



HAL
open science

Développement de nouveaux biocapteurs électrochimiques pour la détection spécifique de biomarqueurs du cancer de la prostate

Meriem Mokni

► **To cite this version:**

Meriem Mokni. Développement de nouveaux biocapteurs électrochimiques pour la détection spécifique de biomarqueurs du cancer de la prostate. Chimie analytique. Université Paris-Saclay; Université de Monastir (Tunisie), 2022. Français. NNT : 2022UPAST187 . tel-04562318

HAL Id: tel-04562318

<https://theses.hal.science/tel-04562318>

Submitted on 29 Apr 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.

Développement de nouveaux biocapteurs électrochimiques pour la détection spécifique de biomarqueurs du cancer de la prostate

*Design of new electrochemical biosensors for the
specific detection of prostate cancer biomarkers*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay
et de l'université de Monastir**

Ecole doctorale n°575: electrical, optical, bio: physics and engineering

Spécialité : Science des Matériaux

Graduate School : Sciences de l'ingénierie et des systèmes

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans les unités de recherche SATIE (Université Paris-Saclay, ENS Paris-Saclay, CNRS), et le laboratoire LR12SP11 (CHU Sahloul Sousse), sous la direction de : **Najla FOURATI ENNOURI**, Maîtresse de Conférence HDR, la codirection de **Asma OMEZZINE**, Professeure

Thèse soutenue à Monastir, le 22 décembre 2022, par

Meriem MOKNI

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Mohamed Fadhel NAJJAR

Professeur, Faculté de Pharmacie de Monastir

Président

Mohamed Mehdi CHEHIMI

Directeur de Recherche, CNRS, Laboratoire ITODYS
Université de Paris

Rapporteur

Mohamed KSIBI

Professeur, Institut Supérieur de Biotechnologie de
Sfax

Rapporteur & Examineur

Chouki ZERROUKI

Maître de Conférence HDR, Université Paris Saclay

Examineur

Titre : Développement de nouveaux biocapteurs électrochimiques pour la détection spécifique des biomarqueurs du cancer de la prostate

Mots clés : Cancer de la prostate, biocapteurs électrochimiques, PSA, Engrailed 2, PCA3

Résumé :

Le cancer de la prostate occupe le cinquième rang des cancers les plus meurtriers dans le monde. Une meilleure prise en charge via un diagnostic précoce permettrait de réduire les mortalités de façon considérable. En l'absence d'un biomarqueur 100% spécifique, le recours à différents biomarqueurs tumoraux permettrait d'améliorer de façon significative la spécificité et la sélectivité du test, et donc une meilleure détection du cancer de la prostate. C'est dans ce contexte que s'inscrit cette thèse dont l'objectif est de développer trois biocapteurs électrochimiques dédiés à la détection de trois biomarqueurs du cancer de la prostate : l'antigène spécifique de la prostate (PSA), l'Engrailed 2 (EN2) et le gène 3 du cancer de la prostate (PCA3). Le premier biocapteur, fonctionnalisé avec des polymères à empreintes moléculaires, était dédié à la détection sélective du PSA. Les études électrochimiques ont mis en évidence une grande affinité entre les analytes cibles et les empreintes formées au sein de la matrice polymérique.

Les résultats des tests de détection du PSA dans une quarantaine de sérums humains étaient en parfaite concordance avec ceux issus de la méthode de référence ELISA, démontrant ainsi la robustesse du capteur réalisé. Le deuxième biocapteur est un immunocapteur dédié au dosage de l'EN2 urinaire. Les tests de sélectivité et de compétitivité ont démontré que l'immunocapteur est capable de détecter sélectivement EN2 et de la différencier des autres protéines interférentes. Les tests de détection dans les urines artificielles ont mis en évidence le fait que les performances du capteur n'étaient pas affectées par la complexité du milieu de détection. Le troisième capteur est un génocapteur destiné à la quantification du PCA3 extrait des échantillons urinaires. Le protocole choisi repose sur le greffage de sondes d'ADN thiolées sur la surface en or de l'électrode de travail et sur la reconnaissance par complémentarité du PCA3, sans avoir recours à l'utilisation d'un couple rédox ou à un marquage préalable des cibles. Les résultats obtenus ont montré que le choix de la sonde, et plus particulièrement la position de la séquence retenue dans la chaîne, influence la réponse du capteur.

Title : Design of new biosensors for the specific detection of prostate cancer biomarkers

Keywords : Prostate cancer, electrochemical biosensors, PSA, Engrailed 2, PCA3

Abstract :

Prostate cancer is the fifth most lethal cancer in the world. Better management through early diagnosis could significantly reduce mortality. In the absence of a 100% specific biomarker, the use of different tumour biomarkers would significantly improve the specificity and selectivity of the test and therefore a better detection of prostate cancer. In this context, three electrochemical biosensors were designed for the detection of different prostate cancer biomarkers: prostate-specific antigen (PSA), Engrailed 2 (EN2) and prostate cancer gene 3 (PCA3). The first biosensor: functionalized with molecularly imprinted polymers, was dedicated to the selective detection of PSA. Electrochemical studies showed a high affinity between the analytes and the imprints formed within the vicinity of the polymeric matrix. The results of the PSA detection tests in about 40 human sera were in perfect agreement with those of the reference ELISA method, demonstrating the robustness of the designed sensor.

The second biosensor is an immunosensor dedicated to the determination of urinary EN2. Selectivity and competitiveness tests demonstrated that the immunosensor can selectively detect EN2 and differentiate it from other interfering proteins. Detection tests in artificial urine showed that the performance of the sensor was not affected by the complexity of the detection medium. The third sensor is a genosensor for the quantification of PCA3 extracted from urine samples. The chosen protocol is based on the grafting of thiolated DNA probes onto the gold surface of the working electrode and the recognition of PCA3 by complementarity, without the use of a redox couple or prior labelling of targets. Results highlighted that the choice of the probe, and more particularly the position of the sequence selected in the chain, has a significant influence on the response of the sensor.

Dédicaces

A mes chers parents Mohamed et Narjes

C'est avec une joie immense et le cœur ému que je vous dédie ce travail en témoignage de ma très tendre affection et ma reconnaissance infinie.

J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi.

Que Dieu vous prête bonne santé et longue vie.

A mes sœurs Asma et Salma,

Vous m'avez toujours soutenu et encouragé.

Que ce travail soit le témoignage de mon attachement et de mon amour.

Puisse Dieu vous accorder santé, succès, réussite et bonheur.

A la mémoire de mes grands-parents Ezzeddine et Jaafoura

Vous avez toujours cru en moi et vous m'avez toujours encouragée dans mon long parcours.

Vous me manquez énormément.

A tous les membres de ma famille,

Vous êtes un vrai trésor dans ma vie.

Que cette thèse soit le témoignage de ma profonde affection.

Remerciements

Je souhaite d'abord exprimer ma très profonde gratitude à mes directrices de thèse, Madame **Asma OMEZZINE** et Madame **Najla FOURATI** pour m'avoir fait le grand honneur d'accepter de diriger ce travail, pour leurs précieux conseils et encouragement et pour avoir su tirer le meilleur de moi-même. Que ce travail soit le témoin de ma sincère reconnaissance et de ma profonde estime.

J'adresse tous mes remerciements à l'ensemble des membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir étudier avec attention cette thèse. En premier lieu à Monsieur **Mohamed Fadhel NAJJAR**, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury. Je remercie également Monsieur **Mohamed Mahdi CHEHIMI** et Monsieur **Mohamed KSIBI** qui ont bien voulu être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également, Monsieur **Chawki ZERROUKI** pour avoir accepté d'examiner mon travail de thèse et pour sa participation scientifique ainsi que le temps qu'il a consacré à ma recherche.

J'exprime ma gratitude aussi à Monsieur **Ali OTHMANE** pour sa disponibilité permanente et pour les nombreux encouragements qu'il m'a prodigués.

Je remercie aussi Dr. **Wissam HMIDA**, et toute l'équipe du service de l'urologie du CHU Sahloul pour leur précieuse contribution à l'établissement de ce travail.

Je tiens à remercier chaleureusement **Sohayb** pour ses conseils et d'être toujours à l'écoute.

Mes pensées à **Ghada, Amal** et **Nadia** qui m'ont toujours écoutée motivée et encouragée. Nos fous rires et les bons moments passés ensemble vont me manquer.

Enfin, je ne pourrais oublier tous mes amis doctorants de l'unité de recherche LR12SP11 et laboratoire SATIE Paris : **Haythem, Bilel, Housseem, Thamer, Asma, Zouhair, Yassine, Amani**, je leurs souhaite le meilleur.

