($M + H^+$) ; 482,9 m/z ($M + Na^+$) ; 942,5 m/z ($2M + Na^+$).

- **Co(II)-NOTA**

50 mg de NOTA (0,1648 mmol) ont été dissous dans 10 mL d'eau distillée. 47,97 mg $Co(NO_3)_2$. 6 H_2O (0,1648 mmol) en solution dans 10 mL d'eau ont été ajoutés par goutte à goutte, donnant une coloration rose foncé. Le mélange a été chauffé à reflux durant trois heures. Aucuns précipités ou cristaux ne sont apparus après une nuit à température ambiante. La solution a enfin été congelée puis lyophilisée. Masse = 33 mg (55%). λ_{max} = 370 et 509 nm. Masse calculée pour $C_{12}H_{18}O_6N_3Co$ (359,05 g/mol). Masses trouvées : 359,9 m/z ($M + H^+$) ; 381,9 m/z ($M + Na^+$) ; 718,46 m/z ($2M + H^+$) ; 740,5 m/z ($2M + Na^+$).

4) CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons rapporté l'étude de la complexation de différents métaux communs (Fe, Ni, Co, Cu) avec les ligands macrocycliques de type DOTA et NOTA, ainsi que l'étude de leurs caractéristiques en voltampérométrie cyclique. En utilisant diverses méthodes d'analyse en électrochimie, nous avons défini certaines caractéristiques des complexes Fe(III)-DOTA et Fe(III)-NOTA, parmi lesquelles les coefficients de diffusion et les constantes de taux de transfert d'électrons hétérogènes, que ce soit sur une électrode de carbone vitreux ou sur des électrodes de carbone sérigraphiées.

Par une comparaison avec des espèces redox de référence comme le ferricyanure et le ferrocèneméthanol, nous avons pu mettre en évidence que les complexes métalliques DOTA/NOTA pouvaient être adaptés à la conception de biocapteurs. En effet, ils possèdent des caractéristiques similaires voire meilleures que celles des composés de référence, notamment au niveau de la séparation des pics, de la plage d'oxydo-réduction ou encore du taux de transfert d'électrons hétérogène. Le Fe(III)-NOTA possède des caractéristiques similaires à celles du ferrocèneméthanol et se montre le plus apte au marquage électrochimique d'aptamères ou anticorps pour le développement de biocapteurs. Le Fe(III)-DOTA, quant à lui, est un peu moins intéressant. Néanmoins, il reste plus performant que le ferricyanure en termes de séparation des pics et de taux de transfert d'électrons hétérogènes.
En conclusion, les complexes de Fer avec le DOTA et NOTA constituent des alternatives prometteuses aux marqueurs électrochimiques classiques utilisés dans le domaine des biocapteurs.

CHAPITRE 3 : INSERTION DES COMPLEXES MÉTALLIQUES DANS DES BIOCAPTEURS

1) INTRODUCTION

L'étude et la caractérisation électrochimique terminées, l'objectif suivant a été d'utiliser les complexes métalliques dans un biocapteur. Différentes cibles ont été choisies afin d'exemplifier cette approche :

- Des bactéries du genre *Vibrio* ;
- Plusieurs contaminants : l'aflatoxine, l'ochratoxine et de l'estradiol.

La détection de ces cibles a été réalisée en utilisant des oligonucléotides/aptamères développés spécifiquement pour les reconnaître. Dans ce chapitre, nous présentons les essais menés pour concevoir un génocapteur spécifique des bactéries *Vibrio*, de même que les essais réalisés pour la reconnaissance de l'aflatoxine, de l'ochratoxine et de l'estradiol.

2) GÉNOCAPTEUR POUR LA DÉTECTION DE BACTÉRIES DE TYPE *VIBRIO*

Sur la base de précédents travaux réalisés par le laboratoire, l'ADN de bactérie *Vibrio* a été choisi pour réaliser les premiers tests de conception d'un génocapteur intégrant nos complexes métalliques comme marqueurs électrochimiques [7]. Le capteur inclura des sondes d'oligonucléotides immobilisées capables de s'hybrider avec certaines séquences spécifiques d'ADN/ARN bactérien, même dans des échantillons environnementaux où la mesure est difficile.

Le format du génocapteur choisi pour cette étude comprend un court oligonucléotide de capture fixé sur une électrode sérigraphiée permettant la fixation par hybridation de l'ADN bactérien cible. Un oligonucléotide de détection marqué par les complexes métalliques étudiés, vient ensuite révéler la présence de cette cible piégée. L'oligonucléotide marqué pourra aussi contenir un second marqueur (fluorescent ou autre) afin d'accroître les possibilités de détection. L'approche que nous avons définie repose sur un travail de l'ICMUB [139] dans lequel, une molécule de dichlorotétrazine permet de réaliser la conjugaison sur un oligonucléotide, de deux complexes de cuivre et/ou deux colorants fluorescents. Ainsi, en utilisant ce nouveau procédé, il serait possible d'effectuer un double marquage sur un oligonucléotide (Figure 25). L'avantage d'un tel marquage est la possibilité de détecter un large éventail de cibles biologiques et chimiques, en s'affranchissant d'éventuels problèmes liés à l'autofluorescence ou électroactivité intrinsèque de certaines cibles.

L'utilisation en tant que sondes capture de dérivés de nucléotides comme les LNA et les PNA, dont les avantages ont été discutés précédemment, pourraient aussi permettre d'améliorer les performances du capteur.

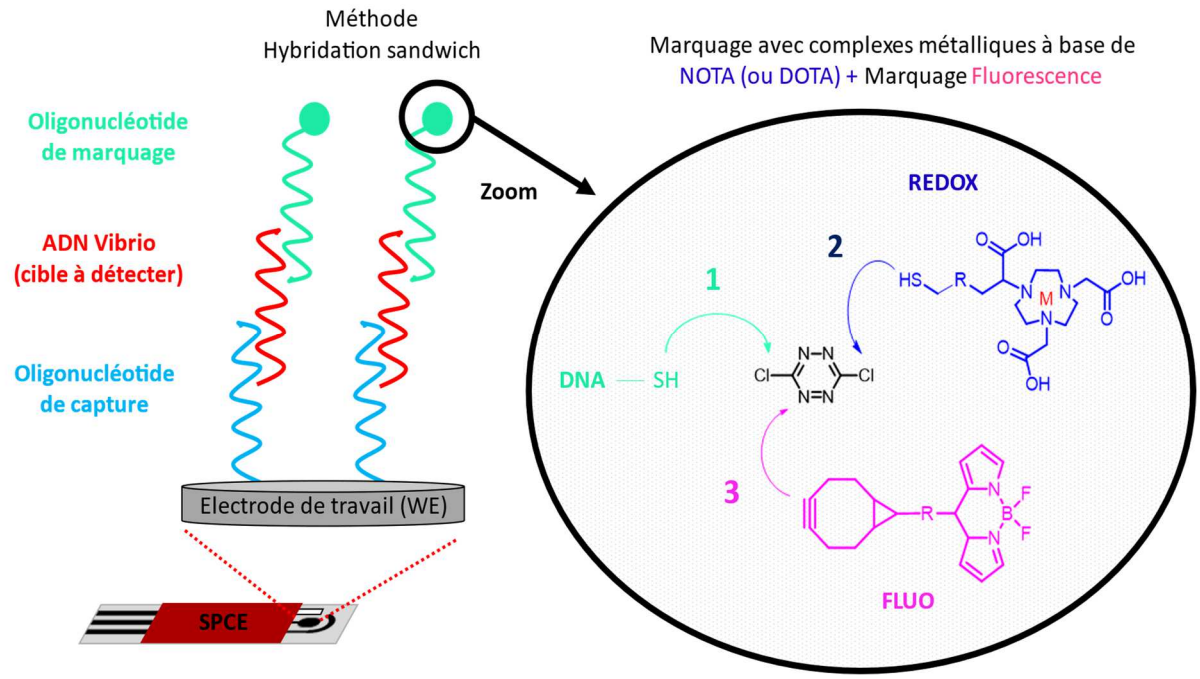


Figure 25: Représentation théorique du biocapteur désiré

Après la présentation des bactéries de type *Vibrio*, nous verrons les différentes étapes de conception du génocapteur, ainsi que les optimisations effectuées pour prouver son fonctionnement.

2.1) PRÉSENTATION DE LA CIBLE *VIBRIO*

Vibrio, du latin *vibrare* (vibrer), est un genre de bactéries ubiquitaires à gram négatif en forme de bâtonnets, dont la taille varie entre 1 et 3 µm [179]. Le genre *Vibrio* provient du phylum des *Pseudomonadota* (protéobactéries procaryotes), de la classe des γ-protobactéries et de la famille des *Vibrionaceae*. Il inclut à ce jour plus de 100 espèces de bactéries rassemblées en une quinzaine de clades [175–177]. Les nombreuses espèces de *Vibrio* se trouvent dans les écosystèmes aquatiques. En effet, ils sont soit sous forme libre dans la colonne d'eau, soit sous forme de biofilms à la surface du phytoplancton, du zooplancton, de macroalgues, ou encore de sédiments. Ces bactéries se développent préférablement dans des milieux où la température est supérieure à 15°C, et la salinité inférieure à 25 parts pour mille de NaCl [178]. Elles sont aussi souvent associées aux animaux aquatiques sauvages et d'élevage tels que les poissons, les crustacés et les mollusques [179].

La majorité des espèces de bactéries *Vibrio* est inoffensive et possède même des relations symbiotiques avec des hôtes marins. Cependant, certaines espèces sont pathogènes pour l'Homme et les animaux aquatiques, et sont responsables par ingestion ou contact de deux maladies : la vibriose et le choléra. Chez l'Homme les deux maladies sont possibles, les espèces responsables sont : *Vibrio cholerae* (seul responsable du choléra), *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* et *Vibrio alginolyticus*.

En France, par exemple, les maladies liées aux *Vibrio* sont fréquemment signalées dans les zones côtières et particulièrement sur la côte atlantique.
Les symptômes du choléra et de la vibriose sont communs et se traduisent généralement par de fortes gastroentérites et des septicémies (crampes, nausées, fièvre…), la vibriose se caractérisant par des infections cutanées (inflammations et nécroses).
Il y a un fort contraste entre les pathologies humaines et celles rencontrées dans le milieu naturel et en particulier au sein des élevages. En effet, une trentaine de souches de *Vibrio* pathogènes peuvent infecter les poissons, crustacés et mollusques [7,180]. Les bactéries se développent tout d'abord en surface de l'hôte, puis s'insinuent dans les tissus mous où elles se multiplient avant d'être relarguées dans le milieu à la mort de l'hôte. Les symptômes varient selon l'hôte marin, dont les principaux sont les suivants : anorexies, changements de comportements, abcès, inflammations, nécroses et dans certains cas l'hôte peut devenir luminescent [181,182].
Ces maladies ont un impact négatif important sur les aquacultures. En effet, depuis 2004 les activités ostréicoles en Europe sont touchées par une mortalité anormale, causée en partie par la présence de bactéries *Vibrio*. Ces bactéries et les effets néfastes qu'elles induisent, constituent une menace pour la sécurité alimentaire mondiale dans un contexte de demande en croissance constante. De plus, les maladies auxquelles elles sont associées ont un impact économique négatif sur les filières aquacoles.

2.2) RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

2.2.1) ÉTUDE DE LA CONCEPTION DU CAPTEUR

L'objectif a été de développer un génocapteur comprenant les complexes métalliques pour la détection de bactérie *Vibrio*. Cette section présente chaque aspect lié à la conception du capteur : des oligonucléotides utilisés, en passant par la méthode de traitement des données mesurées, jusqu'aux résultats censés être obtenus.

2.2.1.1) SÉLECTION DES OLIGONUCLÉOTIDES

La sélection des oligonucléotides a été réalisée en fonction d'une thèse sur les *Vibrio* [7] réalisée dans notre laboratoire. Dans ce travail, la cible était le gène codant pour l'ARNr 16S pour lequel une sonde capture complémentaire de 35 bases a été trouvée.

Oligonucléotide sonde capture « Vib 35 » (35 bases):

5' – TTG AGC CCC GGG CTT TCA CAT CTG ACT TAA TGA AC – 3'

Comme contrôle positif, de l'ADN *Vibrio* de 70 bases a été utilisé à la place de l'ARNr 16S en raison d'une meilleure stabilité / résilience, mais aussi du fait que le procédé de reconnaissance est le même pour ADN et ARN.

Oligonucléotide contrôle positif « ADN *Vibrio* cible » (70 bases):

5' – TAA TCG GAA TTA CTG GGC GTA AAG CGC ATG CAG GT

GTT CAT TAA GTC AGA TGT GAA AGC CCG GGG CTC AA – 3'

Nous avons donc utilisé les oligonucléotides précédents dans nos recherches, avec cependant quelques modifications. Précisément, la sonde Vib 35 a été adapté dans le but de faciliter l'utilisation de différents types d'oligonucléotides comme les LNA ou PNA. Il a donc été nécessaire de réduire le nombre de bases de guanine (G) et de cytosine (C), afin de garder un pourcentage de présence de 30-60 %. La nouvelle séquence de l'oligonucléotide a ensuite été validée pour la détection de *Vibrio,* par analyse *in silico* sur RDP (Ribosomal Database Project).

Oligonucléotide modifié sonde capture « Vib 25 » (25 bases) :

5' – GGC TTT CAC ATC TGA CTT AAT GAA C – 3'

2.2.1.2) MESURES DE SPECTROSCOPIE D'IMPÉDANCE ÉLECTROCHIMIQUE

Chaque étape de la conception du biocapteur a été contrôlée en réalisant des mesures d'impédance. La mesure de l'impédance dans un système électrique est appelée spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS). C'est une technique se basant sur la réponse à l'application d'un potentiel sur une large gamme de fréquence (50 kHz à 0,001 Hz généralement). L'EIS

présente plusieurs avantages qui en font l'une des techniques les plus appropriées pour caractériser des systèmes électrochimiques :

- Elle permet des mesures en séparant les influences de chaque composant ;
- Elle est très sensible aux variations à la surface d'une électrode, et repère d'infimes changements non détectables par d'autres techniques ;
- Hormis une espèce redox externe servant de médiateur, aucun marquage redox n'est nécessaire pour réaliser l'analyse.

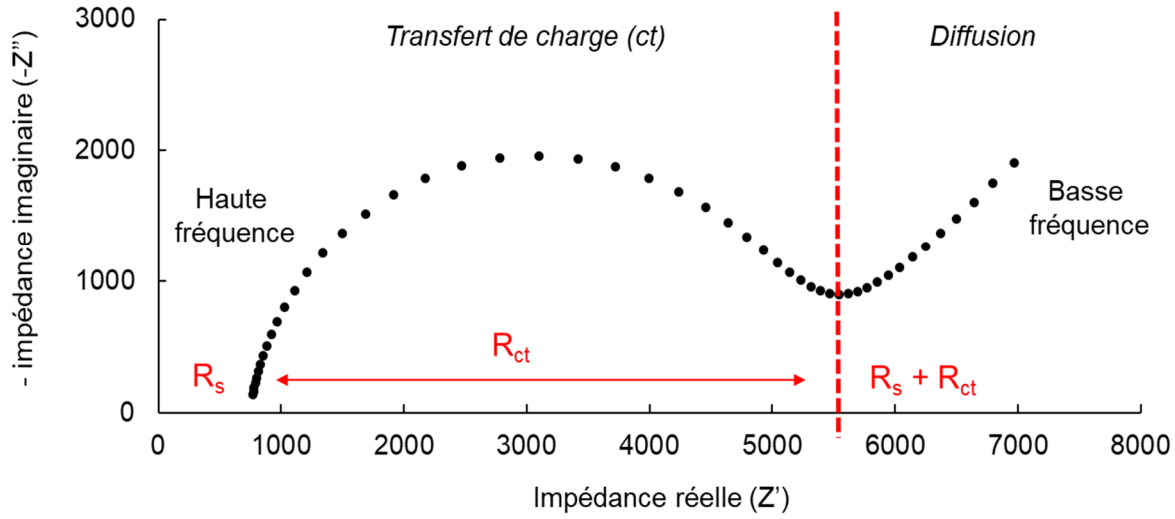
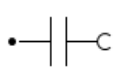
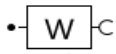
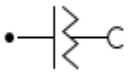


Figure 26: Représentation et caractéristiques d'un diagramme de Nyquist de l'impédance électrochimique

La représentation des données en EIS se fait d'ordinaire par un diagramme de Nyquist, obtenu en traçant l'impédance imaginaire (-Z'') en fonction de l'impédance réelle (Z'). Chaque point du diagramme équivaut à une mesure d'impédance à une fréquence donnée, la courbe tracée prend ainsi la forme un demi-cercle (Figure 26). La partie haute fréquence du diagramme correspond au processus de résistance du transfert de charge, tandis que la partie basse fréquence représente le processus de diffusion. Le diamètre du demi-cercle détermine la résistance du transfert de charge (R_{ct}) à la surface de l'électrode, la valeur où débute le demi-cercle correspond à la résistance de solution (R_s), et la présence d'une ligne droite à la fin du demi-cercle désigne la résistance de diffusion [183,184]. Bien que moins utilisée dans cette thèse, il existe une autre façon de représenter l'impédance : le diagramme de Bode. Ce dernier comprend deux diagrammes logarithmiques distincts : un diagramme de l'amplitude par rapport à la fréquence, et un diagramme de la phase par rapport à la fréquence.

Revenons maintenant à la conception d'un capteur électrochimique. Les différentes étapes de la conception du capteur peuvent être suivies en observant les variations d'impédance sur les électrodes. En effet, le traitement de la surface des électrodes se traduit par une modification de leur résistance électrique. Cette modification peut être appréhendée au travers du calcul du R_{ct}, et des variations des impédances imaginaires (–Z'') et réelles (Z'). Afin de déterminer le R_{ct}, des médiateurs chimiques à réaction simple comme le ferri/ferrocyanure de potassium sont utilisés lors des mesures. Ainsi, du fait que la réaction chimique des médiateurs peut être modélisée par une simple résistance à n'importe quelle fréquence, R_{ct} équivaut à la résistance de polarisation R_p. Cependant, pour calculer R_p, il faut traiter les données acquises par l'EIS. En électrochimie, les procédés et réactions redox se produisant à la surface des électrodes peuvent être retranscrites en un élément d'un circuit électrique (résistance, condensateur, inductance…) (Tableau 3). Ce circuit électrique est appelé circuit équivalent, il aide à déterminer et à comprendre chaque caractéristique entrant en jeu dans le système électrochimique. Différents circuits équivalents existent selon les systèmes étudiés. Aujourd'hui, de nombreux logiciels d'impédance existent pour trouver ces circuits et calculer les valeurs de chacun de ses composants.

Tableau 3: Éléments de circuits équivalents et les paramètres leur correspondant

	Résistances (R)	R_s = Résistance initiale R_p = Résistance de polarisation R_{ct} = Résistance transfert de charge
	Bobine (L)	L = Induction
	Condensateur (C)	C = Capacitance
	Diffusion de Warburg (W) Diffusion semi-infinie	Y_0 = Magnitude de l'admittance
	Élément à Phase Constante (CPE ou Q) qui peut représenter un nombre fini de composants comme R, C ou L	f ° et Capa = Fréquence et Capacité au sommet du demi-cercle
χ^2	Valeur statistique montrant si la simulation du circuit équivalent concorde ou non avec les données expérimentales (plus elle est faible mieux c'est)	

Dans nos recherches, nous avons choisi d'utiliser le logiciel NOVA pour la modélisation du circuit équivalent. Techniquement, cette modélisation vise à faire correspondre les données expérimentales du système électrochimique étudié, avec les données d'un circuit équivalent obtenues par simulation. Le logiciel exploite donc la régression non linéaire des moindres

carrés, en utilisant l'algorithme de Levenberg-Marquardt, pour ajuster les données expérimentales avec celles du circuit équivalent. La procédure d'ajustement modifie les valeurs des paramètres du circuit équivalent, jusqu'à ce qu'elles coïncident avec les données expérimentales (selon une certaine marge d'erreur) (Figure 27). Enfin, les valeurs précises des paramètres du circuit et donc, de ceux de l'expérience effectuée sont listées par le logiciel.

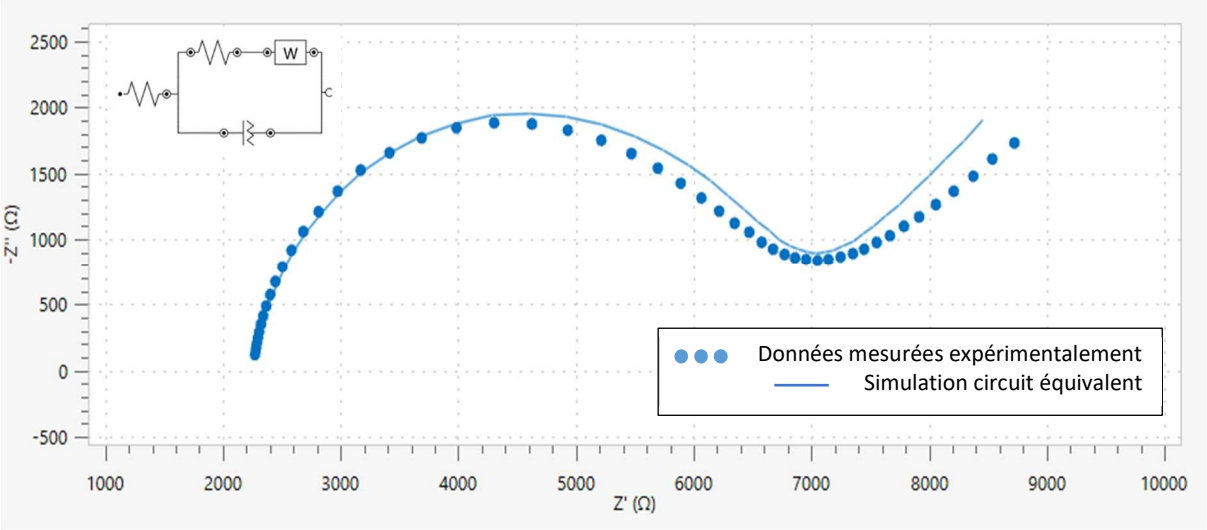


Figure 27: Exemple de simulation de circuit équivalent superposé aux données mesurées expérimentalement par le logiciel NOVA version 2.1.3 METROHM

2.2.1.3) RÉSULTATS ATTENDUS

Nous décrivons ici les résultats attendus à chaque étape de la conception du génocapteur (Figure 28). L'étude des étapes entrant dans la conception du biocapteur est réalisée en étudiant les spectres d'impédance, réalisés sur SPCEs avec une solution de ferri/ferrocyanure dans du tampon PBS. Ces médiateurs chimiques, en majorité chargés négativement, jouent un rôle important dans les mesures d'impédances. En fonction de la fonctionnalisation des SPCEs, des hausses/baisses d'impédances sont observées lors des mesures.

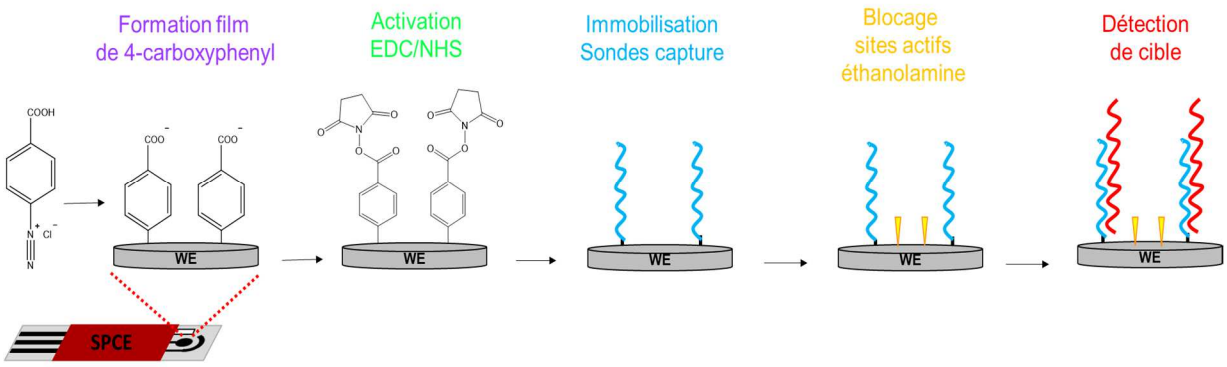


Figure 28: Représentation des étapes de la conception du capteur

- **Prétraitement des SPCEs**

Les SPCEs sont prétraitées avec une solution de H_2SO_4 dans le KCl 0,1 M, pour éliminer les produits organiques résiduels de l'encre de carbone. Cela permet d'augmenter la fonctionnalité de la surface des électrodes et d'améliorer les performances de l'électrode [188]. L'impédance des électrodes nues varie selon la pâte de carbone et les autres matériaux utilisés pour leur fabrication (Figure 29).

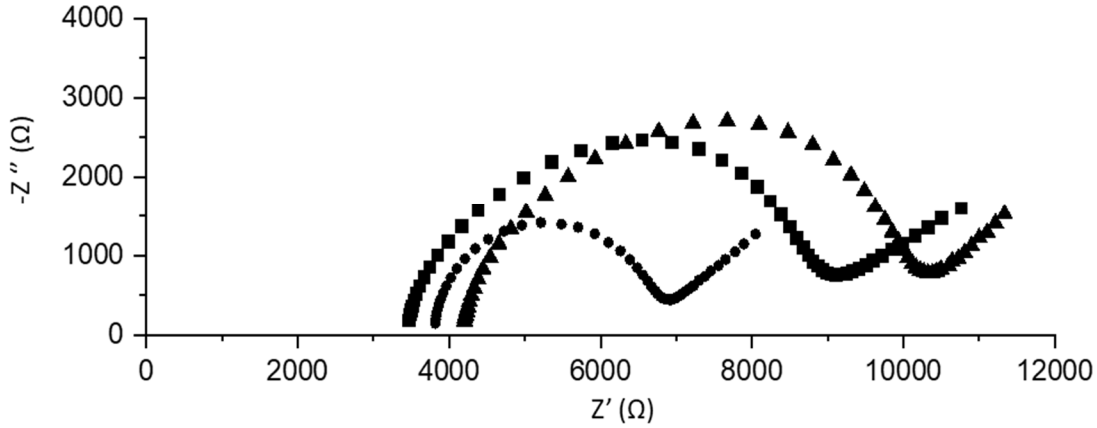


Figure 29: Spectre d'impédance de plusieurs SPCEs nues (courbes noires)

- **1ère étape : Réduction électrochimique du diazonium**

L'étape de réduction de la fonction diazonium permet de créer une couche fonctionnalisée à la surface de l'électrode : le carboxyphényle de diazonium se lie en surface de l'électrode après électroréduction par voltampérométrie. La couche d'acide benzoïque ainsi générée isole la surface de l'électrode et bloque la conductivité, ce qui augmente la résistance (Figure 30). De plus, les médiateurs ferri/ferrocyanure ainsi que les groupements carboxylates de surface, sont tous deux chargés négativement. Lors des mesures, ces composés se repoussent, il n'y a donc que peu d'échanges d'électrons, d'où l'augmentation conséquente de l'impédance.

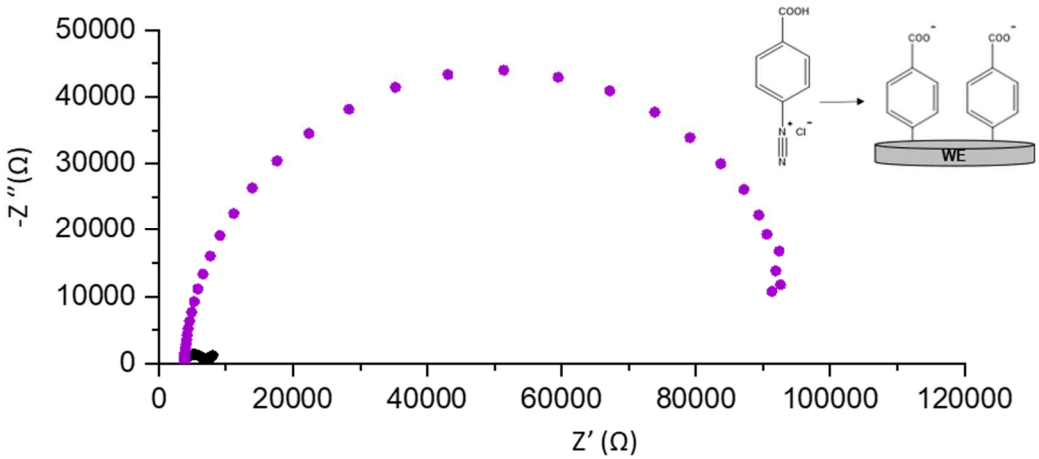


Figure 30: Spectre d'impédance d'une SPCE modifiée avec couche de diazonium (courbe violette)

- **2e étape : Activation EDC/NHS**

L'addition d'un mélange EDC/NHS vient annuler le blocage réalisé par les groupements carboxylates de l'acide benzoïque en transformant ces derniers en esters activés de NHS. Cette étape augmente la conductivité à la surface de l'électrode. L'impédance baisse fortement (Figure 31) : les groupements à la surface de la SPCE ne sont plus chargés négativement, donc l'échange d'électrons avec les médiateurs est meilleur que précédemment.

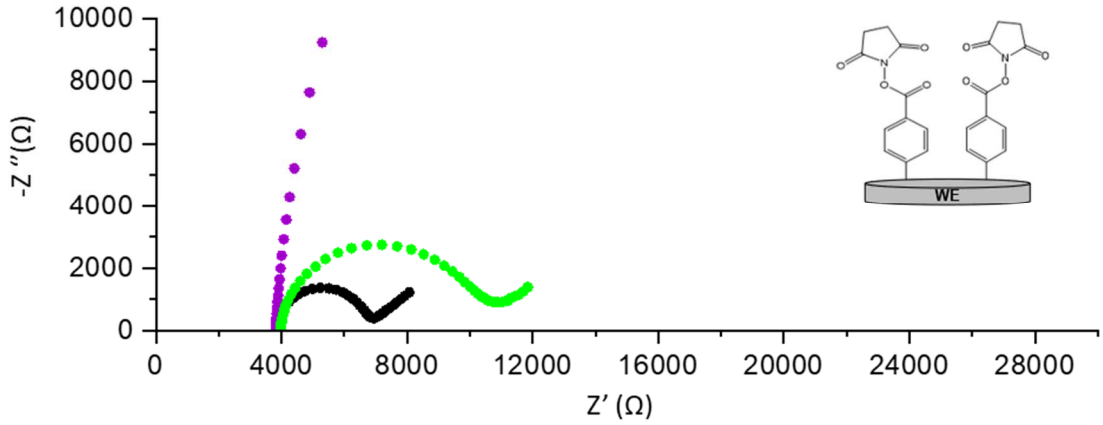


Figure 31: Spectre d'impédance d'une SPCE activée avec EDC/NHS (courbe verte)

- **3e étape : Immobilisation oligonucléotides / blocage sites actifs**

L'immobilisation des oligonucléotides se fait par liaisons covalentes via leur extrémité en NH_2. Après immobilisation, une solution d'éthanolamine (NH_2-CH_2-CH_2-OH) bloque les sites restants où aucun oligonucléotide n'est venu se fixer. En plus d'empêcher des liaisons non spécifiques, l'éthanolamine permet aussi un certain espacement entre les oligonucléotides. L'immobilisation et le blocage des sites actifs restreignent la conductivité (charges négatives), une augmentation de l'impédance est observée (Figure 32).

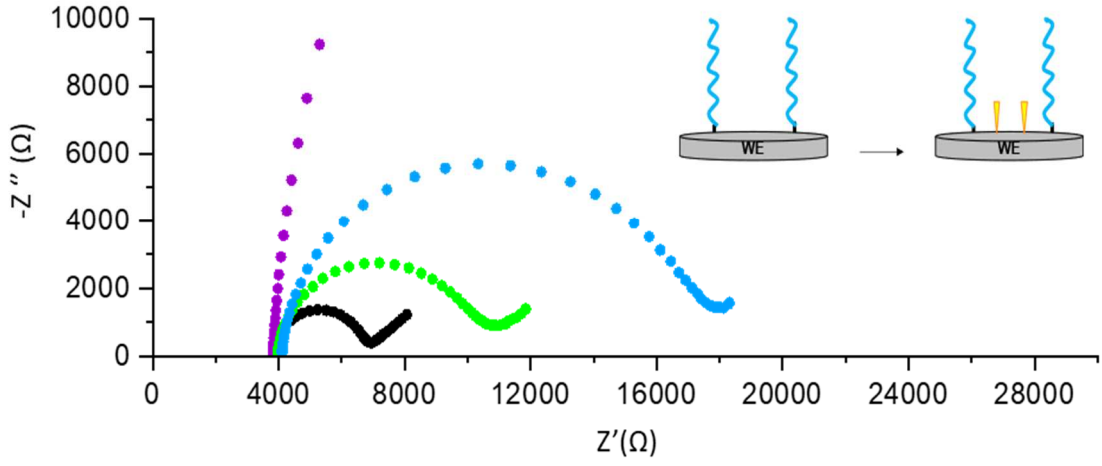


Figure 32: Spectre d'impédance d'une SPCE après immobilisation d'oligonucléotides (courbe bleue)

- **4e étape : Détection d'ADN cible *Vibrio***

L'hybridation avec l'ADN de *Vibrio* se réalise suite à une incubation à température précise. Due à la liaison avec la cible, les groupements conducteurs restants sont bloqués. À cette étape finale, l'impédance doit normalement augmenter (Figure 33).

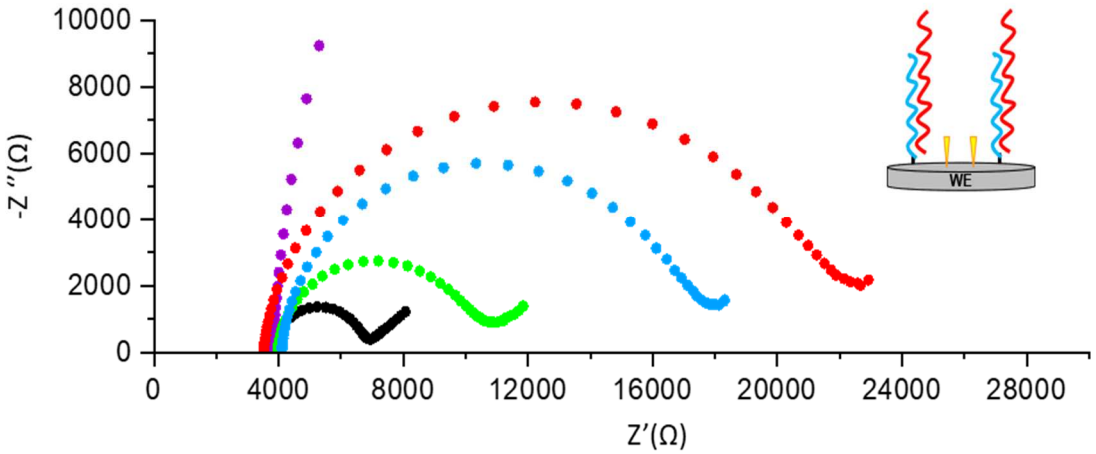


Figure 33: Spectre d'impédance d'une SPCE après hybridation avec ADN cible (courbe rouge)

2.2.2) RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Les premiers tests ont suivi le protocole décrit dans une précédente thèse sur le sujet [7]. L'immobilisation de la sonde de capture Vib 25 (*25A*) a été réalisée sur trois SPCEs par dépôt de 20 µL d'une solution de concentration de 1 µM sous environnement humide durant 4 h. Pour la détection de l'ADN *Vibrio* (cible/contrôle positif), 20 µL d'un mélange (10 µL d'ADN à 1 µM (*C1*), 55 µL d'eau distillée et 25 µL de solution tampon HYB×4) sont placés sur les électrodes. Ces dernières sont ensuite incubées à 46°C sous environnement humide durant 40 min puis lavées avec une solution tampon POP×1. La mise en environnement humide signifie que les électrodes sont placées dans une boîte avec un fond d'eau (les électrodes ne touchent pas l'eau) pour les protéger et empêcher l'évaporation des dépôts de solutions.

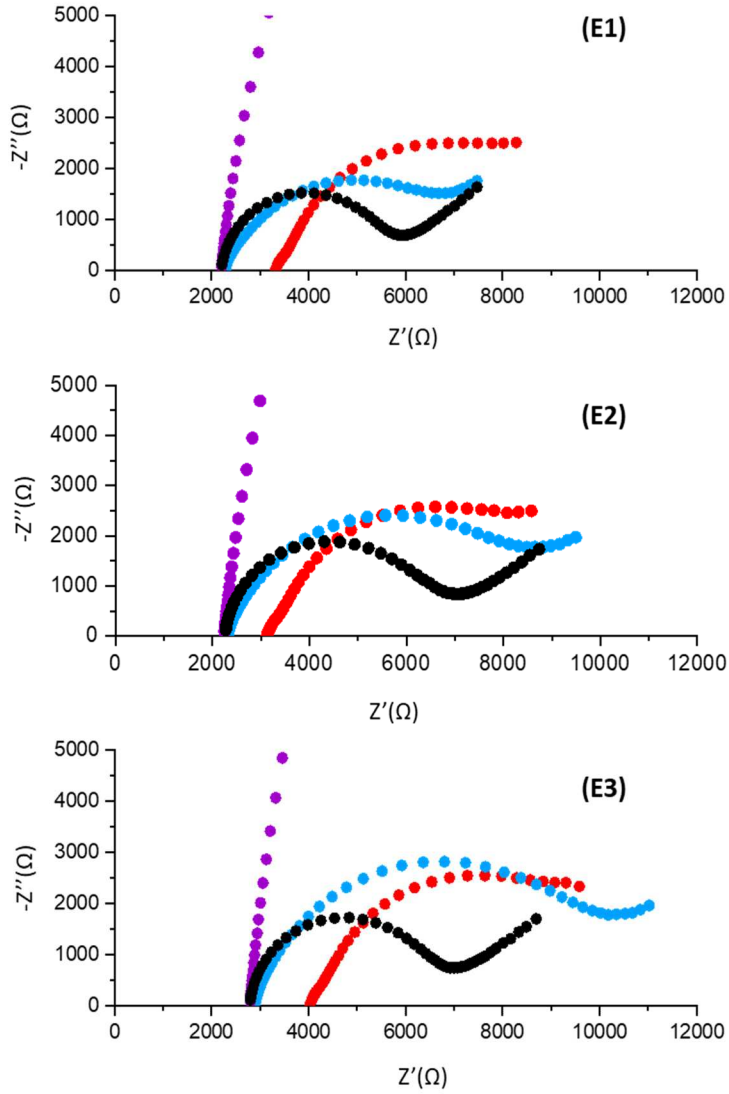


*Figure 34: Spectres d'impédance des premiers tests de conception de biocapteur Vibrio, réalisés sur trois électrodes (**E1, E2, E3**). Courbe noire = électrode nue, courbe violette = réduction de diazonium, courbe bleue = immobilisation des sondes capture, courbe rouge = détection de la cible. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 1000-0,1 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,13 V*

Les spectres d'impédance (Figure 34) et leurs paramètres (Tableau 4) laissent supposer que le biocapteur est fonctionnel. En effet, les mesures réalisées à chaque étape correspondent aux attendus théoriques. L'analyse par circuit équivalent paraît également en accord avec les résultats observés, avec un χ^2 de l'ordre de 10^{-3}. Cependant, l'étape de capture de la cible par le biocapteur ne peut pas être validée avec certitude. Deux points négatifs sont notés :

- La résistance initiale R_s a nettement augmenté (+ 1000 Ω) après la détection de cible ;
- Les variations de R_{ct} après l'incubation du contrôle positif sont trop importantes et variables. Cela est remarqué en calculant la moyenne/écart-type des différences de R_{ct} entre les deux étapes.

*Tableau 4: Paramètres du circuit équivalent de trois électrodes (**E1**, **E2**, **E3**), pour l'étape d'immobilisation des oligonucléotides (1 µM de Vib 25) et pour la détection d'ADN cible (1µM)*

			E1	**E2**	**E3**
Circuit équivalent : [R([RW]Q)]	**Éléments**	**Paramètres**	Valeurs (erreurs estimées %)	Valeurs (erreurs estimées %)	Valeurs (erreurs estimées %)
Étape d'immobilisation des oligonucléotides 1 µM Vib 25	R_s	R (Ω)	2272 (0,2)	2881 (0,1)	2302 (0,2)
	R_{ct}	R (Ω)	4554 (1,1)	7116 (0,4)	6175 (0,5)
	CPE (Q) sommet demi-cercle	Capa (F)	$1,58 \times 10^{-5}$	$7,65 \times 10^{-6}$	$9,36 \times 10^{-6}$
		f° (Hz)	2,21	2,92	2,76
	W	Y_0 (S)	$7,06 \times 10^{-4}$ (2,9)	$6,40 \times 10^{-4}$ (1,8)	$6,15 \times 10^{-4}$ (1,8)
	χ^2		$2,64 \times 10^{-3}$	$7,84 \times 10^{-4}$	$1,12 \times 10^{-3}$
Détection d'ADN cible 1 µM	R_s	R (Ω)	3337 (0,3)	4047 (0,3)	3145 (0,3)
	R_{ct}	R (Ω)	6346 (4,9)	6327 (3,7)	6426 (4,3)
	CPE (Q) sommet demi-cercle	Capa (F)	$7,85 \times 10^{-5}$	$5,34 \times 10^{-5}$	$5,81 \times 10^{-5}$
		f° (Hz)	0,32	0,47	0,43
	W	Y_0 (S)	$1,03 \times 10^{-3}$ (19,9)	$9,44 \times 10^{-4}$ (14,6)	$9,10 \times 10^{-4}$ (16,4)
	χ^2		$7,61 \times 10^{-3}$	$6,15 \times 10^{-3}$	$9,27 \times 10^{-3}$
Moyenne et Écart-type des différences de R_{ct}			418 ± 1299		

Le problème du changement de résistance initiale a été étudié. Il s'est avéré après quelques manipulations, que ceci provenait de l'incubation à 46°C des électrodes après le dépôt de la solution d'ADN cible. En effet, il semble que les SPCEs fabriquées au laboratoire sont affectées par l'étape de chauffage. Afin de confirmer cette hypothèse, les SPCEs non fonctionnalisées (électrodes nues), ont été chauffées plusieurs fois sous environnement humide, puis des mesures d'impédance ont été réalisées pour observer l'effet de ce traitement (Figure 35).