Sommaire

Introduction Générale	1
Chapitre 1 : Etat de l'art	5
Partie 1 : Cancer de la prostate et techniques de diagnostic.....	6
1. Méthodes actuelles de diagnostic du cancer de la prostate	6
2. Les nouveaux biomarqueurs du cancer de la prostate.....	11
3. Techniques analytiques usuelles de détection des biomarqueurs du cancer de la prostate	20
Partie 2 : Les biocapteurs électrochimiques pour la détection des biomarqueurs du cancer de la prostate	24
4. Définition d'un biocapteur.....	25
5. Les Biorécepteurs	28
6. Les méthodes d'immobilisation des biorécepteurs	31
7. Application des biocapteurs pour la détection des marqueurs tumoraux du cancer de la prostate	36
Objectif de notre travail :	41
Chapitre 2 : Matériel et Méthodes	57
1. Introduction	58
2. La transduction électrochimique	58
2.1. La chronoampérométrie (CA)	58
2.2. La voltammétrie cyclique (CV).....	60
2.3. La voltammétrie à ondes carrées (SWV)	61
2.4. Dispositifs expérimentaux pour les mesures électrochimiques.....	62
2.5. Nettoyage de l'électrode de travail.....	63
3. La microscopie à force atomique (AFM).....	63
4. Recueil des échantillons urinaires et extraction du PCA3	65
4.1. Protocole de recueil, traitement et conservation des échantillons urinaires.....	65
4.2. Extraction de l'ARN total urinaire	66
4.3. La transcription reverse et la synthèse de l'ADNc.....	68
4.4. Amplification de la PCA3 par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	70
4.5. Extraction et purification de la PCA3	75
5. Conclusion.....	76
Chapitre 3 : Biocapteur électrochimique à empreintes moléculaires pour la détection du PSA	79

1. Introduction	80
2. Optimisation des paramètres de réalisation d'un MIP-PSA.....	80
2.1. Choix du monomère fonctionnel	80
2.2. Choix de la technique de polymérisation du pyrrole.....	81
2.3. Choix du sel de fond de polymérisation	82
2.4. Optimisation de la durée d'électropolymérisation	84
2.6. Choix de l'agent extracteur	86
3. Performances analytiques du biocapteur MIP-PSA	90
3.1. Courbe de calibration	90
4. Application : détection à l'aveugle du PSA dans des sérums humains.....	100
5. Conclusion.....	101
Chapitre 4 : Immunocapteur électrochimique pour la détection de la protéine Engrailed 2 dans les urines.....	106
1. Introduction	107
2. Optimisation des paramètres d'élaboration de l'immunocapteur pour la détection de l'EN2	108
2.1. Choix de la méthode de fonctionnalisation des surfaces des électrodes de travail .	108
2.2. Choix de la technique de polymérisation du PABA.....	109
2.3. Optimisation de l'épaisseur du film de PABA	110
2.4. Choix du sel de fond de polymérisation	111
2.5. Greffage des anticorps sur la surface	112
3. Les performances analytiques de l'immunocapteur	115
3.1. Etalonnage du capteur	115
3.2. Test de sélectivité	118
3.3. Test de compétitivité	118
4. L'applicabilité du capteur : détection dans les urines artificielles	119
5. Conclusion.....	121
Chapitre 5 : Génocapteur électrochimique pour la détection de la PCA3 urinaire.....	128
1. Introduction	129
2. Extraction du PCA3 à partir des échantillons urinaires	130
2.1. Contrôle de la qualité de l'ADNc par la détection du gène B2M ubiquitaire	130
2.2. Amplification et extraction de la PCA3	131
3. Optimisation des paramètres d'élaboration du génocapteur	136
3.1. Choix des sondes thiolées	136

3.2. Méthode de greffage des sondes ADN thiolées sur l'or.....	136
3.3. Choix de la technique électrochimique de transduction.....	136
3.3.1. Etude de la réponse électrochimique de l'ADN thiolée.....	136
3.3.2. Etude électrochimique de la détection de PCA3.....	137
4. Détection du PCA3 urinaire.....	139
4.1. Etude de l'effet de la nature de la sonde sur la détection par hybridation.....	139
4.2. Test de sélectivité.....	144
5. Conclusion.....	145
Conclusion Générale et Perspectives.....	149

Liste des figures

Figure 1.1 : Formes moléculaires du PSA	8
Figure 1.2 : Interprétation des valeurs du PSA total sérique.....	10
Figure 1.3 : Intérêt du rapport PSA-L/PSA-T	10
Figure 1.4: Localisation du gène PCA3 et modalités de sa transcription en ARN non codant	16
Figure 1.5 : Principe de la technique ELISA.....	21
Figure 1.6 : Les types de systèmes chimiluminescents	22
Figure 1.7 : Principe de la réaction PCR.....	23
Figure 1.8 : Principe simplifié de la spectrométrie de masse	24
Figure 1.9 : Schéma représentatif d'un biocapteur	25
Figure 1.10 : Structure simplifiée d'un anticorps	29
Figure 1.11 : a) Structure des nucléotides formant l'ADN ; b) Représentation de la structure de l'ADN à double hélice.....	30
Figure 1.12 : Principe de l'élaboration du polymère à empreintes moléculaires	31
Figure 1.13: Schéma d'une monocouche auto-assemblée	32
Figure 1.14 : Composés organosoufrés pouvant être utilisés pour l'élaboration de SAMs sur un substrat en or	33
Figure 1.15 : Structure chimique des polymères conducteurs les plus courants.....	34
Figure 2.1 : Allure du potentiel appliqué (a) et la réponse en courant (b)	59
Figure 2.2 : Exemple d'un chronoampéromètre correspondant à l'électropolymérisation du pyrrole	60
Figure 2.3 : a) Principe de la voltammétrie cyclique (variation du potentiel en fonction du temps) ; et b) exemple type d'un voltamogramme enregistré suite à une réaction d'oxydoréduction)	60
Figure 2.4 : Voltampérométrie à onde carrée : a) Schéma d'application des potentiels somme d'un escalier et d'une onde carrée et (b) Représentation typique d'un voltamogramme à ondes carrées.....	61
Figure 2.5 : Le dispositif de mesures électrochimiques CHI 650	62
Figure 2.6 : Montage électrochimique à trois électrodes	62
Figure 2.7 : a) Photo d'un mélange piranha déposé sur la surface d'électrodes en or/verre, b) un schéma représentatif d'un polissage mécanique d'électrodes de type CHI	63
Figure 2.8 : Principe de la microscopie à force atomique	64
Figure 2.9: Microscope à Force Atomique easyScan 2.....	65
Figure 2.10: Hybridation de l'amorce oligo(dT) à la queue poly A de l'ARNm.	68
Figure 2.11: Thermocycleur "Proflex PCR System" (Thermo Fisher®).....	71
Figure 2.12 : a) cuve d'électrophorèse horizontale Apelex® ; b) Générateur d'électrophorèse Apelex®	72
Figure 2.13 : Localisation des amorces pour l'amplification du fragment du PCA3.....	74
Figure 3.1 : Structures chimiques du pyrrole et du polypyrrole.....	80
Figure 3.2 : Caractérisation par voltammétrie à onde carrée de trois films de PSA-PPy avec trois sels de fond différents : LiClO ₄ / PBS, KCl / PBS, et NaCl / PBS.	83
Figure 3.3 : Images AFM correspondant aux films de PSA-PPy réalisés dans des solutions de PBS contenant les électrolytes support suivants : a) NaCl, b) KCl et c) LiClO ₄	83