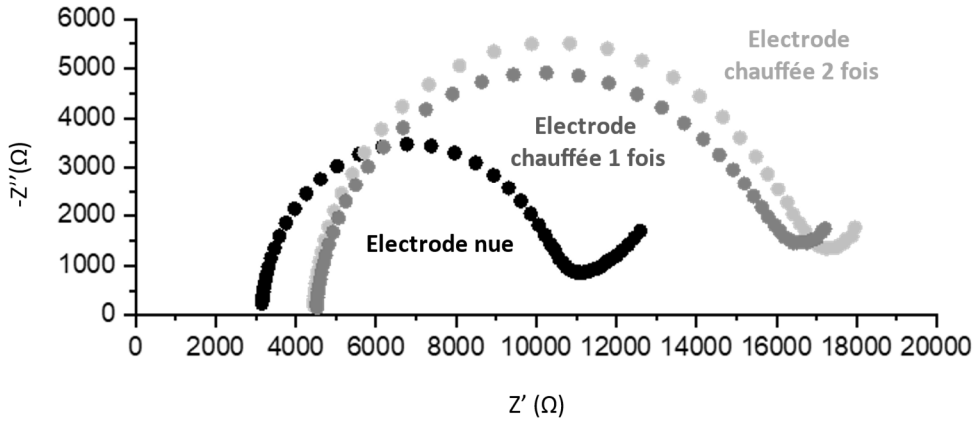


Figure 35: Spectres d'impédances d'électrodes SPCE non fonctionnalisées chauffés à 46°C sous environnement humide. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 1000-0,1 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,13 V

Les spectres d'impédance confirment un effet de la température sur les SPCEs. Après avoir chauffé les électrodes une première fois, il n'y a plus de changement important au niveau de la résistance initiale. Toutefois, de très faibles changements en -Z'' (résistance imaginaire) sont encore notés. Ainsi, pour éliminer cette variabilité dans les mesures un prétraitement des électrodes consistant en un préchauffage avant leur fonctionnalisation a été réalisé.

Étant donné les résultats précédents sur la détection de cible, nous avons réalisé par la suite une comparaison de fonctionnement entre les sondes capture Vib 25 (*25A*) et Vib 35 (*35A*). Le protocole a été le même que précédemment (solution à 1 µM pour l'immobilisation et solution à 1 µM pour l'ADN cible (*C1*)). Les spectres et paramètres sont regroupés en Figure 36 et Tableau 5.

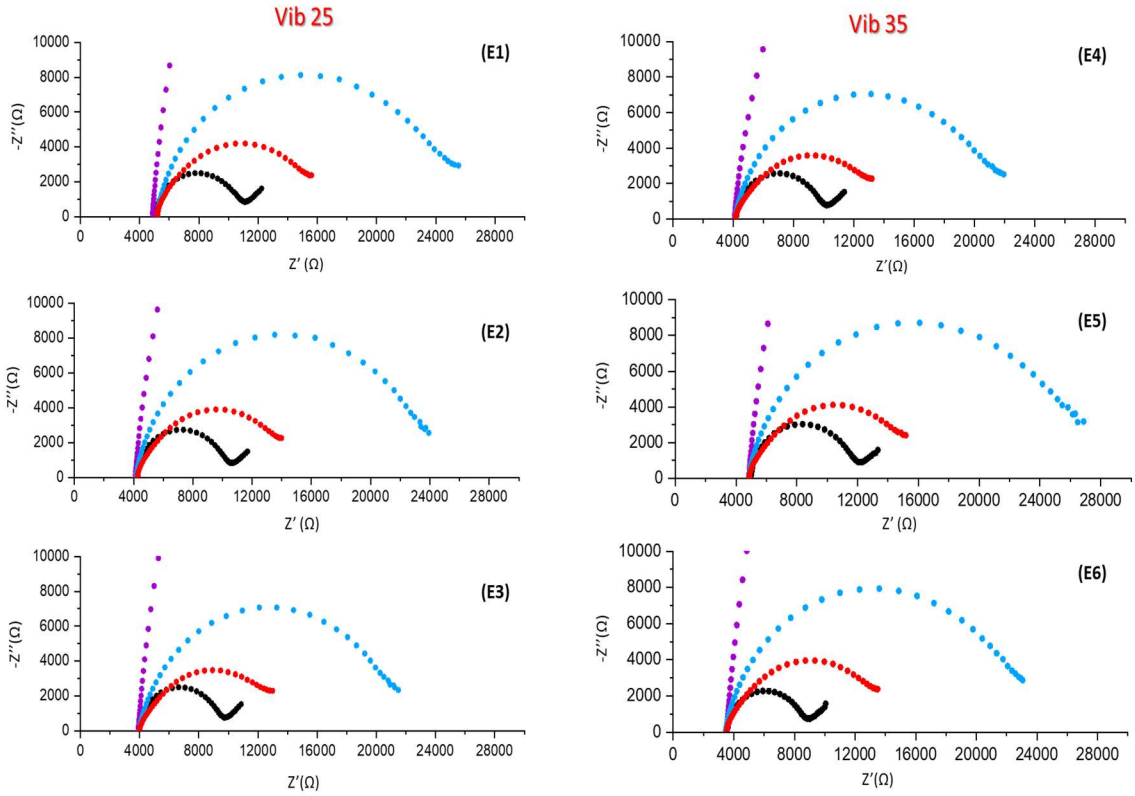


*Figure 36: Spectres d'impédance des électrodes fonctionnalisées avec Vib 25 (**E1, E2, E3**) et Vib 35 (**E4, E5, E6**). Courbe noire = électrode nue, courbe violette = réduction de diazonium, courbe bleue = immobilisation des sondes capture, courbe rouge = détection de la cible. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 1000-0,1 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,13 V*

Les spectres d'impédance semblent en adéquation avec une fonctionnalisation effective des électrodes et l'analyse du circuit équivalent, avec une valeur de χ^2 toujours de l'ordre de 10^{-3} semble confirmer ce résultat. Toutefois, sur ces spectres, pour les deux sondes captures, nous observons une nette baisse d'impédance après l'incubation de l'ADN cible. En effet, la résistance imaginaire chute sous les 4000 **Ω** et les R_{ct} montrent une différence moyenne de – 8000 **Ω**.

*Tableau 5: Paramètres du circuit équivalent pour l'étape d'immobilisation des oligonucléotides (1µM) et pour la détection d'ADN cible (1µM). L'étape d'immobilisation a été réalisée avec les sondes Vib 25 (**E1, E2, E3**) et Vib 35 (**E4, E5, E6**)*

Circuit équivalent : [R([RW]Q)]	Éléments	Paramètres	E1 (Vib 25) Valeurs (erreurs estimées %)	E2 (Vib 25) Valeurs (erreurs estimées %)	E3 (Vib 25) Valeurs (erreurs estimées %)	E4 (Vib 35) Valeurs (erreurs estimées %)	E5 (Vib 35) Valeurs (erreurs estimées %)	E6 (Vib 35) Valeurs (erreurs estimées %)
Étape d'immobilisation des oligonucléotides 1 µM	R_s	R (Ω)	5182 (0,1)	4175 (0,1)	3978 (0,1)	4139 (0,1)	4835 (0,1)	3453 (0,1)
	R_{ct}	R (Ω)	18965 (0,2)	18995 (0,3)	16913 (0,3)	16679 (0,1)	20862 (0,2)	18821 (0,2)
	CPE (Q) sommet demi-cercle	Capa (F)	$3,27 \times 10^{-6}$	$3,45 \times 10^{-6}$	$4,03 \times 10^{-6}$	$3,47 \times 10^{-6}$	$3,34 \times 10^{-6}$	$3,71 \times 10^{-6}$
		f° (Hz)	2,57	2,43	2,34	2,75	2,29	2,28
	W	Y_0 (S)	$4,79 \times 10^{-4}$ (2,1)	$6,27 \times 10^{-4}$ (3,3)	$7,59 \times 10^{-4}$ (4,1)	$5,55 \times 10^{-4}$ (1,4)	$4,87 \times 10^{-4}$ (2,5)	$5,63\times 10^{-4}$ (2,6)
	χ^2		$4,14 \times 10^{-4}$	$6,54 \times 10^{-4}$	$8,31 \times 10^{-4}$	$1,96 \times 10^{-4}$	$4,93 \times 10^{-4}$	$5,42\times 10^{-4}$
Détection d'ADN cible 1 µM	R_s	R (Ω)	5145 (0,2)	4232 (0,3)	3963 (0,3)	4130 (0,3)	4836 (0,3)	3487 (0,3)
	R_{ct}	R (Ω)	10506 (1,3)	10067 (1,5)	9564 (1,6)	9379 (1,6)	10626 (1,4)	10445 (1,4)
	CPE (Q) sommet demi-cercle	Capa (F)	$1,03 \times 10^{-5}$	$1,23 \times 10^{-5}$	$1,63 \times 10^{-5}$	$1,40 \times 10^{-5}$	$1,19 \times 10^{-5}$	$1,30 \times 10^{-5}$
		f° (Hz)	1,47	1,29	1,02	1,21	1,26	1,18
	W	Y_0 (S)	$7,99 \times 10^{-4}$ (9,6)	$1,01 \times 10^{-3}$ (12,8)	$1,19 \times 10^{-3}$ (14,3)	$9,36 \times 10^{-4}$ (11,4)	$9,12 \times 10^{-4}$ (11,8)	$1,04 \times 10^{-3}$ (13,3)
	χ^2		$4,64 \times 10^{-3}$	$5,74 \times 10^{-3}$	$4,70 \times 10^{-3}$	$5,50 \times 10^{-3}$	$4,94 \times 10^{-3}$	$6,08 \times 10^{-3}$
Moyenne et Écart-type des différences de R_{ct}			-8245 ± 811			-8637 ± 1485		

Contrairement à ce qui est théoriquement attendu, c'est une baisse d'impédance qui est enregistrée après l'ajout de l'ADN cible. Nous avons émis l'hypothèse que la concentration de l'ADN cible était trop élevée et induirait une baisse importante de l'impédance en saturant la surface de l'électrode. Pour confirmer cela, l'expérience a été relancée pour la sonde Vib 25 (*25A*), toujours à concentration 1 µM, mise cette fois en présence de plus faibles concentrations en ADN cible (*C1*) (solutions à 0,1 et 0,01 µM au lieu de 1 µM) (Figure 37 et Tableau 6). Ainsi, la diminution de la concentration en cible devrait se traduire par une variation de l'impédance lors de l'étape de détection (courbes rouges) dont les valeurs devraient se rapprocher de celles de l'étape d'immobilisation (courbes bleues).

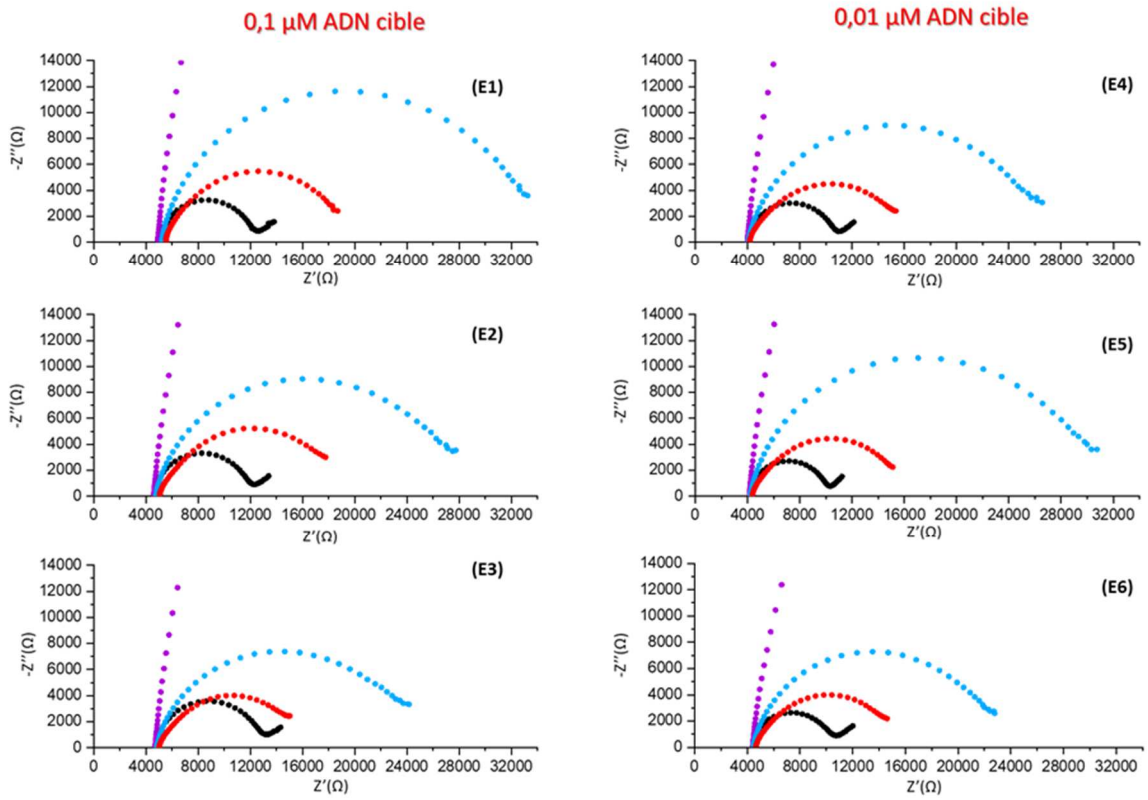


*Figure 37: Spectres d'impédance des électrodes fonctionnalisées avec la sonde Vib 25 à une concentration de 1 µM et mises en présence d'ADN cible à des concentrations de 0,1 µM (**E1, E2, E3**) et 0,01 µM (**E4, E5, E6**). Courbe noire = électrode nue, courbe violette = réduction de diazonium, courbe bleue = immobilisation des sondes capture, courbe rouge = détection de la cible. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 1000-0,1 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,13 V*

Les résultats obtenus sont similaires aux précédents, une baisse d'impédance est toujours observée après incubation d'ADN *Vibrio* peu importe la concentration testée. En analysant les résistances imaginaires des SPCEs ainsi que les différences de R_{ct} pour chaque concentration d'ADN cible, il est possible de conclure qu'il y a bien un problème au niveau de la détection de la cible : peu importe la concentration d'ADN cible en contact avec les électrodes, la baisse d'impédance semble toujours la même.

*Tableau 6: Paramètres du circuit équivalent pour l'étape d'immobilisation des oligonucléotides (1µM de Vib 25) et pour la détection d'ADN cible. La détection a été réalisée en présence de 0,1 µM (**E1, E2, E3**) et 0,01 µM (**E4, E5, E6**) d'ADN cible*

Circuit équivalent : [R([RW]Q)]	Éléments	Paramètres	**E1 (Cible 0,1 µM)** Valeurs (erreurs estimées %)	**E2 (Cible 0,1 µM)** Valeurs (erreurs estimées %)	**E3 (Cible 0,1 µM)** Valeurs (erreurs estimées %)	**E4 (Cible 0,01 µM)** Valeurs (erreurs estimées %)	**E5 (Cible 0,01 µM)** Valeurs (erreurs estimées %)	**E6 (Cible 0,01 µM)** Valeurs (erreurs estimées %)
Étape d'immobilisation des oligonucléotides 1 µM Vib 25	R_s	R (Ω)	5178,6 (0,1)	4728,1 (0,1)	4806,9 (0,1)	4042,1 (0,1)	4203,5 (0,1)	4446,7 (0,4)
	R_{ct}	R (Ω)	27350 (0,2)	21909 (0,3)	18077 (0,3)	21245 (0,2)	25255 (0,2)	17428 (0,2)
	CPE (Q) sommet demi-cercle	Capa (F)	$2,95 \times 10^{-6}$	$3,40 \times 10^{-6}$	$3,76 \times 10^{-6}$	$3,08 \times 10^{-6}$	$3,01 \times 10^{-6}$	$3,49 \times 10^{-6}$
		f° (Hz)	1,97	2,14	2,34	2,44	2,10	2,62
	W	Y_0 (S)	$5,73 \times 10^{-4}$ (3,2)	$4,7 \times 10^{-4}$ (2,7)	$4,16 \times 10^{-4}$ (2,6)	$4,90 \times 10^{-4}$ (2,0)	$4,87 \times 10^{-4}$ (2,7)	$5,62 \times 10^{-4}$ (2,3)
	χ^2		$3,60 \times 10^{-4}$	$5,53 \times 10^{-4}$	$8,07 \times 10^{-4}$	$3,43 \times 10^{-4}$	$4,41 \times 10^{-4}$	$4,21 \times 10^{-4}$
Détection d'ADN cible	R_s	R (Ω)	5473,8 (0,3)	5003,4 (0,3)	4984,4 (0,3)	4119 (0,3)	4332,6 (0,4)	4633,8 (0,3)
	R_{ct}	R (Ω)	13427 (1,2)	14062 (1,7)	10524 (1,6)	11615 (1,3)	11231 (1,5)	10247 (1,5)
	CPE (Q) sommet demi-cercle	Capa (F)	$7,60 \times 10^{-6}$	$1,35 \times 10^{-5}$	$1,34 \times 10^{-5}$	$9,96 \times 10^{-6}$	$9,70 \times 10^{-6}$	$1,08 \times 10^{-5}$
		f° (Hz)	1,56	0,84	1,13	1,38	1,46	1,44
	W	Y_0 (S)	$9,46 \times 10^{-4}$ (14,5)	$1,57 \times 10^{-3}$ (30,3)	$1,02 \times 10^{-3}$ (14,1)	$9,62 \times 10^{-4}$ (13,3)	$1,04 \times 10^{-3}$ (16,3)	$9,60 \times 10^{-4}$ (13,3)
	χ^2		$6,00 \times 10^{-3}$	$6,15 \times 10^{-3}$	$5,13 \times 10^{-3}$	$6,18 \times 10^{-3}$	$8,47 \times 10^{-3}$	$5,90 \times 10^{-3}$
Moyenne et Écart-type des différences de R_{ct}			-9774 ± 3596			-10278 ± 3467		

Dans le but de résoudre ce problème, des optimisations des protocoles de conception du capteur ont été effectuées. Désormais pour chaque nouveau test, deux groupes de trois ont été préparés (Figure 38) : un « groupe Essai » où la cible dans sa solution tampon est incubée sur les électrodes, ainsi qu'un « groupe Témoin » qui reprend le même protocole que le groupe Essai, où l'incubation se fait en absence de cible juste avec la solution tampon.

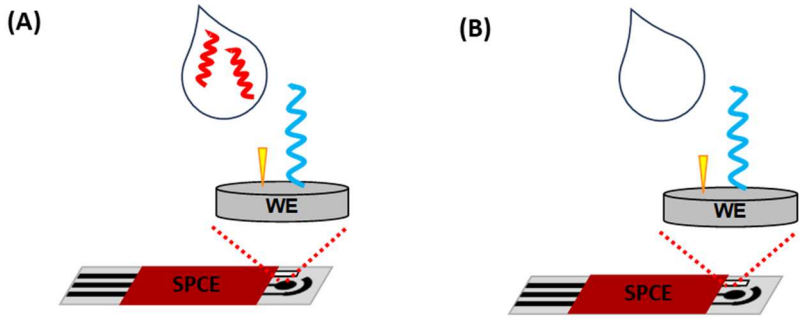


*Figure 38: Deux groupes d'électrodes pour les mesures : le groupe Essai **(A)** où la cible est présente, et le groupe Témoin **(B)** où la cible est absente*

Les optimisations réalisées sont les suivantes :

- Optimisation de la température d'incubation. Lors de l'étape de détection de cible, les SPCEs sont chauffées à 65°C après le dépôt d'une solution à 1 µM d'ADN cible. En parallèle, un test similaire est effectué, mais sans chauffage des électrodes. Cette optimisation se base sur l'hypothèse que l'hybridation entre sonde capture et cible prend trop de temps et qu'il faudrait accélérer ce processus ;
- Optimisation de la concentration d'ADN. Les tests sont accomplis en utilisant une solution de cible à une concentration de 10 µM. Dans ce cas-ci, l'utilisation d'une forte proportion de d'ADN cible pourrait aider à réaliser l'hybridation ;
- Optimisation de la solution tampon. La solution utilisée lors de l'étape de détection possède désormais une concentration moins importante en sels (d'un tampon HYB×4 à un tampon HYB×1). Cette dernière optimisation prend en compte la possibilité que la solution tampon employée (sa composition ou concentration) interfère avec le processus de reconnaissance de la cible.

Les résultats des tests comprenant ces optimisations ont été similaires aux précédents (forte baisse d'impédance avec résistance imaginaire bloquée vers 4000 Ω). Néanmoins, cela nous a permis de confirmer que le problème vient de l'étape de détection de la cible. Il s'est avéré que les responsables sont le dispositif de chauffage des électrodes, ainsi que la solution tampon

utilisée. Précisément, le dispositif de chauffage paraît évaporer une partie des dépôts de solution ADN *Vibrio* sur les électrodes, et la solution tampon semble non adaptée pour les SCPEs.

Le protocole de cette étape a donc été ajusté en utilisant un appareil de chauffe plus adapté, et un changement du tampon HYB par une solution PBS. Une étape de linéarisation de l'ADN cible a aussi été ajoutée (passage par cycle de 90°C – 4°C – T_{amb}) avant son utilisation sur les électrodes.
Des vérifications ont été faites et le spectre obtenu (Figure 39) ne montre plus de chute de l'impédance lors de l'incubation de cible comme auparavant : les changements de protocole au niveau de la détection résolvent les précédents problèmes.

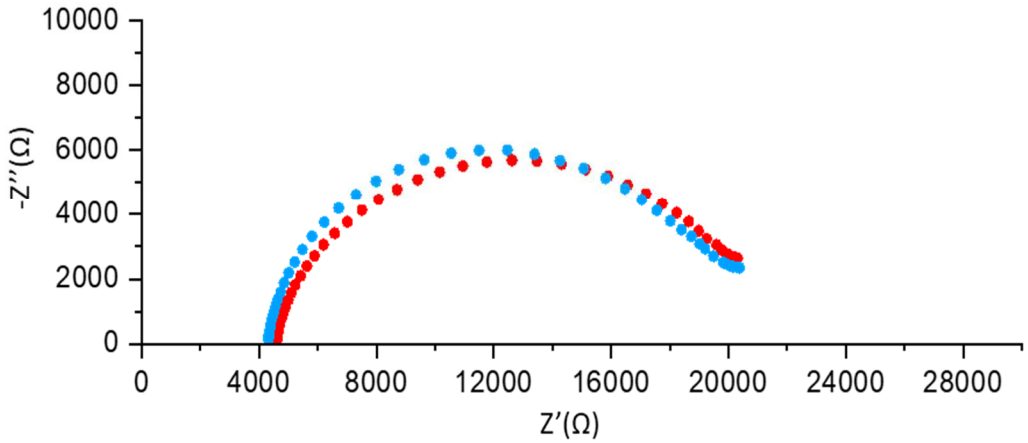


Figure 39: Spectres d'impédance de la sonde Vib 25 avec l'optimisation de détection en présence de la cible. Courbe bleue = immobilisation des sondes capture, courbe rouge = détection de la cible. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 1000-0,1 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,13 V

Le spectre de la Figure 39 montre que l'impédance n'évolue pas après incubation de cible, ce qui ne permet pas de valider l'hybridation entre oligonucléotides et l'ADN cible. De ce fait, d'autres optimisations ont été entreprises. Ces dernières impliquent des changements de température d'incubation de la cible, de durée d'incubation et de quantité d'oligonucléotides immobilisés sur les SPCEs. Pour chaque optimisation, les mesures ont été faites en reprenant la configuration des groupes Essai et Témoin.

Les premières optimisations ont concerné la température d'incubation de la solution d'ADN cible (Tableau 7). Dans ces tests, une solution à 1 µM de sonde Vib 25 (*25A*) ainsi qu'une solution à 1 µM d'ADN cible (*C1*). Trois températures ont été testées : 46°C, 37°C et la température ambiante soit 20-22°C. Des températures plus basses n'auraient servi seulement

qu'à ralentir l'hybridation, alors que des températures plus élevées (T > 55°C) auraient détérioré les électrodes.
Les données recueillies sur les spectres d'impédances présentent des variations positives et négatives des valeurs de R_{ct} et de -Z'' après l'incubation de cible. La majorité de ces variations sont des augmentations de valeurs ; pour les cas de diminution cela paraît provenir d'une perte d'oligonucléotide après les lavages des électrodes. En conclusion, ces données ne permettent pas de valider la détection de l'ADN cible car les groupes Témoin et Essai présentent les mêmes évolutions de R_{ct} et -Z''.

Les différentes températures testées n'ont pas montré de réels effets sur l'hybridation avec la sonde capture. Pour les tests suivants, la température d'incubation de 46°C a été reprise.

Tableau 7: Effet de la température d'incubation sur les paramètres des spectres d'impédance obtenus pour l'étape d'immobilisation des oligonucléotides (1µM de Vib 25) et pour la détection d'ADN cible (1µM). Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 5000/2000-0,1 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,13 V

Circuit équivalent [R([RW]Q)]	**Groupes**	**Éléments**	**E1**			**E2**			**E3**		
Optimisations			Avant incubation cible	Après incubation cible	Différence des valeurs	Avant incubation cible	Après incubation cible	Différence des valeurs	Avant incubation cible	Après incubation cible	Différence des valeurs
Température d'incubation 46°C **1 µM Vib 25** **1 µM ADN cible**	Essai	R_{ct} (Ω)	15569	19303	+3734	12493	13613	+1120	11663	15378	+3715
		-Z'' (Ω) sommet demi-cercle	5818	6144	+326	4787	5270	+483	6094	6311	+217
	Témoin	R_{ct} (Ω)	21892	25109	+3217	15739	17038	+1299	15085	13142	-1943
		-Z'' (Ω) sommet demi-cercle	9694	10552	+858	6856	7119	+263	6461	5279	-1182
Température d'incubation 37°C **1 µM Vib 25** **1 µM ADN cible**	Essai	R_{ct} (Ω)	11996	13336	+1340	12601	13871	+1270	11802	13884	+2082
		-Z'' (Ω) sommet demi-cercle	5185	5065	-120	5511	5247	-264	5018	5180	+162
	Témoin	R_p (Ω)	17854	18063	+209	10904	12747	+1843	11938	14563	+2625
		-Z'' (Ω) sommet demi-cercle	7517	6858	-659	4724	4979	-255	5141	5495	+354
Température d'incubation 20-22°C (T_{amb}) **1 µM Vib 25** **1 µM ADN cible**	Essai	R_{ct} (Ω)	11366	12736	+1370	11188	13076	+1888	9770	12008	+2238
		-Z'' (Ω) sommet demi-cercle	4690	5420	+730	4681	5649	+968	4119	4986	+867
	Témoin	R_{ct} (Ω)	11450	14217	+2767	10553	13850	+3297	12376	14729	+2353
		-Z'' (Ω) sommet demi-cercle	4873	6069	+1196	4310	5858	+1548	5210	6230	+1020

L'optimisation qui a suivi a porté sur la quantité d'oligonucléotides immobilisée. L'hypothèse, ici, était que la densité d'oligonucléotides était trop importante à la surface des SPCEs. De ce fait, la cible ne pouvait venir s'hybrider avec la sonde capture Vib 25. Nous avons donc choisi d'immobiliser la sonde Vib 25 (*25A*) en utilisant des solutions de concentrations différentes (1, 0,1 et 0,05 µM) ; et de tester des solutions d'ADN de *Vibrio* (*C1*) à des concentrations respectives de 10, 1 et 0,1 µM. Les autres paramètres n'ont pas été modifiés (incubation 46°C durant 40 min-1 h et solution PBS).
Les résultats de ces optimisations de concentration (Tableau 8) montrent des évolutions d'impédance semblables entre groupe Essai et Témoin : une faible augmentation des R_{ct} et de -Z'' de l'ordre de 150-1200 Ω. À la différence des autres résultats, les tests de concentration à 0,1 µM pour Vib 25 montrent des baisses d'impédance.

Une autre optimisation a concerné la durée d'incubation de l'ADN cible (Tableau 8). Cette dernière s'est effectuée sans chauffage à T_{amb} pour éviter d'évaporer les dépôts d'ADN cible. Nous avons laissé l'incubation se produire durant une nuit (15 h en tout). Les données de ce test montrent, dans le groupe Essai, une hausse d'impédance des R_{ct} et -Z'' supérieure à celle du groupe Témoin. Cependant, des tests complémentaires en variant les concentrations de solution cible ont montré des augmentations d'impédance similaires au test de base. Cette augmentation d'impédance peut s'expliquer par une adsorption de l'ADN cible sur les électrodes plutôt que qu'une hybridation.

Il a été difficile de déterminer la cause de ces diverses variations d'impédance survenant après l'étape de détection de la cible. Les baisses d'impédances observées peuvent provenir des lavages qui enlèveraient les sondes de capture et les molécules d'éthanolamine. A l'inverse des augmentations d'impédance peuvent s'expliquer par une très faible quantité d'ADN cible hybridé, soit par l'adsorption non spécifique de la cible à la surface de l'électrode.

Tableau 8: Effet des concentrations de Vib 25 et d'ADN cible sur les paramètres des spectres d'impédance obtenus pour l'étape d'immobilisation des oligonucléotides et pour la détection d'ADN cible. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 5000/2000-0,1 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,13 V

Circuit équivalent [R([RW]Q)]	**Groupes**	**Éléments**	**E1**			**E2**			**E3**		
Optimisations			Avant incubation cible	Après incubation cible	Différence des valeurs	Avant incubation cible	Après incubation cible	Différence des valeurs	Avant incubation cible	Après incubation cible	Différence des valeurs
1 µM Vib 25 10 µM ADN cible	Essai	R_{ct} (Ω)	8571	9694	+1123	12548	13469	+921	13708	12224	-1484
		-Z'' (Ω) sommet demi-cercle	3690	3843	+153	5430	5247	-183	5248	5385	+137
	Témoin	R_{ct} (Ω)	13604	14645	+1041	11234	12639	+1405	14515	15570	+1055
		-Z'' (Ω) sommet demi-cercle	5818	6144	+326	4787	5270	+483	6094	6311	+217
0,1 µM Vib 25 1 µM ADN cible	Essai	R_{ct} (Ω)	6878	7356	+478	12761	10025	-2736	7786	7195	-591
		-Z'' (Ω) sommet demi-cercle	2797	2677	-120	5242	3557	-1685	3111	2567	-544
	Témoin	R_{ct} (Ω)	13650	11132	-2518	11365	9743	-1622	10884	9198	-1686
		-Z'' (Ω) sommet demi-cercle	5702	4380	-1322	4554	3684	-870	4376	3539	-837
0,05 µM Vib 25 0,1 µM ADN cible	Essai	R_{ct} (Ω)	6986	7391	+405	6148	6770	+622	5067	5989	+922
		-Z'' (Ω) sommet demi-cercle	2853	2775	-78	2418	2662	+244	2049	2254	+205
	Témoin	R_{ct} (Ω)	14342	12236	-2106	5864	6621	+757	6679	7208	+529
		-Z'' (Ω) sommet demi-cercle	6090	4815	-1275	2373	2542	+169	2766	2756	-10

D'autres tests supplémentaires ont été réalisés, notamment : l'utilisation d'acide nucléique bloqué (LNA) (basé sur la sonde Vib 25) comme sonde capture, le dépôt de très faibles ou très fortes concentrations d'ADN cible (20 µM), ou la réduction des temps et des concentrations utilisés pour la conception du capteur. Cependant, les données recueillies n'ont pas permis de valider le capteur d'ADN *Vibrio*.

2.2.3) ESSAIS AVEC LE BLEU DE MÉTHYLÈNE (MB)

La méthode de marquage au bleu de méthylène a été employée comme une alternative en parallèle des tests précédents, et afin de vérifier l'hybridation entre sonde capture immobilisée et ADN de *Vibrio*. Les tests de conception du capteur ont été réalisés en utilisant la séquence d'ADN cible de *Vibrio* marquée en 5' avec le MB (*C2*). De cette façon, si l'hybridation entre l'oligonucléotide immobilisé et l'ADN cible fonctionne, un signal devrait apparaître lors des mesures en voltampérométrie. Pour étudier cela, nous avons choisi la voltampérométrie à impulsions différentielles (DPV) qui est une technique électrochimique permettant de réaliser des mesures avec une plus grande sensibilité et résolution, ce qui conduit à une différenciation plus efficace des diverses espèces redox étudiées [185]. La DPV est une mesure du courant en fonction d'un balayage linéaire de potentiel, mais à laquelle sont ajoutées des impulsions de potentiel. Les mesures de DPV sont prises à des instants précis de chaque impulsion, juste avant l'application de l'impulsion et avant sa fin [186] La différence entre le courant à ces points est déterminée et tracée par rapport au potentiel pour obtenir un voltampérogramme (Figure 40).

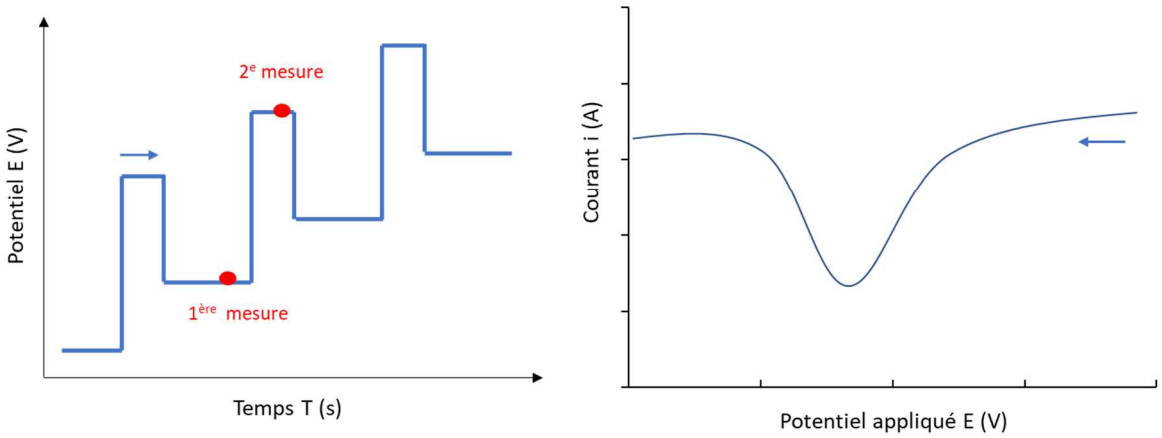


Figure 40: Schéma des variations de potentiel appliqués en DPV et le voltampérogramme caractéristique

- **Analyses préliminaires**

Le protocole utilisé pour l'expérience est le même que précédemment : une solution à 1 µM d'oligonucléotides (*25A*) est déposé sur les SPCEs durant 4 h, puis une solution à 1 µM d'ADN

marqué en MB (*C2*), déposé sur les SPCEs et chauffé à 37°C durant 1 h. La vérification du signal spécifique au MB se fait par DPV à la suite de l'incubation avec la cible. La mesure en DPV est réalisée pour observer l'oxydation du marqueur, ainsi un certain potentiel est appliqué durant 5 s avant mesure. En se basant sur de précédents résultats obtenus au laboratoire, le pic d'oxydation du MB sur les SPCEs fonctionnalisées est observé à des potentiels autour de -0,4 V vs Ag/AgCl.

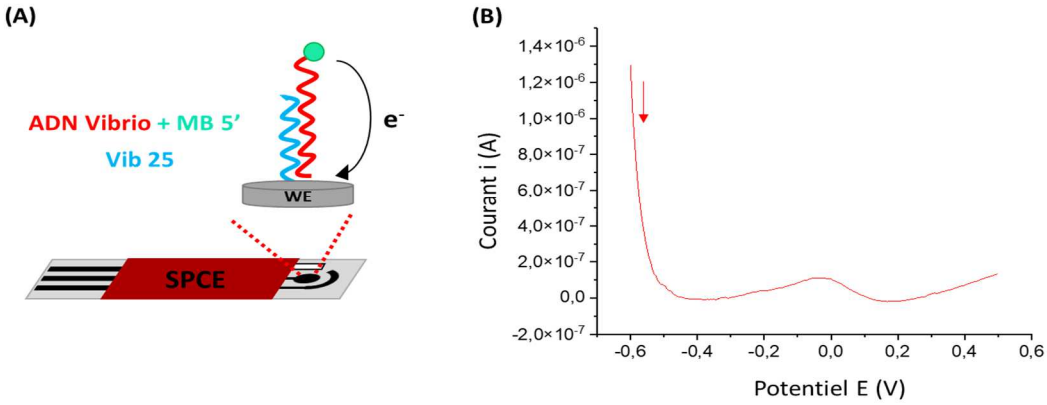


*Figure 41: Schéma théorique d'hybridation entre l'oligonucléotide immobilisé et l'ADN cible marqué en 5' avec MB (**A**) ; Voltampérogramme DPV obtenu après incubation de l'ADN cible marqué au MB (**B**), mesure de -0,6 à 0,5 V dans le tampon DPV (KCl 0,1 M / Na_2HPO_4 0,1 M / KH_2PO_4 0,1 M) ; application d'un potentiel de -0,6 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,005 V, amplitude de 0,025 V, intervalle de 0,5 s, modulation du temps de 0,05 s*

D'après le voltampérogramme représenté en Figure 41, un pic est obtenu vers un potentiel de 0 V, d'une intensité proche des 1,4 × 10^{-7} A. Toutefois, ce pic ne correspond pas à celui du MB, il s'agit là d'un pic inhérent aux électrodes. Pour le confirmer, une DPV a été réalisée sur des SPCEs non fonctionnalisées (Figure 42), les résultats obtenus sont similaires aux précédents avec un pic d'intensité situé vers 0 V.

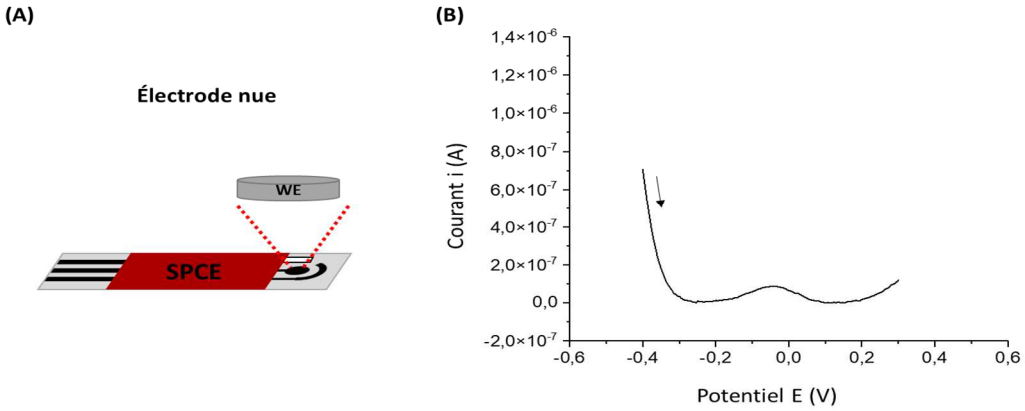


*Figure 42: Schéma théorique électrode SPCE non fonctionnalisée (**A**) ; Voltampérogramme DPV obtenu à partir d'une électrode SPCE non fonctionnalisée (**B**), mesure de -0,4 à 0,3 V dans un tampon DPV (KCl 0,1 M / Na_2HPO_4 0,1 M / KH_2PO_4 0,1 M) ; application d'un potentiel de -0,4 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,005 V, amplitude de 0,025 V, intervalle de 0,5 s, modulation de temps de 0,05 s*

Différents tests avec le marquage MB ont été effectués, notamment sans l'utilisation de chauffage et avec une forte concentration d'ADN cible (10 µM), mais aucun pic représentant le MB n'est apparu. L'hypothèse que nous avons émise était que l'ADN cible est bien trop long (70 bases). De ce fait, même si l'hybridation se réalise, le marqueur MB serait trop éloigné de la surface de l'électrode pour permettre l'enregistrement d'un signal.

- **Fonctionnalisation des oligonucléotides**

Nous avons étudié la possibilité d'utiliser un ADN cible marqué au MB sur l'autre extrémité (3') (*C3*). De cette façon, le marqueur devrait être plus proche de la surface de l'électrode après l'hybridation. Le protocole est toujours sensiblement le même (solution à 1 µM de sondes capture (*25A*) + solution à 1 µM de cible (*C3*) avec chauffage à 46°C durant 40 min après dépôt). Les résultats (Figure 43) montrent que seul le pic de l'électrode est présent.

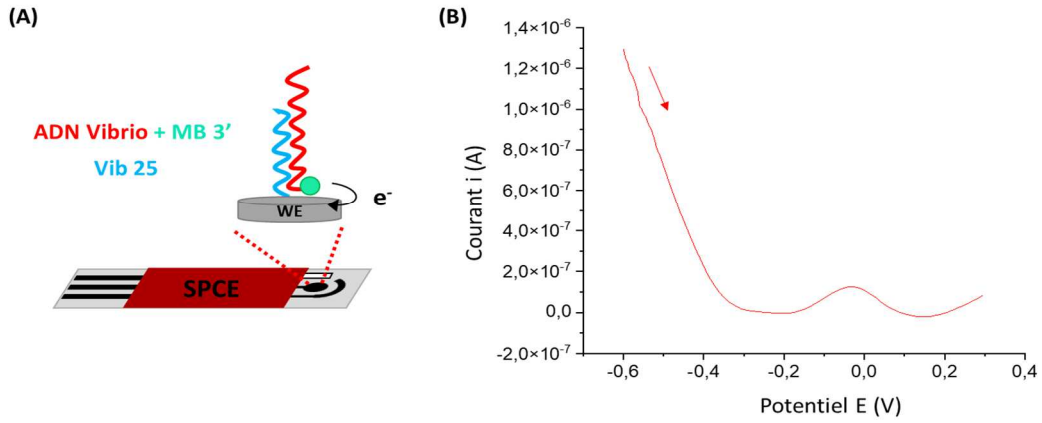


*Figure 43: Schéma théorique hybridation entre oligonucléotide immobilisé et l'ADN cible marqué en MB 3' **(A)** ; Voltampérogramme DPV après incubation solution d'ADN cible marqué au MB **(B)**, mesure de -0,6 à 0,3 V avec un tampon DPV (KCl 0,1 M / Na_2HPO_4 0,1 M / KH_2PO_4 0,1 M) ; application d'un potentiel de -0,6 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,005 V, amplitude de 0,025 V, intervalle de 0,5 s, modulation de temps de 0,05 s*

La seconde optimisation a été de tenter d'hybrider en solution la sonde capture (*25A*) avec l'ADN cible marqué en MB (3') (*C3*) puis de les immobiliser dans un second temps sur les SPCEs (mélange de mêmes concentrations (1 µM) dans le PBS placé à 46°C et agitation durant 1 h). Les données acquises (Figure 44) montrent un chevauchement de pics d'intensité 3,3 × 10^{-7} A vers un potentiel de -0,4 V, pour le premier pic, et -0,2 V pour le second. Le pic vers -0,4 V semble être celui du MB, alors que le second pic pourrait correspondre au pic de l'électrode qui chevauche avec le premier. Cela est peut-être dû au fort potentiel négatif employé dès le départ de la mesure (-1,2 V). L'ADN cible est bien présent mais il est difficile de savoir si cet ADN s'hybride à la sonde Vib 25 ou s'il est juste adsorbé à la surface des SCPEs. Ces points restent difficiles à éclaircir.