Figure 3.4 : Chronoampérogrammes de l'électropolymérisation de la couche protectrice (pendant 2 s) et d'un film de PSA-PPy (pendant 7 s) .	85
Figure 3.5 : a) Caractérisation par SWV des différents films de PSA-PPy (dans 0,1M de LiClO ₄) ; b) Variations des intensités des pics d'oxydation du PSA en fonction de la durée d'électropolymérisation par CA	85
Figure 3.6 : Représentation schématique des différents problèmes qui peuvent être rencontrés lors de l'étape d'extraction	86
Figure 3.7 : Voltammogrammes cycliques des capteurs fonctionnalisés avec un film de PSA-PPy avant et après l'extraction du PSA, un NIP avant et après l'immersion dans la solution de NaCl sursaturé.	88
Figure 3.8 : Images AFM de (2×2) μm ² des surfaces de : PSA-PPy (a), MIP-PSA (b) NIP avant (c) et après (d) l'immersion dans la solution d'extraction	89
Figure 3.9 : Voltammogrammes de détection des différentes concentrations de PSA. La caractérisation a été faite dans une solution aqueuse de LiClO ₄ 0,1M.	90
Figure 3.10 : Courbes de calibration des capteurs fonctionnalisés avec un MIP et un NIP et incubés dans des concentrations croissantes de PSA. L'inset correspond à la représentation en semi-log.	91
Figure 3.11 : Valeurs des pics de courant de capteurs fonctionnalisés avec un polymère à empreintes moléculaires de PSA incubé dans des solutions contenant du PSA, du BSA, de l'IgG ou de l'IgM, à une même concentration de 10 ⁻⁸ M.	99
Figure 3.12: Comparaison entre les valeurs sériques obtenues avec le biocapteur et celles avec la technique ELISA	100
Figure 4.1 : Structure de l'acide para amino benzoïque (à gauche) et du PABA : poly (acide para-amino-benzoïque).	108
Figure 4.2 : a) Voltammogrammes cycliques enregistrés au cours de l'électropolymérisation du film PABA sur des électrodes de travail en or, b) Proposition d'un mécanisme d'électropolymérisation du PABA.	110
Figure 4.3 : a) Voltammogrammes cycliques après l'électropolymérisation de 1, 3, 5, 6, 7, 8 et 10 cycles de 4-ABA ; b) Variation de la densité de courant (du pic d'oxydation) en fonction du nombre de cycles.	111
Figure 4.4: Voltammogrammes de caractérisation par SWV des films obtenus pour les différentes solutions : a) solution1, b) solution 2 et c) solution 3	111
Figure 4.5 : Optimisation du choix de la molécule de blocage : (a) structure des molécules bloquantes étudiées (b), Caractérisation électrochimique par voltammétrie à ondes carrées	113
Figure 4.6 :Caractérisation électrochimique des étapes de l'élaboration du capteur par (a) voltammétrie cyclique (b) voltammétrie à ondes carrées.	114
Figure 4.7 :Schéma simplifié des différentes étapes de l'élaboration de l'immunocapteur...	115
Figure 4.8 :Détection par SWV de concentrations croissantes en EN2 dans PBS.....	115
Figure 4.9: Courbe de calibration de l'immunocapteur EN2	116
Figure 4.10 :Représentation semi-Log des courbes de détections de la protéine EN2 avec un capteur élaboré sans dépôt d'histamine (courbe noire) et avec dépôt d'histamine (courbe rouge)	117
Figure 4.11 :Courbes de détection des protéines interférantes comparées à celle de la détection de EN2, en représentation semi-Log.	118

Figure 4.12: Test de compétitivité de l'immunocapteur (courbe semi-Log)	119
Figure 4.13 : Courbe de calibration dans les urines artificielles et le milieu tamponné PBS	120
Figure 5.1 : Le principe schématique de l'élaboration et le fonctionnement du génocapteur électrochimique	130
Figure 5.3 : Principe de l'amplification du PCA3 par la PCR nichée	132
Figure 5.4 : Profil de migration électrophorétique des fragments amplifiés du PCA3 après les deux PCR nichées.....	133
Figure 5.5: Révélation de produits d'amplification des fragments de PCA3 provenant de divers échantillons d'ADNc.....	134
Figure 5.6 : Révélation de produits d'amplification des fragments de PCA3 par deux PCR successives en utilisant le même couple d'amorces.....	135
Figure 5.7 : Photo de l'extraction du fragment PCA3 à partir du gel d'électrophorèse.....	135
Figure 5.8 : Réponse électrochimique des sondes thiolées par (a) voltammétrie à ondes carrées en réduction, (b) voltammétrie à ondes carrées en oxydation (c) voltammétrie cyclique	137
Figure 5.9 : Etude de l'hybridation des sondes par des concentrations cumulatives en PCA3 par : (a) voltammétrie cyclique (b) voltammétrie à ondes carrées en réduction (c) voltammétrie à ondes carrées en oxydation.....	138
Figure 5.10: Courbes de calibration signal en fonction de la concentration (a) par CV en oxydation, (b) par CV en réduction, (c) par SWV en oxydation et (d) par SWV en réduction	139
Figure 5.11 : Courbes de calibration du génocapteur (rouge sonde 1, bleu sonde 2)	140
Figure 5.12 : Test de sélectivité avec des brins non-complémentaires (NC) (sonde 1 (a); sonde 2 (b)).....	144

Liste des tableaux

Tableau 1.1: Valeurs moyennes de PSA en fonction de l'âge.....	9
Tableau 1.2 : Interprétation des valeurs du PSA total sérique	10
Tableau 1.3 : Principales caractéristiques d'un marqueur tumoral idéal	14
Tableau 1.4 : Comparaison entre les différentes techniques de dosage des biomarqueurs tumoraux.....	27
Tableau 1.5 : Avantages et inconvénients des différentes techniques de fonctionnalisation..	35
Tableau 1.6 : Exemples de biocapteurs électrochimiques pour la détection des marqueurs tumoraux du cancer de la prostate.....	37
Tableau 2.1 : Rôles des réactifs utilisés pour l'extraction de l'ARN.....	67
Tableau 2.2 : Les mélanges réactionnels pour la transcription réverse.....	69
Tableau 2.3 : Rôles des réactifs utilisés pour la transcription reverse	70
Tableau 2.4: Composition du mélange réactionnel des réactions PCR.....	73
Tableau 2.5: Programme du thermocycleur pour l'amplification d'un fragment du gène B2M.....	73
Tableau 2.6 : Programme du thermocycleur pour l'amplification d'un fragment du PCA3.....	74
Tableau 3.1 : Etude comparative des méthodes d'extraction des protéines d'une matrice polymérique en PPy.....	87
Tableau 3.2 : Paramètres des différents tests menés pour l'extraction du PSA.....	88
Tableau 3.3 : Revue bibliographique des biocapteurs pour la détection du PSA.....	93
Tableau 4.1 : Composition des solutions de sel de fond de polymérisation testés dans cette étude.....	111
Tableau 4.2: Variation des charges de l'histamine en fonction du pH.....	113
Tableau 4.3 :Comparaison synthétique entre notre travail et des travaux précédents.....	121
Tableau 5.1: Programme de la deuxième PCR pour l'amplification de fragments de PCA3..	133
Tableau 5.2 : Performances analytiques des deux sondes étudiées.....	141
Tableau 5.3 : Etude comparative des génocapteurs pour la détection du PCA3.....	143
Tableau 5.4 : Paramètres de modélisation comparés pour les deux génocapteurs en cas de complémentarité totale ou partielle entre sondes et cibles.....	145

Liste des abréviations

4-ABA	acide para aminobenzoïque
ADN	acide désoxyribonucléique
AFM	microscope à force atomique
AFU	Association Française d'Urologie
AMACR	α -méthylacyl-CoA racémase
BSA	Bovine serum albumin
CA	Chronoampérométrie
CLIA	Chemiluminescent immunoassay
CP	Cancer de la prostate
CV	Voltammétrie cyclique
dNTP	Désoxyribonucléotides triphosphates
DPV	La voltamétrie à impulsions différentielles
EIS	Spectroscopie d'impédance électrochimique
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
EN2	Engrailed 2
FTIR	spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
HSA	Human serum albumin
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
ITO	Indium Tin Oxide
MIP	Polymère à empreintes moléculaires
oligodT	Oligo deoxythymine
PABA	Poly paraaminobenzoic acid
PBS	Phosphate-buffered saline
PCA3	Prostate Cancer antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PPY	polypyrrole
PSA	Prostate specific antigen
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
SAMs	Self Assembled Monolayers
STOM	Société Tunisienne d'Oncologie Médicale
SWV	Voltammétrie à ondes carrées

Introduction Générale

Introduction Générale

Selon des données publiées par l'Organisation Mondiale de la Santé en 2020¹, le cancer est l'une des principales causes de mortalité dans le monde avec près de 10 millions de décès. Actuellement, une personne sur cinq développe un cancer au cours de sa vie ; un homme sur huit et une femme sur onze en meurent². Chez l'homme, le cancer de la prostate (CP) est le cancer le plus fréquent en France (devant le cancer du poumon et le cancer colorectal) et c'est le troisième cancer le plus diagnostiqué en Tunisie après le cancer du poumon et le cancer de la vessie. Un diagnostic précoce permet d'optimiser la prise en charge du CP, et *in-fine* de réduire la mortalité liée à ce cancer.

Des sociétés savantes, telles que la Société Tunisienne d'Oncologie Médicale (STOM) et l'Association Française l'Urologie, recommandent différents examens cliniques et biologiques pour établir le diagnostic du CP, dont le dosage de l'antigène spécifique de la prostate (PSA), et le toucher rectal, qui permet de repérer une grosseur suspecte de la prostate. Une biopsie est effectuée en cas de toucher rectal suspect et/ou un taux de PSA supérieur à une valeur seuil prédéfinie. Une technologie moins invasive et aussi robuste que ces techniques cliniques, permettrait d'aider au diagnostic du cancer de la prostate et d'améliorer grandement la qualité de vie des patients. Notre choix s'est donc porté sur les biocapteurs afin de relever ces nombreux défis. Ces dispositifs visent en effet à identifier et à quantifier, in-situ et de façon rapide et ultrasensible, divers types de biomolécules dans des milieux aussi complexes que les fluides biologiques, comme le sérum humain ou les urines.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une coopération entre deux équipes qui collaborent ensemble depuis de nombreuses années :

- Le laboratoire des Systèmes et Applications des Technologies de l'Information et de l'Energie (SATIE, UMR CNRS 8029, ENS Paris Saclay, Cnam Paris, Université de Cergy Pontoise)
- Le laboratoire de Recherche LR 12SP 11 « Méthodes de Biologie Moléculaires appliquées au diagnostic des néphropathies héréditaires, à l'identification des facteurs de risque génétiques des maladies cardiovasculaire et à la pharmacogénomique ».

¹ <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer#:~:text=%C3%80%20l'origine%20de%20pr%C3%A8s,le%20cancer%20de%20la%20prostate.>

² <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/cancers>

Cette collaboration internationale a pour but de mettre en place une nouvelle voie d'aide au diagnostic précoce du cancer de la prostate. Pour atteindre cette finalité, nous proposons de réaliser trois types de biocapteurs électrochimiques.

Le premier, à base de polymère à empreintes moléculaires, est dédié à la quantification du PSA dans le sérum humain. Malgré le fait que ce biomarqueur du CP présente plusieurs inconvénients, dont une faible sensibilité, son dosage reste une des « techniques de routine » en milieu clinique. Il était donc attendu que le premier capteur à réaliser dans le cadre de ces travaux de thèse soit dédié à la détection du PSA.

Pour pallier les limitations du PSA, et améliorer *in-fine* la spécificité du diagnostic, nous nous sommes intéressés à deux différents biomarqueurs urinaires du cancer de la prostate : l'Engrailed 2 (une protéine) et le PCA3 (un ARNm non codant). Nous avons développé un immunocapteur, dédié à la détection de l'EN2, et un capteur d'ADN pour le dosage du PCA3.

Ce manuscrit est subdivisé en cinq chapitres :

Le premier chapitre est dédié à l'état de l'art. Dans sa première partie sont présentés les biomarqueurs tumoraux du CP, leurs intérêts dans le diagnostic du cancer de la prostate et leur méthodes actuelles de dosage. La deuxième partie est consacrée à la présentation des biocapteurs, des bio-récepteurs et les techniques usuelles de fonctionnalisation. Une étude bibliographique recensant les biocapteurs pour la détection des marqueurs tumoraux du CP est présentée en fin de chapitre.

Le deuxième chapitre s'intéresse à la description des différents protocoles et méthodes de biologie moléculaire utilisés pour le traitement des échantillons biologiques. Sont ensuite présentés les techniques et les dispositifs expérimentaux électrochimiques pour la conception et la caractérisation des différents biocapteurs réalisés dans le cadre de ces travaux de thèse.

Le troisième chapitre concerne le développement d'un biocapteur fonctionnalisé avec un polymère à empreintes moléculaires (MIP pour Molecularly Imprinted Polymer) pour la détection du PSA. Y sont donc présentées les différentes étapes d'optimisation du MIP et les caractérisations métrologiques du dispositif électrochimique. Des tests de détection à l'aveugle ont été faits dans 35 sérums humains et les résultats ont été corrélés à ceux obtenus à partir de la technique de référence ELISA (pour enzyme-linked immunosorbent assay).

Le quatrième chapitre traite du développement d'un immunocapteur pour la détection de l'Engrailed 2 (EN2). Nous avons décrit d'abord l'optimisation de la technique de

fonctionnalisation des surfaces des électrodes de travail. Une fois les paramètres métrologiques du biocapteur déterminés, nous avons réalisé des tests de compétitivité avec différentes protéines interférentes aussi bien dans un tampon physiologique que dans l'urine artificielle.

Le dernier chapitre porte sur le dosage du PCA3. La première partie concerne l'extraction du PCA3 à partir des échantillons urinaires. La seconde partie est dédiée à l'élaboration d'un biocapteur d'ADN pour la reconnaissance spécifique de de l'ADN cible formé d'un fragment de 543 paires de bases qui couvrent les 4 exons du transcrit PCA3. Y sont donc présentés les expérimentations liées au choix de la technique électrochimique de la transduction puis les mesures de détection et de sélectivité.

Une conclusion générale et des perspectives viennent clôturer ce manuscrit.

Chapitre 1

Etat de L'art

Partie 1 : Cancer de la prostate et techniques de diagnostic

Le cancer de la prostate (CP) est la deuxième tumeur maligne la plus fréquemment diagnostiquée chez les hommes dans le monde et constitue la deuxième cause de décès liés au cancer chez les hommes en 2020 [1]. En France, il occupe le premier rang des cancers masculins avec une incidence de 99 cas par 100 000 habitants en 2020, et il est le troisième cancer le plus meurtrier avec un nombre de décès de 9 060 en 2020 [1]. C'est le troisième cancer de l'homme en Tunisie après ceux du poumon et de la vessie (selon les données des registres du Cancer du Nord et du Sud de la Tunisie) avec une incidence de 17 cas par 100 000 habitants en 2020 [2, 3].

La revue systématique sur l'épidémiologie et la prévention du cancer de la prostate de Gandaglia et al. [4] a rapporté que les causes du cancer de la prostate ne sont pas encore complètement élucidées, mais les recherches ont mis en évidence plusieurs facteurs qui pourraient augmenter le risque comme l'âge, les antécédents familiaux, l'origine ethnique, le régime alimentaire, l'obésité, etc...

Pour établir le diagnostic du cancer de la prostate, les sociétés savantes telles que la Société Tunisienne d'Oncologie Médicale (STOM) [5] et l'Association Française l'Urologie (AFU) [6] recommandent différents examens cliniques et biologiques que nous allons détailler dans ce chapitre.

1. Méthodes actuelles de diagnostic du cancer de la prostate

1.1. Le toucher rectal

La zone périphérique de la prostate, d'où proviennent la majorité des cancers, est située près du rectum, ce qui permet d'identifier facilement la croissance d'une tumeur grâce au toucher rectal. Le médecin effectue une palpation de la prostate afin de déceler des modifications du volume, de la forme et de la consistance, caractéristiques d'une anomalie de la prostate [7, 8].

Cette méthode de diagnostic permet de détecter des cancers de la prostate avec une spécificité élevée (96% et 99%) mais la sensibilité est basse (entre 33% et 58%) [9]. Cet examen n'est pas censé être douloureux, mais il est très peu accepté par les hommes, ce qui représente un obstacle à la détection précoce du CP [10].

1.2. La biopsie de la prostate

Le diagnostic du CP est essentiellement anatomopathologique d'où le recours à la biopsie de la prostate. Cet examen est souvent pratiqué en chirurgie ambulatoire, sous antibioprofylaxie et sous anesthésie locale. Plusieurs échantillons du tissu sont prélevés avec des aiguilles, sous contrôle par échographie transrectale, dans différentes zones de la prostate (généralement 10 à

12 prélèvements pratiqués). La confirmation du diagnostic est obtenue à partir du score de Gleason, un système de stadification établi après un examen microscopique de l'échantillon de biopsie qui permet d'étudier l'architecture cellulaire et estimer la taille de la tumeur, l'étendue de l'atteinte des ganglions lymphatiques et des métastases, afin d'évaluer le résultat pronostique. Ce test étant invasif, il n'est pas sans risques pour le patient : il peut provoquer des saignements (retrouvés dans les urines, le sperme ou le rectum) et plus rarement des infections. De plus, l'emplacement et le nombre de « carottes » de biopsie dans lesquelles les échantillons doivent être prélevés restent controversés, ce qui réduit la précision de cette technique [9]. Par conséquent, des résultats de biopsies négatifs n'écartent pas totalement la possibilité d'avoir un CP vu l'hétérogénéité du tissu tumoral. Des biopsies peuvent donc être refaites si les éléments cliniques ou biologiques continuent d'indiquer un risque de CP, comme une concentration du marqueur tumoral¹ de référence, l'antigène spécifique de la prostate (plus connu sous le nom de PSA pour Prostate specific antigen :), supérieure à 10 ng/ml alors que la biopsie est négative [6].

1.3. Dosage de l'antigène spécifique de la prostate

1.3.1. Généralités sur le PSA

Le PSA est une sérine protéase neutre de faible poids moléculaire (33 kDa) appartenant à la famille des kallicréines humaines produite principalement par l'épithélium prostatique et par le revêtement épithélial des acini et des canaux du tissu prostatique et elle est présente de façon physiologique (1 mg/L) dans le liquide séminal [11-13].