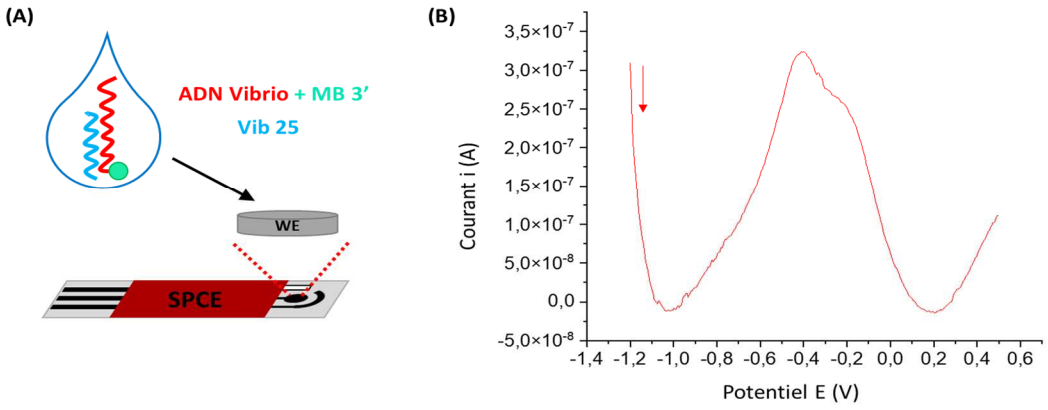


*Figure 44: Schéma théorique hybridation entre oligonucléotide et cible marqué en MB 3' puis immobilisation **(A)** ; Voltampérogramme DPV après immobilisation solution Vib 25 et ADN cible marqué au MB **(B)**, mesure de -1,2 à 0,5 V avec tampon DPV (KCl 0,1 M / Na_2HPO_4 0,1 M / KH_2PO_4 0,1 M) ; application d'un potentiel de -1,2 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,005 V, amplitude de 0,025 V, intervalle de 0,5 s, modulation de temps de 0,05 s*

L'optimisation suivante a été d'utiliser la sonde capture Vib 25 et de la marquer avec du MB à son extrémité 3' (*25B*). Les voltampérogrammes présentent deux pics : un vers 0 V correspondant à celui de l'électrode, et un second vers -0,5 V spécifique au MB (Figure 45, courbe bleue). Les quelques essais réalisés en présence de l'ADN cible (*C1*) ne montrent pas d'évolution significatives (faible diminution du signal) permettant de mettre en évidence une hybridation des deux séquences d'ADN utilisées (Figure 45, courbe rouge).

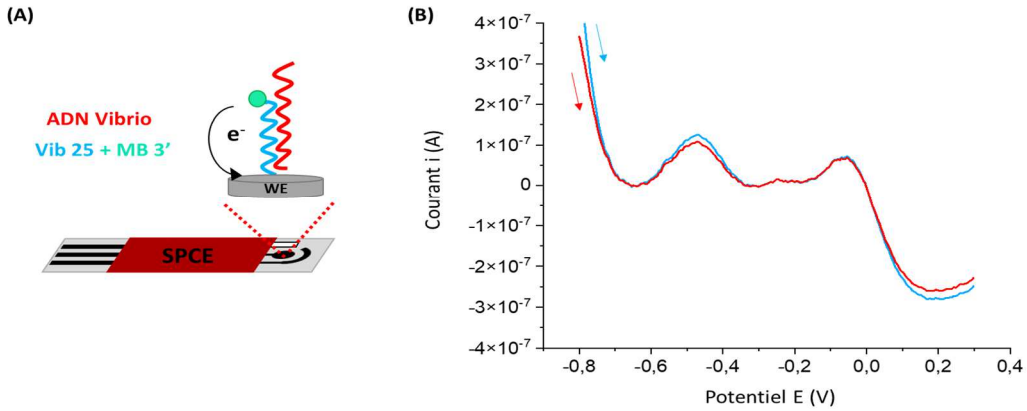


*Figure 45: Schéma théorique d'hybridation entre oligonucléotide marqué avec MB 3' immobilisé et l'ADN cible **(A)**. Voltampérogramme DPV avant/après incubation solution d'ADN cible avec Vib 25 marqué avec MB 3' **(B)**, mesure de -0,8 à 0,3 V en utilisant un tampon DPV (KCl 0,1 M / Na_2HPO_4 0,1 M / KH_2PO_4 0,1 M) ; application d'un potentiel de -0,8 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,005 V, amplitude de 0,025 V, intervalle de 0,5 s, modulation de temps de 0,05 s. Courbe bleue = immobilisation des sondes capture, courbe rouge = détection de la cible*

La majorité des résultats obtenus sur les tests avec le bleu de méthylène ne sont pas concluants, mais peut-être avec plus d'optimisations nous aurions obtenu des résultats positifs. Cependant, les quantités de sonde capture / cible marquée par du MB étant limitantes, la décision a été prise d'abandonner cette approche et de se concentrer sur la mesure en impédance.

2.2.4) PRÉTRAITEMENT ET IMMOBILISATION DE LA CIBLE

Le travail réalisé n'a pas permis de conclure au fonctionnement du capteur, alors que l'ADN de capture Vib 25 semble être correctement fixé à l'électrode, d'après les mesures d'impédance que nous avons réalisées. Dans l'ensemble des expériences réalisées jusqu'à présent, nous avons constaté que nous avions des difficultés à mettre en évidence l'hybridation de la sonde de capture avec l'ADN de *Vibrio* constituant la cible. Nous avons donc envisagé que la sonde Vib 25 ne s'hybride pas correctement à la cible. En effet, bien qu'ayant à son extrémité un groupement espaceur de six carbones portant une fonction amine, une trop grande proximité de l'électrode ou une conformation particulière de Vib 25 semble empêcher l'ADN cible de bien s'hybrider à la sonde de capture (Figure 46).

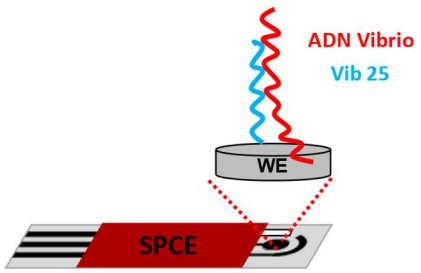


Figure 46 : Schéma théorique d'une hybridation incorrecte entre oligonucléotide immobilisé et l'ADN cible

Pour vérifier si le problème que nous rencontrions était lié à l'hybridation des deux sondes nous avons eu recours à deux autres oligonucléotides : la sonde Vib 35 (*35A*) (oligonucléotide original) et la sonde Vib 35-7T (*35B*). La sonde Vib 35-7T comprend la même séquence que l'oligonucléotide original à laquelle sept thymines ont été ajoutées comme espaceur afin d'accroître la distance avec la surface de l'électrode. Les tests se réalisent toujours en comparant des groupes Essai et Témoin.

2.2.4.1) PRÉTRAITEMENT DE LA CIBLE

Il est important de s'assurer que l'ADN soit correctement linéarisé et que sa conformation ne nuise pas à l'hybridation avec la sonde capture. Différents essais de traitements ont donc été effectués sur l'ADN cible avant son l'incubation sur les électrodes.

- **Utilisation de différentes solutions d'hybridation (SSC, Tris-Cl, EDTA et SDS…)**

Le tampon utilisé classiquement lors de manipulations d'oligonucléotides est le PBS à 0,1 M, mais plusieurs tampons comprenant des composés comme le SDS servant à éviter les liaisons non spécifiques et à faciliter l'hybridation des ADN ont été employés. Les tampons qui ont été

testés sont ceux favorisant l'hybridation d'ADN, couramment utilisés dans certains protocoles de traitement de l'ADN (Northern Blot…).

Les premiers testés ont été des solutions de NaCl ou Tris/HCl comprenant soit de l'EDTA, soit du SDS à 0,01 %. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 47. Les tampons contenant de l'EDTA semblent altérer la surface des SPCEs, ce qui se traduit par une baisse d'impédance. Les tampons à base de SDS montrent une forte augmentation de l'impédance suite à l'incubation avec la cible. Étant donné que l'augmentation d'impédance se produit aussi dans le groupe Témoin, il est possible de conclure que le SDS peut s'adsorber à la surface des électrodes.

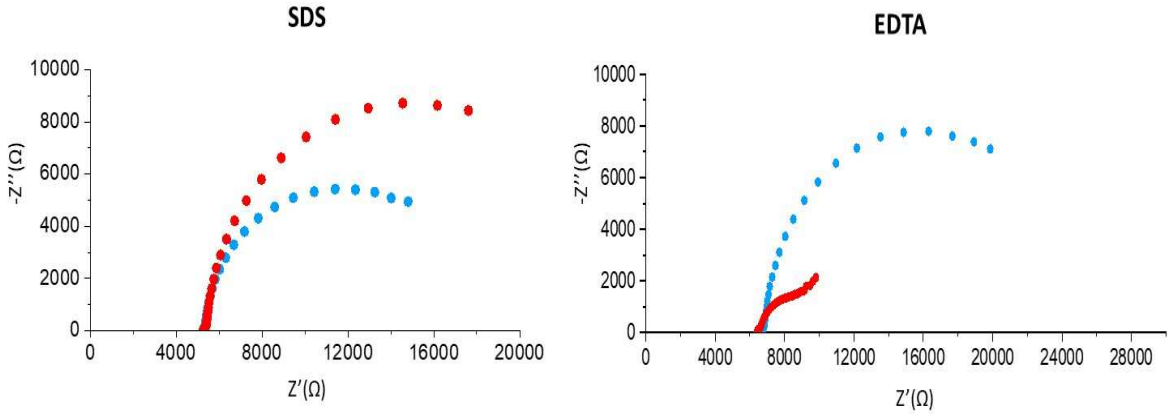


Figure 47: Spectres d'impédance des tests de tampons contenant 0,01 % de SDS et d'EDTA. Courbe bleue = immobilisation des sondes capture, courbe rouge = détection de la cible. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 2000-0,05 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,12 V

D'autres essais ont été conduits en utilisant les tampons à base de Tris-HCl de même que le tampon citrate sodique (SSC) (forte quantité de NaCl et de citrate de sodium), ou un tampon phosphate à basse concentration qui permet de réduire la température de fusion des oligonucléotides. Ces autres tampons n'ont pas conduit à de fortes variations d'impédance lors de l'hybridation, ce qui ne permet pas de s'assurer que celle-ci soit bien effective.

- **Dénaturation à 95°C durant 5-10 min**

Un traitement de linéarisation permet de favoriser l'hybridation de l'ADN. Il s'agit d'un traitement thermique à une température de 90°C suivi d'un refroidissement dans une plage de température comprise entre 4 et 0°C, permettant d'éviter d'éventuels auto-appariements et la formation de structures secondaires. C'est ce traitement qui a été utilisé dans chacun des tests précédents.

Afin de favoriser l'hybridation, la cible a été chauffée à 95°C durant 5-10 min, puis déposée sur les SPCEs. Après un temps d'incubation d'une heure à T_{amb}, permettant à l'ADN cible d'adopter une conformation préférentielle permettant l'hybridation à la sonde de capture, nous avons réalisé les mesures d'impédance. Les résultats du groupe Essai après l'ajout de cible nous montrent d'infimes variations positives comme négatives de l'ordre d'une centaine d'Ohms au niveau de la résistance imaginaire -Z'' et de l'ordre de 500-700 **Ω** pour ce qui concernent la résistance de transfert de charge. Toutefois, le groupe Témoin présente des variations de résistance similaires pour -Z'' et R_{ct}. Nous en concluons que cette optimisation de traitement de linéarisation n'a pas eu d'effet significatif.

- **Préparation de la cible dans une solution à 50% de DMSO**

Le DMSO est connu comme un réactif dénaturant les brins d'ADN et abaissant la température de fusion moléculaire. Selon certaines publications, le DMSO [187,188] favoriserait l'hybridation d'ADN. Conformément à cela, l'ADN cible a été placé dans une solution aqueuse à 50 % de DMSO durant 15 min pour la dénaturation, puis dilué dans un tampon PBS pour être immédiatement déposé pour incubation sur les SPCEs. De façon similaire à l'expérience précédente aucune variation significative d'impédance n'a été observée qui puisse traduire l'hybridation de l'ADN cible avec la sonde de capture.

Les expériences précédentes n'ont pas permis de mettre en évidence l'hybridation de la cible et de la sonde de capture. Travailler sur la dénaturation de la cible par chauffage ou en utilisant divers composés n'a pas abouti aux résultats souhaités. Cela nous a amené à la conclusion que le problème d'hybridation ne venait peut-être pas de la cible en elle-même. En effet, il est nécessaire de rappeler que la complémentarité des deux séquences (sonde capture et cible) a été mise à profit lors d'une thèse précédente pour mettre au point un génocapteur à détection optique. De ce fait, pour tous les tests à venir, nous sommes repartis sur le même prétraitement de cible qu'au départ, à savoir le cycle de chauffage (8 min à 90°C, 4 min à 0°C). Il s'agit d'un prétraitement classique qui a déjà fait ses preuves. L'étape d'incubation à 46°C a aussi été conservée. Cependant, il nous a aussi semblé nécessaire de faire une modification quant à la longueur de la séquence de l'ADN cible et à ses effets potentiels. L'ADN cible utilisé est composé de 70 bases, une taille peut-être trop importante pour s'hybrider à la sonde complémentaire. Ainsi la séquence de la cible a été réduite à 35 bases, complémentaires de celles de la sonde Vib 35 :

ADN cible *Vibrio* (contrôle positif) 70 bases :

5'- TAA TCG GAA TTA CTG GGC GTA AAG CGC ATG CAG GTG TTC ATT AAG TCA GAT GTG AAA GCC CGG GGC TCA A -3'

ADN cible *Vibrio* (contrôle positif) 35 bases :

5'- GTT CAT TAA GTC AGA TGT GAA AGC CCG GGG CTC AA - 3'

2.2.4.2) MÉTHODES D'IMMOBILISATION ALTERNATIVES

Après avoir examiné les effets de la longueur de la séquence de l'oligonucléotide (augmentation de taille, recours à une séquence espaceur de 7 T), de la méthode de détection (impédance et DPV), pour mettre en évidence l'hybridation entre la cible et la sonde capture, nous avons envisagé en dernier recours de changer la méthode d'immobilisation des sondes de capture sur les SPCE. En effet, le protocole d'immobilisation par liaison covalente amide entre la fonction NH_2 de la sonde de capture et la fonction acide carboxylique en surface de l'électrode, n'est peut-être pas la méthode la plus appropriée. Il est vrai que ce protocole peut conduire à une surface de travail de l'électrode porteuse d'une densité trop importante, engendrer une conformation inadaptée de la sonde de capture, ou encore introduire des sous-produits de réaction modifiant les propriétés électriques de l'électrode.

Trois méthodes différentes d'immobilisation ont donc été testées : l'immobilisation par adsorption, l'immobilisation par affinité streptavidine-biotine, et l'immobilisation par interaction entre groupements thiol et or.

- **L'immobilisation par adsorption physique**

La première méthode testée est celle de l'adsorption physique. Cette approche se distingue de la précédente par sa simplicité de mise en œuvre : elle consiste à incuber à la surface de la SCPE, durant 3 à 4 h, 20 µL d'une solution PBS contenant les sondes capture. La solution cible est ensuite ajoutée et incubée à 46°C pendant 30 à 60 min. Des expériences ont donc été réalisées avec trois concentrations de sondes Vib 35 (*35A*) (0,01 µM, 0,1 µM et 1 µM) avec, dans chaque cas, une concentration en ADN cible (*C1/2*) équivalente à celle des sondes capture (Figure 48). Pour cette méthode d'immobilisation seulement, le groupe Témoin utilise une sonde capture (*N*) non spécifique à l'ADN *Vibrio* afin de bien discerner les différences d'hybridation.

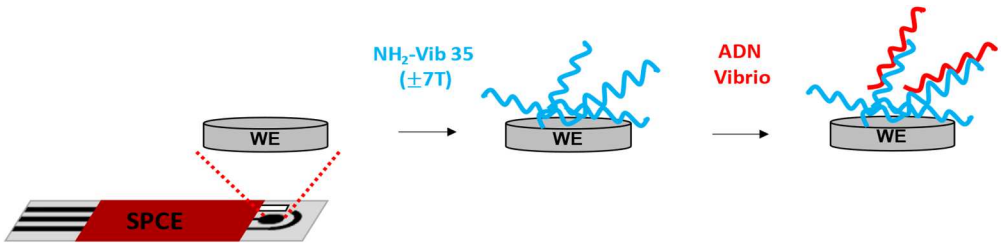


Figure 48: Schéma théorique du biocapteur avec immobilisation par adsorption physique

Contrairement aux autres techniques d'immobilisation, il a été plus facile d'avoir un aperçu de la « quantité » d'oligonucléotides déposée en fonction des concentrations des solutions utilisés (Figure 49). Nous remarquons des augmentations de -Z'' de l'ordre de 1000 Ω pour des dépôts de solutions à 0,01 µM, 5000 Ω pour des solutions à 0,1 µM et 10000 Ω pour des solutions à 1 µM. Même observation pour les R_{ct} avec des augmentations respectives de 6700 Ω, 14000 Ω et 25000 Ω.

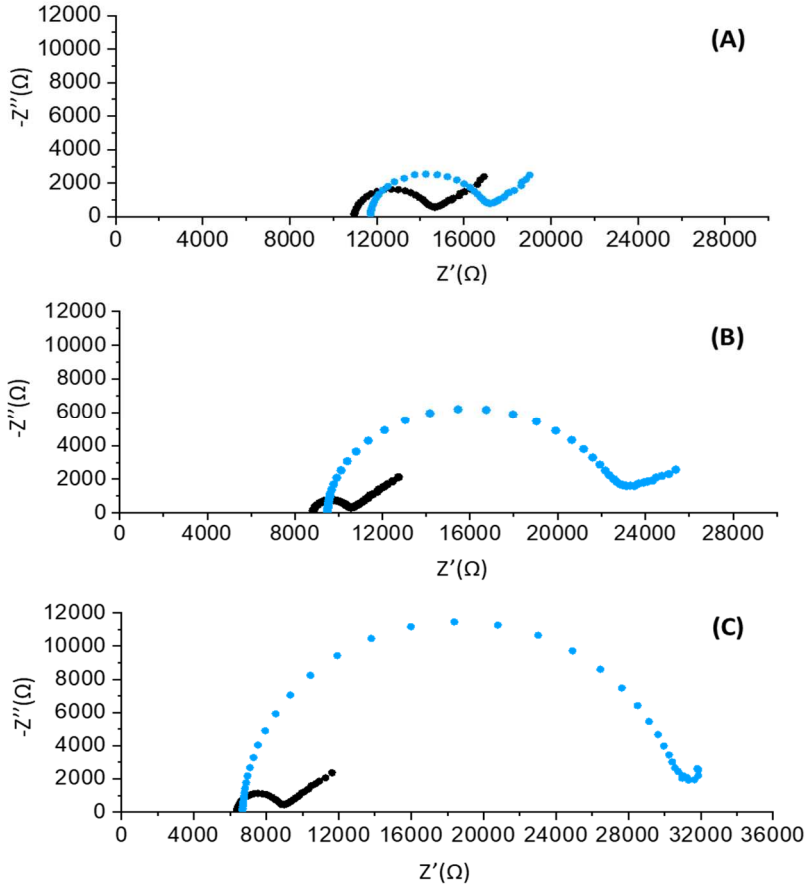


*Figure 49: Spectres d'impédance obtenus après immobilisation par adsorption de la sonde Vib 35 à différentes concentrations 0,01 µM (**A**), 0,1 µM (**B**) et 1 µM (**C**). Courbe noire = électrode nue, courbe bleue = après adsorption des sondes de capture). Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 2000-0,05 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,12 V*

Les résultats obtenus après incubation de la cible montrent des variations irrégulières d'impédance pour le groupe Essai comme le groupe Témoin (Figure 50). De plus, nous avons observé de forts changements de la résistance réelle Z' des électrodes à chaque étape, suggérant que les signaux observés proviennent uniquement de variations entre électrodes.

À la vue des évolutions d'impédance à chaque étape, cette méthode d'immobilisation n'est pas la bonne pour ce travail. Trop de variations d'impédance sont présentes. De plus, dans les cas où l'augmentation d'impédance tant attendue est observée après ajout de cible, il reste impossible de confirmer le fonctionnement du capteur (adsorption de l'ADN cible sur la surface, sans hybridation).

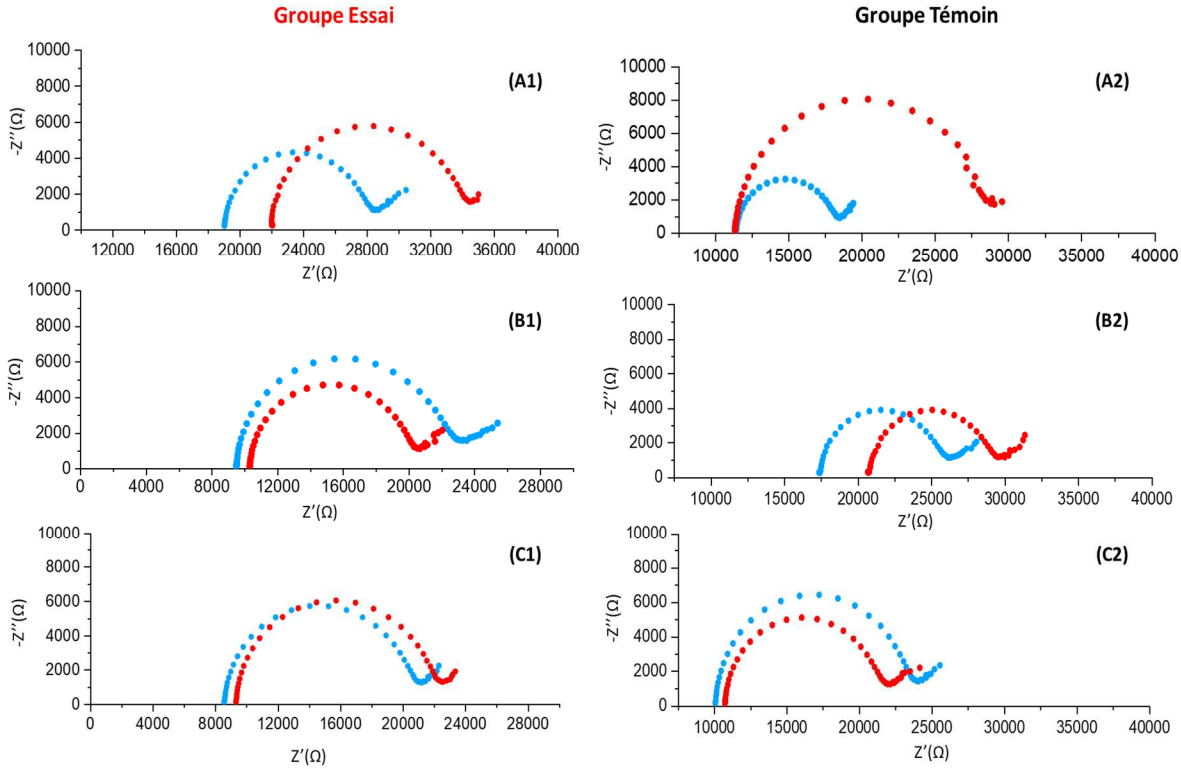


*Figure 50: Spectres d'impédance de l'immobilisation par adsorption pour les groupes Essai (**colonne de gauche**) et Témoin (**colonne de droite**) avec des concentrations similaires en sonde Vib 35 et en ADN cible : 0,01 µM (**A1** et **A2**), 0,1 µM (**B1** et **B2**) et 1 µM (**C1** et **C2**). Courbe bleue = immobilisation des sondes capture, courbe rouge = détection de la cible. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 2000-0,05 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,12 V*

- **L'immobilisation via liaison streptavidine-biotine**

La streptavidine est une protéine dérivée de bactéries qui montre une haute affinité pour la biotine (vitamine B8). Elle possède la capacité de lier jusqu'à quatre molécules de biotine, ce qui la rend utile pour des applications d'immobilisation de biomolécules et de purification en biologie.

Dans ce protocole d'immobilisation, la construction du capteur suit toujours un schéma similaire (Figure 51): réduction de diazonium par voltampérométrie, activation EDC/NHS durant 2 h, dépôt d'une solution de streptavidine à 1 mg/mL avec incubation durant 3 h, immobilisation des oligonucléotides biothinylés en solution à 1 µM (*35C*) avec incubation en environnement humide durant 1 h, détection de cible avec dépôt d'ADN cible à 1 µM (*C1/2*) et incubation pendant 1 h à 46 °C en environnement humide.

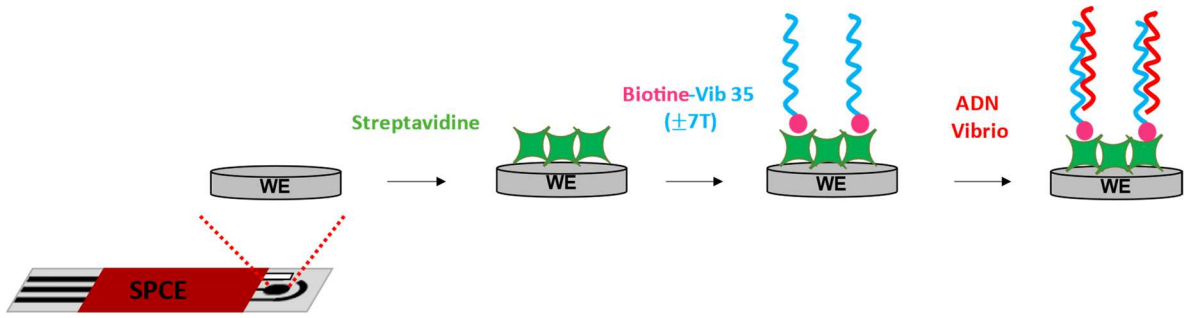


Figure 51: Schéma théorique du biocapteur avec immobilisation par liaison streptavidine-biotine

Suite à son dépôt, la streptavidine bloque la surface des électrodes, l'impédance augmente donc fortement jusqu'à 19700-23200 Ω en R_{ct} et 1000-12000 Ω en -Z''. Suite à l'immobilisation des oligonucléotides, la résistance continue d'augmenter de quelques milliers d'ohms. Enfin, après ajout de l'ADN cible, l'impédance chute au niveau des valeurs avant immobilisation des sondes capture (Figure 52 et Tableau 9). Les expériences qui ont suivi ont montré des résultats identiques pour les groupes Témoin et Essai. Malheureusement, peu de tentatives et d'optimisations de cette technique d'immobilisation par streptavidine-biotine ont pu être réalisées, et ces dernières n'ont rien prouvé quant au bon fonctionnement de l'hybridation sonde-cible.

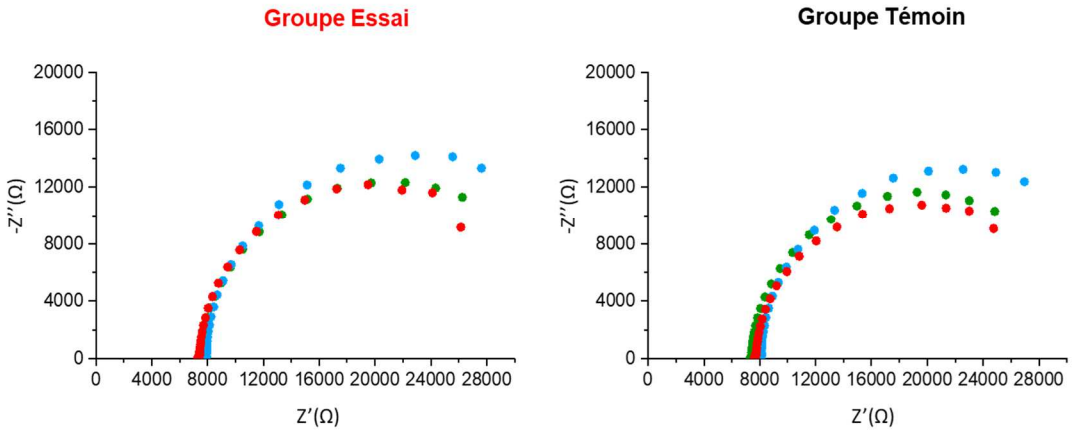


Figure 52: Spectres d'impédance avec immobilisation streptavidine-biotine du Vib 35-7T. Courbe verte = dépôt de streptavidine, courbe bleue = immobilisation sondes capture, courbe rouge = détection de cible. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 2000-0,03 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,12 V

Tableau 9: Paramètres des spectres d'impédance pour l'immobilisation par affinité streptavidine-biotine. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 2000-0,03 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,12 V

Circuit équivalent [R([RW]Q)] / **Optimisations**	**Groupes**	**Éléments**	**E1**	**E2**	**E3**
			Différence entre avant et après détection de cible	Différence entre avant et après détection de cible	Différence entre avant et après détection de cible
Immobilisation streptavidine-biotine **1 mg/mL streptavidine** **1 µM Vib 35** **1 µM ADN cible**	Essai	R_{ct} (Ω)	-3250	-3016	-1747
		-Z'' (Ω) sommet demi-cercle	-1984	-2514	-2043
	Témoin	R_{ct} (Ω)	-3401	-2554	-3907
		-Z'' (Ω) sommet demi-cercle	-2852	-2526	-2446

- **Méthodes d'immobilisation par liaison or-thiol**

Une des immobilisations les plus connues et efficaces dans le domaine de la chimie est basée sur la liaison or (Au)-thiol (SH). Quelques tests ont été réalisés sur des électrodes sérigraphiées en or (SPE-Au) provenant de chez METROHM DROPSENS, et sur les SPCEs du laboratoire, modifiées par réduction d'une solution d'or (20 cycles CV de – 0,6 à 0,8 V, 100 µL de $HAuCl_4$ 10 mM dans H_2SO_4 0,5 M). Les sondes capture employées sont les sondes Vib 35 (*35D*) fonctionnalisées avec un thiol à leur extrémité 5'. Similairement à l'immobilisation par adsorption, il est simple de suivre les évolutions d'impédance avec des électrodes d'or : l'impédance doit théoriquement augmenter à chaque étape (spectre Figure 53). De plus, l'or étant un matériau très conducteur, des valeurs moins élevées que précédemment ont été observées.

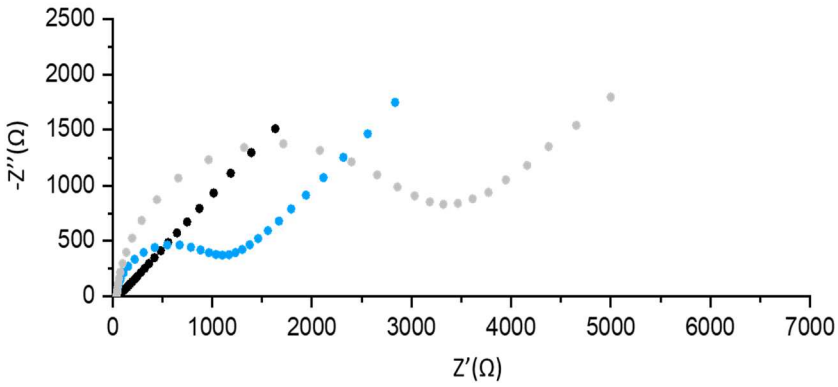


Figure 53: Spectres d'impédances théoriques du biocapteur avec immobilisation par liaison or-thiol. ***Courbe noire*** *= électrode nue,* ***courbe bleue*** *= immobilisation des sondes capture,* ***courbe grise*** *= blocage avec MCH*

Le protocole de conception est celui qui suit : les sondes Vib 35 thiolées en 5' (*35D*) sont placées en solution dans le PBS 0,1 M puis 20 µL sont déposées sur des électrodes et incubées durant 1 à 3 h. Une solution de 6-mercaptohexanol (MCH) à 1 mM dans le PBS est ensuite incubée sur la surface pendant 1 h. Enfin, l'ADN cible (*C1 et C1/2*) est incubé pendant 1 h à 46°C à la surface des électrodes (Figure 54). Le MCH joue un rôle similaire à l'éthanolamine : il s'intercale entre les oligonucléotides, et favorise ainsi leur orientation verticale permettant une bonne accessibilité pour l'hybridation de la cible.

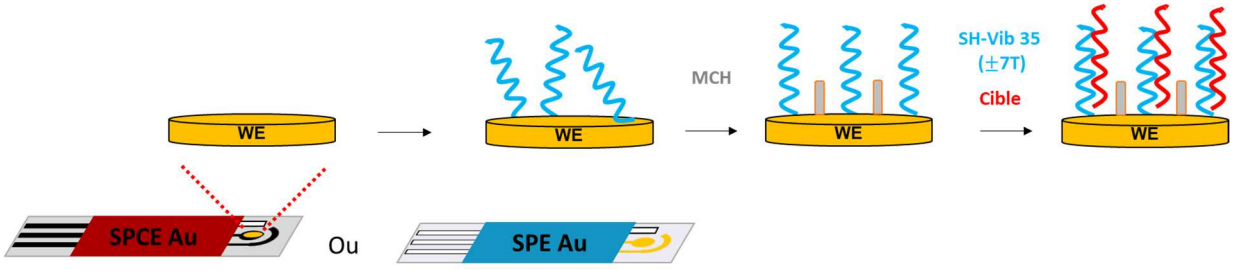


Figure 54: Schéma de la conception du capteur par immobilisation or-thiol

Une première série d'essais de conception de capteur a donc été effectuée sur électrodes d'or commerciales avec des concentrations similaires pour sonde capture et cible (1 µM). Les données obtenues sont sensiblement semblables à celles des tests précédents Tableau 10 : une augmentation de l'impédance après ajout de l'ADN cible pour les groupes Essai et Témoin. Ce qui ne confirme rien quant au fonctionnement des capteurs.

Tableau 10: Paramètres des spectres d'impédance obtenus pour l'immobilisation or-thiol de la sonde SH-Vib 35 sur une électrode d'or (DROPSENS). Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 2000-0,1 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,10 V

Circuit équivalent [R([RW]Q)]	**Groupes**	**Éléments**	**E1**	**E2**	**E3**
Optimisations			Différence entre avant et après détection de cible	Différence entre avant et après détection de cible	Différence entre avant et après détection de cible
Immobilisation Or-Thiol **1 µM Vib 35** **1 µM ADN cible**	Essai	R_{ct} (Ω)	+1008	+171	+119
		-Z'' (Ω) sommet demi-cercle	+453	+35	+48
	Témoin	R_{ct} (Ω)	+148	+328	+302
		-Z'' (Ω) sommet demi-cercle	+63	+155	+141

Divers tests ont été lancés dans la continuité. Certaines expériences ont eu lieu avec du dithiothréitol (DTT), où l'objectif (Figure 55) a été d'optimiser plus encore la surface des SPCEs d'or ; ajouter du DTT en concurrence avec les sondes capture pour les espacer entre elles, puis mettre le MCH pour finir d'organiser la surface. En se basant sur des résultats publiés [189], une solution de DTT à 200 µM a été déposée sur les SPCEs d'or nues en même temps que la solution à 1 µM de sondes Vib 35 (*35D*) et incubées durant 16 h en environnement humide. Une solution à 1 mM de MCH est alors déposée durant 1 h et pour finir, c'est au tour de l'ADN cible (*C1/2*).

En comparant les résultats d'une immobilisation « DTT + oligonucléotides » et une immobilisation « oligonucléotides seuls », une différence concrète d'impédance est notée (Figure 55). Dans le cas des « oligonucléotides seuls », l'impédance augmente avec un passage de 200 à 500 Ω en -Z'' et de 300 vers 1000 Ω en R_{ct} ; dans le cas du DTT, par contre, d'infimes changement d'impédance ont été observés (augmentations comme diminutions).

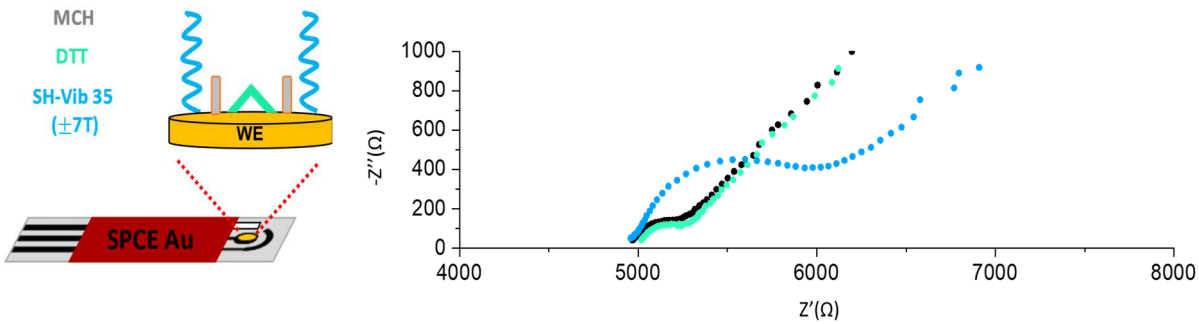


Figure 55: Schéma théorique du biocapteur avec utilisation de DTT et spectres d'impédance de comparaison des immobilisations avec et sans DTT. Courbe noire = électrode nue, courbe verte = immobilisation du DTT et des sondes capture, courbe bleue = immobilisation sondes capture. Mesures avec ferri/ferrocyanure 1 mM dans le PBS à 0,1 M, fréquence entre 2000-0,1 Hz, 50 points de fréquences, amplitude 0,01 V, sine wave type, pas de fréquence logarithmique, potentiel de conditionnement de 0,13 V

Avec l'emploi de DTT, l'impédance aurait dû augmenter plus significativement : le DTT possédant deux groupements thiol pour l'immobilisation et deux groupements hydroxyles. Des vérifications ont été effectuées pour confirmer cela (pH de la solution de dépôt, temps d'immobilisation de 4-16 h, baisse de concentration en DTT de 200 à 50 µM) mais rien n'a fonctionné. Peut-être cela provenait-il d'un autre paramètre que nous avons oublié (lots d'électrodes et oligonucléotides…). Bien entendu les expériences se sont déroulées jusqu'à l'étape de détection, mais sans grand succès. Ainsi à la vue de ces problèmes, l'utilisation du DTT n'a pas été maintenue.

Un marquage au bleu de méthylène a aussi été tenté avec une sonde Vib 35 marquée en 3' au MB et avec un thiol en 5'. Toutefois le pic de l'or, proche des -0,4 V sur certaines Au-

SPEs/SPCEs et assez important sur les électrodes, le signal du marqueur s'en est vu fortement amoindri, voire aggloméré à celui de l'or. Cela a rendu la lecture des résultats très difficile.
Les expériences auraient pu continuer sur ces sujets, mais par souci de matériel (problèmes avec certaines électrodes), de temps et de résultats positifs, la conception de capteur pour la détection de d'ADN *Vibrio* a été arrêtée.

2.3) CONCLUSION

Lors de cette étude sur la détection d'ADN *Vibrio*, des difficultés ont été rencontrées comme des soucis de méthodes (électrodes, multiples optimisations…) ou des changements dans la fabrication des électrodes SPCEs du laboratoire. Ces travaux de conception de biocapteur n'ont malheureusement pas été concluants, même si de nombreux essais portant sur l'optimisation des protocoles ont été réalisés. Il s'avère difficile de définir avec précision les raisons qui pourraient expliquer l'absence de résultat dans la conception du biocapteur. La non-hybridation de l'ADN cible avec son oligonucléotide complémentaire immobilisé à la surface d'électrodes paraît la plus probable et pourrait être liée au fait que :

- À la surface de l'électrode, l'oligonucléotide de capture ne s'hybride pas avec l'ADN cible, car des phénomènes physico-chimiques que nous ne pouvions pas maîtriser induisent des changements conformationnels qui entravent l'hybridation ;
- Aux méthodes de construction du biocapteur employées, qui n'étaient peut-être pas adaptées aux cas étudiés. Le génocapteur basé l'utilisation d'électrodes sérigraphiées ne s'est pas révélé fonctionnel, malgré les nombreux essais d'optimisation réalisés concernant différents paramètres (concentrations, quantités d'oligonucléotides, température, nature de l'électrode, temps d'incubations…).

Ces nombreux échecs de conception du capteur ont été chronophages, et ne nous ont pas permis de tester et mettre en pratique l'ensemble de l'approche envisagée qui comportait un double système de marquage par dichlorotétrazine de même que l'utilisation de LNA/PNA comme sondes capture. Toujours est-il que l'étude électrochimique des complexes issus des ligands NOTA et DOTA nous avait convaincu de leurs qualités et importance pour le domaine des biocapteurs. Nous nous sommes donc focalisés sur une approche différente de leur utilisation en orientant nos recherches vers des cibles et sondes ayant déjà validé leur efficacité.

3) APTACAPTEURS POUR LA DÉTECTION DE CIBLES CHIMIQUES

Les recherches concernant le biocapteur pour ADN *Vibrio* n'ayant pas abouti, notre nouvel objectif a donc été d'utiliser les complexes métalliques DOTA/NOTA avec des aptamères. L'idée a été de coupler un complexe de fer avec trois types d'aptamères spécifiques à une cible précise. Ces cibles sont le 17β-estradiol, l'ochratoxine A et l'aflatoxine M1, avec leurs aptamères respectifs : l' Anti-E2 [8,190], l'Anti-OTA [191,192] et l'Anti-AFM1 [193,194].

3.1) DÉFINITION DES CIBLES

Les molécules ciblées par ces différents aptamères peuvent contribuer à une dégradation de l'environnement. Nous avons souhaité brièvement rappeler leurs caractéristiques et les problématiques environnementales qui leur sont associées.

3.1.1) 17β-ESTRADIOL (E2)

Le 17β-estradiol ou E2 (Figure 56) est une hormone sexuelle permettant, chez la femme, le bon fonctionnement des fonctions sexuelles et reproductrices, ainsi que le maintien de la structure osseuse et de certains organes. Il s'agit d'un composé qui peut être prescrit pour contrer l'arrêt de production des œstrogènes lors de la ménopause ou encore pour pallier ses symptômes.