Cette protéine existe également dans les spermatozoïdes, participe à la liquéfaction des fluides séminaux et sa sécrétion dépend des hormones androgènes [11]. Elle peut exceptionnellement être détectée dans d'autres tissus tels que les reins et l'endomètre à de faibles concentrations [11]. Dans le sérum, le PSA total (tPSA) se trouve sous deux formes : libre (fPSA qui représente 30% du tPSA) et complexée (cPSA qui représente 70 du tPSA) (figure 1.1) [14]. Ces complexes se font essentiellement à l'alpha1-antichymotrypsine, l'inhibiteur l'alpha1-protéase ou à l'alpha 2-macroglobuline.

Il est à noter que le test PSA sérique actuel mesure le tPSA alors que la fraction qui augmente le plus en cas de cancer est le cPSA [14].

¹ Les biomarqueurs tumoraux sont des molécules biochimiques de natures variables (protéines, acides nucléiques, métabolites, ...) qui peuvent être exprimées et secrétées de manière anormale par une tumeur dans un milieu biologique accessible (sang, urines, salive ou liquide céphalorachidien).

Chez les hommes dont la prostate est saine, la majorité du PSA libre dans le sérum reflète la protéine mature qui a été inactivée par un clivage protéolytique interne. En revanche, en cas de cancer de la prostate, on observe une désorganisation des cellules de la membrane basale qui entraîne la diminution de la transformation du PSA actif en PSA inactif et par la suite une diminution relative du PSA libre et une augmentation de PSA complexe. Ainsi une diminution du PSA libre et une augmentation du PSA complexe indiquerait la présence d'un cancer [12, 13].

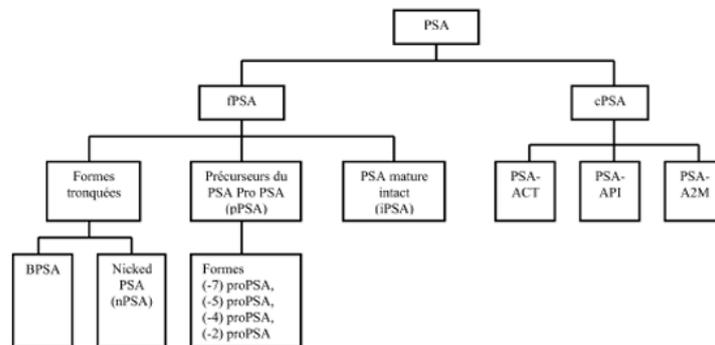


Figure 1.1 : Formes moléculaires du PSA² [14]

Notons cependant qu'une concentration élevée de PSA sanguin peut être le reflet de pathologies prostatiques non cancéreuses, comme l'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) ou les prostatites. En effet, le PSA est spécifique du tissu et non du cancer.

D'autres paramètres peuvent influencer les concentrations de PSA :

- La race : les hommes sains de race noire ont tendance à avoir des taux moyens de PSA plus élevés que ceux des hommes de race blanche, c'est pourquoi certains auteurs ont proposé de définir des seuils de PSA variant par « race » [12].
- L'âge : des études antérieures ont montré que la concentration de PSA sérique varie avec l'âge comme de montre les données du tableau 1.1 [15]

² BPSA: fPSA associé à une HBP ; Pro PSA: précurseur du fPSA ; PSA-ACT : PSA lié à l'1-antichymotrypsine ; PSA-API : PSA lié à l'inhibiteur de l' α 1-protéase ; PSA-A2M : PSA lié à l' α 2-macroglobuline.

Tableau 1.1: Valeurs moyennes de PSA en fonction de l'âge [15]

Age	PSA sérique
40 – 49 ans	0 – 2,5 ng/mL
50 – 59 ans	0 – 3,5 ng/mL
60 – 69 ans	0 – 4,5 ng/mL
70 – 79 ans	0 – 6,5 ng/mL

Certains traitements médicamenteux peuvent causer une diminution des concentrations de PSA sériques. C'est le cas des anti-inflammatoires non stéroïdiens, les statines, les dérivés thiazidiques et surtout les inhibiteurs de 5-alpha-reductase (Finasteride et Dutasteride) qui peuvent causer une chute des concentrations d'environ 50%, voire plus, et cette diminution persiste tout au long du traitement.

1.3.2. Rôle du PSA dans le dépistage du cancer de la prostate

Les sociétés savantes tels que la Haute Autorité de Santé française [8], le Canadian Task Force on Preventive Health Care [16, 17] ainsi que le ministère de la santé de la Tunisie [18][18][18][18][18][18][18][18][18][18][18][18][18][18][18][18][18] se sont accordées à ne plus le recommander comme marqueur de dépistage systématique. Cette recommandation repose, entre autres, sur les résultats d'une campagne de dépistage réalisée par l'American Urological Association [19] sur des hommes de plus de 50 ans. Les résultats de l'étude n'ont pas montré d'intérêt manifeste du PSA pour le dépistage du CP.

1.3.3. Intérêt du PSA dans le diagnostic du cancer de la prostate

Nous listons ci-après les valeurs « seuils » de PSA actuellement utilisées en milieu clinique :

- Pour une valeur de PSA supérieure à 4 ng/ml : la sensibilité³ du PSA est comprise entre 20% et 75% et la spécificité⁴ est de 90% [9].
- A une valeur de PSA supérieure à 10 ng/mL, la valeur prédictive positive de cancer de prostate est de 80% et elle passe à 90% pour une concentration supérieure à 20 ng/mL (Figure 1.2).
- Pour les patients ayant une concentration de PSA entre 4 et 10 ng/mL, dite « zone grise » (figure 1.2), il existe des méthodes pour affiner l'interprétation du test PSA tels que l'abaissement du seuil du PSA, le calcul de la vélocité et de densité du PSA mais surtout le

³ Le terme sensibilité quantifie la probabilité de déclarer des personnes comme atteintes sur une population développant effectivement un cancer.

⁴ Un biomarqueur est dit spécifique s'il est détectable uniquement dans un type de tumeur et qu'il est produit par la seule cellule cancéreuse.

rapport PSA libre/PSA total. Ce dernier couramment utilisé en routine, a l'utilité d'améliorer la sensibilité de la détection du cancer lorsque le PSA total est dans la gamme normale (< 4 ng/ml) et d'augmenter la spécificité de la détection du cancer lorsque le PSA total est dans la "zone grise" (4 à 10 ng/ml) [12].



Figure 1.2 : Interprétation des valeurs du PSA total sérique [9]

Plus le pourcentage de PSA libre par rapport au PSA total est faible plus il est associé à une forme agressive de cancer de la prostate (figure 1.3) [12, 15].

Cependant, l'hétérogénéité des dosages des fractions libres et totales ne permet pas l'adoption d'un seuil unique de décision pour la discrimination du cancer de la prostate des autres pathologies : les seuils fixés avec une sensibilité et une spécificité optimales peuvent varier de 14 % à 25 % [13, 15].

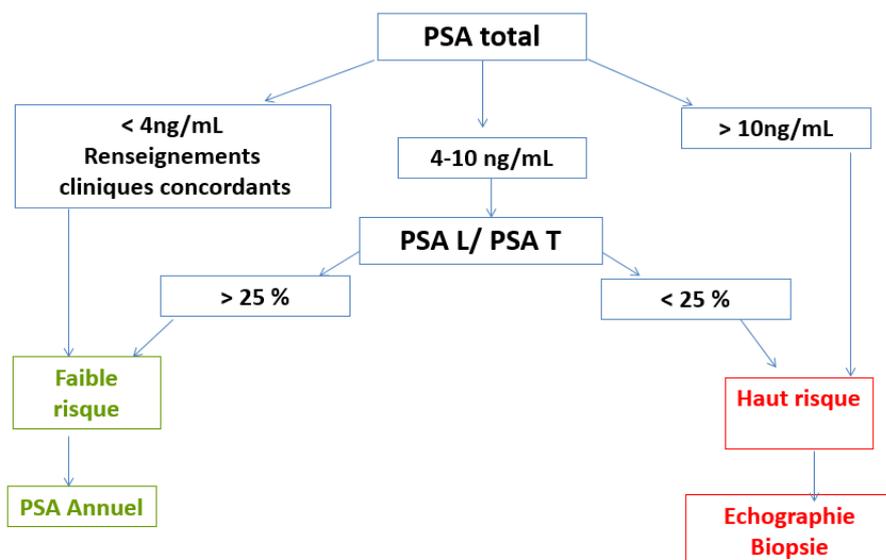


Figure 1.3 : Intérêt du rapport PSA-L/PSA-T [20]

1.3.4. Intérêt du PSA dans le pronostic et le suivi thérapeutique

Le PSA est utilisé actuellement pour le suivi de l'efficacité du traitement et la détection des éventuelles récurrences.

La récurrence biologique est définie comme une ascension du PSA d'une valeur indétectable à une valeur détectable, alors que le patient est asymptomatique. Il faut ainsi distinguer cette récurrence des situations où le PSA reste détectable après chirurgie radicale, et qui témoigne d'une résection incomplète[21].

La STOM [5] et l'AFU [22] recommandent un dosage du PSA total sérique dans les trois mois après le traitement. En cas de PSA détectable, il est recommandé de pratiquer un contrôle à trois mois pour certifier l'anomalie et estimer le temps de dédoublement de la valeur du PSA[22].

Le seuil de PSA varie selon la thérapie [22] :

- Prostatectomie totale : concentration doit être inférieure à 0,2 ng/mL selon la STOM [5]
- Radiothérapie externe : le nadir du PSA peut atteindre une valeur inférieure à 1 ng/ml La valeur du nadir du PSA est corrélée à la survie sans récurrence biologique. Une récurrence biologique après radiothérapie est définie par une valeur de PSA augmentant de 2 ng ou plus au-dessus du nadir de PSA qu'elle soit associée ou non à une hormonothérapie [22]
- Traitement hormonal : l'abaissement du PSA est observé pendant une durée moyenne de 18 à 24 mois, puis survient une ré-augmentation du taux, ce qui définit l'hormono-indépendance. Les valeurs seuils du PSA imposant une réintroduction du traitement sont de 10 ou 20 ng/ml chez les patients métastatiques et inférieures à 10 ng/ml chez les patients en récurrence biologique après traitement à visée curative [22] :

A l'état actuel de ces techniques de dosage (immunologiques essentiellement), le PSA, sert comme aide au diagnostic mais pas au diagnostic de certitude. Ainsi, il oriente vers la nécessité ou non de biopsies. Un fort intérêt s'est porté sur la recherche de nouveaux biomarqueurs, objets du paragraphe suivant.

2. Les nouveaux biomarqueurs du cancer de la prostate

De nombreux nouveaux biomarqueurs de l'aide au diagnostic sont étudiés dans le cadre des applications cliniques. En fonction de leur nature moléculaire, ces biomarqueurs peuvent être répartis en trois grandes catégories : des ADN, des ARN et des protéines [23]. Nous avons résumé dans le tableau 1.2 les marqueurs tumoraux du CP récemment étudiés et qui ont montré, grâce à des études de cohortes, des résultats encourageants [24-47].

Tableau 1.2 : Les biomarqueurs tumoraux actuels du cancer de la prostate

Marqueur tumoral	Nature	Milieu biologique	Méthode de dosage	Cut-off	Sensibilité	Spécificité	Rôle dans le diagnostic du CP	Référence
Sarcosine	Acide aminé	Urines	HPLC	179 µg/g de créatinine urinaire	79%	87%	<ul style="list-style-type: none"> Différencier le cancer des pathologies bénignes Prédiction des rechutes post- chimiothérapie 	[24-28]
Les micro ARN	ARN	Urines Sérum	PCR, DNA microarray, Northern Blot	non défini	78.4%	66.7%	Marqueur pronostique (métastases)	[29-31]
α-Methylacyl-CoA Racemase (AMACR)	Enzyme	Urines; serum	PCR en temps réel	(AMACR mRNA/PSA mRNA) × 100 = 10,7	70%	71%	<ul style="list-style-type: none"> Outil de suivi de l'hormonothérapie Valeur diagnostique importante dans la zone grise (PSA) 	[32-34]
Microseminoprotéine-Beta (MSMB)	Peptide	Urines; serum	ELISA	15 pg/mL (sérum)	57,5%(sérum)	30%(sérum)	Inversement proportionnel au stade de la tumeur	[35, 36]
La fusion TMPRSS2: ERG	ADN	Urines	PCR en temps réel	-	67%	87%	<ul style="list-style-type: none"> Stade clinique de la tumeur Prédiction de l'extension extracapsulaire de la tumeur. 	[37-39]
Engrailed 2	Protéine	Urines	ELISA	42,5 ng/mL	66%	88,2%	<ul style="list-style-type: none"> Corrélation avec le volume de la tumeur Différencier le cancer des pathologies bénignes 	[40, 41]

Marqueur tumoral	Nature	Milieu biologique	Méthode de dosage	Cut-off	Sensibilité	Spécificité	Rôle dans le diagnostic du CP	Référence
PCA3	ARN non codant	Urines	PCR en temps réel Test Progenesa®	(PCA3 mRNA/PSA mRNA) × 1000 varie entre 20 et 35	66,27%	80,94%	<ul style="list-style-type: none"> • Outil de décision aux biopsies, • Corrélation avec le volume et le degré d'invasion de la tumeur • Prédiction l'extension extracapsulaire de la tumeur 	[42-47]

Signalons à ce niveau qu'il n'existe aujourd'hui aucun marqueur tumoral idéal du cancer de la prostate. En effet, un biomarqueur idéal doit posséder les principales caractéristiques regroupées dans le tableau 1.3 :

Tableau 1.3 : Principales caractéristiques d'un marqueur tumoral idéal [48]

Caractéristique	Remarques
Spécifique	DéTECTABLE uniquement dans un type de tumeur (produit par la seule cellule cancéreuse).
Sensible	Non détectable dans les états physiologiques, pathologiques sans relation avec la tumeur ou bénins
Précoce	Permet la détection de la tumeur dès les premières phases de sa genèse
Les niveaux devraient être corrélés de manière fiable à la charge tumorale	Pour l'évaluation pronostique et prédictive. Permet de localiser la tumeur. Prévoit son évolution, son extension, reflétant avec précision toute progression ou régression tumorale.
Durée de ½ vie courte	Pour permettre une surveillance par la mesure fréquente du marqueur (5-6 demi-vie).
Test simple, rapide et peu onéreux.	Applicable en tant que test de dépistage et surveillance des populations à risque
Prélèvements facilement obtenus	Acceptés par la population cible.

Pour résumer, un biomarqueur idéal du cancer de la prostate aurait permis :

- De dépister la population à risque,
- De réaliser un diagnostic précoce du CP in situ,
- De détecter la dissémination métastatique,
- D'évaluer l'efficacité thérapeutique,
- Et de détecter les rechutes.

A partir de ce constat, il nous ait paru évident que le recours à d'autres biomarqueurs du cancer de la prostate, en plus du PSA, pourrait aider à améliorer le diagnostic de cette maladie. Notre choix s'est donc porté sur deux biomarqueurs urinaires : le PCA3 et l'EN2.

A la question, pourquoi avoir choisi l'urine ?, nous pourrions répondre comme suit :

Les urines ont été proposées, au cours de ces dernières décennies, comme milieux biologiques prometteurs pour l'exploration de nouveaux biomarqueurs tumoraux du CP [49-51]. Elles

possèdent en effet de nombreux avantages favorisant son utilisation par rapport aux prélèvements sanguins. Elles peuvent tout d'abord être facilement recueillies de manière abondante et à intervalles fréquents ce qui favorise l'acceptabilité des tests par les hommes et les rend propices aux procédures d'échantillonnage répétées. Elles sont aussi relativement stables et leurs composants solides peuvent facilement être séparés de la fraction liquide par centrifugation à faible vitesse. [49, 52]. Elles ont également l'avantage d'être non infectieuses pour le VIH et moins infectieuses pour de nombreux autres agents pathogènes. Enfin, elles permettent un accès direct aux cellules prostatiques, recueillies après massage prostatique ou non, dans le premier jet d'urines, et ce contrairement au sérum qui ne permet que l'accès aux molécules sécrétées par la prostate [52].

Les paragraphes suivants sont dédiés à la présentation des propriétés des deux biomarqueurs urinaires que nous avons sélectionnés dans le cadre de ces travaux de thèse : le PCA3 et l'Engrailed 2.

2.1. Prostate Cancer Antigen 3 (PCA3)

2.1.1. Généralités

L'antigène 3 du cancer de la prostate (nommé auparavant gène DD3 : Differential Display clone 3) a été décrit pour la première fois en 1999 par Bussemakers et al. [53]. Il s'agit d'un long brin d'ARN messager (ARNm) non codant de 3922 nucléotides.

Le gène codant pour le PCA3 est localisé sur le chromosome 9q21-22. Il se compose de quatre exons contenant un nombre inhabituel de codons stop. C'est pour cette raison que le PCA3 ne code pas pour une protéine et fonctionne comme un ARN non codant [54]. La figure 1.4 décrit la structure du PCA3 et ses différents transcrits. Des études sur les exons du PCA3 ont montré que l'exon 2 (présent dans seulement 5 % des transcrits) est identifié dans les tissus tumoraux prostatiques mais pas dans des échantillons provenant des patients avec HBP [55, 56].