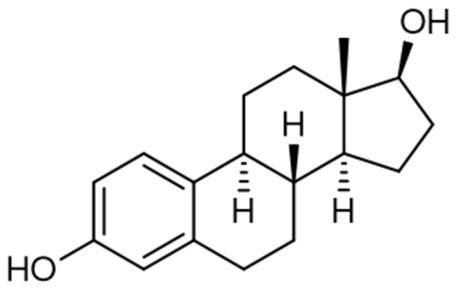


Figure 56: Structure chimique du 17β-estradiol (E2)

L'estradiol est aussi considéré comme un perturbateur endocrinien : une substance chimique naturelle ou synthétique qui influe sur le système endocrinien des organismes vivants. Après excrétion, l'estradiol et ses métabolites se retrouvent dans la nature, principalement, via les rejets d'eaux usées issus des domiciles et hôpitaux qui ne sont malheureusement pas dégradés en totalité par les traitements des STEPs (STations d'EPuration des eaux usées).

Une exposition conséquente ou sur le long terme à ces hormones estrogéniques expliquerait chez les animaux marins ou terrestres des perturbations de la croissance et de la reproduction voire une mortalité accrue [195,196].

3.1.2) OCHRATOXINE A (OTA)

Découverte en 1965, l'ochratoxine A ou OTA (Figure 57) est une toxine courante et potentiellement dangereuse, produite par quelques espèces de champignons *Aspergillus* dans des zones chaudes et humides et *Penicillium* dans des lieux à basses températures [197]. Elle se forme principalement sous certaines conditions (température, pH…) au moment de la conservation des récoltes et peut ensuite contaminer les denrées alimentaires (céréales, fromages, fruits, grains de café, vin, épices…).

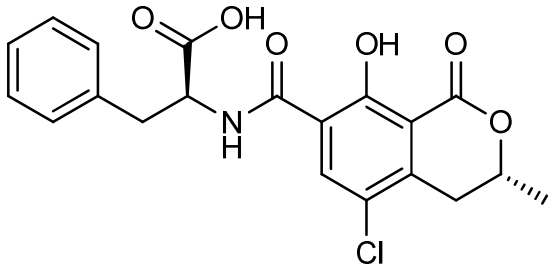


Figure 57: Structure chimique de l'ochratoxine A (OTA)

L'OTA est la plus connue et répandue des trois ochratoxines naturelles existantes (OTA, OTB, OTC). C'est un composé chimique hautement stable, il est donc difficile de réduire/éliminer sa présence dans certains aliments ou boissons [198].

Le mécanisme d'action biologique expliquant la toxicité des ochratoxines envers les organismes n'est pas parfaitement connu. Pourtant, certains groupements de l'OTA, dont la phénylalanine, viendrait interférer avec la production de protéines dans le corps [199]. Des expérimentations sur les animaux montrent que l'OTA peut être néphrotoxique, hépatotoxique, neurotoxique, immunotoxique, ou encore cancérogène lorsqu'il s'agit d'interactions à fortes doses [200–202]. À contrario, chez l'être humain, aucun lien n'a été nettement établi entre l'OTA et certaines maladies (cancer du rein, néphropathies…). Cette toxine n'en reste pas moins préoccupante, car elle a été classée comme cancérogène possible pour l'Homme par le Centre International de Recherche sur le Cancer (IARC) [198,202–204].

3.1.3) AFLATOXINE M1 (AFM1)

Les aflatoxines proviennent de deux espèces de champignons (*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*) et sont considérées comme faisant partie des mycotoxines les plus toxiques. Ces toxines se développent dans des sols en décomposition, dans le foin et les graines qui sont consommés par des animaux d'élevage. L'aflatoxine M1 (AFM1) est un métabolite de l'aflatoxine B1 (Figure 58), l'aflatoxine la plus répandue. Lorsque l'aflatoxine B1 présente dans

un aliment est consommée, elle est « transformée » en aflatoxine M1 et est excrétée dans le lait des animaux nourris (d'où la dénomination M pour lait/milk) [205].

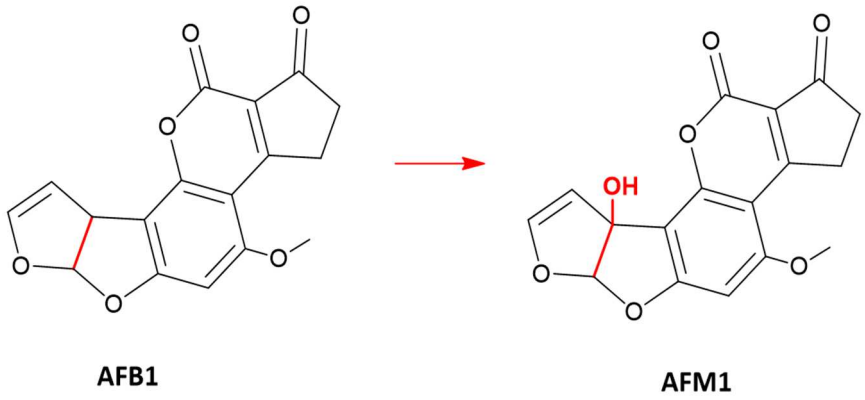


Figure 58: Structures chimiques de l'aflatoxine B1 (AFB1) et l'aflatoxine M1 (AFM1)

De la famille des difuranocoumarines, l'AFM1 est fortement fluorescente en UV et émet dans le bleu-violet. L'AFM1 comme l'AFB1 possède des propriétés similaires : faiblement solubles dans l'eau, insolubles dans les solvants non polaires, et solubles dans les solvants organiques polaires [206]. Ces deux toxines sont aussi thermiquement stables, il est impossible de les dégrader à fortes températures, et sont résistantes aux procédés de préparation culinaire.
La forte stabilité chimique de l'AFM1 induit des difficultés pour son élimination, par les procédés classiques de traitement de lait (pasteurisation). La toxine peut donc contaminer divers produits laitiers de consommation courante, et ainsi être ingérée par les consommateurs finaux. L'exposition à long terme ou bien à une forte dose, peut impacter la santé humaine et animale en provoquant des cancers hépatiques ou gastro-intestinaux [206–208].

3.2) CONCEPTIONS DES APTACAPTEURS

Afin de mettre au point ces nouvelles sondes marquées, les recherches se sont basées sur les travaux d'une thèse précédente, effectuée dans notre laboratoire [8,9]. Le projet consistait au développement d'un biocapteur électrochimique pour hormones estrogènes, en employant comme marqueurs redox des complexes métalliques salen/salan couplés à des aptamères.

La conjugaison entre marqueurs et aptamères est établie par la réaction entre le groupement maléimide des complexes et le groupement terminal thiol des aptamères employés. Cette réaction présente l'avantage de pouvoir être facilement mise en œuvre sans avoir recours à des conditions extrêmes. Ainsi, nos complexes métalliques de fer (III) ont été fonctionnalisés avec une extrémité maléimide. Le complexe de fer avec le NOTA ayant présenté de meilleures

caractéristiques, un de ses dérivés, le NODAGA, a été choisi pour nos travaux de recherche (Figure 59).

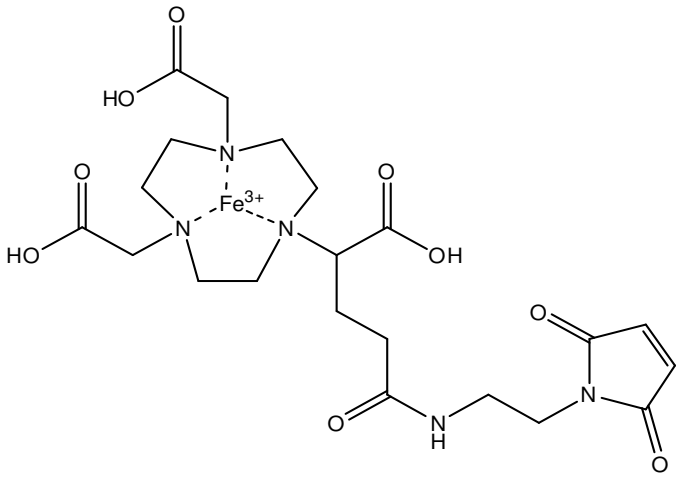


Figure 59: Le complexe métallique Fe(III)NODAGA-maléimide

3.2.1) CONJUGAISON APTAMÈRE-COMPLEXE

Le couplage des aptamères avec le complexe métallique suit une réaction, connue sous le nom d'addition thiol-Michael, entre un thiol libre (SH) et un groupement maléimide [209]. Cette réaction click chimiosélective se déroule d'ordinaire sans catalyseur dans un intervalle de pH compris entre 6,5 et 8 [210]. L'addition thiol-Michael est normalement simple à mettre en place, il faut cependant faire attention aux conditions de réaction. Par exemple, au-delà de pH 8, les amines primaires entrent en compétition avec les thiols. De même, si la réaction se fait en solution aqueuse, il est possible que le cycle du maléimide puisse s'ouvrir par hydrolyse [211,212]. Si l'ouverture du cycle se produit, il sera alors impossible de réaliser le couplage avec le thiol (Figure 60).

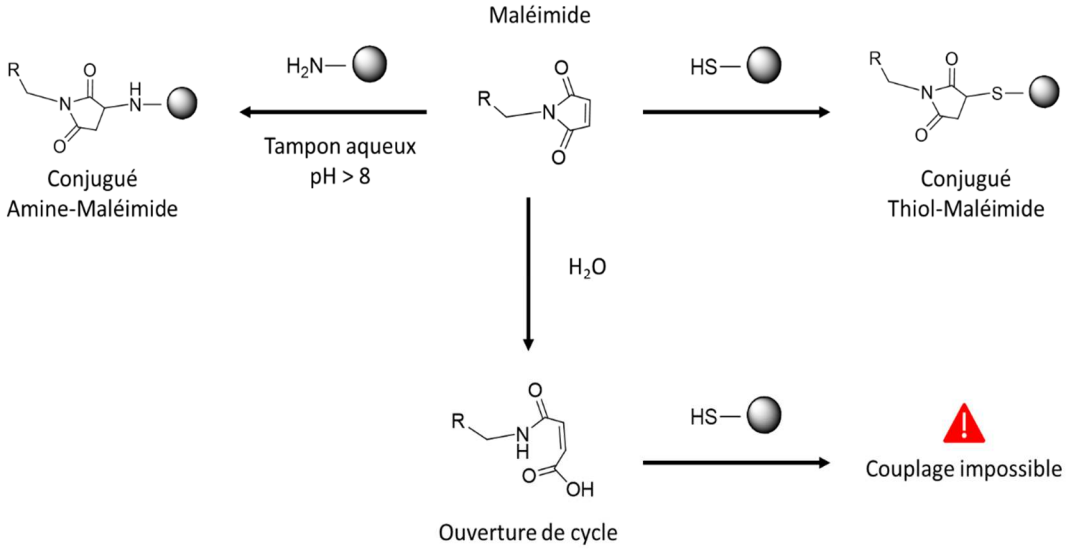


Figure 60: Différentes réactions possibles lors d'un couplage thiol-maléimide

3.2.2) CHOIX DES APTAMÈRES

Les aptamères choisis pour cette étude sont complémentaires de l'estradiol, de l'ochratoxine A et de l'aflatoxine M1. L'aptamère Anti-E2 (ou Alsager 35 du nom du chercheur qui l'a mis au point) est spécifique de l'estradiol, alors que les aptamères Anti-OTA et Anti-AFM1 se lient respectivement à l'ochratoxine A et à l'aflatoxine M1. Ces composés ont été sélectionnés sur la base de leurs affinités, mais aussi car ce sont des aptamères qui ont déjà été étudiés et utilisés par notre laboratoire dans la conception de divers biocapteurs [8,190–192,194,213,214]. À ce titre, ils constituent une base solide pour l'exploitation de complexes métalliques dérivant des ligands DOTA et NOTA. En prévision des analyses par spectrométrie de masse, qui permettront de vérifier que les aptamères ont été conjugués aux complexes employés, les masses exactes ont été calculées pour les aptamères et les complexes (Tableau 11 et Tableau 12).

Tableau 11: Formules et masses exactes du complexe Fe(III)NODAGA-maléimide

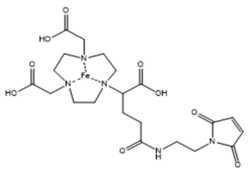
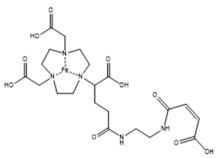
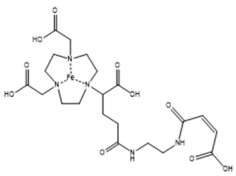
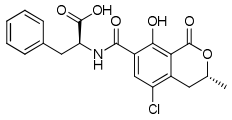
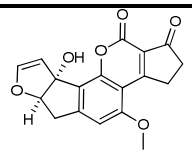
Complexe métallique et ligand	 Fe(III)NODAGA-maléimide	 Fe(III)NODAGA-maléimide (cycle ouvert)	 NODAGA-maléimide
Formules brutes et Masses Exactes (g/mol)	$C_{21}H_{31}FeN_5O_9$ M.E = 553,1455	$C_{21}H_{33}FeN_5O_{10}$ M.E = 571,1560	$C_{21}H_{31}N_5O_9$ M.E = 497,2122

Tableau 12: Formules et masses exactes des aptamères choisis et leurs cibles complémentaires

Cibles	**Aptamères**	**Modifications**	**Formules brutes Masses Exactes (g/mol)**
17β-estradiol (E2)	NH_2-Anti-E2-SH	NH_2 (5') (3') SH	$C_{352}H_{450}N_{138}O_{215}P_{36}S$ M.E = 11195,8796
	NH_2-Anti-E2-Fe(III)NODAGA	NH_2 (5') (3') Fe(III)NODAGA	$C_{373}H_{481}FeN_{143}O_{224}P_{36}S$ M.E = 11744,9949
	NH_2–Anti-E2 – NODAGA	NH_2 (5') (3') NODAGA	$C_{373}H_{481}N_{143}O_{224}P_{36}S$ M.E = 11693,0918
	SH- Anti-E2 -FAM	SH (5') (3') FAM	$C_{374}H_{462}N_{139}O_{221}P_{36}S_2$ M.E = 11613,9181
	Fe(III)NODAGA- Anti-E2 -FAM	Fe(III)NODAGA (5') (3') FAM	$C_{395}H_{493}N_{144}O_{230}P_{36}S_2$ M.E = 12111,1303

 Ochratoxine A (OTA)	NH_2-Anti-OTA-SH	NH_2 (5') (3') SH	$C_{363}H_{460}N_{151}O_{218}P_{37}S$ M.E = 11598,9563
	NH_2-Anti-OTA – Fe(III)NODAGA	NH_2 (5') (3') Fe(III)NODAGA	$C_{384}H_{491}FeN_{156}O_{227}P_{37}S$ M.E = 12152,1018
	NH_2-Anti-OTA-NODAGA	NH_2 (5') (3') NODAGA	$C_{384}H_{491}N_{156}O_{227}P_{37}S$ M.E = 12096,1685
	SH-Anti-OTA-FAM	SH (5') (3') FAM	$C_{385}H_{472}N_{152}O_{224}P_{37}S_2$ M.E = 12016,9949
	Fe(III)NODAGA-Anti-OTA-FAM	Fe(III)NODAGA (5') (3') FAM	$C_{406}H_{503}N_{157}O_{233}P_{37}S_2$ M.E = 12514,2070
 Aflatoxine M1 (AFM1)	NH_2-Anti-AFM1-SH	NH_2 (5') (3') SH	$C_{214}H_{281}N_{75}O_{131}P_{22}S$ M.E = 6710,1580
	NH_2-Anti-AFM1-Fe(III)NODAGA	NH_2 (5') (3') Fe(III)NODAGA	$C_{235}H_{312}FeN_{80}O_{140}P_{22}S$ M.E = 7263,3035

3.3) RÉSULTATS ET DISCUSSION APTACAPTEURS

Les recherches concernant le développement d'aptacapteurs et leur marquage par des complexes métalliques ont vu différentes expériences se réaliser parallèlement, à savoir : l'étude par LC-HRMS du marquage des complexes par interaction thiol-or, l'optimisation de la conception des aptacapteurs utilisant un marqueur plus commun et les vérifications d'hybridation en fluorescence par thermophorèse à micro-échelle.

3.3.1) MARQUAGE DES APTAMÈRES PAR LES COMPLEXES

Les couplages entre aptamères et Fe(III)NODAGA-maléimide ont été effectués suivant le protocole mis en place lors de précédents travaux réalisés au laboratoire. Les aptamères avec un groupement amine à l'extrémité 5' et un groupement thiol à l'extrémité 3' ont été linéarisés (par cycle de chauffage et de refroidissement) afin de favoriser la réaction de couplage. Cette dernière a été effectuée dans un tampon PBS 0,1 M à pH 7 en utilisant 11 nmol d'aptamère, ayant subi le traitement thermique habituel, avec 22 nmol (2 éq) de complexe métallique. Précisément : 10 µL d'aptamères solubilisés dans de l'eau ultra pure sont mélangés à 90 µL d'une solution de complexe métallique dans le PBS. La réaction a ensuite été conduite à 46°C durant une nuit (12 h maximum). Les couplages ont été suivis par analyse LC-HRMS ESI^-.

3.3.1.1) RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Les aptamères et le complexe comporte des fonctions phosphates ou carboxylates, ce qui nous a amené à privilégier une détection des masses en mode négatif.

Le premier composé analysé a été le complexe Fe(III)NODAGA-maléimide seul. Cette analyse avait pour but de vérifier la pureté du complexe pour son couplage futur à l'aptamère. Il était également nécessaire de vérifier l'intégrité du cycle du maléimide.

Trois pics de masse ressortent du chromatogramme (Figure 61) deux pics à faibles intensités à des temps de rétentions (Rt) de 2 min (m/z = **567,1260**) et 5 min (m/z = **540,1952**) et un pic à forte intensité vers 2,5 min (m/z = **595,1225**). L'analyse et le calcul théorique des masses exactes selon les formules brutes des composés nous permet d'attribuer chaque pic à sa molécule lui correspondant.

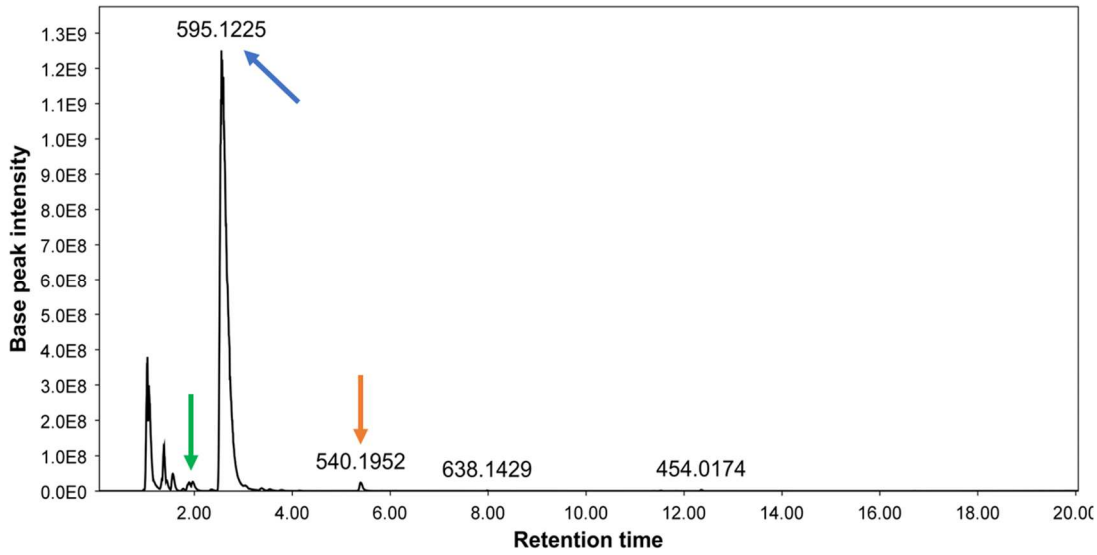


Figure 61: Chromatogramme obtenu pour Fe(III)NODAGA-maléimide

Le complexe Fe(III)NODAGA-maléimide avec hydrolyse du cycle se caractérise par le pic présentant un Rt de 2 min et un ion moléculaire de **567,1260** compatible avec la masse isotopique calculé pour $C_{21}H_{30}FeN_5O_{10}$ $[M-H]^-$ de **567,1274** (Figure 62). Les massifs isotopiques obtenus via le site envipat.eawag.ch confirment aussi cette conclusion.

Le pic majoritaire à un temps de 2,5 min représente un adduit du complexe de Fer attendu avec de l'acide formique. Sa masse isotopique de **595,1225** correspond à celle calculée pour $C_{21}H_{28}FeN_5O_9.CHO_2$ $[M+CHO_2-H]^-$ de **595,1213** (Figure 63).

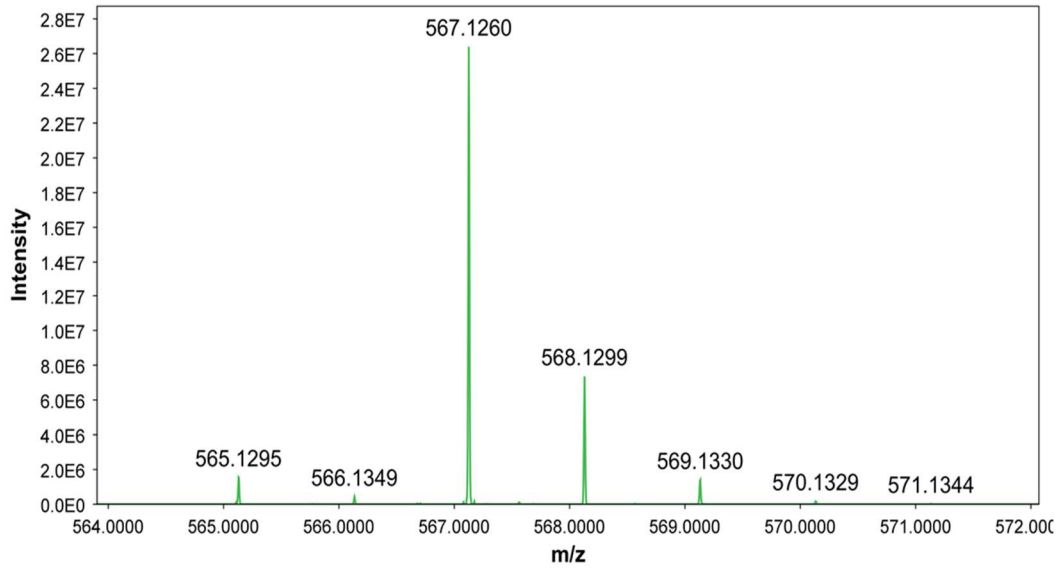


Figure 62: Spectre de masse ESI- du pic de masse 567 obtenu à Rt = 2 min

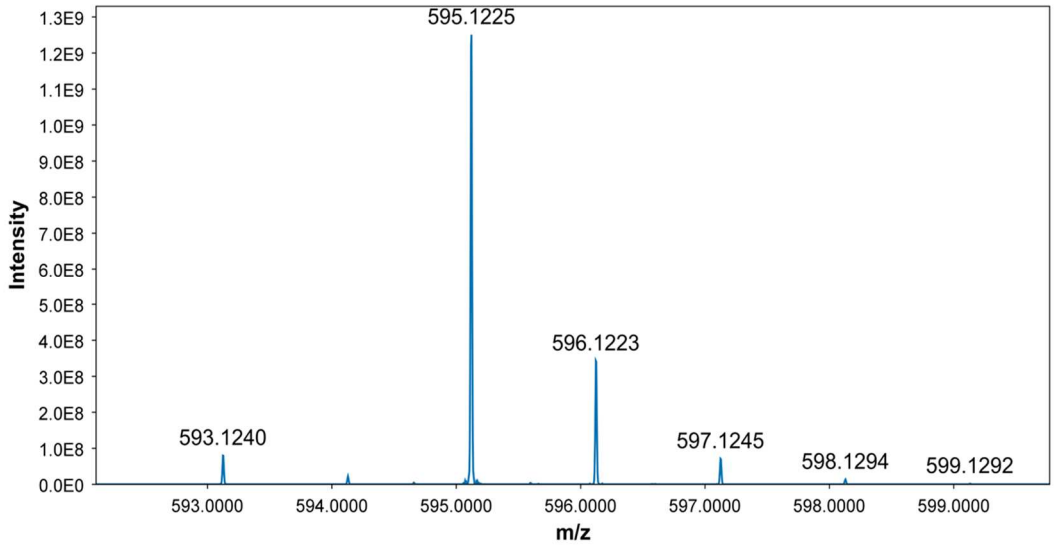


Figure 63: Spectre de masse ESI- du pic de masse 595 obtenu à Rt = 2,5 min

Le dernier pic, présentant un Rt de 5 min, comporte deux composés se caractérisant par deux ions moléculaires l'un à m/z = **482,1882** et l'autre à m/z = **540,1952** (Figure 64). L'ion moléculaire à **540,1963** correspond à un adduit d'acide formique avec des restes de ligand NODAGA-maléimide non complexé. Sa masse de **540,1947** calculée pour $C_{21}H_{29}N_5O_9.CHO_2$ $[M+CHO_2-H]^-$ est compatible avec celle obtenue par analyse m/z = **540,1952**. Toutefois pour l'ion moléculaire de m/z = **482,1882**, aucune correspondance n'a été trouvée. Il s'agit certainement d'un produit de dégradation du ligand avec un possible adduit, mais il est difficile de proposer une structure.

Ces analyses LC/MS nous ont permis de confirmer que la solution analysée comprend majoritairement le complexe Fe(III)NODAGA-maléimide, et que celui-ci pourra être utilisé pour les réactions de conjugaison avec les aptamères.

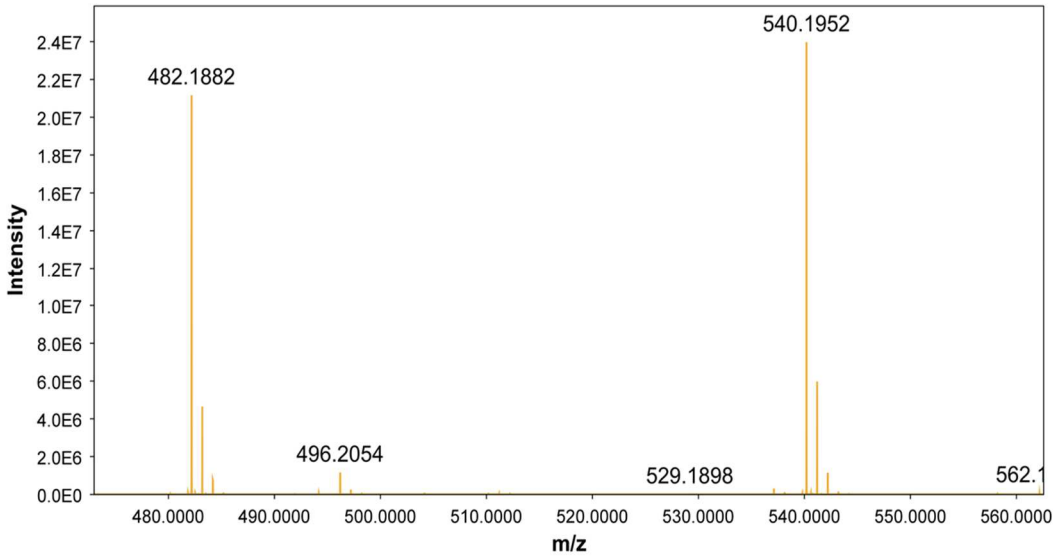


Figure 64: Spectre de masse ESI- du pic de masse 540 obtenu à Rt = 5 min

Les analyses suivantes se sont concentrées sur la mise en évidence par LC/MS du couplage entre le complexe métallique et les aptamères fonctionnalisés avec un thiol à l'extrémité 3'.
Dans tous les essais de couplage entre aptamère et Fe(III)NODAGA, nous avons mis en évidence un pic moléculaire à m/z = **567,1260** à un temps de rétention de 2 min qui correspond au complexe métallique présentant une hydrolyse du maléimide que nous avions mis en évidence lors de la précédente étude du complexe.

Pour le couplage réalisé entre l'aptamère NH_2-Anti-E2-SH (*A1*) et le complexe Fe(III)NODAGA, le chromatogramme (Figure 65) présente plusieurs pics dans des gammes de masse correspondant aux composés mis en réaction. En effet, en plus du pic correspondant au complexe, nous retrouvons un second pic important, à un Rt = 5,8 min, de masse m/z = **2257,1713**. Après analyse de ce dernier (Figure 66), plusieurs masses importantes apparaissent et semblent correspondre à des adduits d'acide formique de l'aptamère Anti-E2 seul selon différents états de charge :

- Une masse isotopique de **2257,1713** est compatible avec celle calculée à l'espèce chargée cinq fois : $C_{352}H_{450}N_{138}O_{215}P_{36}S.2CHO_2$ $[M_{NH_2\text{–Anti-E2–SH}} + 2CHO_2 - 5H]^-$ m/z = **2256,9737** ;
- Une masse isotopique de **1880,8039** est compatible avec celle calculée à l'espèce chargée six fois : $C_{352}H_{450}N_{138}O_{215}P_{36}S.2CHO_2$ $[M_{NH_2\text{–Anti-E2–SH}} + 2CHO_2 - 6H]^-$ m/z = **1880,8114** ;
- Une masse isotopique de **1612,2611** est compatible avec celle calculée à l'espèce chargée sept fois : $C_{352}H_{450}N_{138}O_{215}P_{36}S.2CHO_2$ $[M_{NH_2\text{–Anti-E2–SH}} + 2CHO_2 - 7H]^-$ m/z = **1612,1241**.

L'analyse approfondie du chromatogramme et un essai d'extraction des ions parents ne permet pas de mettre en évidence le produit de couplage entre l'aptamère Anti-E2 et Fe(III)NODAGA.

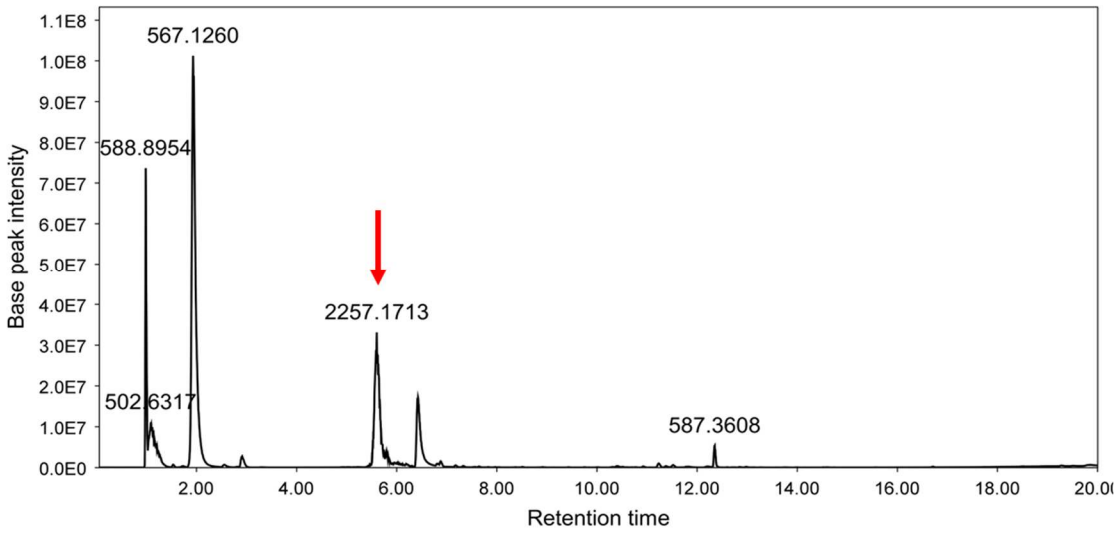


Figure 65: Chromatogramme obtenu pour l'échantillon NH_2-Anti-E2-SH + Complexe

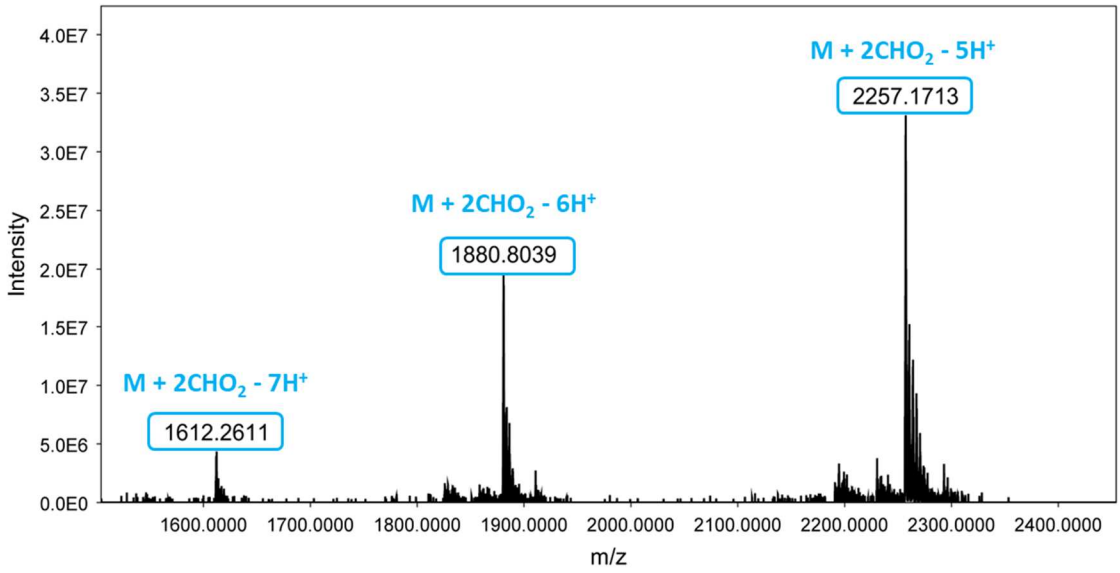


Figure 66: Spectres de masse ESI- du pic de masse 2257 obtenu à Rt = 5,8 min. En bleu, les espèces chargées de l'aptamère NH_2-Anti-E2-SH non conjugué

Sur le chromatogramme (Figure 67) de l'échantillon du couplage de entre NH_2-Anti-OTA-SH (*O1*) et Fe(III)NODAGA, un premier pic du complexe avec cycle du maléimide hydrolysé est retrouvé à Rt = 2 min pour m/z = **567,1254**. Un second pic à Rt = 5,8 min comprend trois ions moléculaires correspondant à des ions moléculaires de charges différents qui correspondent à l'entité chimique attendu après couplage entre l'aptamère et le complexe (Figure 68) :

- Un ion m/z = **2429,8146** correspondant à la masse isotopique calculée d'une espèce chargée cinq fois : $C_{363}H_{460}N_{151}O_{218}P_{37}S$ $[M_{NH2–Anti\text{-}OTA–Fe(III)NODAGA} - 5H]^-$ = **2429,4126** ;

- Un ion m/z = **2024,8467** correspondant à la masse isotopique calculée d'une espèce chargée six fois : $C_{363}H_{460}N_{151}O_{218}P_{37}S$ [M $_{NH2–Anti\text{-}OTA–Fe(III)NODAGA}$ - 6H]$^-$ = **2024,3453** ;
- Un ion m/z = **1734,9992** correspondant à la masse isotopique calculée d'une espèce chargée sept fois : $C_{363}H_{460}N_{151}O_{218}P_{37}S$ [M $_{NH2–Anti\text{-}OTA–Fe(III)NODAGA}$ - 7H]$^-$ = **1735,0067**.

L'analyse de ce milieu réactionnel permet de mettre en évidence que le couplage entre les deux entités a été réalisé, le complexe NH_2-Anti-OTA-Fe(III)NODAGA (*O2*) est bien obtenu.

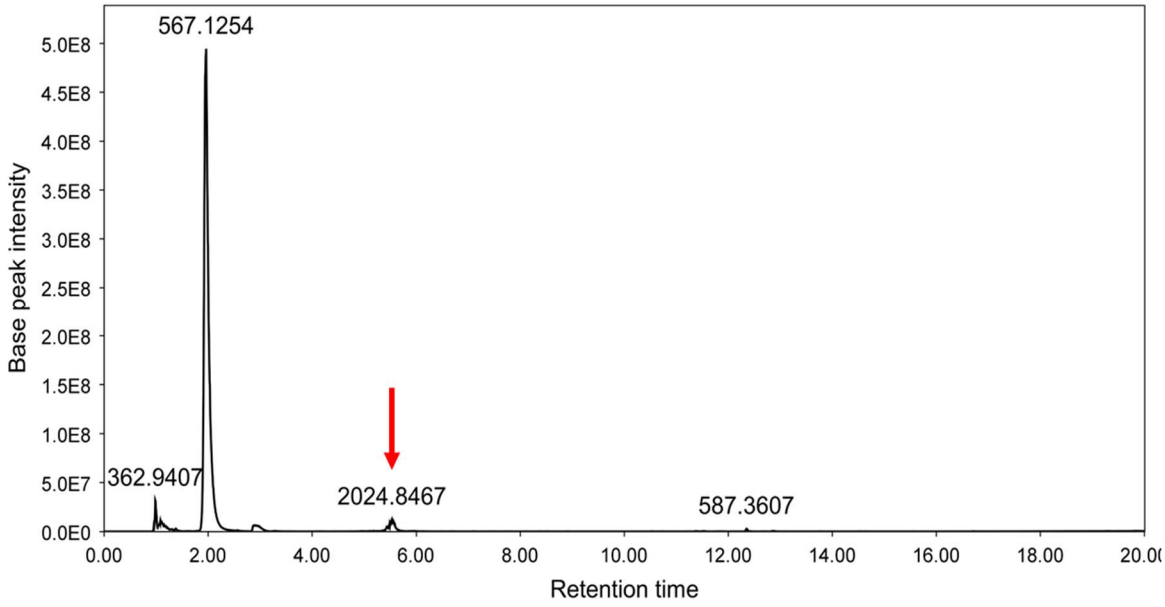


Figure 67: Chromatogramme obtenu pour l'échantillon NH_2-Anti-OTA-SH + Complexe

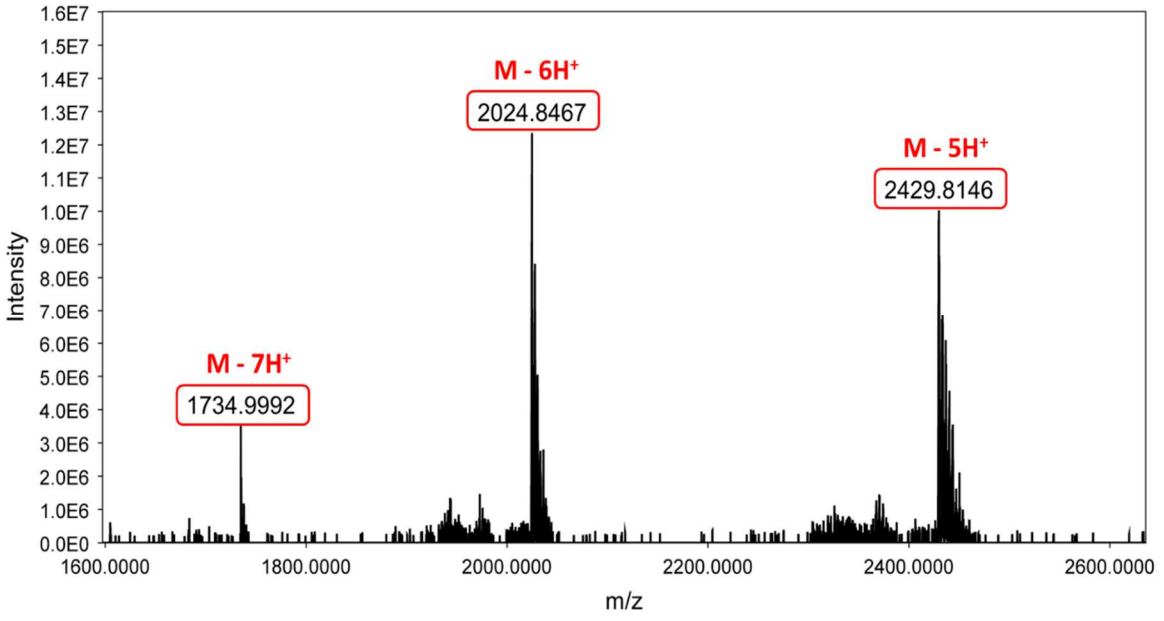


Figure 68: Spectres de masse ESI- du pic de masse 2024 obtenu à Rt = 5,8 min. En rouge, les espèces chargées de l'aptamère NH_2-Anti-OTA-SH conjugué au complexe

Concernant le chromatogramme de l'échantillon NH_2-Anti-AFM1-SH (*M1*) + Fe(III)NODAGA (Figure 69), de façon surprenante, rien ne permet d'identifier des pics de masse pouvant correspondre aux entités chimiques engagées en réaction. Seule une multitude de pics est observée sur le chromatogramme : des masses entre 300 et 1700 sont présentes et difficiles d'analyse. L'exploitation de ces données n'a donc pas été poursuivie, de même pour l'utilisation de l'aptamère Anti-AFM1.

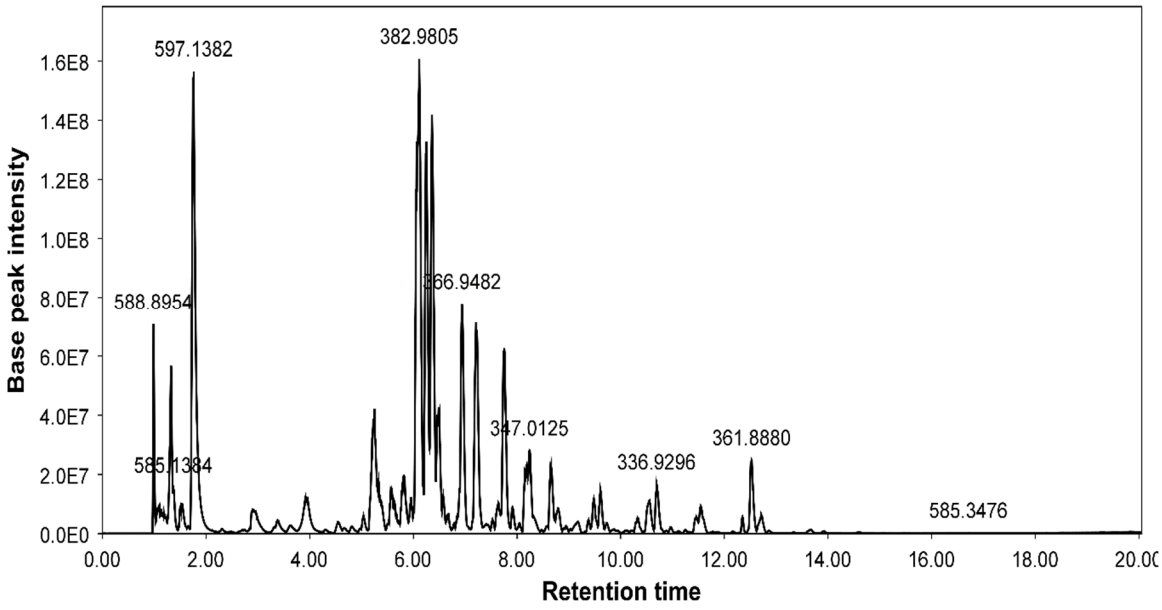


Figure 69: Chromatogramme obtenu pour l'échantillon Anti-AFM1+ Complexe

Nous avons observé avec ces premières analyses que la réaction de couplage entre aptamère et complexe n'était pas systématiquement observée, puisqu'un seul essai à conduit au composé souhaité. Nous avons aussi mis en évidence la présence de complexe dont le cycle maléimide avait subi une réaction d'hydrolyse ce qui ne permet plus à la réaction de couplage de se faire. Afin de diminuer l'importance de cette réaction secondaire et d'améliorer les quantités de d'aptamères conjugués obtenues, nous avons donc remanié le protocole de couplage en modifiant certaines conditions de réaction comme le temps de couplage et les concentrations de chaque élément.

3.3.1.2) OPTIMISATION DU COUPLAGE

Nous avons optimisé la réaction de couplage en réalisant les changements suivants :

- Réduction du temps de couplage de 12 à 2 h, afin de limiter les réactions secondaires et en particulier l'hydrolyse du maléimide. Cela permet également d'être plus proche des

conditions expérimentales observées dans la littérature pour ce type de réaction chimie-click ;

- Purge des solutions utilisées à l'azote, et ajout de TCEP en quantité équimolaire à l'aptamère pour réduire les risques d'oxydation de la fonction thiol ;
- Augmentation de la température de couplage et des concentrations des solutions d'aptamères et complexes pour agir sur la cinétique de la réaction.

Au total, trois séries d'expérimentations prenant en compte différentes optimisations ont eu lieu. Dans l'optique de réaliser des analyses complémentaires d'interactions entre biomolécules par fluorescence, certains des couplages ont été effectués avec les mêmes aptamères que précédemment, mais marqués à leurs extrémités avec un groupement FAM (fluorescéine).

- **Première série d'expérimentations**

Dans la première série d'expérimentations, le couplage avec le complexe métallique a été testé avec deux aptamères : l'aptamère Anti-E2 possédant une modification thiol en 5' et une modification FAM en 3' (SH-Anti-E2-FAM) (*A3*), et l'aptamère Anti-OTA ayant la même fonctionnalisation (SH-Anti-OTA-FAM) (*O3*).

Les données du chromatogramme (Figure 70) pour le couplage avec l'aptamère Anti-E2 montrent de nombreux pics (allant de 300 à 2500 m/z). Les pics aux temps de rétention 2 et 2,5 min concordent toujours avec le complexe métallique de Fer, avec et sans hydrolyse du cycle maléimide. Le spectre de masse du pic à Rt = 5,8 min (Figure 71) indique trois masses dominantes qui coïncident à celles d'ions moléculaires de l'aptamère SH-Anti-E2-FAM (*A3*), non couplé, avec des adduits d'acide formique :

- Pour une espèce chargée cinq fois, la masse est calculée pour $C_{385}H_{472}N_{152}O_{224}P_{37}S_2.2CHO_2$ $[M_{SH–Anti\text{-}E2–FAM} + 2CHO_2 – 5H]^-$ = **2340,5814**. Résultat compatible avec la masse m/z = **2339,7856** trouvée en analyse ;
- Pour une espèce chargée six fois, la masse est calculée pour $C_{385}H_{472}N_{152}O_{224}P_{37}S_2.2CHO_2$ $[M_{SH–Anti\text{-}E2–FAM} + 2CHO_2 – 6H]^-$ = **1950,4845**. Cela concorde avec la masse m/z = **1949,8315** trouvée en analyse ;
- Pour une espèce chargée sept fois, la masse est calculée pour $C_{385}H_{472}N_{152}O_{224}P_{37}S_2.2CHO_2$ $[M_{SH–Anti\text{-}E2–FAM} + 2CHO_2 – 7H]^-$ = **1671,9876**. Cela concorde avec la masse m/z = **1670,7061** trouvée en analyse.

Nous avons recherché les masses correspondant à celle de l'aptamère SH-Anti-E2-FAM conjugué au complexe Fe(III)NODAGA (*A4*), mais aucune masse résultant du couplage attendu n'a été trouvée, nous amenant à conclure que couplage ne s'est pas effectué.

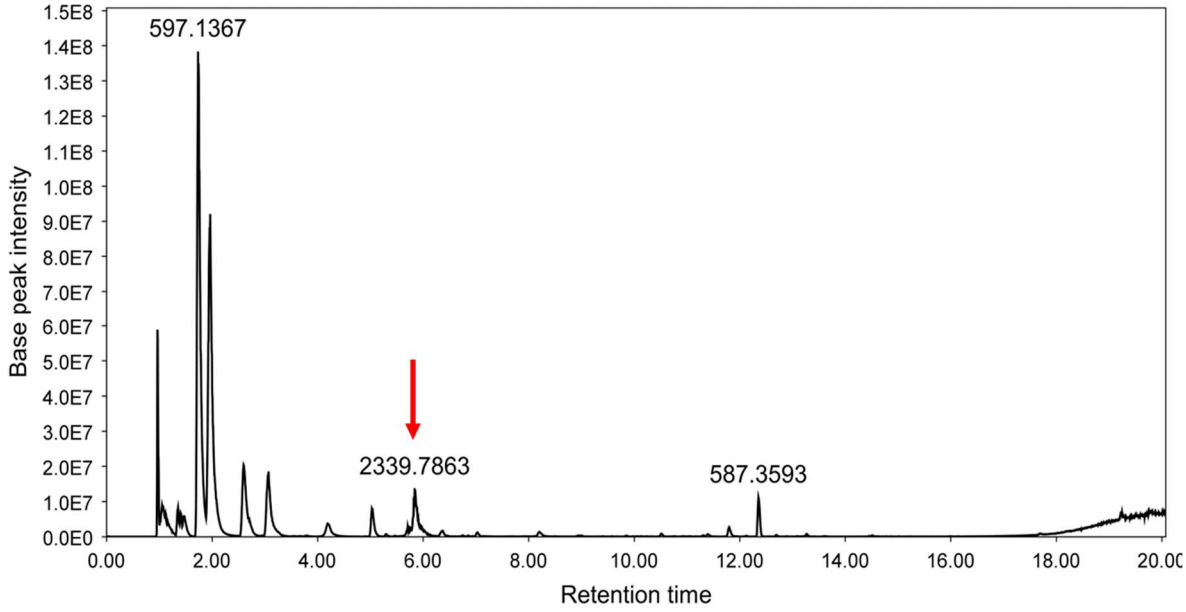


Figure 70: Chromatogramme obtenu pour l'échantillon SH-Anti-E2-FAM + Complexe

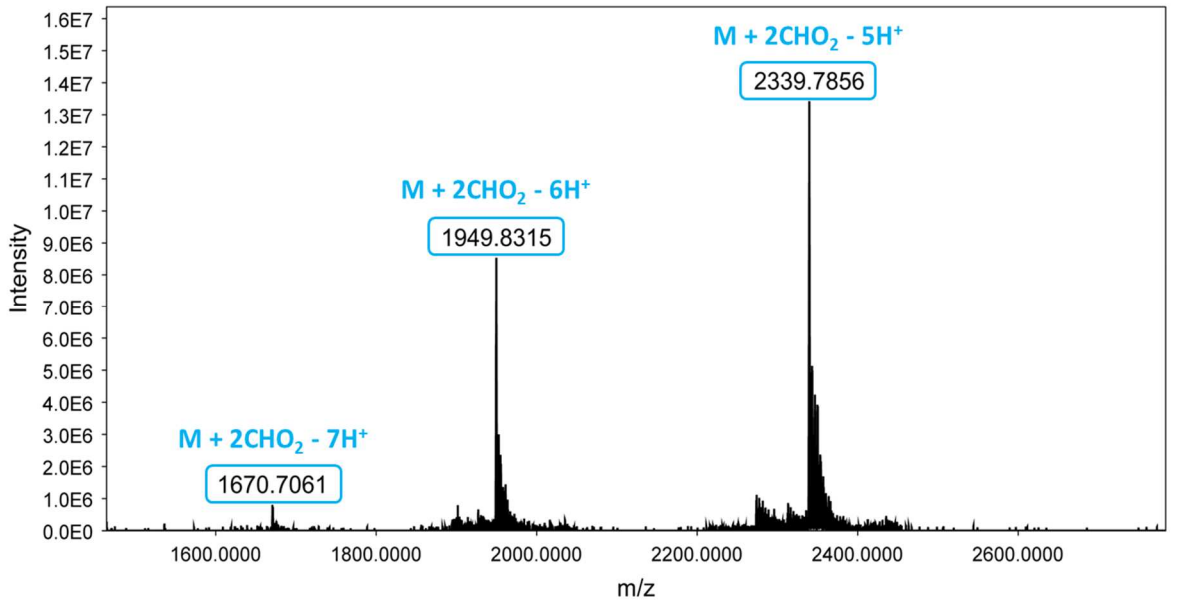


Figure 71: Spectre de masse ESI- du pic de masse 2339 obtenu à Rt = 5,8 min. En bleu, les espèces chargées de l'aptamère SH-Anti-E2-FAM non conjugué

Les résultats pour le couplage de l'aptamère SH-Anti-OTA-FAM sont similaires (Figure 72 et Figure 73), le spectre de masse du pic à Rt = 5,8 min dévoile la présence de trois massifs isotopiques proches de la masse de l'aptamère non couplé (*O3*), avec adduit d'acide formique :

- Une masse m/z = **2420,8145** correspondant à la masse isotopique calculée d'une espèce chargée cinq fois : $C_{385}H_{472}N_{152}O_{224}P_{37}S_2.2CHO_2$ $[M_{SH–Anti\text{-}OTA–FAM} + 2CHO_2 - 5H]^-$ = **2421,1968** ;
- Une masse m/z = **2016,8429** correspondant à la masse isotopique calculée d'une espèce chargée six fois : $C_{385}H_{472}N_{152}O_{224}P_{37}S_2.2CHO_2$ $[M_{SH–Anti\text{-}OTA–FAM} + 2CHO_2 - 6H]^-$ = **2017,6640** ;
- Une masse m/z = **1729,0108** correspondant à la masse isotopique calculée d'une espèce chargée sept fois : $C_{385}H_{472}N_{152}O_{224}P_{37}S_2.2CHO_2$ $[M_{SH–Anti\text{-}OTA–FAM} + 2CHO_2 - 7H]^-$ = **1729,4263**.

Nous notons cependant une faible présence de l'aptamère couplé au complexe de fer (*O4*) avec une masse m/z = **2097,0126** pouvant correspondre à la masse isotopique calculée d'une espèce chargée six fois : $C_{406}H_{503}N_{157}O_{233}P_{37}S_2.2CHO_2$ $[M_{Fe(III)NODAGA–Anti\text{-}OTA–FAM} + 2CHO_2 - 6H]^-$ = **2100,7003**.

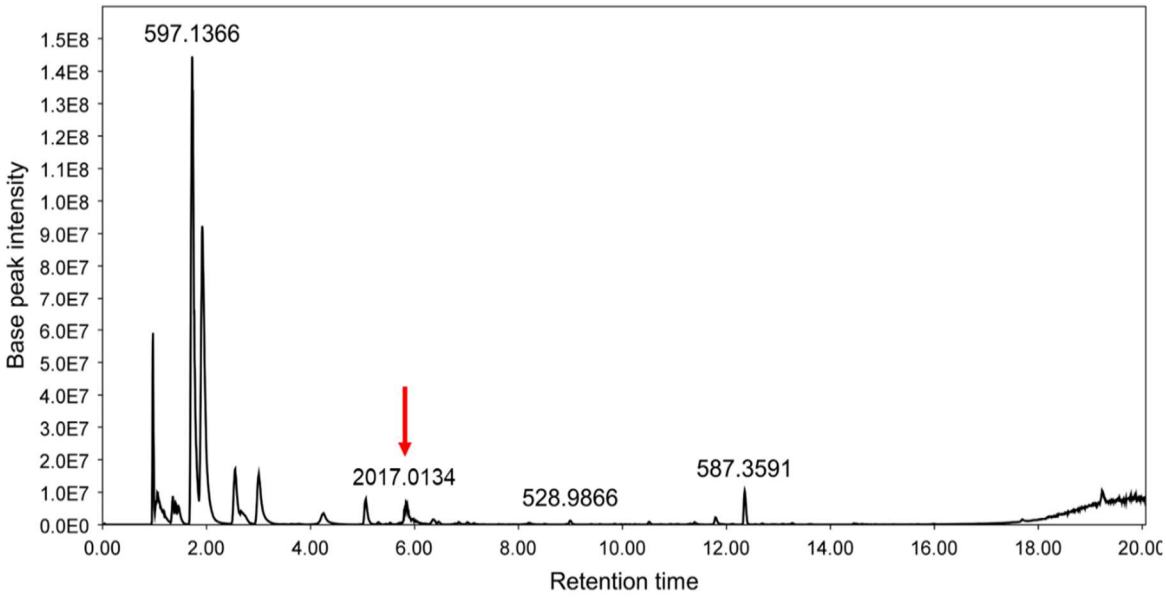


Figure 72: Chromatogramme obtenu pour l'échantillon SH-Anti-OTA-FAM + Complexe

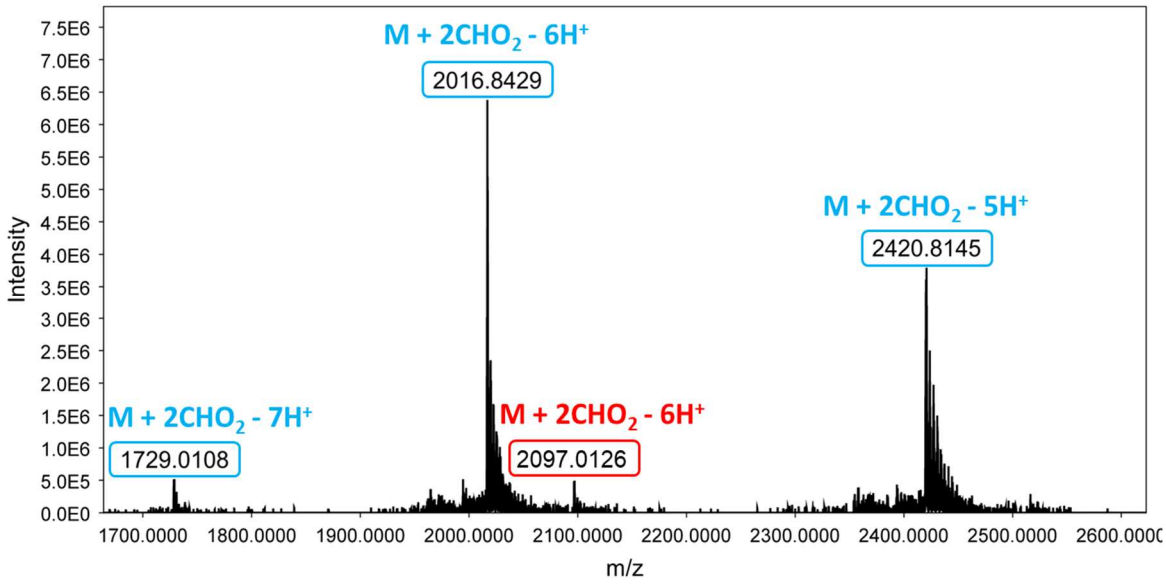


Figure 73: Spectre de masse ESI- du pic de masse 2017 obtenu à Rt = 5,8 min. En bleu, les espèces chargées de l'aptamère SH-Anti-OTA-FAM non conjugué et en rouge, les espèces chargées de l'aptamère SH-Anti-OTA-FAM conjugué au complexe Fe(III)NODAGA

- **Deuxième série d'expérimentations**

Pour la seconde série d'expérimentations, le couplage a été réalisé en reprenant les mêmes aptamères (Anti-E2 et Anti-OTA) (*A1 et O1*), mais en utilisant cette fois le ligand NODAGA-maléimide. Cette différenciation a été faite pour observer si le couplage de l'aptamère au ligand seul fonctionne mieux que celui avec le complexe métallique de fer.

Pour l'échantillon d'aptamère NH_2-Anti-E2-SH (*A1*) + NODAGA (Figure 74) de nombreux pics sont présents aux temps de rétention correspondants aux aptamères. Vers Rt = 5,5 min, nous retrouvons un pic à une masse de **2239,1576**. Dans le spectre de masse associé à ce pic, l'aptamère non conjugué est présent à forte intensité sous la forme de trois massifs isotopiques :

- Un massif de masse principale **2239,1576,** semblable à la masse calculée d'une espèce chargée cinq fois : $C_{352}H_{450}N_{138}O_{215}P_{36}S$ $[M_{NH2-\ Anti\text{-}E2\text{-}SH} - 5H]^-$ = **2238,9745** ;
- Un massif de masse principale **1865,9713,** semblable à la masse calculée d'une espèce chargée six fois : $C_{352}H_{450}N_{138}O_{215}P_{36}S$ $[M_{NH2-\ Anti\text{-}E2\text{-}SH} - 6H]^-$ = **1865,8121** ;
- Un massif de masse principale **1599,1209**, semblable à la masse calculée d'une espèce chargée sept fois : $C_{352}H_{450}N_{138}O_{215}P_{36}S$ $[M_{NH2-\ Anti\text{-}E2\text{-}SH} - 7H]^-$ = **1599,4114**.

La présence de l'aptamère conjugué au ligand NODAGA (*A5*) est notée à faible intensité (Figure 75). La masse de ce pic m/z = **2338,6057** coïncide avec celle calculée pour l'aptamère chargé cinq fois : $C_{373}H_{481}N_{143}O_{224}P_{36}S$ $[M_{NH2\text{-}Anti\text{-}E2\text{-}NODAGA} - 5H]^-$ = **2338,4169**.

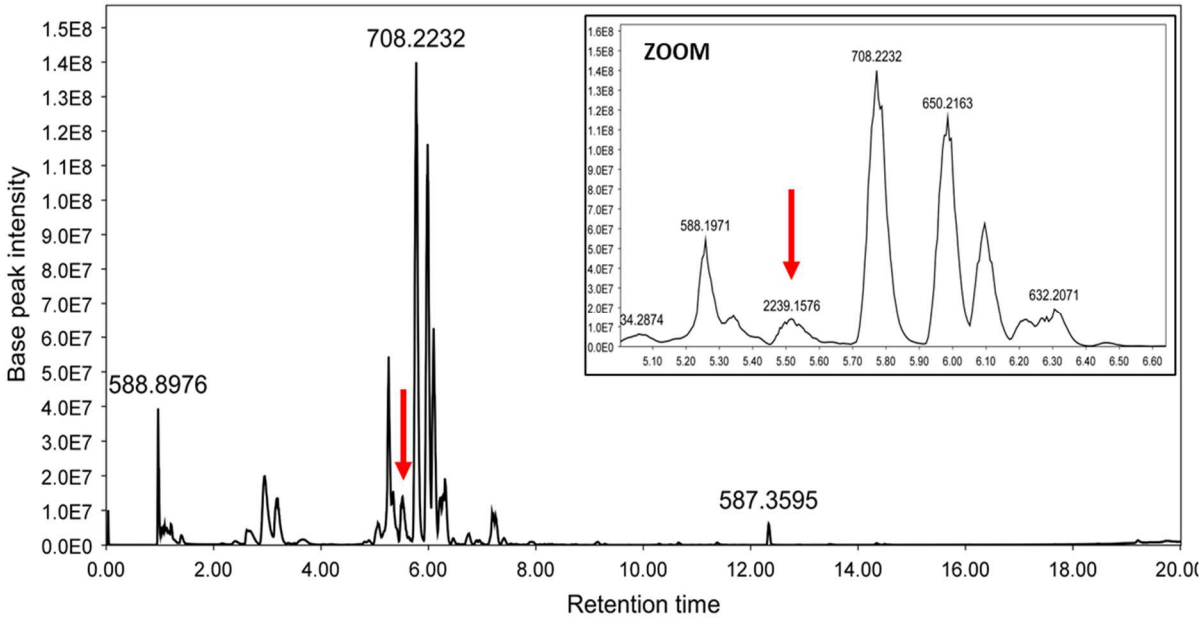


Figure 74: Chromatogramme obtenu pour l'échantillon NH_2-Anti-E2-SH + NODAGA

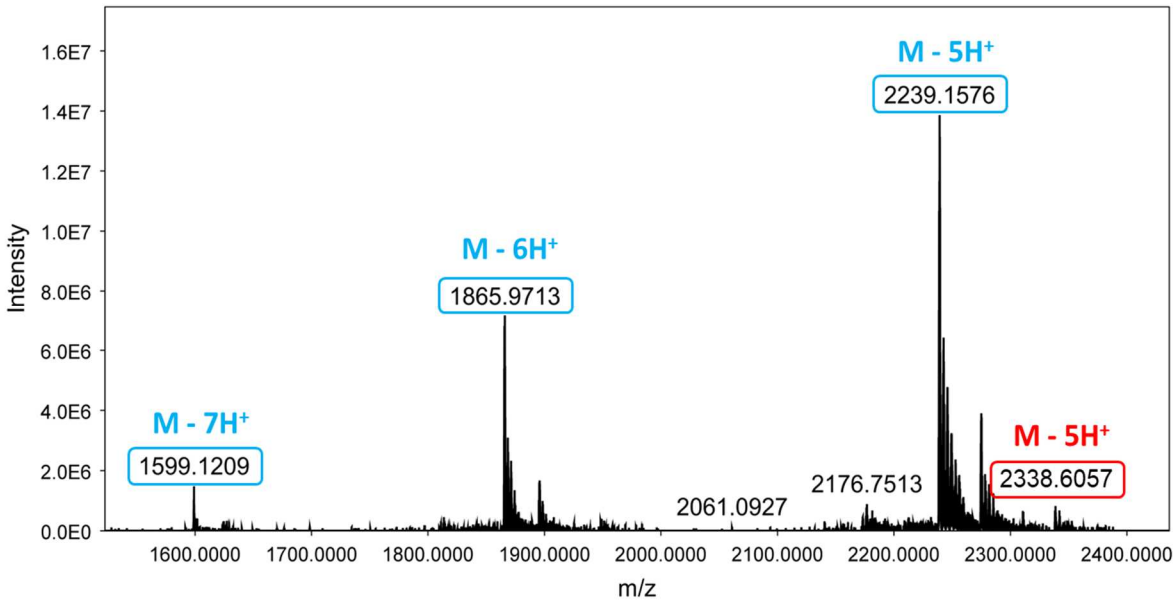


Figure 75 : Spectre de masse ESI- du pic de masse 2239 obtenu à Rt = 5,5 min. En bleu, les espèces chargées de l'aptamère NH_2-Anti-E2-SH non conjugué et en rouge, les espèces chargées de l'aptamère NH_2-Anti-E2-SH conjugué au ligand NODAGA

L'échantillon suivant NH_2-Anti-OTA-SH (*O1*) + NODAGA montre des résultats similaires. Le pic majoritaire à Rt = 5,6 min de masse **2334,1890** correspond à l'aptamère non conjugué (Figure 76). Dans le spectre de masse (Figure 77) du pic, la présence de massifs d'ions isotopiques de masse m/z = **1666,9895**, **1945,0039** et **2334,1892** valide la présence de l'aptamère seul (*O1*) mais sous forme chargée et avec adduit d'acide formique :

- Espèce chargée cinq fois : $C_{363}H_{460}N_{151}O_{218}P_{37}S.2CHO_2$ $[M_{NH_2\text{–Anti-OTA–SH}} + 2CHO_2 - 5H]^-$ = **2337,5890** ;
- Espèce chargée six fois : $C_{363}H_{460}N_{151}O_{218}P_{37}S.2CHO_2$ $[M_{NH_2\text{–Anti-OTA–SH}} + 2CHO_2 - 6H]^-$ = **1947,9909** ;
- Espèce chargée sept fois : $C_{363}H_{460}N_{151}O_{218}P_{37}S.2CHO_2$ $[M_{NH_2\text{–Anti-OTA–SH}} + 2CHO_2 - 7H]^-$ = **1669,8502**.

L'aptamère conjugué au ligand (*O5*) est aussi faiblement distingué en plus faible proportion avec une masse isotopique de **2027,6910**, masse qui semble compatible avec celle du couple aptamère-ligand chargé six fois avec adduit : $C_{384}H_{491}N_{156}O_{227}P_{37}S.2CHO_2$ $[M_{NH_2\text{–Anti-OTA–NODAGA}} + 2CHO_2 - 6H]^-$ = **2031,0273**.

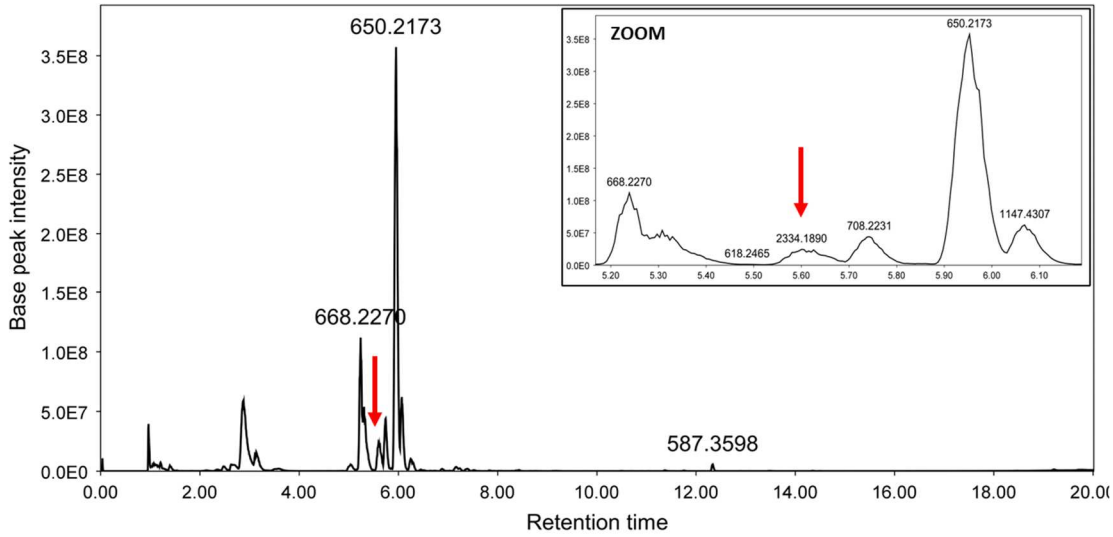


Figure 76: Chromatogramme obtenu pour l'échantillon NH_2-Anti-OTA-SH + NODAGA

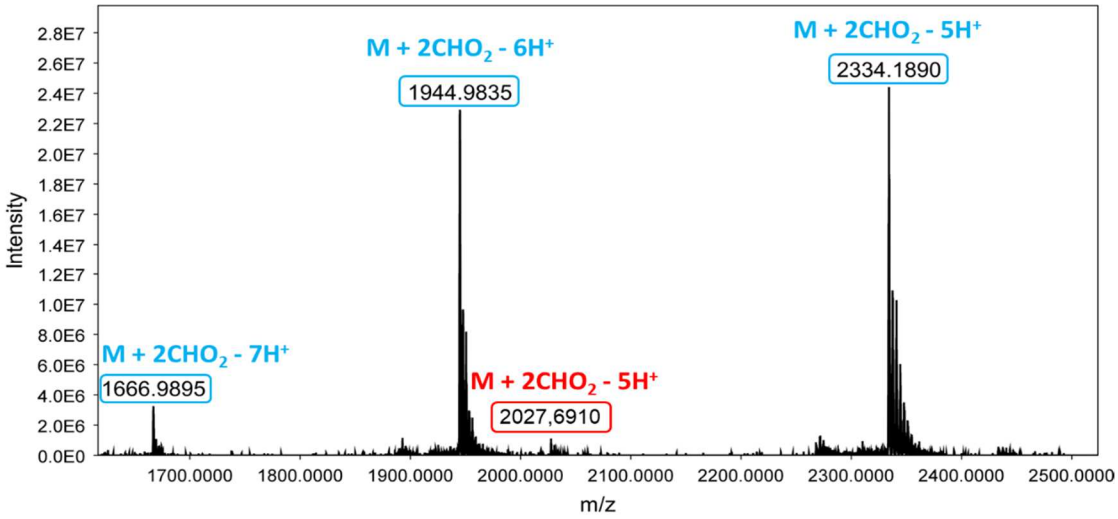


Figure 77 : Spectre de masse ESI-et isotopique du pic de masse 2334 obtenu à Rt = 5,6 min. En bleu, les espèces chargées de l'aptamère NH_2-Anti-OTA-SH non conjugué et en rouge, les espèces chargées de l'aptamère NH_2-Anti-OTA-SH conjugué au ligand NODAGA

Sur chaque chromatogramme, nous avons observé de nombreux pics à des masses comprises entre 300-700 qui pourraient concorder avec des couplages entre le TCEP et le NODAGA-maléimide. Le TCEP a été enlevé par la suite, pour éviter ce genre de liaisons non désirées.

- **Dernière série d'expérimentations**

Dans la dernière série d'expérimentations, le couplage a été réalisé entre le NODAGA-maléimide et l'aptamère Anti-OTA (*O1*). Pour ce couplage le TCEP a été retiré, la température de couplage a été montée vers 80°C et la durée de la réaction a été portée à 1h30. Les concentrations des solutions en aptamères et ligands ont été augmentés : 25 µL de chaque solution de composé à 1 mM ont été mélangés.

Le chromatogramme de ce nouveau couplage (Figure 78) nous montre des traces du ligand non couplé et de sa version avec le cycle maléimide ouvert (vers Rt = 2,7 et 3,8 min respectivement). Cependant, à la différence des mesures antérieures, un pic de forte intensité est observé à 5,5 min d'une masse de **2015,8477**, il correspond aux masses associées à l'aptamère Anti-OTA conjugué au ligand NODAGA (*O5*) (Figure 79) :

- Une masse m/z = **2419,2217** correspondant à la masse calculée pour une espèce chargée cinq fois : $C_{384}H_{491}N_{156}O_{227}P_{37}S$ $[M_{NH2–Anti\text{-}OTA–NODAGA} – 5H]^-$ = **2419,0322**.
- Une masse m/z = **2015,8477** correspondant à la masse calculée pour une espèce chargée six fois : $C_{384}H_{491}N_{156}O_{227}P_{37}S$ $[M_{NH2–Anti\text{-}OTA–NODAGA} – 6H]^-$ = **2015,8602** ;
- Une masse m/z = **1727,5917** correspondant à la masse calculée pour une espèce chargée sept fois : $C_{384}H_{491}N_{156}O_{227}P_{37}S$ $[M_{NH2–Anti\text{-}OTA–NODAGA} – 7H]^-$ = **1727,8802** ;

Contrairement aux précédents tests, le couplage aptamère-ligand a bien abouti et le produit de couplage semble être majoritaire. Les autres masses importantes sur le spectre MS (**2319,7764** et **1932,9897**) concordent à l'aptamère Anti-OTA non couplé (*O1*) sous forme chargée cinq et six fois respectivement (sans adduit).

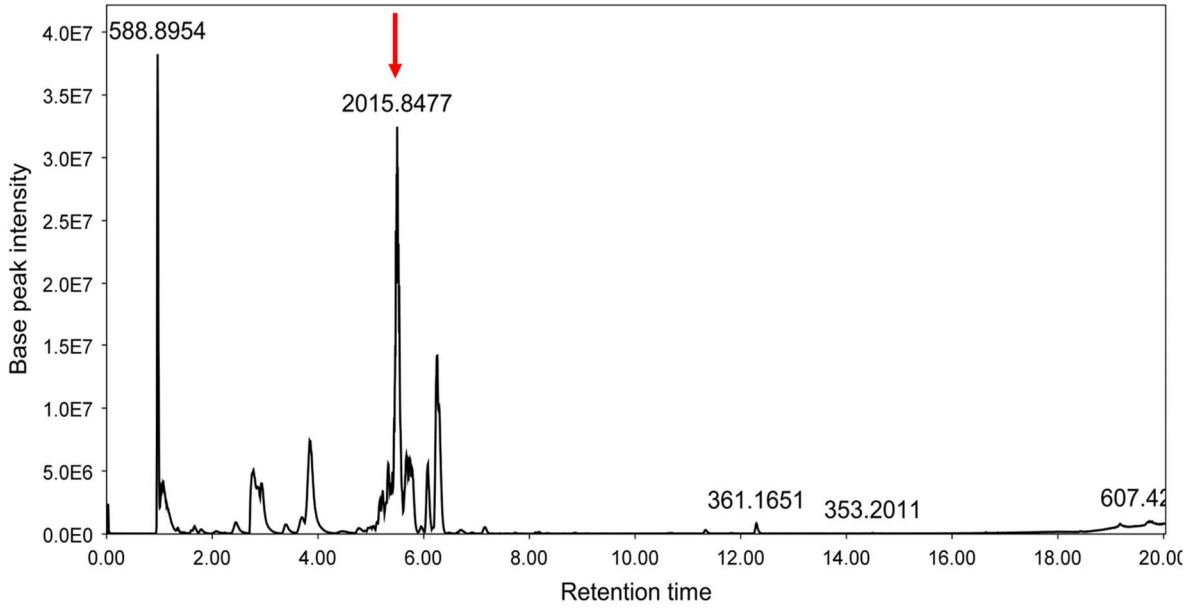


Figure 78: Chromatogramme obtenu pour le couplage NH_2-Anti-OTA-SH + NODAGA à 1 mM et 80°C

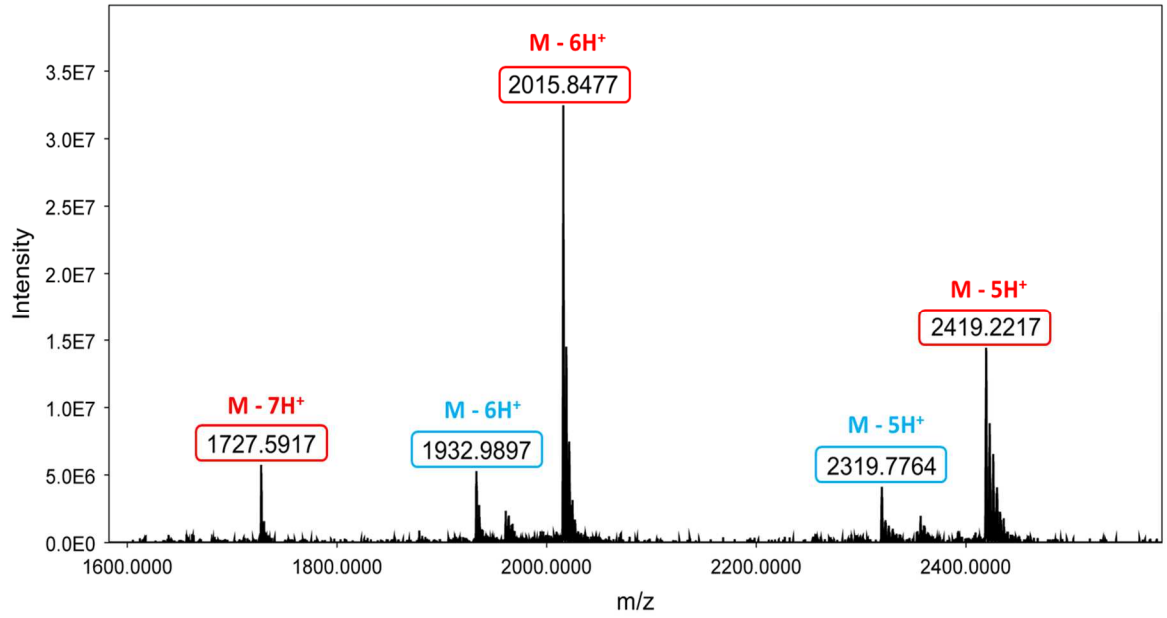


Figure 79 : Spectre de masse ESI- du pic de masse 2015 obtenu à Rt = 5,5 min. En bleu, les espèces chargées de l'aptamère NH_2-Anti-OTA-SH non conjugué et en rouge, les espèces chargées de l'aptamère NH_2-Anti-OTA-SH conjugué au ligand NODAGA

Le couplage aptamère-ligand semble mieux fonctionner à fortes concentrations (solution à 1 mM d'aptamères + solution à 1 mM de ligand). L'étude du chromatogramme et du spectre de masse nous montre bien la présence de l'aptamère couplé au ligand dans une proportion trois fois supérieure à celle de l'aptamère non couplé. D'autres tests de couplages similaires ont eu lieu parallèlement, avec l'utilisation de solutions à plus faibles concentrations et à température élevée. Les résultats étaient au final similaires à ceux des deux premières séries d'expérimentation, avec un pic de l'aptamère couplé au complexe moins important ou non existant. Nous avons noté, par contre, la présence récurrente de plusieurs pics de masses

comprises entre 300 et 900. Ils pourraient correspondre à des coupures au niveau du ligand NODAGA avec différents adduits.

3.3.2) DÉVELOPPEMENT DES APTACAPTEURS

Parallèlement aux expériences de couplages, la conception des aptacapteurs a débuté avec comme méthode de détection des mesures en voltampérométrie à ondes carrées (SWV). Inventée par *Ramaley et Krause* [215] puis largement développée par la suite, la SWV est la mesure d'un courant selon une variation de potentiel entre deux points, qui subit une série d'impulsions directes et inverses [216]. Les mesures sont prises à deux endroits : à la fin de l'impulsion de potentiel directe, et à la fin de l'impulsion de potentiel inverse. La différence de ces deux valeurs est tracée en fonction du courant et de la fréquence, pour obtenir le voltampérogramme (Figure 80). La SWV est une méthode très sensible, permettant des mesures ayant des limites de détection comparables à celles des techniques chromatographiques. Elle est aussi plus rapide que les autres techniques de voltampérométrie (une mesure SWV est souvent enregistrée en quelques secondes). Les variables régissant la SWV incluent l'amplitude d'impulsion, la fréquence et l'incrément d'escalier ; variables gérant la netteté et définition des pics du voltampérogramme.

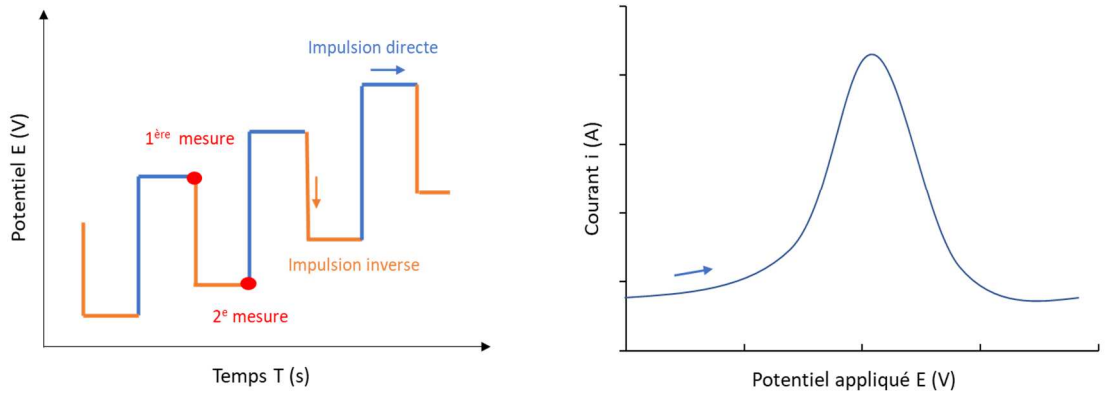


Figure 80: Schéma des variations de potentiel appliqués en SWV et le voltampérogramme caractéristique

Les données SWV que nous sommes censés obtenir des capteurs développés sont l'affichage de différents changements d'intensité des signaux électrochimiques, mesurés avant et après l'ajout des cibles étudiées. De par l'intensité du signal de départ ainsi que les changements observés, il est alors possible d'en déduire le type de système auquel correspond le biocapteur réalisé (Figure 81).

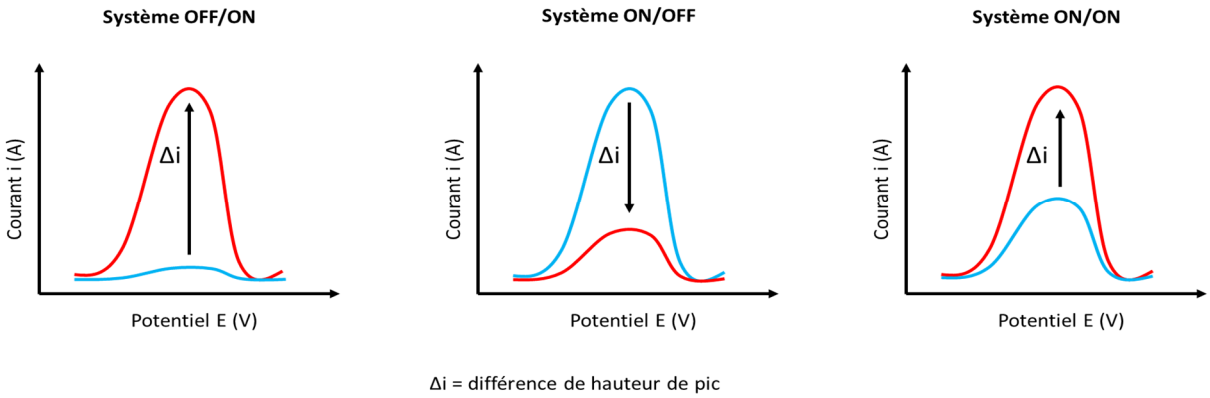


Figure 81: Représentation schématique des types de systèmes de signaux possibles. Courbe bleue = signal des aptamères marqués immobilisés, courbe rouge = signal en présence de la cible

Trois types de systèmes sont généralement considérés :

- Un système OFF/ON où l'on démarre sans un signal, puis lors de l'ajout de la cible, le marqueur vient se rapprocher de la surface de l'électrode. Le signal augmente alors selon la concentration de la cible incubée ;
- Un système ON/OFF où l'on démarre avec un signal, puis lors de l'ajout de la cible, le marqueur vient s'éloigner de la surface de l'électrode. Le signal diminue donc et change selon la concentration de la cible incubée ;
- Un système ON/ON qui n'est pas le plus commun, où l'on démarre avec un signal, puis lors de l'ajout de la cible, le marqueur vient un peu plus se rapprocher de la surface de l'électrode. Le signal augmente alors selon la concentration de la cible incubée.