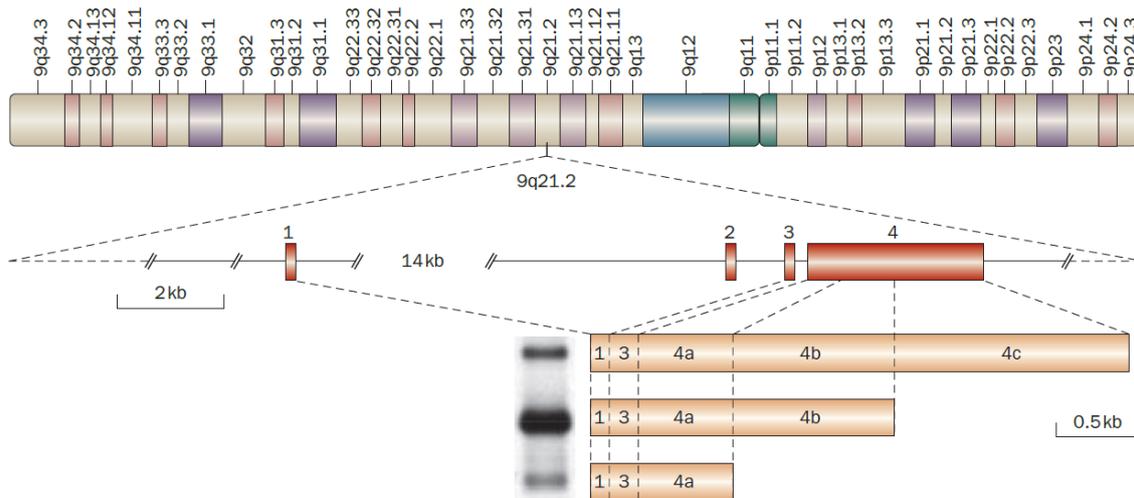


Figure 1.4: Localisation du gène PCA3 et modalités de sa transcription en ARN non codant [54]

Bussemakers et al. [53] ont étudié de l'expression de ce gène dans divers tissus humains normaux et tumoraux et ils ont démontré que PCA3 est exprimé uniquement dans les tissus tumoraux prostatiques, par contre expression n'a été détectée dans d'autres tissus humains normaux, ni dans des tumeurs ni dans les lignées cellulaires tumorales (sein, du col de l'utérus, endomètre, ovaire et du testicule ...) [53].

2.1.2. Techniques de dosage du PCA3

Le recueil des échantillons urinaires se fait après un massage de la prostate selon un protocole standardisé [43, 57, 58]. L'analyse s'effectue ensuite sur la totalité des urines prélevées ou sur le sédiment urinaire après centrifugation.

Trois générations de tests se sont succédées pour le dosage du PCA3 [59] :

- La première génération est la RT-PCR quantitative : cette technique sélective et très sensible permet la quantification de l'ARN en temps réel en passant d'abord par une étape de transcription reverse en ADN complémentaire par une transcriptase reverse généralement d'origine virale.
- La deuxième génération repose sur l'utilisation de la NASBA (nucleic acid sequence-based amplification), une technique différente d'amplification de l'ARN qui évite certaines étapes de la RT-PCR et notamment la dénaturation itérative des brins amplifiés. Ainsi il est devenu possible d'avoir une amplification sans nécessité de modifier la température à chaque cycle, dans un seul tube. Par conséquent, cette technique offre un gain de temps appréciable, avec rendu rapide des résultats [59]. Un kit commercial, uPM3™, basé sur cette technique a été proposé par le laboratoire canadien DiagnoCure.

- La génération la plus récente utilise un test d'amplification médiée par la transcription (TMA). Ce test a été conçu en 2006 et il est commercialisé par le laboratoire Gen-Probe sous licence avec DiagnoCure sous le nom de Progenesa® [60]. La TMA implique l'amplification isotherme de l'ARN ribosomal par transcription inverse et la génération ultérieure de nombreux transcrits par l'ARN polymérase. Ces copies d'ARN sont capturées par des billes magnétiques recouvertes de séquences oligonucléotidiques complémentaires de l'ARN cible. Il en résulte l'isolement spécifique de cet ARN d'intérêt qui seul, est alors soumis à l'amplification et la quantification simultanée [59, 61]. Ce test calcule un score quantitatif de PCA3 sous la forme d'un rapport entre l'ARNm du PCA3 et celui du PSA ($[\text{ARNm du PCA3} / \text{ARNm du PSA}] \times 1000$) [60]. Ce score reflète l'expression de PCA3 normalisée par rapport aux cellules adjacentes normales ou présentant une hypertrophie bénigne [62].

Le test Progenesa® a été approuvé en 2006 en Europe et 6 ans plus tard par la FDA (Food and Drug Administration) aux Etats Unis [52, 63]. Cette dernière recommande une valeur seuil du score PCA3 de 25 au-dessous de laquelle le risque d'avoir un CP est faible, tandis qu'un score plus élevé indiquerait une probabilité importante d'identifier un CP lors d'une biopsie [64].

2.1.3. Intérêts dans le cancer de la prostate

- Intérêt dans le dépistage

Le PCA 3 ne peut pas être utilisé pour le dépistage du cancer de la prostate en raison du coût élevé des techniques de dosage. A titre d'information, le test Progenesa® coûte environ 300 € [65] et n'est pas remboursé par la sécurité sociale en France.

- Intérêt diagnostique

La première étude de cohorte sur le PCA3 urinaire a été publiée par Hessels et al. [66] en 2003. Elle a inclus 108 patient adressés pour biopsie de la prostate sur la base d'une concentration de PSA > 3 ng/mL. Les auteurs ont rapporté une sensibilité de 67%, une spécificité de 83 % et une valeur prédictive négative de 90% en optant pour un seuil du rapport (ARNm du PCA3 / ARNm du PSA) égal à 200×10^{-3} . De même, ils ont constaté le PCA3 est 66 fois plus élevé dans les cellules cancéreuses que dans les cellules bénignes adjacentes et qu'il s'agit donc plutôt d'une surexpression du gène en cas de CP.

Depuis, plus de 100 études cliniques ont été publiées explorant les applications cliniques du test urinaire PCA3 [67]. Les résultats de ces études ne sont pas encore suffisants pour recommander le remplacement de la biopsie de la prostate par le PCA3 comme test de référence pour le diagnostic du CP. Cependant le recours au dosage du PCA3 a été approuvé pour apporter une aide à la décision dans le cadre d'une biopsie répétée chez des patients de plus de 50 ans ayant une concentration de PSA élevée mais une série antérieure de biopsies négative [67]. Ceci

pourrait être justifié par le fait que le score PCA3 n'est pas, contrairement au PSA sérique, corrélé au volume prostatique, il n'augmente pas dans les pathologies prostatiques bénignes, et son utilisation permettrait de réduire de moitié ou des deux tiers le nombre de biopsies prostatiques inutiles [67].

Signalons finalement que diverses études ont rapporté l'association de PCA3 avec d'autres marqueurs comme meilleures approches dans le diagnostic précoce du CP : le PSA [43], le α -Methylacyl-CoA Racemase (AMACR) [32] ou encore le TMPRSS2: ERG [68].

- Intérêt pronostique

Le PCA3 a été proposée pour le suivi de la progression clinique du CP, ce qui aiderait également aux choix des stratégies thérapeutiques.

Le PCA3 pourrait par exemple être utilisé dans la sélection de patients qui pourraient bénéficier d'une surveillance active, une option de gestion conservatrice pour les hommes présentant un CP à faible risque qui devrait réduire le sur-traitement. La majorité des protocoles de surveillance active à l'heure actuelle nécessitent des biopsies de la prostate en série, souvent associées à l'inconfort du patient et au risque de complications [69, 70].

Il pourrait être aussi utilisé pour aider à l'évaluation de l'agressivité potentielle d'une tumeur déjà objectivée. Nous pouvons citer par exemple les études de Nakanishi et al. [71], Whitmann [72] et Durand et al. [73] qui ont démontré une valeur pronostique de PCA3 grâce à une bonne corrélation avec le volume de la tumeur. D'autres auteurs ont confirmé l'association du score PCA3 au score de Gleason tels que Auprich et al. [45], Durand et al. [74] et van Poppel et al. [75].

2.2. La protéine Engrailed 2 (EN2)

2.2.1. Généralités

L'Engrailed 2 est une protéine codée par le gène *En 2* qui est situé sur le chromosome 7 (7q36.3) et appartient à la famille Engrailed (*En*), une catégorie particulière de gènes homéotiques (Homeobox genes) jouant un rôle clé dans le développement du cerveau au stade embryonnaire précoce [76]. L'EN2 a été identifié dans les cellules dorsales de la région frontière entre le mésencéphale et le cerveau postérieur, où il contribue à la survie des neurones dopaminergiques chez le fœtus. L'expression a également été notée dans le noyau arqué dans l'hypothalamus où elle intervient dans le contrôle de l'activité cardio-respiratoire et de la pression sanguine [76]. Cette protéine reste exprimée dans ces zones peu après la naissance puis ses niveaux diminuent considérablement peu après. À l'heure actuelle, les seuls sites connus d'expression normale de EN2 chez l'adulte sont les noyaux des cellules de Purkinje dans le cervelet et le cytoplasme des cellules épithéliales tubulaires du rein. Le rôle du gène *En2* dans ces organes et la cause de sa

persistance après la naissance restent encore inconnus [76]. Au-delà de la période périnatale, l'expression pathologique du gène a été associée à la maladie de Parkinson à jeune âge [77].