C'est en mesurant les différences de hauteurs de pics Δi (calculs de moyennes et écart-types) en présence ou non de la cible, que nous avons pu analyser le fonctionnement du capteur avec l'aptamère employé. Ces mesures de SWV ont été effectuées en triplicats avec deux groupes de trois SPCEs commerciales DROPSENS : un groupe Essai où la cible préparée (estradiol / OTA / AFM1) dans sa solution tampon est incubée sur les électrodes, et un groupe Témoin où l'incubation dans la solution tampon se fait en absence de cible. Pour le groupe Essai, de nettes variations d'intensité sont attendues, contrairement au groupe Témoin où les variations devraient être minimes (Figure 82).

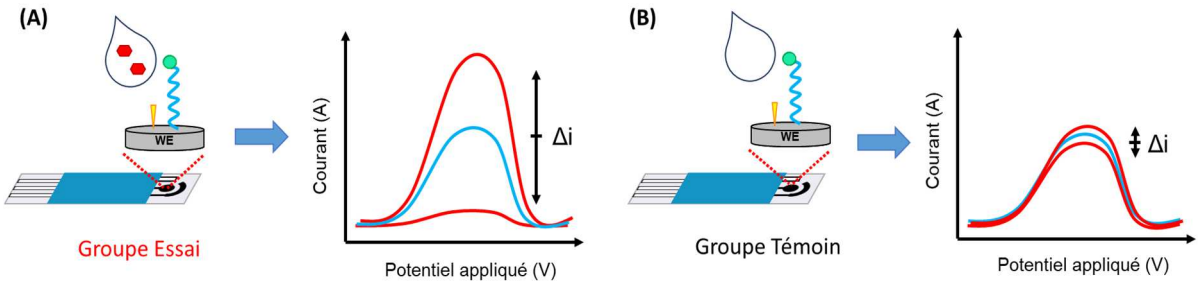


*Figure 82: Résultats attendus pour le groupe Essai **(A)** et le groupe Témoin **(B)***

3.3.2.1) APTAMÈRES ANTI-OTA MARQUÉS AU Fe(III)NODAGA

Les tentatives initiales de conception d'aptacapteurs avec les premiers échantillons d'aptamère-complexe ont été réalisées en parallèle des séries d'expérimentation de couplage. L'échantillon employé provient de la première série d'expérimentation, il s'agit du tout premier couplage ayant fonctionné : le complexe Fe(III)NODAGA-maléimide lié à l'aptamère Anti-OTA thiolé en 3'.

Avant de débuter, nous avons d'abord étudié le comportement électrochimique du Fe(III)NODAGA-maléimide seul par SWV, afin de déterminer son potentiel d'oxydation (Figure 83). Une solution à 0,2 mM a été utilisée et l'oxydation observée se situe entre -0,2 et 0 V.

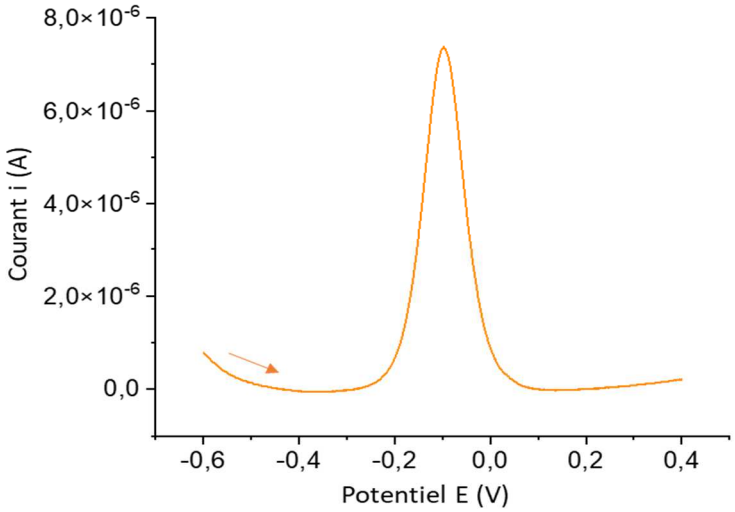


Figure 83: SWV (avec correction de la ligne de base) du complexe métallique Fe(III)NODAGA-maléimide. Mesures de -0,6 à 0,4 V dans PBS 0,1 M à pH 7, application d'un potentiel de -0,6 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,005 V, une modulation d'amplitude de 0,01 V et une fréquence de 25 Hz

Comme nous l'avons expliqué au début de cette partie, la conception des aptacapteurs a suivi le protocole réalisé dans de précédents travaux dans notre laboratoire [8]. Ce protocole suit les

mêmes étapes que celles employées pour le capteur *Vibrio* avec pour seules différences l'utilisation d'aptamères marqués et des mesures réalisées en SWV sur deux groupes de trois électrodes : Essai et Témoin. Ainsi après la formation d'un film de 4-carboxyphenyl et l'activation par EDC/NHS, 20 µL d'une solution (PBS 0,1 M à pH 7) de 10 µM d'aptamère Anti-OTA couplé au complexe de fer (*O2*) sont déposés sur la surface des SPCEs. Après une incubation de 3-4 h, 20 µL d'une solution de cible OTA à 10 µM dans le PBS est déposé sur les électrodes, l'incubation se fait à température ambiante et sous environnement humide durant 1 h.

Les SWVs des deux dernières étapes (pour les groupes Essai et Témoin) montrent une hausse du signal à -0,05 V, déjà présent avant incubation, ainsi que l'apparition d'un nouveau signal vers -0,45 V. Les calculs des différences de hauteur de pics, pour voir si l'aptamère s'est bien lié à la cible, sont retranscrits dans la Figure 84 et le Tableau 13.

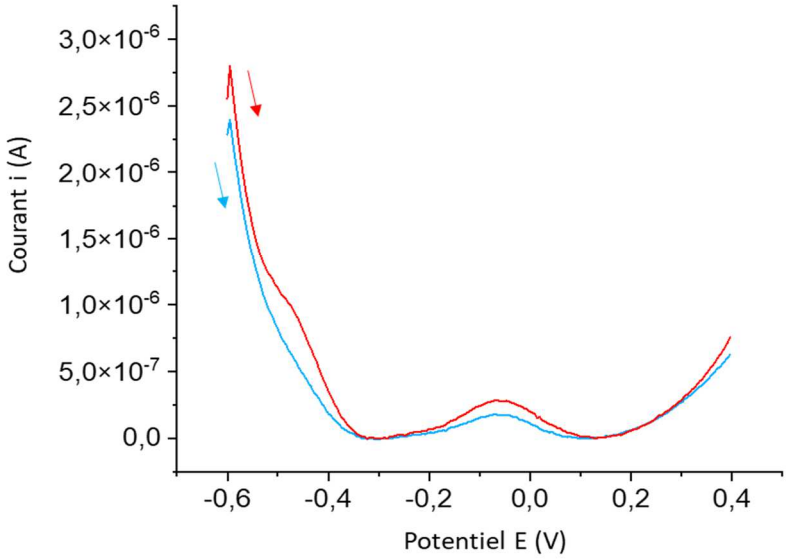


Figure 84: SWV (avec correction de la ligne de base) obtenu pour l'aptacapteur basé sur l'aptamère NH_2-Anti-OTA-Fe(III)NODAGA (pour le groupe Essai et le groupe Témoin). Courbe bleue = aptamères marqués avec le complexe immobilisés, courbe rouge = signal après l'incubation de l'OTA. Mesures de -0,6 à 0,4 V dans PBS 0,1 M à pH 7, application d'un potentiel de -0,6 V durant 5 s avant mesure, une modulation d'amplitude de 0,01 V et une fréquence de 25 Hz

Tableau 13: Moyennes et écart-types du signal Δi obtenu avec les aptamères NH_2-Anti-OTA-Fe(III)NODAGA pour chaque groupe d'étude

Moyennes et écart-types du Δi	**Groupe Essai**	**Groupe Témoin**
Pic à -0,05 V (A)	$(1,1 \pm 0,35) \times 10^{-7}$	$(1,01 \pm 0,35) \times 10^{-7}$
Pic à -0,45 V (A)	$(1,01 \pm 0,16) \times 10^{-7}$	$(1,24 \pm 0,24) \times 10^{-7}$

À première vue, nous ne détectons qu'un faible signal après dépôt de l'aptamère marqué avec le complexe. Ce dernier n'augmente que très légèrement après l'étape d'hybridation. Avec ces données, il est difficile de savoir si le pic vers -0,05 V est bien celui du complexe, cela peut aussi être un pic inhérent de l'électrode ou encore être une superposition des deux. De plus, le fait qu'il est difficile de purifier le composé final obtenu après réaction thiol-maléimide ne facilite pas la reconnaissance des pics. Finalement, peu de tests ont pu être effectués en raison de la faible quantité d'échantillon du conjugué Anti-OTA-Fe(III)NODAGA obtenue à ce moment-là, et donc aucune conclusion n'a été possible.

Pour comprendre le fonctionnement des aptamères face à leurs cibles et éviter le gaspillage des échantillons du couplage thiol-maléimide, il a été décidé de vérifier leurs comportements sur SPCEs, lorsqu'ils sont liés à un marqueur plus classique. Le marqueur utilisé est le bleu de méthylène (MB).

3.3.2.2) APTAMÈRES ANTI-E2 MARQUÉS AU MB

Les premières expériences de conception d'aptacapteur ont débuté avec l'aptamère Anti-E2 modifié en 5' avec un groupement **-**NH_2 et marqué en 3' avec le MB.

- **Optimisation des paramètres de mesure et du protocole**

Des SWVs du capteur avec les aptamères Anti-E2-MB immobilisés ont été prises avec les paramètres par défaut pour voir le comportement du signal du MB (signal trouvé entre -0,4 et -0,1 V). Ce qui en ressort est un voltampérogramme avec trois pics d'oxydation (Figure 85) : deux pics intenses vers les potentiels -0,5 et -0,3 V et un faible pic vers 0 V. Après quelques recherches, il s'est avéré que le pic vers 0 V est celui des SPCEs, et les deux pics restants entre -0,5 et -0,3 V correspondent au MB. Expliqué par *Malhum et al.*[217], il est possible d'observer en voltampérométrie une division du pic d'oxydation du MB (ou de réduction dans certains cas). Cette division est expliquée par l'équilibre de protonation des espèces intermédiaires radicales formées après que le bleu de méthylène ait reçu le premier électron. Différents facteurs permettent d'influer sur ce phénomène notamment : des vitesses de balayage rapides mais aussi des variations de paramètres comme le pKa.

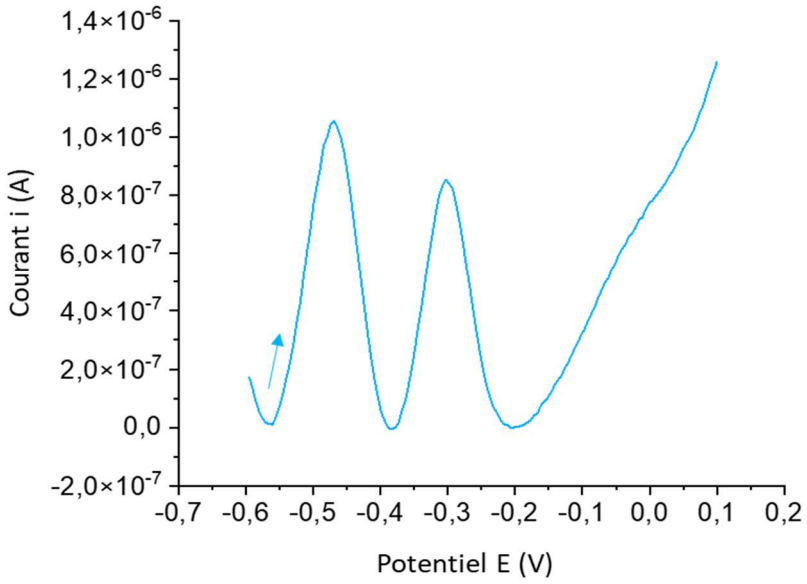


Figure 85: SWV (avec correction de la ligne de base) des aptamères NH_2-Anti-E2-MB immobilisés sur SPCEs. Mesures de -0,6 à 0,1 V dans le tampon PBS 0,1 M à pH 7, application d'un potentiel de -0,6 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,005 V, une modulation d'amplitude de 0,01 V et une fréquence de 25 Hz

Dans le but de résoudre ces problèmes, la vitesse de balayage a été légèrement réduite pour enlever la double oxydation présente, et la fréquence a été doublée pour mieux visualiser les signaux. Au fil des tests en SWVs des changements au niveau du protocole ont eu lieu. L'objectif a été d'accélérer la conception du capteur mais aussi d'optimiser la surface des SPCEs pour éviter une possible saturation de la surface des électrodes dans le cas d'une trop forte présence d'aptamères immobilisés. Ces changements consistent à réduire la durée de certaines étapes : le temps d'activation au EDC/NHS a été diminué de 2 à 1 h, et le temps d'immobilisation des aptamères de 4 à 1 h ; la concentration des solutions d'aptamères immobilisés a également été abaissée de 10-20 µM à 2,5 µM.

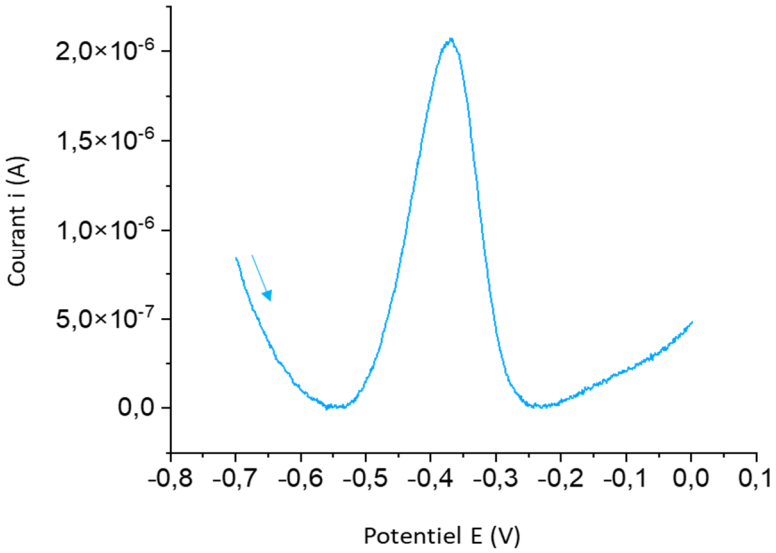


Figure 86: SWV (avec correction de la ligne de base) des aptamères NH_2-Anti-E2-MB immobilisés sur SPCEs après optimisations de mesure et protocole. Mesures de -0,7 à 0 V dans le tampon PBS 0,1 M à pH 7,5, application d'un potentiel de -0,7 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,001 V, une modulation d'amplitude de 0,01 V et une fréquence de 50 Hz

Le voltampérogramme (Figure 86) montre la disparition de la double oxydation avec la baisse de vitesse de balayage. Il présente aussi un signal élevé de 2,0 x 10^{-6} A, bien que les temps du protocole de conception aient changé ainsi que les concentrations de solutions. À ce sujet, après l'étape d'immobilisation des aptamères marqués avec MB, diverses intensités de signal du MB allant de 1,0 à 6,0 x 10-^{6} A ont été recensées.

- **Expériences avec aptamères NH_2-Anti-E2-MB**

Les expériences d'incubation en présence de la cible estradiol ont été réalisées. La solution mère d'estradiol a été préparée en diluant la quantité voulue dans de l'éthanol pur, puis elle a été diluée dans une solution de PBS 0,1 M jusqu'à atteindre la concentration voulue, la teneur en éthanol dans les solutions finales étant inférieure à 5 %. L'aptacapteur a été réalisé en immobilisant sur les électrodes pendant 1 h une solution d'aptamères de concentration 2,5 µM. Les essais de détection ont ensuite été réalisés par incubation d'une solution à 2,5 µM d'estradiol durant 1 h à température ambiante. À la fin du test, les voltampérogrammes SWV affichent alors une légère baisse du signal MB est observée chez le groupe Essai comme chez le groupe Témoin (Figure 87 et Figure 88).

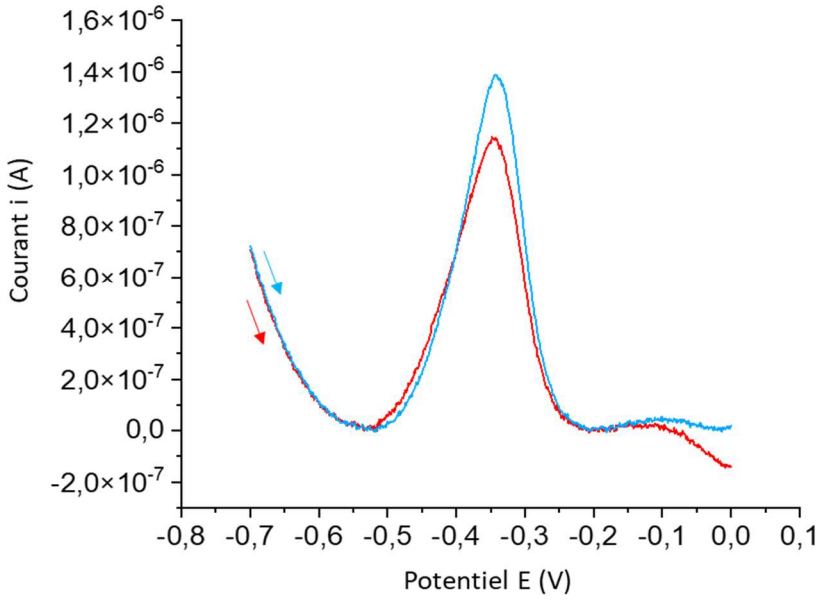


Figure 87: SWV (avec correction de la ligne de base) obtenu avec l'aptamère NH_2-Anti-E2-MB immobilisé sur SPCEs (pour les groupes Essai et Témoin). Courbe bleue = réponse des aptamères marqués immobilisés, courbe rouge = signal après incubation de la cible. Mesures de -0,7 à 0 V dans le tampon PBS 0,1 M à pH 7,5, application d'un potentiel de -0,7 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,001 V, une modulation d'amplitude de 0,01 V et une fréquence de 50 Hz

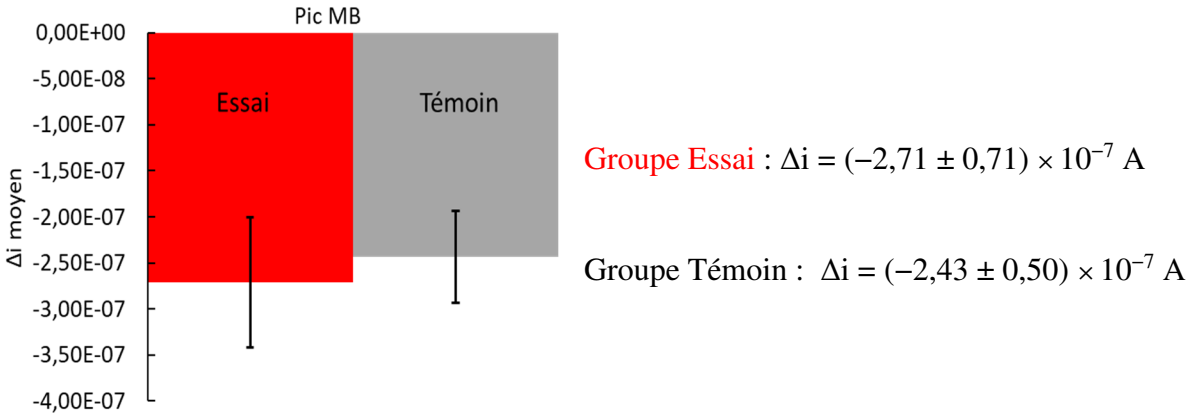


Figure 88: Histogramme des variations d'intensité de pic (Δi) mesurées avec l'aptamère Anti-E2-MB immobilisé, pour les groupes Essai et Témoin (n = 3 électrodes)

Les données expérimentales de fonctionnement de l'aptacapteur Anti-E2-MB (Figure 88) montrent des variations quasi-identiques au niveau des Δi pour les deux groupes de trois électrodes. La baisse des signaux électrochimiques observée correspond à celle d'un système ON/OFF, cependant le fait que le groupe Témoin présente des résultats proches de ceux du groupe Essai ce qui invalide cette hypothèse. D'autres tests de conceptions de l'aptacapteur ont été réalisés en faisant varier certains paramètres tels que les temps d'incubation, les concentrations ou la composition des solutions tampons, cependant, ces derniers ont conduit à

l'obtention de résultats similaires. La cause de ces diminutions de signaux reste difficile à expliquer.

3.3.2.3) APTAMÈRES ANTI-OTA MARQUÉS AU MB

Comme décrit pour l'aptamère Anti-E2, la cible OTA a tout d'abord été diluée dans du méthanol 100 % et la solution a été diluée dans du PBS 0,1 M jusqu'à la concentration désirée, le taux de méthanol étant inférieur à 5 % dans la solution finale. Les aptamères Anti-OTA sont aminés en position 5' et marqués au MB en 3'. Une solution d'aptamères de concentration de 2,5 µM a donc été incubée sur SPCEs durant 1 h, puis la solution de cible OTA à 2,5 µM a été ajoutée et incubée pendant 1 h. La Figure 89 et la Figure 90 montrent l'évolution du signal observé pour les deux groupes d'étude.

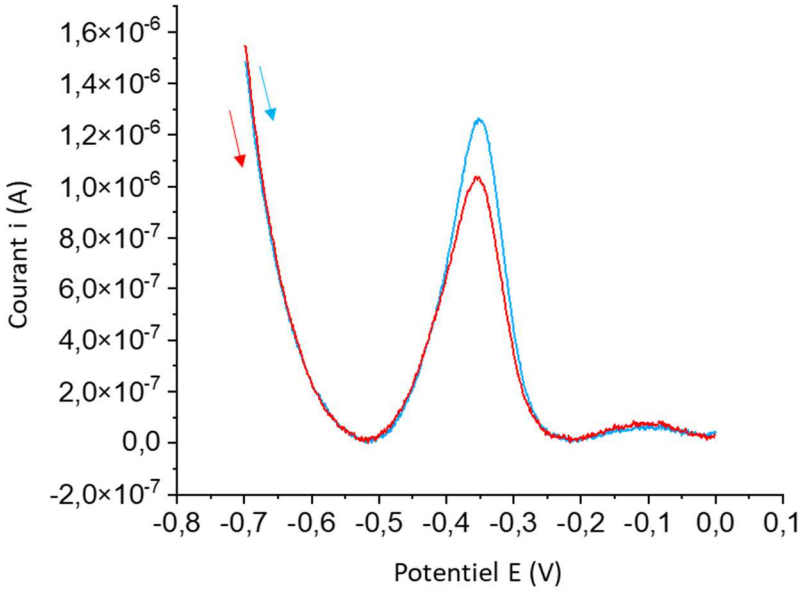


Figure 89: SWV (avec correction de la ligne de base) obtenu avec l'aptamère NH_2-Anti-OTA-MB immobilisé sur SPCEs (pour les groupes Essai et Témoin). Courbe bleue = Réponse des aptamères marqués immobilisés, courbe rouge = signal après incubation de la cible. Mesures de -0,7 à 0 V dans le tampon PBS 0,1 M à pH 7,5, application d'un potentiel de -0,7 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,001 V, une modulation d'amplitude de 0,01 V et une fréquence de 50 Hz

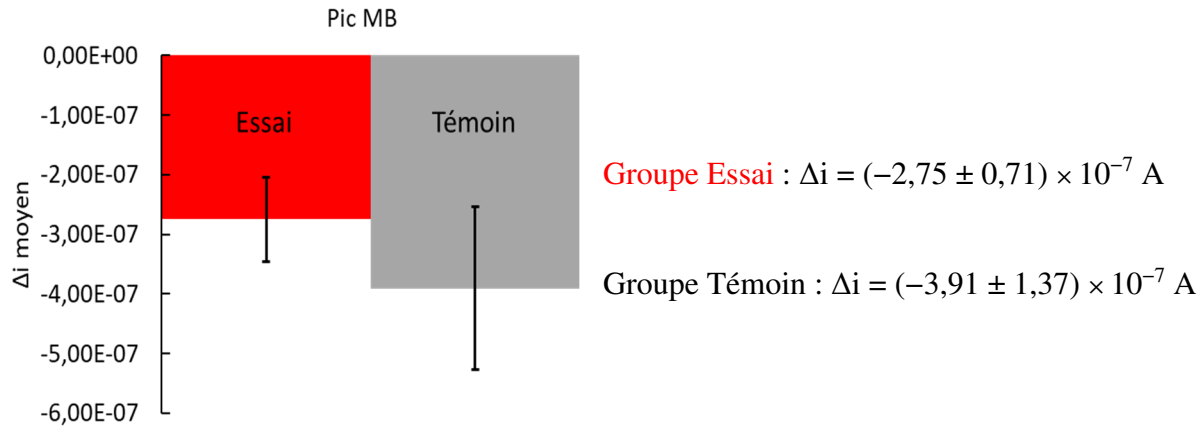


Figure 90: Histogramme des variations d'intensité de pic (Δi) mesurées avec l'aptamère Anti-OTA-MB immobilisé, pour les groupes Essai et Témoin (n = 3 électrodes)

Bien que similaire aux tentatives avec l'aptamère Anti-E2, nous notons que c'est le groupe Témoin qui obtient un Δi plus important que pour les tests avec la présence de cible OTA. Chaque nouvelle expérience réalisée sur le sujet n'a pas su corriger les résultats obtenus. Il est toujours impossible de valider la liaison des aptamères marqué au MB avec leurs cibles.

3.3.2.4) APTAMÈRES ANTI-AFM1 MARQUÉS AU MB

Dans le cas des aptamères Anti-AFM1 (aptamères marqué en 3' au MB et -NH_2 en 5'), le protocole de conception / détection suivi est toujours le même. Cette fois-ci, nous observons sur les résultats obtenus une augmentation des signaux entre les étapes d'immobilisation des aptamères et la détection de la cible AFM1 (Figure 91). Toutefois, sans surprise, les variations observées des signaux électrochimiques après ajout de cible (groupe Essai) et sans ajout de cible (groupe Témoin) ne permettent pas d'affirmer le bon fonctionnement du capteur (Figure 92). Les Δi calculés montrent une plus forte augmentation du signal MB dans le groupe Témoin où la cible AFM1 n'est pas présente que dans le groupe Essai.

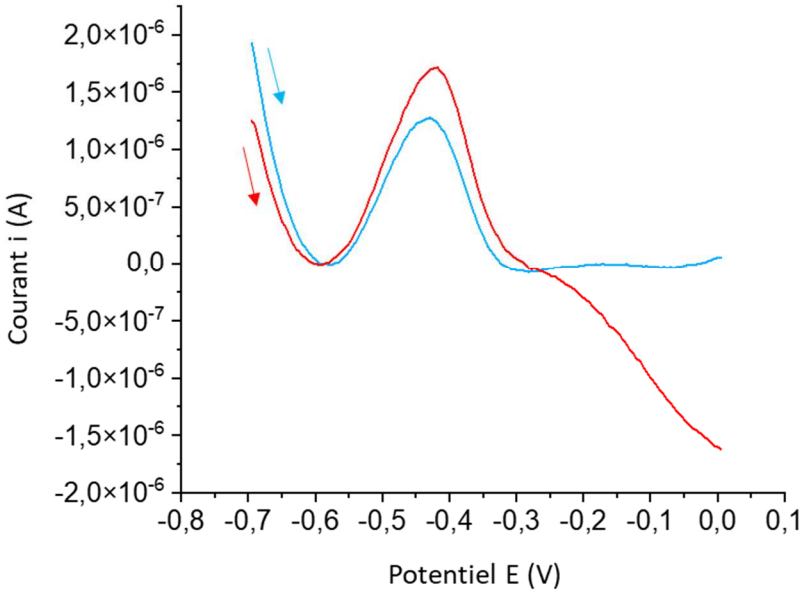


Figure 91: SWV (avec correction de la ligne de base) avant et après étape finale d'ajout de cible (pour groupe Essai et Témoin) du conjugué NH_2-Anti-AFM1-MB. Courbe bleue = réponses des aptamères marqués immobilisés, courbe rouge = signal après l'incubation de la cible. Mesures de -0,7 à 0 V dans le tampon PBS 0,1 M à pH 7,5, application d'un potentiel de -0,7 V durant 5 s avant mesure, un pas de 0,001 V, une modulation d'amplitude de 0,01 V et une fréquence de 50 Hz

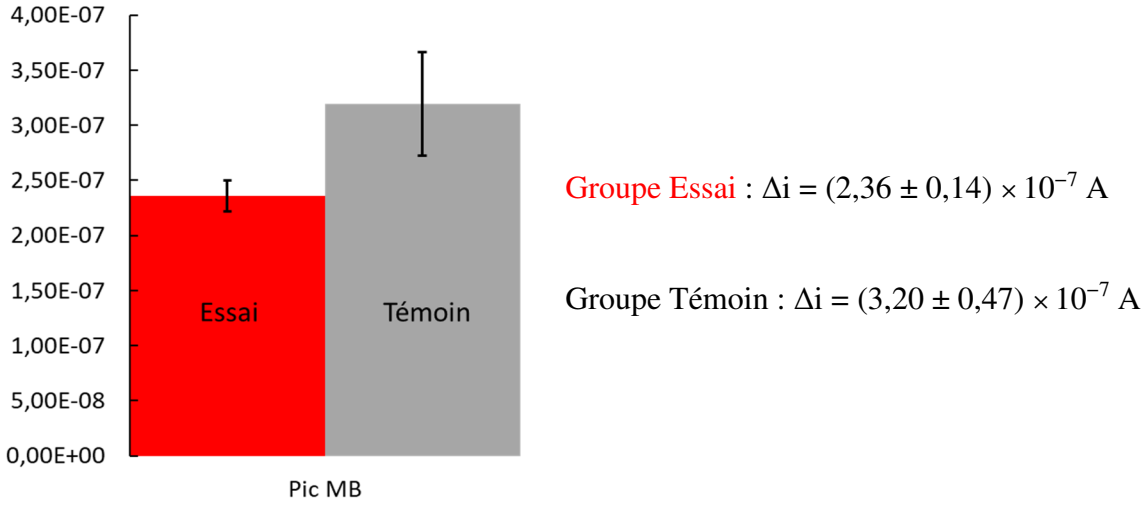


Figure 92: Histogramme des variations d'intensité de pic (Δi) obtenu avec l'aptamère Anti-AFM1-MB immobilisé, pour les groupes Essai et Témoin (n = 3 électrodes)

Contrairement aux tests avec les deux autres aptamères (Anti-E2 et Anti-OTA), peu d'expériences ont été réalisées avec l'aptamère Anti-AFM1. En effet, comme nous avons pu le voir dans la section précédente, il s'est avéré assez difficile de réussir le couplage thiol-maléimide dans le cas de l'Anti-AFM1. Ainsi, après quelques tentatives de conception et de couplage avec le marqueur en parallèle, l'idée d'utiliser cet aptamère a été abandonnée.

3.3.3) BILAN DÉVELOPPEMENT D'APTACAPTEURS

Similairement au capteur *Vibrio*, de nombreux tests / changements / optimisations de surfaces ont été réalisés selon différentes hypothèses pouvant expliquer les résultats précédents.

L'une des principales hypothèses a été que les aptamères changent de conformation après leur immobilisation, d'où les variations de signal observées. Différents changements ont été testés :

- Le temps d'immobilisation d'aptamères a été augmenté jusqu'à 1 jour d'incubation à T_{amb}, pour laisser le temps aux aptamères de se « stabiliser » ;
- Utilisation de solutions tampons surconcentrées (NaCl 420 mM) ou peu concentrées (NaCl 20 mM) afin de forcer ou bloquer rapidement les changement conformationnels des aptamères ;
- Tentatives de linéarisation des aptamères selon plusieurs méthodes (sonication, différents sets de températures…).

Une autre des hypothèses a été de mieux optimiser la densité de la surface des électrodes :
- Changement d'immobilisation des aptamères (différents pH, concentrations de 1 µM à 20 µM…) ;
- Immobilisation en parallèle avec éthanolamine.

Enfin la dernière hypothèse a porté sur les cibles complémentaires des aptamères :
- Différents solvants pour dissoudre les cibles : éthanol, DMSO, acétonitrile, méthanol ;
- Différents temps d'incubation (1 à 12 h) et pH solutions (5 à 10).

Cependant, aucun des résultats produits par ces changements n'ont permis de démontrer que les aptamères se sont bien liés avec leurs cibles.

3.3.4) ÉTUDE DES INTERACTIONS APTAMÈRES-CIBLES

La conception de biocapteur avec des aptamères marqués en MB n'ayant montré aucun résultat concluant, nous avons décidé de vérifier la complémentarité entre les aptamères et leurs cibles en solution. Pour ce faire, nous nous sommes dirigés vers un procédé de thermophorèse optique à micro-échelle (MST). La thermophorèse est un phénomène correspondant à la mise en mouvement de particules/molécules soumises à un gradient de température. Basée sur ce

principe, la thermophorèse optique à micro-échelle permet la reconnaissance d'interactions moléculaires entre biomolécules complémentaires peu importe leurs natures. Au travers d'un appareillage comme le MONOLITH, cette technique de thermophorèse permet, à partir de faibles quantités d'échantillons, de fournir en temps réel des informations sur les interactions et les constantes d'affinité des composés analysés (Figure 93). L'une des constantes calculées est la constante de dissociation K_d, une constante thermodynamique servant à évaluer et déterminer la force des interactions entre plusieurs biomolécules. Plus la valeur du K_d est basse, plus l'affinité entre le ligand et sa cible est forte. Plus cette valeur est élevée, moins il y a d'attraction entre le ligand et sa cible.

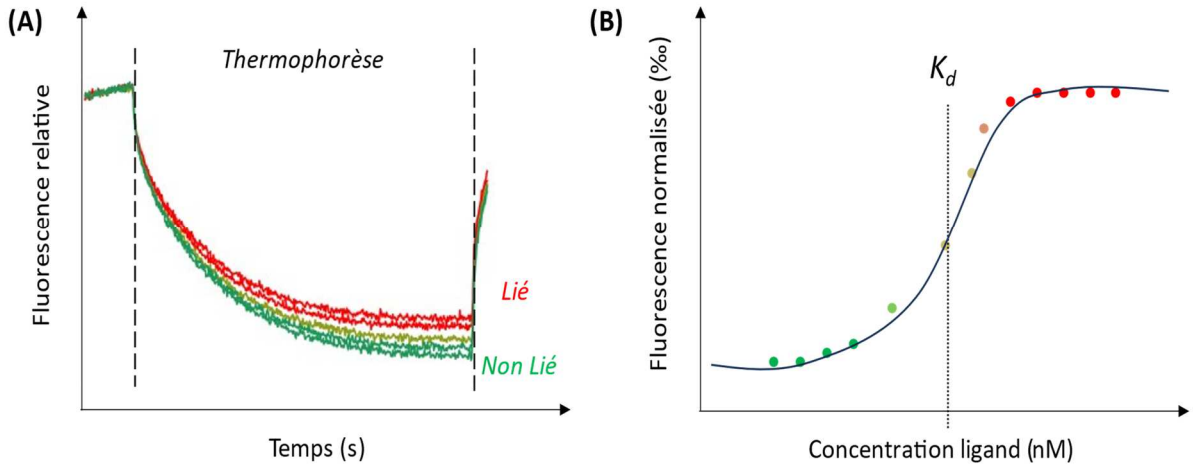


*Figure 93: Courbes de variation de fluorescence enregistrées pour différents rapports de mélange de molécules cibles et de ligands **(A)**, et courbe pour la détermination du K_d **(B)***

Notre idée, au travers de l'utilisation de la MST, a été de faire une comparaison de fonctionnement de deux aptamères : un aptamère thiolé en 5' et marqué avec de la fluorescéine (FAM) en 3', un même aptamère marqué avec la FAM en 3' et aussi avec le complexe Fe(III)NODAGA en 5'. L'objectif est de d'abord confirmer la bonne liaison des aptamères à leurs cibles tout en calculant leurs constantes de dissociation K_d. Le point le plus important est de vérifier par cette comparaison si le fait de coupler un complexe métallique Fe(III)NODAGA à un aptamère vient poser des problèmes de reconnaissance de cible chez ce dernier.

3.3.4.1) ÉTUDE DES INTERACTIONS APTAMÈRES-OTA

Les aptamères Anti-OTA ont été testés dans une solution tampon PBS 0,1 M pH 8 contenant 10 % de méthanol (MeOH) à une concentration de 20 nM. Les concentrations de la cible varient de 20 µM à 0,4 nM selon les échantillons.

- **Anti-OTA-FAM et OTA**

Un premier graphe (Figure 94A) montre les scans de fluorescence de chaque capillaire contenant les échantillons d'aptamères et de cible. Ce graphique permet de voir qu'il n'y a pas eu d'adsorption des molécules/brins sur les parois des capillaires, ni de changement inattendu de fluorescence lors des mesures. Une plus forte fluorescence est notée sur le capillaire n°9, mais cela provient des manipulations de dilution. Les capillaires de 1 à 3 ont été exclus de la mesure globale pour obtenir des résultats plus précis.

Les graphes suivants (Figure 94B et C) servent à déterminer si les liaisons entre aptamères et cibles ont eu lieu. Le premier des deux graphes (Figure 94B) permet de suivre les modifications du signal de fluorescence global en fonction de la température. Les données obtenues valident la présence d'interactions entre aptamères et cible OTA. Elles indiquent aussi qu'il n'y a pas eu d'agrégation des composés (pas de déformations présentes sur les courbes) ni de blanchiment du FAM. Les données recueillies sur le second graphe (Figure 94C) montrent une courbe de dissociation imparfaite et un ratio signal/bruit proche de la limite. Cependant, les résultats démontrent que les liaisons entre les aptamères et l'OTA ont eu lieu. Le K_d calculé par ce procédé vaut 4 nM, une faible valeur certifiant l'affinité du ligand à sa cible. En recherchant dans la littérature, différentes valeurs du K_d du couple aptamère-OTA sont recensées : allant de 200 à 9,13 nM [218,219]. Il reste bien entendu difficile de comparer ces valeurs tant les procédés de calculs ainsi que composés et paramètres des expériences sont différents. Les mesures devront donc être refaites pour plus de précision.

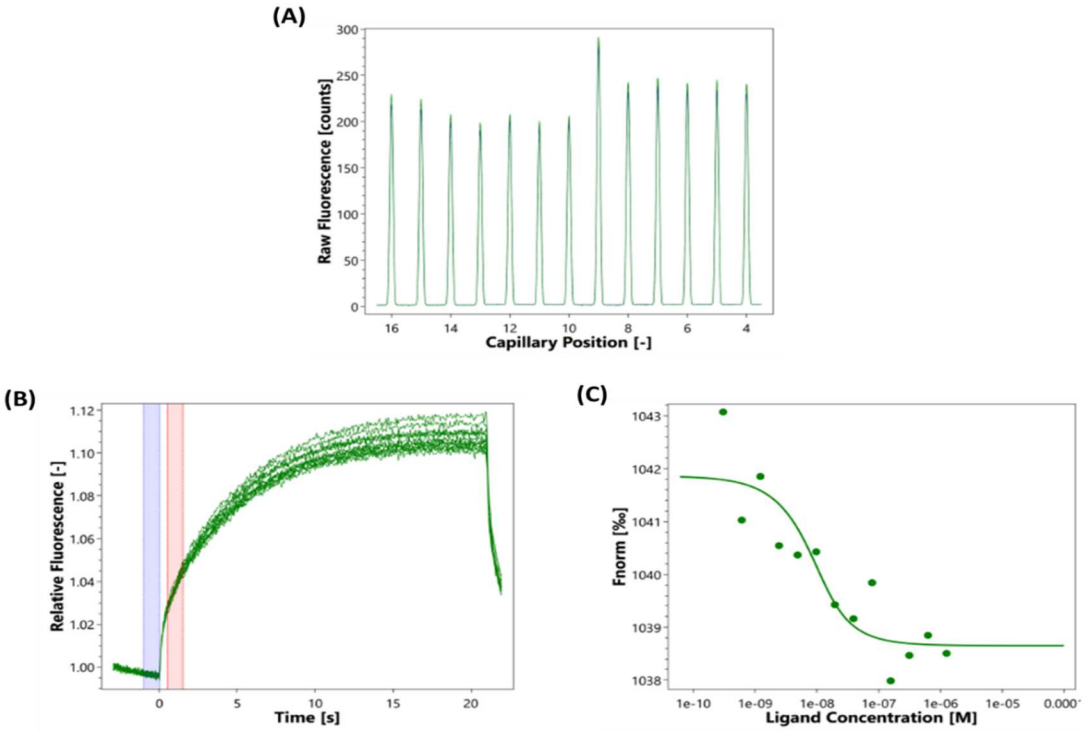


*Figure 94: Analyses par MST des interactions entre l'aptamère SH-Anti-OTA-FAM et la cible OTA. Scans de la fluorescence pour chaque capillaire **(A)**, courbes de variation de fluorescence **(B)** et courbe du K_d **(C)***

- **Fe(III)NODAGA-Anti-OTA-FAM et OTA**

Le graphe montrant les scans de capillaires (Figure 95A) ne montre aucune adsorption des composés ni aucun changement inattendu de fluorescence lors des mesures. Les capillaires n°1, 2, 3 et 9 ont été exclus de la mesure globale pour obtenir des résultats plus précis.

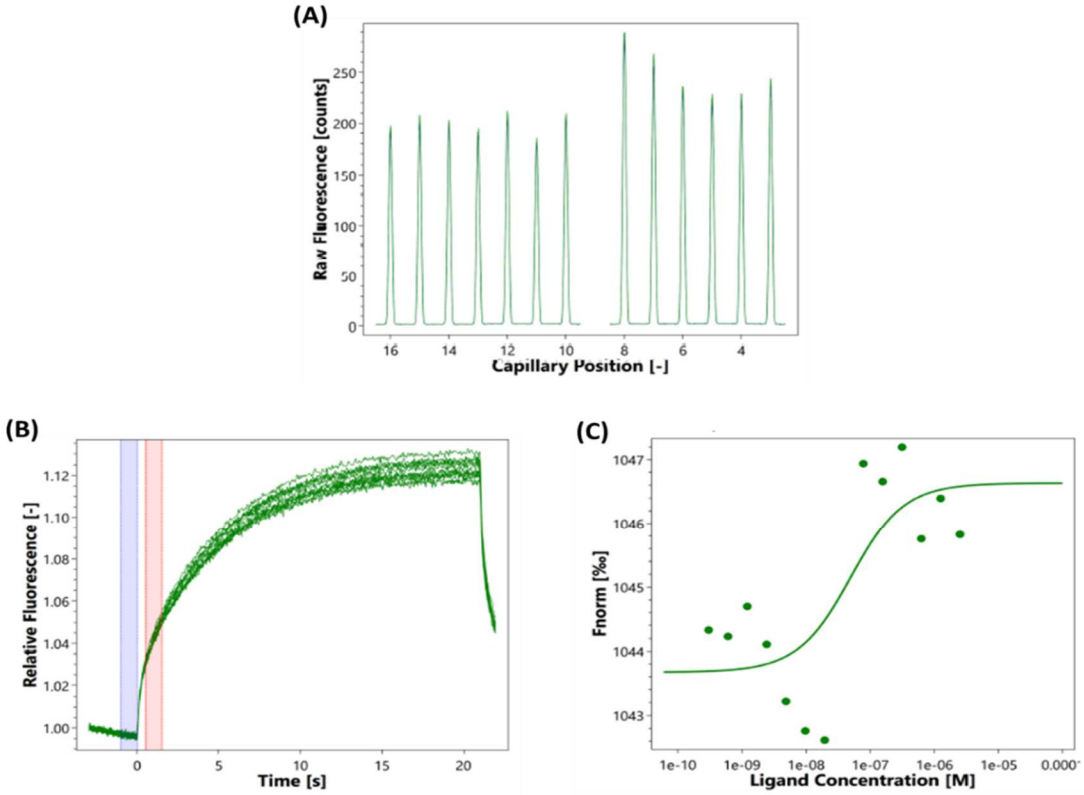


Figure 95: Analyses par MST des interactions entre l'aptamère Fe(III)NODAGA-Anti-OTA-FAM et la cible OTA. Scans de la fluorescence pour chaque capillaire ***(A)****, courbes de variation de fluorescence* ***(B)*** *et courbe du* K_d ***(C)***

Les graphes d'interactions (Figure 95B et C) indiquent des interactions entre l'aptamère et la cible OTA, mais le graphe montrant la fluorescence normalisée en fonction de la concentration en OTA révèle deux courbes de dissociations permettant de calcul de deux valeurs distinctes de $K_{d,}$ dont les valeurs sont respectivement de 4 nM et 500 nM (Figure 96), Ce phénomène semble montrer que deux formes différentes de l'aptamère sont présentes, probablement la forme native et la forme modifiée par le marqueur électrochimique. Il semblerait donc que le couplage du marqueur modifie l'affinité de l'aptamère, mais ces résultats restent à confirmer.

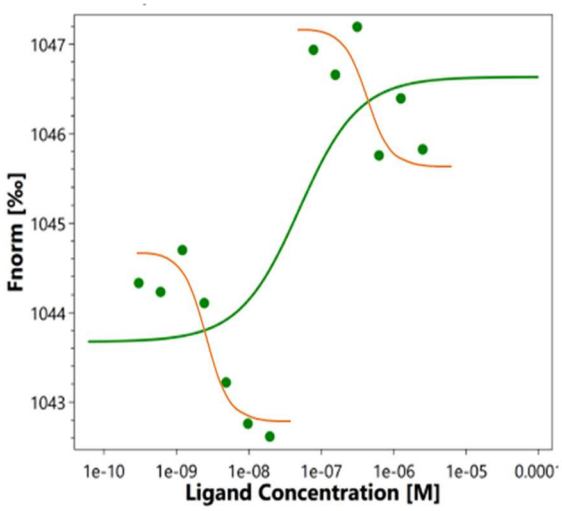


Figure 96 : Courbes révélant les valeurs de K_d pour les deux formes d'aptamères présent dans l'échantillon (courbes orange)

4) PARTIE EXPÉRIMENTALE

4.1) RÉACTIFS ET SOLVANTS

Tous les produits, composés, sels, ont été achetés chez SIGMA ALDRICH et VWR. Le ligand NODAGA-maléimide a été fourni par CHEMATECH. Les oligonucléotides et aptamères ont été commandés lyophilisés chez MICROSYNTH et ont ensuite été remis en solution dans de l'eau ultra pure stérile (Tableau 14). Ils sont généralement modifiés avec différents groupements aux extrémités 5' et 3' (Tableau 15).

Tableau 14: Formules des oligonucléotides et aptamères utilisés

Oligonucléotides / Aptamères	Nombre de bases	Formules
Vib 25	25	5'- GG CTT TCA CAT CTG ACT TAA TGA AC-3'
Vib 35	35	5'- TTG AGC CCC GGG CTT TCA CAT CTG ACT TAA TGA AC-3'
ADN *Vibrio* Contrôle positif	70	5'- TAA TCG GAA TTA CTG GGC GTA AAG CGC ATG CAG GTG TTC ATT AAG TCA GAT GTG AAA GCC CGG GGC TCA A -3'
ADN *Vibrio* $^{1/2}$ Contrôle positif	35	5'- GTT CAT TAA GTC AGA TGT GAA AGC CCG GGG CTC AA -3'
Oligonucléotide non spécifique à l'ADN *Vibrio*	35	5'- GGC CAC GGC TTG GGT TGG TCC CAC TGC GCG TGG AT-3'
Aptamère Anti-E2	35	5' - AAG GGA TGC CGT TTG GGC CCA AGT TCG GCA TAG TG - 3'
Aptamère Anti-OTA	36	5' - GAT CGG GTC TGG GTG GCG TAA AGG GAG CAT CGG ACA - 3'
Aptamère Anti-AFM1	21	5' - ACT GCT AGA GAT TTT CCA CAT - 3'

Tableau 15: Modifications réalisées aux extrémités 5' et 3' des oligonucléotides et aptamères utilisés

Modifications	Groupement greffé en 5'	Groupement greffé en 3'
Bleu de méthylène (MB)	PHO_4-$C_{25}H_{35}N_4OS$	PHO_4-$C_{25}H_{35}N_4OS$
Thiol (SH)	PHO_4-$(CH_2)_6$-SH	PHO_4-$(CH_2)_3$-SH
Amine (NH_2)	PHO_4-$(CH_2)_6$-NH_2	PHO_4-$(CH_2)_3$-NH_2
Biotine	PHO_4-$C_{16}H_{29}N_3O_2S$	/
Fluorescéine (FAM)	/	PHO_4-$C_{28}H_{26}NO_7$

L'ensemble des tampons et solutions préparés pour la conception du génocapteur *Vibrio* et des aptacapteurs ont été réalisés dans de l'eau distillée préalablement traitée, voici leurs compositions :

Tampon prétraitement SPCE : H_2SO_4 à 0,5 M dans solution aqueuse de KCl à 0,1 M
Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7,4 : NaCl 137 mM / KCl 2,7 mM / Na_2HPO_4 10 mM / KH_2PO_4 1,8 mM, $MgCl_2$ 10 mM ;
Tampon hybridation (HYB) pH 8 : NaCl 75 mM / Tris 20 mM / SDS 0,01 % ;
Tampon mesure DPV pH 7 : KCl 0,1 M / Na_2HPO_4 0,1 M / KH_2PO_4 0,1 mM ;
Tampon SSC 1X pH 7 : NaCl 150 mM / Sodium citrate 15 mM ;
MES (Acide 2-(4-morpholinyl) éthane sulfonique) pH 5,5 : MES 0,1 M ;
POP 10X pH 6,5: NaH_2PO_4 50 mM / NaCl 100 mM.
Tris-HCl, $MgCl_2$ pH 7,4 : Tris-HCl 10 mM / $MgCl_2$ 20 mM ;
Tampon sélection Anti-E2 pH 7,5 : Tris-HCl 2,5 mM / NaCl 10 mM / KCl 0,5 mM
Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7,4 : NaCl 137 mM / KCl 2,7 mM / Na_2HPO_4 10 mM / KH_2PO_4 1,8 mM ;
Tampon surconcentré pH 8 : Tris 300 mM, NaCl 420 mM, KCl 60 mM ; $MgCl_2$ 60 mM.

4.2) APPAREILLAGE ET SUPPORTS DE MESURE

Les mesures électrochimiques ont été effectuées à l'aide d'un potentiostat/galvanostat AUTOLAB PGSTAT100 et AUTOLAB PGSTAT302N avec le logiciel NOVA 2.1.3 AUTOLAB METROHM B.V.
Les oligonucléotides et aptamères ont été chauffés/refroidis avec un ThermoMixer Eppendorf.
Les électrodes utilisées pour la conception du génocapteur sont principalement des SPCEs fabriquées par le laboratoire LBBM-BAE. Les mesures en électrochimie ont été réalisées en triplicatas (trois électrodes).

Les mesures de masses ont été effectuées sur LC-HRMS QEXactive plus de THERMO FISHER SCIENTIFIC.
Les analyses de couplages aptamères-cibles ont été réalisées sur MONOLITH 2020 de NANOTEMPER avec les logiciels MO.CONTROL/MO.AFFINITY ANALYSIS de NANOTEMPER.
Les électrodes utilisées pour la conception des aptacapteurs sont des électrodes sérigraphiées de carbone (DRP-110) commercialisées par METROHM DROPSENS. Les mesures en électrochimie ont été réalisées en triplicatas (trois électrodes).

4.3) PROTOCOLE DE CONCEPTION DES BIOCAPTEURS

La méthodologie pour la conception du génocapteur *Vibrio* comme pour les différents aptacapteurs reprend les mêmes étapes à savoir une réduction diazonium suivi d'une activation par EDC/NHS pour une immobilisation d'oligonucléotides/aptamères, un blocage des sites actifs et la détection de cible. Bien entendu, des optimisations au niveau des paramètres des mesures et des étapes de conception ont été réalisées au cours des recherches comme explicité dans la partie résultats et discussions.

Dans le cas du génocapteur, chaque étape du protocole suivant a été suivie par mesure de l'impédance avec une solution médiateur de ferricyanure-ferrocyanure de 1 mM dans le PBS. Les mesures en impédance ont été faites en triplicatas.
Pour les aptacapteurs, les mesures ont été réalisées en triplicatas par SWV pour vérifier l'immobilisation des aptamères marqués, et leurs liaisons avec leurs cibles complémentaires.

- **1ère étape : modification de la surface des électrodes**

Les électrodes de carbone sérigraphiées ont d'abord été prétraitées avec une solution de 0,5 M de H_2SO_4 dans 0,1 M KCl, en appliquant six scans successifs en voltampérométrie cyclique entre -1,5 et 1 V à un scan rate de 100 $mV.s^{-1}$.
La modification de la surface de l'électrode a ensuite été réalisée par électrodéposition d'un sel de 4-carboxyphenyl diazonium : ce composé est formé en mélangeant 4 mL une solution à 2 mM de l'acide 4-aminobenzoïque préparé dans une solution de HCl à 0,5 M avec 100 µL d'une solution aqueuse de nitrite de sodium à 0,1 M. Le mélange est laissé reposer 10 minutes avant utilisation, puis 100 µL en sont déposés sur les SPCEs. Enfin, une mesure en LSV a été lancée deux fois sur les SPCEs à un potentiel de -0,8 à 0,6 V avec une vitesse de balayage de 0,05 V s^{-1}. Enfin, les SPCEs sont lavées avec de l'eau distillée.

- **2ème étape : activation de la surface modifiée**

L'étape d'activation des groupements carboxyles à la surface des électrodes s'effectue avec une solution de EDC/NHS (à 100 mM/ 20 mM respectivement) dans du tampon MES à 0,1 M. 50 µL de la solution d'activation ont été déposés sur l'électrode de travail. Après deux heures d'incubation sous atmosphère humide et à température ambiante, les électrodes sont lavées avec de l'eau distillée.

- **3ème étape : immobilisation des oligonucléotides/aptamères**

Les oligonucléotides ont en premier lieu été mis à concentration voulue dans le tampon choisis (principalement PBS) puis été linéarisés. Leur linéarisation a été accomplie en les chauffant à 90°C pendant 8 minutes puis 4 minutes à 0°C et enfin 10-15 minutes de retour à température ambiante.

L'immobilisation des oligonucléotides a été réalisée par couplage entre la fonction amine (NH_2) et le groupement carboxyle (ester) activé au niveau de la surface des électrodes. 20 µL de la solution de l'aptamère ont été déposés et laisser incuber quatre heures en atmosphère humide et à température ambiante. Finalement, les électrodes sont lavées avec le tampon choisi pour l'aptamère (généralement du PBS).

- **4ème étape : blocage et détection de cible**

Une étape de blocage, des sites activés au NHS, est réalisée en utilisant 30 µL d'une solution d'éthanolamine (NH_2-$(CH_2)_2$-OH) à 1 M dans le tampon utilisé pour les aptamères. Suite à 45 minutes d'incubation, la surface des électrodes a été lavée avec le tampon de la solution d'éthanolamine.

20 µL d'un mélange comprenant 55 µL d'eau pure, 10 µL d'ADN cible (à concentration voulue) et 25 µL de solution tampon, ont été déposés sur l'électrode de travail des SPCEs. Après 40 minutes d'incubation en atmosphère humide et à 46°C, les électrodes sont ensuite lavées avec du tampon de la cible.

4.4) COMPLEXATION DU LIGAND NODAGA-MALÉIMIDE

Pour la conception des aptacapteurs, nous prenons un dérivé du NOTA, le NODAGA qui a été modifié avec un maléimide pour mieux se lier aux différents aptamères. Le protocole de complexation avec des cations de fer est décrit ci-dessous.

50 mg de NODAGA-maléimide (0,101 mmol) et 16,31 mg $FeCl_3$ (0,101 mmol) ont été dissous séparément dans 10 mL d'eau distillée. La solution de ligand a été ajoutée goutte à goutte à la

solution de métal donnant une solution jaune intense. Le mélange réactionnel est porté au reflux et agité pendant deux à trois heures. Un précipité jaune apparait. Pas de cristallisation du composé. Après filtration, le solide est lavé avec de l'éthanol puis séché. Masse du complexe = 38,6 mg (69,4 %). Masse calculée pour $C_{21}H_{29}FeN_5O_9$ (551,13 g/mol). Trouvé ESI^+ : 551,17 m/z ($M + H^+$) ; 573,24 m/z ($M + Na^+$).

4.5) CONJUGAISON APTAMÈRES-COMPLEXE

- **Protocole de conjugaison**

Le protocole est basé sur les travaux réalisés dans notre laboratoire [8,18]. Les aptamères ont été linéarisés en subissant un cycle de chauffage et refroidissement de 8 minutes à 90°C, puis 4 minutes à 0°C et 15 minutes à T_{amb}. 10 µL à d'une solution à 1,1 mM d'aptamères dans de l'eau pure stérile ont été ajoutés 90 µL de solution du complexe métallique à 2,2 mM préparé dans le tampon PBS 0,1 M pH 7. Le mélange réactionnel a ensuite été mis sous agitation à 46°C, une nuit (12 h maximum).

Ce protocole de couplage a subi plusieurs optimisations au cours des recherches (voir sections précédentes) dont :

- Des augmentations de concentrations des solutions d'aptamères et complexes ;
- Une réduction de temps de couplage à 1h30-2 h ;
- L'utilisation ou non de TCEP ;
- Des changements de température de couplage (37-80 °C).

- **Vérification par LC-HRMS**

Les échantillons d'aptamères ont été préparés dans du PBS 0,1 M pH 7-7,5 à des concentrations comprises entre 250-100 µM.

Les analyses ont été réalisées en utilisant colonne AERIS PEPTIDE XB-C18, 2,6 µm, 100 Å, 150 × 2,1 mm, sur un appareillage LC-HRMS QEXactive plus équipé d'un PDA pour des longueurs d'onde comprises entre 200 et 800 nm et à deux longueurs d'ondes fixes (254 et 280 nm). Les spectres de masses ont été acquis en ESI^- entre 334 et 5000 m/z avec une résolution de 70000. 5 µL de la solution à analyser ont été élués en utilisant un gradient des solutions tampons A et B (Tableau 16). Les tampons utilisés sont les suivants :

- Tampon A : Eau pure + 0,1 % acide formique + 5 mmol formate d'ammonium ;
- Tampon B : Acétonitrile (ACN) + 0,1 % acide formique.

Tableau 16: Gradient chromatographique pour les analyses en LC-HRMS

Temps	Flux (mL/min)	% Tampon A	% Tampon B	Courbe
0.000	0,300	95,0	5,0	5
2,000	0,300	95,0	5,0	5
17,000	0,300	5,0	95,0	5
20.000	0,300	5,0	95,0	5
22,000	0,300	95,0	5,0	5
26,000	0,300	95,0	5,0	5

4.6) ANALYSES DES INTERACTIONS MOLÉCULAIRES EN SOLUTION

Le but de ces expériences par thermophorèse était de comparer différents aptamères et plus particulièrement de mettre en évidence la possible influence d'un complexe métallique sur la reconnaissance de la cible. Nous avons donc utilisé un aptamère, complémentaire à une des cibles, marqué en FAM (fluorescéine) à l'extrémité 3' et avec un thiol à l'extrémité 5'. Ce dernier a été comparé au même aptamère marqué en FAM à l'extrémité 3' mais portant le complexe Fe(III)-NODAGA à son extrémité 5'.

Les solutions à analyser ont été préparées dans un tampon PBS 0,1 M pH 8 contenant 10 % de méthanol (MeOH). Pour chaque analyse, 16 capillaires ont été préparés à partir de solutions, contenant chacune 10 µL d'aptamères marqués avec FAM, à des concentrations de 20 nM. Des solutions de cible de 10 µL ont été préparées à des concentrations comprises entre 20 et 0,4 nM. Le protocole de préparation des échantillons est le suivant. 10 µL de solution tampon ont été placés dans 16 puits d'une microplaque. 10 µL de solution stock de la cible étudiée ont été introduits dans le premier puit. Le tout a été mélangé, puis 10 µL du mélange du premier puit ont été pris et introduits dans le 2ème puit. Le processus se répète ainsi de suite jusqu'au 16ème puit. 10 µL de solution d'aptamères-FAM sont ensuite ajoutés dans chaque puit. Après une homogénéisation sous agitation, les solutions à analyser sont prélevées par capillarité (Figure 97). Enfin, les capillaires sont placés sur le portoir du MONOLITH pour pouvoir lancer les mesures.

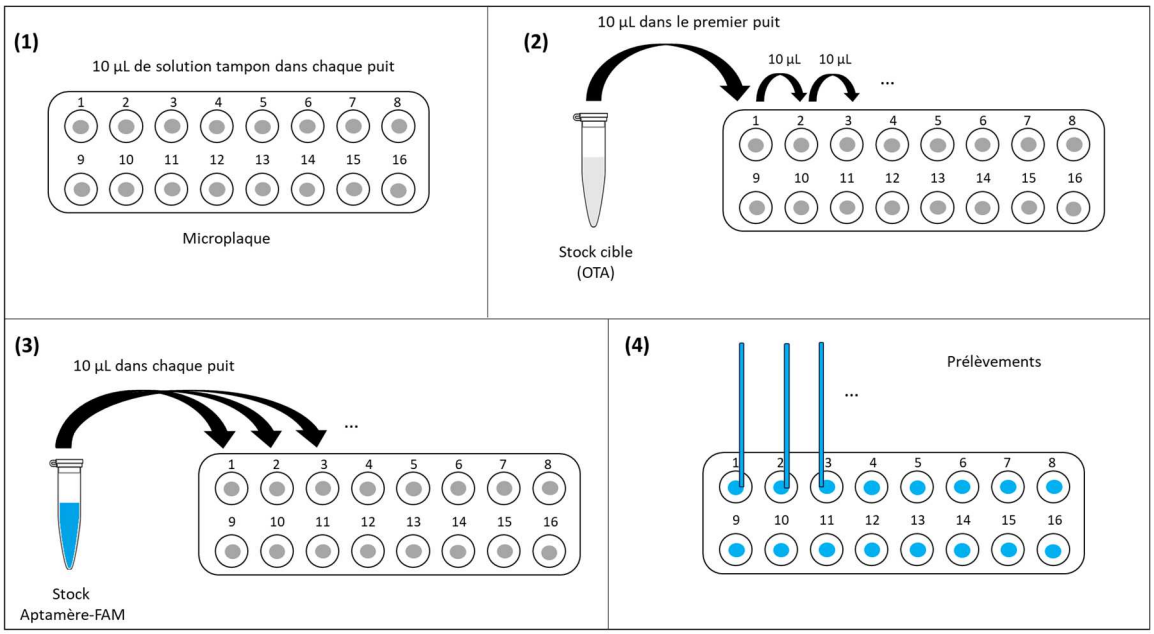


Figure 97: Protocole de préparation des échantillons permettant une dilution en cascade de l'analyte en présence d'une quantité constante de l'aptamère cible pour les analyses en MST

5) CONCLUSION

Les tests de conceptions des aptacapteurs avec aptamères marqués (MB ou complexes), spécifiques aux cibles estradiol, aflatoxine M1 et ochratoxine A, ont montré les mêmes difficultés que pour le genocapteur *Vibrio*. Les couplages entre aptamères et complexes/ligands ont réussi, mais le protocole doit encore être adapté pour mieux fonctionner.

Les analyses par thermophorèse à micro-échelle ont prouvé que les aptamères se lient bien à leurs cibles mais que lorsque que ces derniers sont marqués avec un complexe métallique les interactions varient grandement. Les recherches sur ces dernières parties (couplages et MST) sont toujours poursuivies à l'heure actuelle.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif de ce travail de thèse a été de proposer de nouveaux marqueurs électro-actifs comme alternatives aux marqueurs classiques souvent utilisés pour les biocapteurs d'affinité. Ces nouveaux marqueurs se devaient d'être appliqués dans le développement de différents biocapteurs (génocapteurs, aptacapteurs) électrochimiques pour la détection de multiples cibles, comme pour exemple l'ADN *Vibrio*, le 17β-estradiol, l'ochratoxine A et l'aflatoxine M1.

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur l'étude électrochimique de différents complexes métalliques formés avec pour base les ligands macrocycles DOTA (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique) et NOTA (acide 1,4,7-triazacyclononane-N, N, N-triacétique). Des complexes de fer, de cuivre, de nickel et de cobalt ont été formés, et après analyse, seuls les complexes de fer ont présenté des propriétés électrochimiques intéressantes. Nous avons alors réalisé en voltampérométrie cyclique une caractérisation des complexes de fer sur électrode de carbone vitreux et électrode de carbone sérigraphiée. En parallèle, une comparaison avec des composés de référence en électrochimie (ferricyanure et ferrocèneméthanol) a été effectuée. Ces complexes Fe(III)-DOTA et Fe(III)-NOTA ont exhibés de meilleures caractéristiques face aux produits de référence, confirmant ainsi leur importance et leur possible utilisation comme marqueurs redox de biomolécules.

Par la suite, nous avons souhaité appliquer ces complexes de fer comme marqueurs électrochimiques pour le développement d'un biocapteur ayant pour cible l'ARNr 16S de la bactérie *Vibrio*. Le capteur envisagé était un génocapteur avec méthode d'hybridation de type sandwich. Dans ce format un oligonucléotide devait agir comme sonde marqueur et posséder un double marquage (via la méthode de dichlorotetrazine) comprenant les complexes synthétisés.
Pour construire ce capteur, des électrodes de carbone sérigraphiées ont été fonctionnalisées par des groupements carboxyliques, pour permettre l'immobilisation via une fonction amide des oligonucléotides (modifiés par une groupement amine)). Chaque étape de fonctionnalisation des électrodes ainsi que la détection en présence de cible, a été caractérisée par spectroscopie d'impédance électrochimique en présence de ferricyanure. De multiples essais ont été réalisés avec divers changements de protocoles et de méthodes (prétraitement de cible, temps d'incubation, méthode d'immobilisation, densité d'oligonucléotides à la surface des SPCEs). Malheureusement nous avons rencontré des problèmes à la fois dans l'immobilisation des sondes captures et dans l'hybridation des oligonucléotides, ne nous permettant pas d'aboutir sur un biocapteur fonctionnel pour détecter *Vibrio*.

Face à ces incidents, nous avons opté pour un principe de détection plus simple, mettant en jeu des aptamères déjà décrits dans la littérature et utilisés au laboratoire dans des travaux de recherche antérieurs. En effet, les aptacapteurs électrochimiques fonctionnent par reconnaissance directe de la cible par un oligonucléotide, généralement immobilisé, ce qui permet de s'affranchir des étapes d'hybridation. Nous avons donc utilisé les complexes synthétisés pour marquer trois aptamères respectivement spécifiques du 17β-estradiol, de l'ochratoxine A et de l'aflatoxine M1. Pour ce faire, les aptamères ont été modifiés à l'une de leur extrémité avec un groupement thiol (SH) afin de permettre la fixation par auto-assemblage des complexes de fer préalablement modifiés par groupement maléimide. Ce type de couplage, déjà réalisé dans des travaux antérieurs, a été accompli après plusieurs optimisations et a été validé au travers d'analyses en LC-HRMS.

En parallèle de ces expérimentations, des tests de conception d'aptacapteurs pour les différentes molécules ciblées ont été réalisés en utilisant des électrodes sérigraphiées commerciales. Une étude préliminaire a été réalisée en remplaçant les marqueurs métalliques synthétisés par un marqueur de référence, le bleu de méthylène (MB). Cette étape a été réalisée afin de caractériser le comportement de chaque aptacapteur en présence des cibles de chaque aptamère. Les signaux électrochimiques ont été mesurés par DPV. Cette étude a montré que les aptamères marqués au MB étaient correctement immobilisés, mais malheureusement la détection de cible n'a pas pu être validée malgré de nombreuses tentatives d'optimisation.

Enfin pour terminer ce travail de thèse, nous avons voulu vérifier les interactions de couplage entre certains des aptamères et leurs cibles pour voir si un problème était présent avec les aptamères, ou encore avec les aptamères couplés aux complexes métalliques de fer. Quelques expérimentations ont pu être réalisées sur l'ochratoxine A et son aptamère complémentaire, indiquant que le couplage aptamère simple et cible se lient bien ensemble. D'autres tests concernant les aptamères (couplés ou non aux complexes métalliques) et cibles restantes sont encore en cours.

Pour valoriser ce travail de thèse, malgré les obstacles rencontrés, les complexes Fe(III)-DOTA et Fe(III)-NOTA pourront être utilisés pour le marquage de diverses molécules impliquées dans le développement de capteurs électrochimiques d'affinité, tels que des immunocapteurs. Nous pouvons envisager par exemple le marquage de dérivés d'antigènes (haptènes) couramment utilisés dans la mise en œuvre d'immunocapteurs électrochimiques à détection compétitive. Cela pourrait notamment être réalisé pour la détection de l'antibiotique enrofloxacine, dont la

détection par compétition avec un dérivé de difloxacine marqué au ferrocène a déjà été décrite [220].

Etant donné leurs caractéristiques, les complexes pourront aussi être utilisés à l'état libre comme médiateurs chimiques pour remplacer par exemple des produits comme le ferricyanure.

Une autre perspective serait de poursuivre l'étude en Thermophorèse du comportement des aptamères face à leurs cibles, lorsque ces derniers sont conjugués avec des complexes métalliques.

Les travaux concernant le double système de marquage par utilisation de la dichlorotétrazine cité précédemment restent également à réaliser et pourraient aboutir à des capteurs électrochimiques présentant une meilleure sensibilité.

RÉFÉRENCES

(1) Deroo, M. La pollution environnementale par les hormones oestrogéniques. Thèse de doctorat, 2018.

(2) *Emerging Issues in Water and Infectious Disease*; World health organization: Geneva, 2003.

(3) Richardson, S. D.; Ternes, T. A. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (1), 398–428.

(4) *Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau*; 2000; Vol. 327.

(5) Aubert, P.-H.; Audebert, P.; Roche, M.; Capdevielle, P.; Maumy, M.; Ricart, G. Synthesis and Electrochemical Investigations of Bis(Salen) Complex Precursors Allowing the Formation of a Ladder-Type Polymer. *Chem. Mater.* **2001**, *13* (6), 2223–2230.

(6) Ning, Y.; Jin, G.-Q.; Wang, M.-X.; Gao, S.; Zhang, J.-L. Recent Progress in Metal-Based Molecular Probes for Optical Bioimaging and Biosensing. *Current Opinion in Chemical Biology* **2022**, *66*, 102097.

(7) Da-Silva, E. Développement d'outils Analytiques Innovants Pour Le Suivi Des Populations de Vibrio Dans Les Environnements Aquatiques. Thèse de doctorat, Perpignan, 2017.

(8) Ben Jrad, A.; Kanso, H.; Raviglione, D.; Noguer, T.; Inguimbert, N.; Calas-Blanchard, C. Salen/Salan Metallic Complexes as Redox Labels for Electrochemical Aptasensors. *Chemical Communications* **2019**, *55* (85), 12821–12824.

(9) Ben Jrad, A. Nouvelles Sondes Électrochimiques Pour Le Marquage de Biocapteurs d'affinité. Thèse de doctorat, Perpignan, 2019.

(10) Clark, L. C.; Lyons, C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Ann N Y Acad Sci* **1962**, *102*, 29–45.

(11) Renneberg, R.; Pfeiffer, D.; Lisdat, F.; Wilson, G.; Wollenberger, U.; Ligler, F.; Turner, A. P. F. Frieder Scheller and the Short History of Biosensors. In *Biosensing for the 21st Century*; Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology; Springer: Berlin, Heidelberg, 2008; pp 1–18.

(12) Mehrotra, P. Biosensors and Their Applications – A Review. *J Oral Biol Craniofac Res* **2016**, *6* (2), 153–159.

(13) Kumar, J.; Nn, S.; Srinivas, S.; Khosla, A.; Krishna, R. H.; Chjeelenahalii, M. Review on Biosensors: Fundamentals, Classifications, Characteristics, Simulations, and Potential Applications. *ECS Transactions* **2022**, *107*, 13005–13029.

(14) Hassani, N. E. A. E. Conception et Réalisation de Capteurs et de Biocapteurs Électrochimiques à Base de Nanomatériaux pour le Contrôle de la Qualité en Agroalimentaire et pour l'Analyse Biomédicale. phdthesis, Université de Lyon ; Université Moulay Ismaïl (Meknès, Maroc). Faculté des sciences, 2018.

(15) Thevenot, D. R.; Tóth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. *Pure and Applied Chemistry* **1999**, *71* (12), 2333–2348.

(16) Marks, R.; Wiley-Blackwell (Firm). *Handbook of Biosensors and Biochips*; John Wiley: Chichester, Eng., 2007.

(17) Chambers, J. P.; Arulanandam, B. P.; Matta, L. L.; Weis, A.; Valdes, J. J. Biosensor Recognition Elements. *Curr Issues Mol Biol* **2008**, *10* (1–2), 1–12.

(18) Bousse, L. Whole Cell Biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **1996**, *34* (1), 270–275.

(19) Sołoducho, J. Electrochemical Nanosized Biosensors: Perspectives and Future of Biocatalysts. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques* **2013**, *S7*.

(20) Sukla, L.; Pradhan, N.; Panda, S.; Mishra, B. *Environmental Microbial Biotechnology*; 2015.

(21) Palomar, Q. Intégration de Matériaux Nanostructurés Dans La Conception et La Réalisation de Biocapteurs sans Marquage Pour La Détection de Cibles d'intérêt. Thèse de doctorat, Université Grenoble Alpes (ComUE), 2017.

(22) Ziegler, C. Cell-Based Biosensors. *Fresenius J Anal Chem* **2000**, *366* (6–7), 552–559.

(23) Yélamos, J. Chapter One - Current Innovative Engineered Antibodies. In *International Review of Cell and Molecular Biology*; Aranda, F., Berraondo, P., Galluzzi, L., Eds.; New Antibody Formats; Academic Press, 2022; Vol. 369, pp 1–43.

(24) Smaglo, B. G.; Aldeghaither, D.; Weiner, L. M. Antibody Therapy. In *Encyclopedia of Immunobiology*; Ratcliffe, M. J. H., Ed.; Academic Press: Oxford, 2016; pp 550–559.

(25) Bao, G.; Tang, M.; Zhao, J.; Zhu, X. Nanobody: A Promising Toolkit for Molecular Imaging and Disease Therapy. *EJNMMI Research* **2021**, *11* (1), 6.

(26) Haddache, F. Conception de biocapteurs à ADN photoélectrochimiques et impédancemétriques à base de polymères électrogénérés. phdthesis, Université Grenoble Alpes, 2015.

(27) Song, S.; Wang, L.; Li, J.; Fan, C.; Zhao, J. Aptamer-Based Biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2008**, *27* (2), 108–117.

(28) Lundin, K. E.; Højland, T.; Hansen, B. R.; Persson, R.; Bramsen, J. B.; Kjems, J.; Koch, T.; Wengel, J.; Smith, C. I. E. Biological Activity and Biotechnological Aspects of Locked Nucleic Acids. *Adv Genet* **2013**, *82*, 47–107.

(29) Gasser, G.; Sosniak, A. M.; Metzler-Nolte, N. Metal-Containing Peptide Nucleic Acid Conjugates. *Dalton Trans* **2011**, *40* (27), 7061–7076.

(30) Hagedorn, P. H.; Persson, R.; Funder, E. D.; Albæk, N.; Diemer, S. L.; Hansen, D. J.; Møller, M. R.; Papargyri, N.; Christiansen, H.; Hansen, B. R.; Hansen, H. F.; Jensen, M. A.; Koch, T. Locked Nucleic Acid: Modality, Diversity, and Drug Discovery. *Drug Discov Today* **2018**, *23* (1), 101–114.

(31) Ng, P.-S.; Bergstrom, D. E. Alternative Nucleic Acid Analogues for Programmable Assembly: Hybridization of LNA to PNA. *Nano Lett.* **2005**, *5* (1), 107–111.

(32) Pellestor, F.; Paulasova, P.; Macek, M.; Hamamah, S. The peptide nucleic acids (PNAs): "high-tech" probes for genetic and molecular cytogenetic investigations. *Med Sci (Paris)* **2005**, *21* (8–9), 753–758.

(33) Demidov, V. V. PNA and LNA Throw Light on DNA. *Trends Biotechnol* **2003**, *21* (1), 4–7.

(34) El-Schich, Z.; Zhang, Y.; Feith, M.; Beyer, S.; Sternbæk, L.; Ohlsson, L.; Stollenwerk, M.; Wingren, A. G. Molecularly Imprinted Polymers in Biological Applications. *BioTechniques* **2020**, *69* (6), 406–419.

(35) BelBruno, J. J. Molecularly Imprinted Polymers. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (1), 94–119.

(36) Liébana, S.; Drago, G. A. Bioconjugation and Stabilisation of Biomolecules in Biosensors. *Essays Biochem* **2016**, *60* (1), 59–68.

(37) Putzbach, W.; Ronkainen, N. J. Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Sensors (Basel)* **2013**, *13* (4), 4811–4840.

(38) Migliorini, E.; Weidenhaupt, M.; Picart, C. Practical Guide to Characterize Biomolecule Adsorption on Solid Surfaces (Review). *Biointerphases* **2018**, *13* (6), 06D303.

(39) Gill, I.; Ballesteros, A. Bioencapsulation within Synthetic Polymers (Part 1): Sol-Gel Encapsulated Biologicals. *Trends Biotechnol* **2000**, *18* (7), 282–296.

(40) Sutter, M.; Boehringer, D.; Gutmann, S.; Günther, S.; Prangishvili, D.; Loessner, M. J.; Stetter, K. O.; Weber-Ban, E.; Ban, N. Structural Basis of Enzyme Encapsulation into a Bacterial Nanocompartment. *Nat Struct Mol Biol* **2008**, *15* (9), 939–947.

(41) Dundas, C. M.; Demonte, D.; Park, S. Streptavidin-Biotin Technology: Improvements and Innovations in Chemical and Biological Applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **2013**, *97* (21), 9343–9353.

(42) Zhu, M.; Gong, X.; Hu, Y.; Ou, W.; Wan, Y. Streptavidin-Biotin-Based Directional Double Nanobody Sandwich ELISA for Clinical Rapid and Sensitive Detection of Influenza H5N1. *Journal of Translational Medicine* **2014**, *12* (1), 352.

(43) Roglans, A.; Pla-Quintana, A.; Moreno-Mañas, M. Diazonium Salts as Substrates in Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (11), 4622–4643.

(44) Puleo, D. A.; Kissling, R. A.; Sheu, M. S. A Technique to Immobilize Bioactive Proteins, Including Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4), on Titanium Alloy. *Biomaterials* **2002**, *23* (9), 2079–2087.

(45) Strianese, M.; Staiano, M.; Ruggiero, G.; Labella, T.; Pellecchia, C.; D'Auria, S. Fluorescence-Based Biosensors. *Methods Mol Biol* **2012**, *875*, 193–216.

(46) Roda, A.; Mirasoli, M.; Michelini, E.; Di Fusco, M.; Zangheri, M.; Cevenini, L.; Roda, B.; Simoni, P. Progress in Chemical Luminescence-Based Biosensors: A Critical Review. *Biosensors and Bioelectronics* **2016**, *76*, 164–179.

(47) Damborský, P.; Švitel, J.; Katrlík, J. Optical Biosensors. *Essays Biochem* **2016**, *60* (1), 91–100.

(48) Sawant, S. N. 13 - Development of Biosensors From Biopolymer Composites. In *Biopolymer Composites in Electronics*; Sadasivuni, K. K., Ponnamma, D., Kim, J., Cabibihan, J.-J., AlMaadeed, M. A., Eds.; Elsevier, 2017; pp 353–383.

(49) Hoß, S. G.; Bendas, G. Mass-Sensitive Biosensor Systems to Determine the Membrane Interaction of Analytes. *Methods Mol Biol* **2017**, *1520*, 145–157.

(50) Fourati, N.; Zerrouki, C. Microbalances à Quartz et Polymères à Empreintes Moléculaires Pour La Détection d'espèces Chimiques. État de l'art de 2010 à 2013. *Instrumentation Mesure Métrologie* **2013**, *13*, 9–37.

(51) Lim, H. J.; Saha, T.; Tey, B. T.; Tan, W. S.; Ooi, C. W. Quartz Crystal Microbalance-Based Biosensors as Rapid Diagnostic Devices for Infectious Diseases. *Biosens Bioelectron* **2020**, *168*, 112513.

(52) Alawad, A. Aptacapteurs Électrochimiques Pour Le Contrôle Environnemental de La Tétracycline et Ses Dérivés. Thèse de doctorat, Perpignan, 2019.

(53) Sin, M. L.; Mach, K. E.; Wong, P. K.; Liao, J. C. Advances and Challenges in Biosensor-Based Diagnosis of Infectious Diseases. *Expert Rev Mol Diagn* **2014**, *14* (2), 225–244.

(54) Grieshaber, D.; MacKenzie, R.; Vörös, J.; Reimhult, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors (Basel)* **2008**, *8* (3), 1400–1458.

(55) Luo, X.; Davis, J. J. Electrical Biosensors and the Label Free Detection of Protein Disease Biomarkers. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (13), 5944–5962.

(56) Kauffmann, J.-M. Électrochimie Analytique : Potentiels et Limitations | Mediachimie. *l'actualité chimique* **2015**, No. n° 400-401.

(57) Mousavisani, S. Z.; Raoof, J.-B.; Turner, A. P. F.; Ojani, R.; Mak, W. C. Label-Free DNA Sensor Based on Diazonium Immobilisation for Detection of DNA Damage in Breast Cancer 1 Gene. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2018**, *264*, 59–66.

(58) Sang, S.; Wang, Y.; Feng, Q.; Wei, Y.; Ji, J.; Zhang, W. Progress of New Label-Free Techniques for Biosensors: A Review. *Critical reviews in biotechnology* **2015**, *36*, 1–17.

(59) Bourigua, S.; El Ichi, S.; Korri-Youssoufi, H.; Maaref, A.; Dzyadevych, S.; Jaffrezic-Renault, N. Electrochemical Sensing of Trimethylamine Based on Polypyrrole-Flavin-Containing Monooxygenase (FMO3) and Ferrocene as Redox Probe for Evaluation of Fish Freshness. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, *28* (1), 105–111.

(60) Wang, R. E.; Zhang, Y.; Cai, J.; Cai, W.; Gao, T. Aptamer-Based Fluorescent Biosensors. *Curr Med Chem* **2011**, *18* (27), 4175–4184.

(61) Li, H.; Han, Y.; Zhao, H.; Jafri, H.; Tian, B. *Dyes as Labels in Biosensing*; IntechOpen, 2021.

(62) Syahir, A.; Usui, K.; Tomizaki, K.; Kajikawa, K.; Mihara, H. Label and Label-Free Detection Techniques for Protein Microarrays. *Microarrays (Basel)* **2015**, *4* (2), 228–244.

(63) Batchelor-McAuley, C.; Kätelhön, E.; Barnes, E. O.; Compton, R. G.; Laborda, E.; Molina, A. Recent Advances in Voltammetry. *ChemistryOpen* **2015**, *4* (3), 224–260.

(64) Sadik, O. A.; Aluoch, A. O.; Zhou, A. Status of Biomolecular Recognition Using Electrochemical Techniques. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24* (9), 2749–2765.

(65) Wilson, C. L.; Wilson, D. W. *Comprehensive Analytical Chemistry*; Elsevier Publishing Company, 1959; Vol. 29.

(66) Yalow, R. S.; Berson, S. A. Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods. *Nature* **1959**, *184* (4699), 1648–1649.

(67) Ong, S.-E.; Mann, M. A Practical Recipe for Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC). *Nat Protoc* **2006**, *1* (6), 2650–2660.

(68) Ireson, C. R.; Kelland, L. R. Discovery and Development of Anticancer Aptamers. *Molecular Cancer Therapeutics* **2006**, *5* (12), 2957–2962.

(69) Hayat, A.; Marty, J. L. Aptamer Based Electrochemical Sensors for Emerging Environmental Pollutants. *Frontiers in Chemistry* **2014**, *2*.

(70) Sassolas, A.; J. Blum, L.; D. Leca-Bouvier, B. Electrochemical Aptasensors. *Electroanalysis* **2009**, *21* (11), 1237.

(71) Tang, C.; Zou, Z.; Liang, T.; Yuan, C.; Gao, J.; Tang, K.; Li, C. M. Methylene Blue Intercalated Aptamer to Amplify Signals toward Sensitively Electrochemical Detection of Dopamine Released from Living Parkinson's Disease Model Cells. *Sensors and Actuators Reports* **2022**, *4*, 100080.

(72) Feng, K.; Sun, C.; Kang, Y.; Chen, J.; Jiang, J.-H.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q. Label-Free Electrochemical Detection of Nanomolar Adenosine Based on Target-Induced Aptamer Displacement. *Electrochemistry Communications* **2008**, *10* (4), 531–535.

(73) Raouafi, A.; Sánchez, A.; Raouafi, N.; Villalonga, R. Electrochemical Aptamer-Based Bioplatform for Ultrasensitive Detection of Prostate Specific Antigen. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2019**, *297*, 126762.

(74) Abedi, R.; Bakhsh Raoof, J.; Mohseni, M.; Bagheri Hashkavayi, A. Sandwich-Type Electrochemical Aptasensor for Highly Sensitive and Selective Detection of Pseudomonas Aeruginosa Bacteria Using a Dual Signal Amplification Strategy. *Bioelectrochemistry* **2023**, *150*, 108332.

(75) Wu, L.; Qi, P.; Fu, X.; Liu, H.; Li, J.; Wang, Q.; Fan, H. A Novel Electrochemical PCB77-Binding DNA Aptamer Biosensor for Selective Detection of PCB77. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2016**, *771*, 45–49.

(76) Zuo, X.; Song, S.; Zhang, J.; Pan, D.; Wang, L.; Fan, C. A Target-Responsive Electrochemical Aptamer Switch (TREAS) for Reagentless Detection of Nanomolar ATP. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (5), 1042–1043.

(77) Yoshizumi, J.; Kumamoto, S.; Nakamura, M.; Yamana, K. Target-Induced Strand Release (TISR) from Aptamer–DNA Duplex: A General Strategy for Electronic Detection of Biomolecules Ranging from a Small Molecule to a Large Protein. *Analyst* **2008**, *133* (3), 323–325.

(78) Sadani, K.; Nag, P.; Thian, X. Y.; Mukherji, S. Enzymatic Optical Biosensors for Healthcare Applications. *Biosensors and Bioelectronics: X* **2022**, *12*, 100278.

(79) Alvarado-Ramírez, L.; Rostro-Alanis, M.; Rodríguez-Rodríguez, J.; Sosa-Hernández, J. E.; Melchor-Martínez, E. M.; Iqbal, H. M. N.; Parra-Saldívar, R. Enzyme (Single and Multiple) and Nanozyme Biosensors: Recent Developments and Their Novel Applications in the Water-Food-Health Nexus. *Biosensors* **2021**, *11* (11), 410.

(80) Liu, L. Electrochemical Biosensors with Electrocatalysts Based on Metallic Nanomaterials as Signal Labels. *International Journal of Electrochemical Science* **2018**, *13*, 10496–10513.

(81) Koyappayil, A.; Lee, M.-H. Ultrasensitive Materials for Electrochemical Biosensor Labels. *Sensors (Basel)* **2020**, *21* (1), 89.

(82) Tatsuma, Tetsu.; Okawa, Yusuke.; Watanabe, Tadashi. Enzyme Monolayer- and Bilayer-Modified Tin Oxide Electrodes for the Determination of Hydrogen Peroxide and Glucose. *Anal. Chem.* **1989**, *61* (21), 2352–2355.

(83) Feizabadi, M.; Soleymanpour, A.; Faridnouri, H.; Ajloo, D. Improving Stability of Biosensor Based on Covalent Immobilization of Horseradish Peroxidase by γ-Aminobutyric Acid and Application in Detection of H2O2. *International Journal of Biological Macromolecules* **2019**, *136*, 597–606.

(84) Shen, G.; Zhang, S.; Shen, G.; Yu, R. Development of an Electrochemical Aptasensor for Thrombin Based on Aptamer/Pd–AuNPs/HRP Conjugates. *Anal. Methods* **2016**, *8* (10), 2150–2155.

(85) Balbaied, T.; Moore, E. Overview of Optical and Electrochemical Alkaline Phosphatase (ALP) Biosensors: Recent Approaches in Cells Culture Techniques. *Biosensors (Basel)* **2019**, *9* (3), 102.

(86) Shaban, S. M.; Moon, B.-S.; Pyun, D.-G.; Kim, D.-H. A Colorimetric Alkaline Phosphatase Biosensor Based on P-Aminophenol-Mediated Growth of Silver Nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2021**, *205*, 111835.

(87) Papamichael, K. I.; Kreuzer, M. P.; Guilbault, G. G. Viability of Allergy (IgE) Detection Using an Alternative Aptamer Receptor and Electrochemical Means. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, *121* (1), 178–186.

(88) Safari, M. *Recent Advances in Quantum Dots-Based Biosensors*; IntechOpen, 2022.

(89) Singh, R. D.; Shandilya, R.; Bhargava, A.; Kumar, R.; Tiwari, R.; Chaudhury, K.; Srivastava, R. K.; Goryacheva, I. Y.; Mishra, P. K. Quantum Dot Based Nano-Biosensors for Detection of Circulating Cell Free miRNAs in Lung Carcinogenesis: From Biology to Clinical Translation. *Frontiers in Genetics* **2018**, *9*.

(90) Ghaderi, S.; Ramesh, B.; Seifalian, A. M. Fluorescence Nanoparticles "Quantum Dots" as Drug Delivery System and Their Toxicity: A Review. *Journal of Drug Targeting* **2011**, *19* (7), 475–486.

(91) Biju, V.; Itoh, T.; Ishikawa, M. Delivering Quantum Dots to Cells: Bioconjugated Quantum Dots for Targeted and Nonspecific Extracellular and Intracellular Imaging. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (8), 3031–3056.

(92) Holzinger, M.; Le Goff, A.; Cosnier, S. Nanomaterials for Biosensing Applications: A Review. *Frontiers in Chemistry* **2014**, *2*.

(93) Le, N.; Zhang, M.; Kim, K. Quantum Dots and Their Interaction with Biological Systems. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23* (18), 10763.

(94) Sahu, A.; Kumar, D. Core-Shell Quantum Dots: A Review on Classification, Materials, Application, and Theoretical Modeling. *Journal of Alloys and Compounds* **2022**, *924*, 166508.

(95) Galiyeva, P. Doped Ag-In-Zn-S and Ag-In-Ga-Zn-S QDs : Synthesis and Potential as Dual-Modality Probes for Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging of Cells. Thèse, Université de Lorraine, 2021.

(96) Karadurmus, L.; Ozcelikay, G.; Vural, S.; Ozkan, S. A. An Overview on Quantum Dot-Based Nanocomposites for Electrochemical Sensing on Pharmaceutical Assay. *Innov J Pharm Res* **2021**, *20* (3), 187–203.

(97) Zhu, L.; Yang, B.; Qian, K.; Qiao, L.; Liu, Y.; Liu, B. Sensitive Electrochemical Aptasensor for Detecting EpCAM with Silica Nanoparticles and Quantum Dots for Signal Amplification. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2020**, *856*, 113655.

(98) Iglesias-Mayor, A.; Amor-Gutiérrez, O.; Costa-García, A.; de la Escosura-Muñiz, A. Nanoparticles as Emerging Labels in Electrochemical Immunosensors. *Sensors (Basel)* **2019**, *19* (23), 5137.

(99) Wang, X.; Lu, D.; Liu, Y.; Wang, W.; Ren, R.; Li, M.; Liu, D.; Liu, Y.; Liu, Y.; Pang, G. Electrochemical Signal Amplification Strategies and Their Use in Olfactory and Taste Evaluation. *Biosensors (Basel)* **2022**, *12* (8), 566.

(100) Liu, L. Electrochemical Biosensors with Electrocatalysts Based on Metallic Nanomaterials as Signal Labels. *International Journal of Electrochemical Science* **2018**, *13*, 10496–10513.

(101) Naghshbandi, B.; Adabi, M.; Pooshang Bagheri, K.; Tavakolipour, H. Design of a New Electrochemical Aptasensor Based on Screen Printed Carbon Electrode Modified with Gold Nanoparticles for the Detection of Fumonisin B1 in Maize Flour. *Journal of Nanobiotechnology* **2023**, *20* (1), 534.

(102) Jiang, Y.; Shi, M.; Liu, Y.; Wan, S.; Cui, C.; Zhang, L.; Tan, W. Aptamer/AuNP Biosensor for Colorimetric Profiling of Exosomal Proteins. *Angew Chem Int Ed Engl* **2017**, *56* (39), 11916–11920.

(103) Geagea, R.; Aubert, P.-H.; Banet, P.; Sanson, N. Signal Enhancement of Electrochemical Biosensors via Direct Electrochemical Oxidation of Silver Nanoparticle Labels Coated with Zwitterionic Polymers. *Chem. Commun.* **2014**, *51* (2), 402–405.

(104) Janssen, J.; Lambeta, M.; White, P.; Byagowi, A. Carbon Nanotube-Based Electrochemical Biosensor for Label-Free Protein Detection. *Biosensors* **2019**, *9* (4), 144.

(105) Zhu, Z. An Overview of Carbon Nanotubes and Graphene for Biosensing Applications. *Nano-Micro Lett.* **2017**, *9* (3), 25.

(106) Guo, K.; Wang, Y.; Chen, H.; Ji, J.; Zhang, S.; Kong, J.; Liu, B. An Aptamer–SWNT Biosensor for Sensitive Detection of Protein via Mediated Signal Transduction. *Electrochemistry Communications* **2011**, *13* (7), 707–710.

(107) Bonanni, A.; Chua, C. K.; Zhao, G.; Sofer, Z.; Pumera, M. Inherently Electroactive Graphene Oxide Nanoplatelets As Labels for Single Nucleotide Polymorphism Detection. *ACS Nano* **2012**, *6* (10), 8546–8551.

(108) Erdem, A.; Kerman, K.; Meric, B.; Ozsoz, M. Methylene Blue as a Novel Electrochemical Hybridization Indicator. *Electroanalysis* **2001**, *13* (3), 219–223.

(109) Silvestrini, M.; Fruk, L.; Moretto, L. M.; Ugo, P. Detection of DNA Hybridization by Methylene Blue Electrochemistry at Activated Nanoelectrode Ensembles. *J Nanosci Nanotechnol* **2015**, *15* (5), 3437–3442.

(110) Catanante, G.; Mishra, R. K.; Hayat, A.; Marty, J.-L. Sensitive Analytical Performance of Folding Based Biosensor Using Methylene Blue Tagged Aptamers. *Talanta* **2016**, *153*, 138–144.

(111) Wang, C.; Zhao, Q. A Reagentless Electrochemical Sensor for Aflatoxin B1 with Sensitive Signal-on Responses Using Aptamer with Methylene Blue Label at Specific Internal Thymine. *Biosensors and Bioelectronics* **2020**, *167*, 112478.

(112) Kang, D.; Ricci, F.; White, R. J.; Plaxco, K. W. Survey of Redox-Active Moieties for Application in Multiplexed Electrochemical Biosensors. *Anal Chem* **2016**, *88* (21), 10452–10458.

(113) Zarren, G.; Nisar, B.; Sher, F. Synthesis of Anthraquinone-Based Electroactive Polymers: A Critical Review. *Materials Today Sustainability* **2019**, *5*, 100019.

(114) Manusha, P.; Theyagarajan, K.; Elancheziyan, M.; Shankar, H.; Thenmozhi, K.; Senthilkumar, S. Anthraquinone Functionalized Ionic Liquid Based Disposable Electrochemical Sensor for the Enzyme-Free Detection of Hydrogen Peroxide. *ECS Sens. Plus* **2022**, *1* (3), 033601.

(115) Kongpeth, J.; Jampasa, S.; Chaumpluk, P.; Chailapakul, O.; Vilaivan, T. Immobilization-Free Electrochemical DNA Detection with Anthraquinone-Labeled Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid Probe. *Talanta* **2016**, *146*, 318–325.

(116) Castaño-Guerrero, Y.; Romaguera-Barcelay, Y.; Moreira, F. T. C.; Brito, W. R.; Fortunato, E.; Sales, M. G. F. Poly(Thionine)-Modified Screen-Printed Electrodes for CA 19-9 Detection and Its Properties in Raman Spectroscopy. *Chemosensors* **2022**, *10* (3), 92.

(117) Portaccio, M.; Di Tuoro, D.; Arduini, F.; Lepore, M.; Mita, D. G.; Diano, N.; Mita, L.; Moscone, D. A Thionine-Modified Carbon Paste Amperometric Biosensor for Catechol and Bisphenol A Determination. *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, *25* (9), 2003–2008.

(118) Li, Q.; Zhang, J.; Yan, H.; He, M.; Liu, Z. Thionine-Mediated Chemistry of Carbon Nanotubes. *Carbon* **2004**, *42* (2), 287–291.

(119) Shervedani, R. K.; Amini, A. Preparation of Graphene/Nile Blue Nanocomposite: Application for Oxygen Reduction Reaction and Biosensing. *Electrochimica Acta* **2015**, *173*, 354–363.

(120) Chandrappa, H.; Bhajantri, R. F.; Mahantesha, B. K.; Ravindrachary, V.; Chalawadi, S. Physico-Chemical Properties of PVA-Nile Blue (C20H20ClN3O) Polymer Composite Structures for γ-Ray Protection: A Comparative γ-Ray Irradiation Studies. *Radiation Physics and Chemistry* **2021**, *184*, 109481.

(121) Nasri, Z.; Shams, E.; Ahmadi, M. A Glucose Biosensor Based on Direct Attachment of in Situ Generated Nile Blue Diazonium Cations to the Electrode Surface. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2013**, *703*, 146–152.

(122) Aboul-Enein, H.; Stefan, R.-I.; Van Staden, J. (Koos). Chemiluminescence-Based (Bio)Sensors — An Overview. *Critical Reviews in Analytical Chemistry - CRIT REV ANAL CHEM* **1999**, *29*, 323–331.

(123) Zhang, R.; Yuan, J. Responsive Metal Complex Probes for Time-Gated Luminescence Biosensing and Imaging. *Acc. Chem. Res.* **2020**, *53* (7), 1316–1329.

(124) Li, F.; Chen, W.; Tang, C.; Zhang, S. Recent Development of Interaction of Transition Metal Complexes with DNA Based on Biosensor and Its Applications. *Talanta* **2008**, *77* (1), 1–8.

(125) Ornelas, C. Application of Ferrocene and Its Derivatives in Cancer Research. *New J. Chem.* **2011**, *35* (10), 1973–1985.

(126) Anne, A.; Blanc, B.; Moiroux, J. Synthesis of the First Ferrocene-Labeled Dideoxynucleotide and Its Use for 3'-Redox End-Labeling of 5'-Modified Single-Stranded Oligonucleotides. *Bioconjug Chem* **2001**, *12* (3), 396–405.

(127) Li, T.; Yang, M. Electrochemical Sensor Utilizing Ferrocene Loaded Porous Polyelectrolyte Nanoparticles as Label for the Detection of Protein Biomarker IL-6. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2011**, *158* (1), 361–365.

(128) Ferapontova, E. E.; Gothelf, K. V. Effect of Serum on an RNA Aptamer-Based Electrochemical Sensor for Theophylline. *Langmuir* **2009**, *25* (8), 4279–4283.

(129) Rudewicz-Kowalczyk, D.; Grabowska, I. Antibody-Ferrocene Conjugates as a Platform for Electro-Chemical Detection of Low-Density Lipoprotein. *Molecules* **2022**, *27* (17), 5492.

(130) Sui, C.; Zhou, Y.; Wang, M.; Yin, H.; Wang, P.; Ai, S. Aptamer-Based Photoelectrochemical Biosensor for Antibiotic Detection Using Ferrocene Modified DNA as Both Aptamer and Electron Donor. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2018**, *266*, 514–521.

(131) Ferapontova, E. E.; Olsen, E. M.; Gothelf, K. V. An RNA Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Detection of Theophylline in Serum. *J Am Chem Soc* **2008**, *130* (13), 4256–4258.

(132) Mokhnache, K.; Karbab, A.; Noureddine, C. SCHIFF BASES : CLASSIFICATION AND APPLICATIONS LES BASES DE SCHIFF : CLASSIFICATION ET APPLICATIONS. **2020**, *19*, 16–22.

(133) Alfonso, M.; Garrido, E.; Sancenón, F.; Martínez-Máñez, R. Metal Complexes as Sensors. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*; 2020.

(134) Oiye, É. N.; Ribeiro, M. F. M.; Katayama, J. M. T.; Tadini, M. C.; Balbino, M. A.; Eleotério, I. C.; Magalhães, J.; Castro, A. S.; Silva, R. S. M.; da Cruz Júnior, J. W.; Dockal, E. R.; de Oliveira, M. F. Electrochemical Sensors Containing Schiff Bases and Their Transition Metal Complexes to Detect Analytes of Forensic, Pharmaceutical and Environmental Interest. A Review. *Crit Rev Anal Chem* **2019**, *49* (6), 488–509.

(135) Parsaei, M.; Asadi, Z.; Khodadoust, S. A Sensitive Electrochemical Sensor for Rapid and Selective Determination of Nitrite Ion in Water Samples Using Modified Carbon Paste Electrode with a Newly Synthesized Cobalt(II)-Schiff Base Complex and Magnetite Nanospheres. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, *220*, 1131–1138.

(136) Kanso, H.; Inguimbert, N.; Barthelmebs, L.; Istamboulie, G.; Thomas, F.; Calas-Blanchard, C.; Noguer, T. Oxovanadium–Salen and –Salan Complexes as Effective Labels for Electrochemical Immunosensing: A Case Study for Estradiol Detection. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (14), 1658–1661.

(137) Uma Maheswari, P.; Rajendiran, V.; Stoeckli-Evans, H.; Palaniandavar, M. Interaction of Rac-[Ru(5,6-Dmp)3]2+ with DNA: Enantiospecific DNA Binding and Ligand-Promoted Exciton Coupling. *Inorg. Chem.* **2006**, *45* (1), 37–50.

(138) Connell, T. U.; Donnelly, P. S. Labelling Proteins and Peptides with Phosphorescent D6 Transition Metal Complexes. *Coordination Chemistry Reviews* **2018**, *375*, 267–284.

(139) Canovas, C.; Moreau, M.; Bernhard, C.; Oudot, A.; Guillemin, M.; Denat, F.; Goncalves, V. Site-Specific Dual Labeling of Proteins on Cysteine Residues with Chlorotetrazines. *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57* (33), 10646–10650.

(140) Tenório-Daussat, C. L.; Hauser-Davis, R. A.; Saint'Pierre, T. D.; Tholey, A.; Schaumlöffel, D. Peptide Labeling with Lanthanide-NHS-Ester-DOTA Investigated by Nano-HPLC. *Microchemical Journal* **2015**, *118*, 238–241.

(141) Wängler, C.; Schäfer, M.; Schirrmacher, R.; Bartenstein, P.; Wängler, B. DOTA Derivatives for Site-Specific Biomolecule-Modification via Click Chemistry: Synthesis and Comparison of Reaction Characteristics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19* (12), 3864–3874.

(142) Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*; Academic Press, 2010.

(143) Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Marques, M. P. M.; Geraldes, C. F. G. C.; Pubanz, D.; Merbach, A. E. Conformational and Coordination Equilibria on DOTA Complexes of Lanthanide Metal Ions in Aqueous Solution Studied by (1)H-NMR Spectroscopy. *Inorg Chem* **1997**, *36* (10), 2059–2068.

(144) Viola-Villegas, N.; Doyle, R. P. The Coordination Chemistry of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-N,N′,N″,N‴-Tetraacetic Acid (H4DOTA): Structural Overview and Analyses on Structure–Stability Relationships. *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, *253* (13), 1906–1925.

(145) Hatfield, T. L.; Staples, R. J.; Pierce, D. T. Structure Change Associated with the [MII/III 1,4,7-Triazacyclononane-N,N′,N″-Triacetate (TCTA)]−/0 Electron Transfers (M = Mn, Fe, and Ni): Crystal Structure for [FeII(H2O)6][FeII(TCTA)]2. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (20), 9312–9320.

(146) Chang, C. A.; Francesconi, L. C.; Malley, M. F.; Kumar, K.; Gougoutas, J. Z.; Tweedle, M. F.; Lee, D. W.; Wilson, L. J. Synthesis, Characterization, and Crystal Structures of M(DO3A) (M = Iron, Gadolinium) and Na[M(DOTA)] (M = Fe, Yttrium, Gd). *Inorg. Chem.* **1993**, *32* (16), 3501–3508.

(147) Byegård, J.; Skarnemark, G.; Skålberg, M. The Stability of Some Metal EDTA, DTPA and DOTA Complexes: Application as Tracers in Groundwater Studies. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **2006**, *241* (2), 281–290.

(148) Brichart, T. Traceurs fluorescents à base de lanthanides en milieu complexe. phdthesis, Université Claude Bernard - Lyon I, 2014.

(149) Bertrand, B.; Passador, K.; Goze, C.; Denat, F.; Bodio, E.; Salmain, M. Metal-Based BODIPY Derivatives as Multimodal Tools for Life Sciences. *Coordination Chemistry Reviews* **2018**, *358*, 108–124.

(150) Bernhard, C.; Goze, C.; Rousselin, Y.; Denat, F. First Bodipy–DOTA Derivatives as Probes for Bimodal Imaging. *Chem. Commun.* **2009**, *46* (43), 8267–8269.

(151) Tolmachev, V.; Yim, C.-B.; Rajander, J.; Perols, A.; Karlström, A. E.; Haaparanta-Solin, M.; Grönroos, T. J.; Solin, O.; Orlova, A. Comparative Evaluation of Anti-HER2 Affibody Molecules Labeled with 64Cu Using NOTA and NODAGA. *Contrast Media Mol Imaging* **2017**, *2017*.

(152) Baranyai, Z.; Reich, D.; Vágner, A.; Weineisen, M.; Tóth, I.; Wester, H.-J.; Notni, J. A Shortcut to High-Affinity Ga-68 and Cu-64 Radiopharmaceuticals: One-Pot Click Chemistry Trimerisation on the TRAP Platform. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (24), 11137–11146.

(153) Breeman, W. A. P.; de Blois, E.; Sze Chan, H.; Konijnenberg, M.; Kwekkeboom, D. J.; Krenning, E. P. 68Ga-Labeled DOTA-Peptides and 68Ga-Labeled Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography: Current Status of Research, Clinical Applications, and Future Perspectives. *Seminars in Nuclear Medicine* **2011**, *41* (4), 314–321.

(154) Romero, E.; Martínez, A.; Oteo, M.; García, A.; Morcillo, M. A. Preparation of 68Ga-Labelled DOTA-Peptides Using a Manual Labelling Approach for Small-Animal PET Imaging. *Applied Radiation and Isotopes* **2016**, *107*, 113–120.

(155) Paganelli, G.; Sansovini, M.; Ambrosetti, A.; Severi, S.; Monti, M.; Scarpi, E.; Donati, C.; Ianniello, A.; Matteucci, F.; Amadori, D. 177 Lu-Dota-Octreotate Radionuclide Therapy of Advanced Gastrointestinal Neuroendocrine Tumors: Results from a Phase II Study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2014**, *41* (10), 1845–1851.

(156) Paganelli, G.; Sansovini, M.; Nicolini, S.; Grassi, I.; Ibrahim, T.; Amadori, E.; Di Iorio, V.; Monti, M.; Scarpi, E.; Bongiovanni, A.; Altini, M.; Urso, L.; Cittanti, C.; Matteucci, F.; Severi, S. 177Lu-PRRT in Advanced Gastrointestinal Neuroendocrine Tumors: 10-Year Follow-up of the IRST Phase II Prospective Study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2021**, *48* (1), 152–160.

(157) Adeowo, F. Y.; Honarparvar, B.; Skelton, A. A. The Interaction of NOTA as a Bifunctional Chelator with Competitive Alkali Metal Ions: A DFT Study. *RSC Adv.* **2016**, *6* (83), 79485–79496.

(158) Parus, J.; Pawlak, D.; Mikolajczak, R.; Duatti, A. Chemistry and Bifunctional Chelating Agents for Binding ^{177}Lu. *CRP* **2015**, *8* (2), 86–94.

(159) Lattuada, L.; Barge, A.; Cravotto, G.; Giovenzana, G. B.; Tei, L. The Synthesis and Application of Polyamino Polycarboxylic Bifunctional Chelating Agents. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (5), 3019–3049.

(160) Petrov, S. A.; Zyk, N. Y.; Machulkin, A. E.; Beloglazkina, E. K.; Majouga, A. G. PSMA-Targeted Low-Molecular Double Conjugates for Diagnostics and Therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, *225*, 113752.

(161) Xu, X.; Liu, T.; Liu, F.; Guo, X.; Xia, L.; Xie, Q.; Li, N.; Huang, H.; Yang, X.; Xin, Y.; Zhu, H.; Yang, Z. Synthesis and Evaluation of 64Cu-Radiolabeled NOTA-Cetuximab (64Cu-NOTA-C225) for Immuno-PET Imaging of EGFR Expression. *Chin J Cancer Res* **2019**, *31* (2), 400–409.

(162) Lee, J. Y.; Jeong, J. M.; Kim, Y. J.; Jeong, H.-J.; Lee, Y.-S.; Lee, D. S.; Chung, J.-K. Preparation of Ga-68-NOTA as a Renal PET Agent and Feasibility Tests in Mice. *Nuclear Medicine and Biology* **2014**, *41* (2), 210–215.

(163) Wieghardt, Karl.; Bossek, Ursula.; Chaudhuri, Phalguni.; Herrmann, Willy.; Menke, B. C.; Weiss, Johannes. 1,4,7-Triazacyclononane-N,N',N''-Triacetate (TCTA), a New Hexadentate Ligand for Divalent and Trivalent Metal Ions. Crystal Structures of [CrIII(TCTA)], [FeIII(TCTA)], and Na[CuII(TCTA)].Bul.2NaBr.Bul.8H2O. *Inorg. Chem.* **1982**, *21* (12), 4308–4314.

(164) Castro, B. de; Gomes, J.; Marques, M. P. M.; Geraldes, C. F. G. C. Formation and Decomposition Study of Electrochemically-Generated Nickel(III)–Nota Complexes in Aqueous Solution (Nota3–= 1,4,7-Triazacyclononane-N,N′,N″-Triacetate). *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1995**, No. 12, 2041–2044.

(165) Dixon, D. A.; Shang, M.; Lappin, A. G. Effects of Electronic Structure on Chiral Induction in Outer-Sphere Electron Transfer Reactions of Complexes with the C3 Symmetric Ligand, 1,4,7-Triazacyclononane-1,4,7-Tris[2'(R)-2'-Propionate](-3). *Inorganica Chimica Acta* **1999**, *290* (2), 197–206.

(166) Alirezapour, B.; Rasaee, M. J.; Jalilian, A. R.; Rajabifar, S.; Mohammadnejad, J.; Paknejad, M.; Maadi, E.; Moradkhani, S. Development of [64Cu]-DOTA-PR81 Radioimmunoconjugate for MUC-1 Positive PET Imaging. *Nuclear Medicine and Biology* **2016**, *43* (1), 73–80.

(167) Clarke, E. T.; Martell, A. E. Stabilities of the Fe(III), Ga(III) and In(III) Chelates of N,N′,N″-Triazacyclononanetriacetic Acid. *Inorganica Chimica Acta* **1991**, *181* (2), 273–280.

(168) Audras, M. Caractérisation structurale de complexes d'actinides (III) et (IV) par le ligand DOTA. phdthesis, Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2014.

(169) Scholz, F. Voltammetric Techniques of Analysis: The Essentials. *ChemTexts* **2015**, *1* (4), 17.

(170) Elgrishi, N.; Rountree, K. J.; McCarthy, B. D.; Rountree, E. S.; Eisenhart, T. T.; Dempsey, J. L. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* **2018**, *95* (2), 197–206.

(171) Rezaei, B.; Irannejad, N. Chapter 2 - Electrochemical Detection Techniques in Biosensor Applications. In *Electrochemical Biosensors*; Ensafi, A. A., Ed.; Elsevier, 2019; pp 11–43.

(172) Alawad, A.; Istamboulié, G.; Calas-Blanchard, C.; Noguer, T. A Reagentless Aptasensor Based on Intrinsic Aptamer Redox Activity for the Detection of Tetracycline in Water. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2019**, *288*, 141–146.

(173) Surribas, A.; Barthelmebs, L.; Noguer, T. Monoclonal Antibody-Based Immunosensor for the Electrochemical Detection of Chlortoluron Herbicide in Groundwaters. *Biosensors* **2021**, *11* (12), 513.

(174) Shoair, A. F.; El-Bindary, A. A.; El-Ghamaz, N. A.; Rezk, G. N. Synthesis, Characterization, DNA Binding and Antitumor Activities of Cu(II) Complexes. *Journal of Molecular Liquids* **2018**, *269*, 619–638.

(175) Thompson, F. L.; Austin, B.; Swings, J. G. *The Biology of Vibrios*; 2006.

(176) Baker-Austin, C.; Oliver, J. D.; Alam, M.; Ali, A.; Waldor, M. K.; Qadri, F.; Martinez-Urtaza, J. Vibrio Spp. Infections. *Nat Rev Dis Primers* **2018**, *4* (1), 1–19.

(177) Romalde, J.; Diéguez, A.; Lasa, A.; Balboa, S. New Vibrio Species Associated to Molluscan Microbiota: A Review. *Frontiers in Microbiology* **2014**, *4*.

(178) Baker-Austin, C.; Trinanes, J. A.; Salmenlinna, S.; Löfdahl, M.; Siitonen, A.; Taylor, N. G. H.; Martinez-Urtaza, J. Heat Wave–Associated Vibriosis, Sweden and Finland, 2014. *Emerg Infect Dis* **2016**, *22* (7), 1216–1220.

(179) Beaz-Hidalgo, R.; Balboa, S.; Romalde, J. L.; Figueras, M. J. Diversity and Pathogenecity of Vibrio Species in Cultured Bivalve Molluscs. *Environmental Microbiology Reports* **2010**, *2* (1), 34–43.

(180) Da-Silva, E.; Baudart, J.; Barthelmebs, L. Biosensing Platforms for Vibrio Bacteria Detection Based on Whole Cell and Nucleic Acid Analysis: A Review. *Talanta* **2018**, *190*, 410–422.

(181) Samain, J.-F.; McCombie, H. *Summer Mortality of Pacific Oyster Crassostrea Gigas: The Morest Project*; Editions Quae, 2008.

(182) A, B. J. Diseases of Crustacea. Diseases Caused by Microorganisms. *Diseases of marine animals* **1990**, *0*, 245–349.

(183) Miura, D.; Asano, R. Biosensors: Immunosensors. In *Reference Module in Biomedical Sciences*; Elsevier, 2021.

(184) Magar, H. S.; Hassan, R. Y. A.; Mulchandani, A. Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): Principles, Construction, and Biosensing Applications. *Sensors (Basel)* **2021**, *21* (19), 6578.

(185) Barker, G. C.; Gardner, A. W. Pulse Polarography. *Z. Anal. Chem.* **1960**, *173* (1), 79–83.

(186) Scott, K. 2 - Electrochemical Principles and Characterization of Bioelectrochemical Systems. In *Microbial Electrochemical and Fuel Cells*; Scott, K., Yu, E. H., Eds.; Woodhead Publishing: Boston, 2016; pp 29–66.

(187) Wang, X.; Lim, H. J.; Son, A. Characterization of Denaturation and Renaturation of DNA for DNA Hybridization. *Environ Health Toxicol* **2014**, *29*, e2014007.

(188) Yu, Z.-W.; Quinn, P. J. Dimethyl Sulphoxide: A Review of Its Applications in Cell Biology. *Bioscience Reports* **1994**, *14* (6), 259–281.

(189) Wang, Y.; Feng, J.; Tan, Z.; Wang, H. Electrochemical Impedance Spectroscopy Aptasensor for Ultrasensitive Detection of Adenosine with Dual Backfillers. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, *60*, 218–223.

(190) Alsager, O. A.; Kumar, S.; Zhu, B.; Travas-Sejdic, J.; McNatty, K. P.; Hodgkiss, J. M. Ultrasensitive Colorimetric Detection of 17β-Estradiol: The Effect of Shortening DNA Aptamer Sequences. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (8), 4201–4209.

(191) Gokce, G.; Ben Aissa, S.; Nemcekova, K.; Catanante, G.; Raouafi, N.; Marty, J. Aptamer-Modified Pencil Graphite Electrodes for the Impedimetric Determination of Ochratoxin A. *Food Control* **2020**, 107271.

(192) Mishra, R. K.; Hayat, A.; Catanante, G.; Istamboulie, G.; Marty, J.-L. Sensitive Quantitation of Ochratoxin A in Cocoa Beans Using Differential Pulse Voltammetry Based Aptasensor. *Food Chemistry* **2016**, *192*, 799–804.

(193) Beitollahi, H.; Tajik, S.; Dourandish, Z.; Zhang, K.; Le, Q. V.; Jang, H. W.; Kim, S. Y.; Shokouhimehr, M. Recent Advances in the Aptamer-Based Electrochemical Biosensors for Detecting Aflatoxin B1 and Its Pertinent Metabolite Aflatoxin M1. *Sensors (Basel)* **2020**, *20* (11), 3256.

(194) Istamboulié, G.; Paniel, N.; Zara, L.; Granados, L. R.; Barthelmebs, L.; Noguer, T. Development of an Impedimetric Aptasensor for the Determination of Aflatoxin M1 in Milk. *Talanta* **2016**, *146*, 464–469.

(195) Vilela, C. L. S.; Bassin, J. P.; Peixoto, R. S. Water Contamination by Endocrine Disruptors: Impacts, Microbiological Aspects and Trends for Environmental Protection. *Environmental Pollution* **2018**, *235*, 546–559.

(196) Nazari, E.; Suja, F. Effects of 17β-Estradiol (E2) on Aqueous Organisms and Its Treatment Problem: A Review. *Reviews on Environmental Health* **2016**, *31* (4), 465–491.

(197) Anli, E.; Alkis, İ. M. Ochratoxin A and Brewing Technology: A Review. *Journal of the Institute of Brewing* **2010**, *116* (1), 23–32.

(198) Bui-Klimke, T. R.; Wu, F. Ochratoxin A and Human Health Risk: A Review of the Evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2015**, *55* (13), 1860–1869.

(199) Creppy, E. E.; Kern, D.; Steyn, P. S.; Vleggaar, R.; Röschenthaler, R.; Dirheimer, G. Comparative Study of the Effect of Ochratoxin A Analogues on Yeast Aminoacyl-tRNA Synthetases and on the Growth and Protein Synthesis of Hepatoma Cells. *Toxicol Lett* **1983**, *19* (3), 217–224.

(200) Organization, W. H. Evaluation of Certain Mycotoxins in Food: Fifty-Sixth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Evaluation of certain mycotoxins in food: fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives* **2002**, 62–62.

(201) Genevieve S. Bondy, J. J. P. Immunomodulation by Fungal Toxins. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* **2000**, *3* (2), 109–143.

(202) Duarte, S. C.; Pena, A.; Lino, C. M. Human Ochratoxin A Biomarkers—From Exposure to Effect. *Critical Reviews in Toxicology* **2011**, *41* (3), 187–212.

(203) Chain (CONTAM), E. P. on C. in the F.; Schrenk, D.; Bodin, L.; Chipman, J. K.; del Mazo, J.; Grasl-Kraupp, B.; Hogstrand, C.; Hoogenboom, L. (Ron); Leblanc, J.-C.; Nebbia, C. S.; Nielsen, E.; Ntzani, E.; Petersen, A.; Sand, S.; Schwerdtle, T.; Vleminckx, C.; Wallace, H.; Alexander, J.; Dall'Asta, C.; Mally, A.; Metzler, M.; Binaglia, M.; Horváth, Z.; Steinkellner, H.; Bignami, M. Risk Assessment of Ochratoxin A in Food. *EFSA Journal* **2020**, *18* (5), e06113.

(204) IARC (International Agency for Research on Cancer). *Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins*; 1993.

(205) Galvano, F.; Galofaro, V.; Galvano, G. Occurrence and Stability of Aflatoxin M1 in Milk and Milk Products: A Worldwide Review. *J Food Prot* **1996**, *59* (10), 1079–1090.

(206) Marchese, S.; Polo, A.; Ariano, A.; Velotto, S.; Costantini, S.; Severino, L. Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. *Toxins* **2018**, *10* (6), 214.

(207) Luongo, D.; Russo, R.; Balestrieri, A.; Marzocco, S.; Bergamo, P.; Severino, L. In Vitro Study of AFB1 and AFM1 Effects on Human Lymphoblastoid Jurkat T-Cell Model. *Journal of Immunotoxicology* **2014**, *11* (4), 353–358.

(208) Cullen, J. M.; Ruebner, B. H.; Hsieh, L. S.; Hyde, D. M.; Hsieh, D. P. Carcinogenicity of Dietary Aflatoxin M1 in Male Fischer Rats Compared to Aflatoxin B11. *Cancer Research* **1987**, *47* (7), 1913–1917.

(209) Nair, D. P.; Podgórski, M.; Chatani, S.; Gong, T.; Xi, W.; Fenoli, C. R.; Bowman, C. N. The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry. *Chem. Mater.* **2014**, *26* (1), 724–744.

(210) Northrop, B. H.; Frayne, S. H.; Choudhary, U. Thiol–Maleimide "Click" Chemistry: Evaluating the Influence of Solvent, Initiator, and Thiol on the Reaction Mechanism, Kinetics, and Selectivity. *Polym. Chem.* **2015**, *6* (18), 3415–3430.

(211) Szijj, P. A.; Bahou, C.; Chudasama, V. Minireview: Addressing the Retro-Michael Instability of Maleimide Bioconjugates. *Drug Discovery Today: Technologies* **2018**, *30*, 27–34.

(212) Ravasco, J. M. J. M.; Faustino, H.; Trindade, A.; Gois, P. M. P. Bioconjugation with Maleimides: A Useful Tool for Chemical Biology. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25* (1), 43–59.

(213) Mishra, R. K.; Hayat, A.; Catanante, G.; Ocaña, C.; Marty, J.-L. A Label Free Aptasensor for Ochratoxin A Detection in Cocoa Beans: An Application to Chocolate Industries. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *889*, 106–112.

(214) Nguyen, B. H.; Tran, L. D.; Do, Q. P.; Nguyen, H. L.; Tran, N. H.; Nguyen, P. X. Label-Free Detection of Aflatoxin M1 with Electrochemical Fe3O4/Polyaniline-Based Aptasensor. *Materials Science and Engineering: C* **2013**, *33* (4), 2229–2234.

(215) Ramaley, Louis.; Krause, M. S. Theory of Square Wave Voltammetry. *Anal. Chem.* **1969**, *41* (11), 1362–1365.

(216) Cobb, S. J.; Macpherson, J. V. Enhancing Square Wave Voltammetry Measurements via Electrochemical Analysis of the Non-Faradaic Potential Window. *Analytical Chemistry* **2019**.

(217) Mahlum, J. D.; Pellitero, M. A.; Arroyo-Currás, N. Chemical Equilibrium-Based Mechanism for the Electrochemical Reduction of DNA-Bound Methylene Blue Explains Double Redox Waves in Voltammetry. *J. Phys. Chem. C* **2021**, *125* (17), 9038–9049.

(218) Cruz-Aguado, J. A.; Penner, G. Determination of Ochratoxin A with a DNA Aptamer. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (22), 10456–10461.

(219) Kuang, H.; Chen, W.; Xu, D.; Xu, L.; Zhu, Y.; Liu, L.; Chu, H.; Peng, C.; Xu, C.; Zhu, S. Fabricated Aptamer-Based Electrochemical "Signal-off" Sensor of Ochratoxin A. *Biosens Bioelectron* **2010**, *26* (2), 710–716.

(220) Aymard, C.; Kanso, H.; Serrano, M. J.; Pagán, R.; Noguer, T.; Istamboulie, G. Development of a New Dual Electrochemical Immunosensor for a Rapid and Sensitive Detection of Enrofloxacin in Meat Samples. *Food Chemistry* **2022**, *370*, 131016.

RÉSUMÉ

De nos jours, l'évolution du climat, les rejets anthropiques et l'augmentation de la population mondiale concourent à un accroissement du nombre de bactéries préoccupantes, des rejets médicamenteux et des toxines dans l'environnement. L'ochratoxine A, l'estradiol, et certaines bactéries font partie des contaminants polluant la nature et menaçant la santé des êtres vivants. Dans une optique de détection de ces éléments potentiellement dangereux, nous avons travaillé sur le développement d'un marquage original d'oligonucléotides. Ce marquage est basé sur l'utilisation de complexes métalliques électroactifs comme des sondes redox. Ces complexes sont basés sur les ligands macrocycles DOTA et NOTA, d'ordinaire majoritairement utilisés dans l'imagerie médicale, fonctionnalisés avec du fer (III). L'étude de leurs propriétés électrochimiques, réalisée par voltampérométrie cyclique, a démontré qu'ils présentaient de nombreux atouts faisant concurrence aux composés redox les plus répandus. Nous avons notamment cherché à appliquer ce marquage d'oligonucléotide à la construction de biocapteurs, avec en premier essai un génocapteur pour la détection d'ADN de bactéries *Vibrio*. La conception du capteur et la détection de cible a été suivie par spectroscopie d'impédance. Toutefois, l'analyse par impédance n'a pas permis d'obtenir les résultats espérés, et, afin d'étendre le champ de notre étude, une autre méthode a été testée. C'est pourquoi, nous avons cherché à coupler directement les complexes métalliques à des aptamères via une réaction entre une fonction thiol et un groupement maléimide. Dans l'étape suivante, les biocapteurs ont été construits en immobilisant les aptamères modifiés sur des électrodes. En parallèle, les interactions aptamères-cible ont été quantifiées par des analyses par thermophorèse ou MST pour confirmer certains résultats et valider les caractéristiques de liaison des aptamères.

Mots clés : Marqueurs redox, Biocapteurs, DOTA/NOTA, Electrochimie, Impédance, Complexes métalliques, Polluants et Bactéries.

ABSTRACT

Nowadays, climate change, anthropogenic releases and the increase in the world's population are contributing to an increase in the number of bacteria of concern, drug releases and toxins into the environment. Ochratoxin A, estradiol, and some bacteria are among the contaminants polluting nature and threatening the health of living beings. In order to detect these potentially harmful elements, we worked on the development of an original oligonucleotide labeling. This marking is based on the use of electroactive metal complexes such as redox probes. These complexes are based on the macrocycle ligands DOTA and NOTA, usually mainly used in medical imaging, functionalized with iron (III). The study of their electrochemical properties, carried out by cyclic voltammetry, has shown that they have many advantages competing with the most common redox compounds. In particular, we sought to apply this oligonucleotide labeling to the construction of biosensors, with the first test of a genosensor for the detection of DNA from *Vibrio* bacteria. Sensor design and target detection were followed by impedance spectroscopy. However, impedance analysis did not achieve the expected results, and in order to extend the scope of our study, another method was tested. Therefore, we sought to couple metal complexes directly to aptamers via a reaction between a thiol function and a maleimide. In the next step, the biosensors were built by immobilizing the modified aptamers on electrodes. In parallel, aptamer-target interactions were quantified by thermophoresis or MST analyses to confirm certain results and validate the binding characteristics of aptamers.

Keywords : Redox labels, Biosensors, DOTA/NOTA, Electrochemistry, Impedance, Metal Complexes, Pollutants and Bacteria.