Matin et al. [78] ont découvert en 2005 son expression inhabituelle dans les cellules du cancer de sein mais pas au niveau de l'épithélium mammaire sain. Trois ans après, la protéine EN2 a été présentée pour la première fois comme un biomarqueur potentiel du cancer de la prostate par Bose et al. [79] vu qu'elle est surexprimée dans les cellules cancéreuses de la prostate par opposition aux cellules saines. Les auteurs ont démontré qu'elle peut contribuer au processus d'oncogenèse en favorisant la prolifération cellulaire. Ceci a été confirmé des années plus tard par l'étude de Gomez et al. [80].

Signalons que EN2 a l'avantage d'être stable dans les urines jusqu'à 4 jours après le prélèvement et à température ambiante [81]. Contrairement au PCA3, un massage préalable de la prostate n'est pas nécessaire ce qui améliore l'acceptabilité du test par les individus et réduit les coûts [40, 81, 82].

2.2.2. Technique de dosage de l'EN2

La seule technique de dosage de la protéine EN2 dans les urines est la technique d'immunoabsorption par enzyme liée (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Morgan et al. [40] ont dosé pour la première fois l'EN2 urinaire par ELISA chez 184 candidats répartis en deux groupes : 102 témoins et 82 malades confirmés par biopsie. Ils ont utilisé un protocole « maison » optimisé plutôt qu'un kit commercial.

Le recours à des tests ELISA présente cependant divers inconvénients. Dans une étude parue en 2021, Clark *et al* [83] ont démontré que les kits ELISA manquent de robustesse pour la quantification de EN2 dans les urines.

2.2.3. Intérêt dans le cancer de la prostate

- Intérêt dans le dépistage

Killick *et al.* [81] ont dosé l'EN2 urinaire chez les patients à haut risque génétique porteurs de mutations *BRCA1* et *BRCA2* mais vu la faible taille de l'échantillon, il n'était pas possible de procéder à une analyse par sous-groupe en fonction du statut de porteur d'une mutation *BRCA*. De fait, il semblerait que l'EN2 donne de meilleurs résultats chez les hommes porteurs d'une mutation *BRCA2* lesquels présentant le risque le plus élevé.

Actuellement on ne dispose pas de données qui appuient l'utilité de l'EN2 comme outil de dépistage du CP chez les patients à risque.

- Intérêt diagnostique

Morgan et al. [40] étaient les pionniers dans l'étude de l'intérêt de l'EN2 dans le diagnostic du CP. Ils ont rapporté que la présence de EN2 dans les urines, était hautement prédictive du CP avec une sensibilité de 66 % et une spécificité de 88,2% en utilisant un seuil de 42,5 ng/mL. Dès lors, la protéine EN2 urinaire a été introduite comme un biomarqueur prometteur pour l'aide à la détection précoce du CP.

Ce nouveau marqueur possède une meilleure spécificité que le PSA et il pourrait ainsi être utilisé en deuxième ligne notamment dans le cas de la « zone grise ». Une étude dans ce sens a été publiée par Li et al. [41] qui ont démontré que l'EN2 permet de différencier des tissus tumoraux de ceux provenant d'une prostate hypertrophiée contrairement au PSA.

- Intérêt pronostique

La valeur pronostique EN2 a été étudiée par Pandha et al. [84, 85] sur des sujets ayant subi une prostatectomie totale à la recherche d'une éventuelle corrélation entre les marqueurs résultats de l'examen histopathologiques des glandes prostatiques réséqués et la concentration sérique de PSA et celle de EN2 urinaire. Les résultats ont montré une corrélation entre les niveaux de l'EN2 urinaire et le volume de la tumeur ainsi que son stade, contrairement au PSA dont les concentrations n'étaient pas corrélées à ces paramètres. Les auteurs ont conclu que l'EN2 serait un nouvel outil décisionnel à la biopsie de la prostate compte tenue de la variation significative de la concentration de EN2 entre le stade T1 (non palpables découvertes en général d'une façon fortuite) et le stade T2 (palpables localisées à la prostate).

Quant au suivi des rechutes, aucune étude à notre connaissance ne s'est intéressée à l'éventuelle utilisation de l'EN2 pour cette finalité.

3. Techniques analytiques usuelles de détection des biomarqueurs du cancer de la prostate

3.1. Technique d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA pour enzyme-linked immunosorbent assay)

ELISA est une technique de dosage immunologique qui permet la détection et ou la quantification d'un antigène ou d'un anticorps dans un échantillon biologique. Le principe de cette technique repose sur la visualisation d'une reconnaissance antigène-anticorps grâce à une réaction enzymatique colorimétrique.

Le dosage des marqueurs tumoraux de nature protéique est souvent réalisé par la technique ELISA « sandwich » dont le principe consiste à piéger l'antigène d'intérêt entre un « anticorps de capture » immobilisé au fond des puits des microplaques et un « anticorps de détection »

marqué par une enzyme. [86]. L'enzyme, couplée à l'anticorps de détection, catalyse une réaction chimique qui transforme son substrat en composé coloré comme le montre la figure 1.5. Un lecteur de microplaques ELISA à absorbance détecte la variation de couleur produite lorsque l'antigène cible est présent. Un logiciel pour lecteurs de microplaques est utilisé pour tracer les courbes d'étalonnage et calculer les résultats [87]. Cette technique est couramment utilisée dans l'étude des biomarqueurs tumoraux de nature protéique du CP tels que le PSA [88-90] et l'EN2 [76, 84, 91].

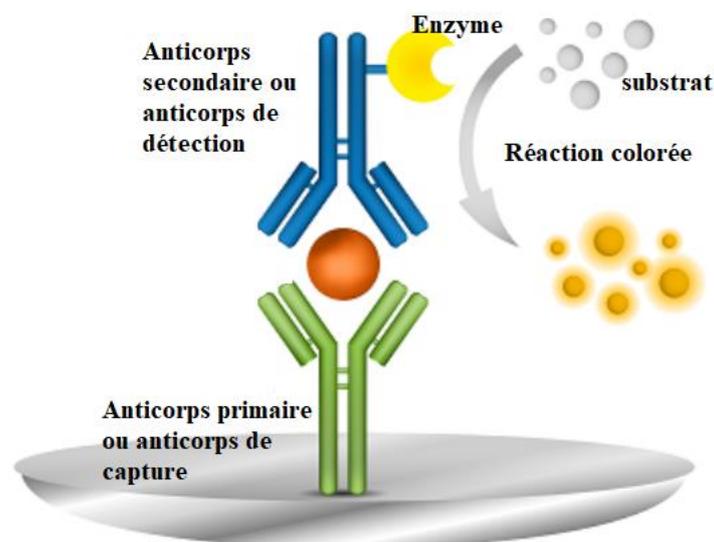


Figure 1.5 : Principe de la technique ELISA

3.2. Immunodosage par chimiluminescence (CLIA pour Chemiluminescent immunoassay)

CLIA est une technique d'immunodosage proche de l'ELISA où la reconnaissance d'une cible se fait par un anticorps marqué par une molécule luminescente engendrant l'émission de photon de lumière visible ($\lambda = 300-800$ nm) mesurée par un luminomètre [92, 93].

La production continue de l'intermédiaire entraîne l'émission constante de lumière constituant le signal de sortie en photons

Il existe trois catégories de systèmes chimiluminescents [94-96] illustrés par la figure 1.6:

- La chimiluminescence directe : le marquage de l'anticorps se fait par une molécule luminescente telle que l'ester d'acridinium. L'émission de la lumière par cette molécule se fait par oxydation en présence de peroxyde d'hydrogène (figure 1.6a).

- La chimiluminescence indirecte : implique le marquage de l'anticorps de détection par une enzyme la HRP qui catalyse la décomposition de son substrat le luminol, en présence de peroxyde d'hydrogène, pour former un état intermédiaire excité. Une lumière visible (maximum à 425nm) est émise lors du retour de à l'état fondamental (figure 1.6b).

-L'électrochimiluminescence : comme le montre la figure 1.6c, l'électro-oxydation concomitante du marqueur tris(bipyridine) ruthénium II $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ et la tri-n-propylamine (TPrA) engendre la formation de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ et TPrA^\bullet respectivement. Ce dernier radical fortement réducteur réduit le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ pour donner la forme excitée $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+*}$. Le retour à l'état fondamental (c'est-à-dire $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$) est accompagné par l'émission d'une lumière orange de 620 nm (figure 1.6c).

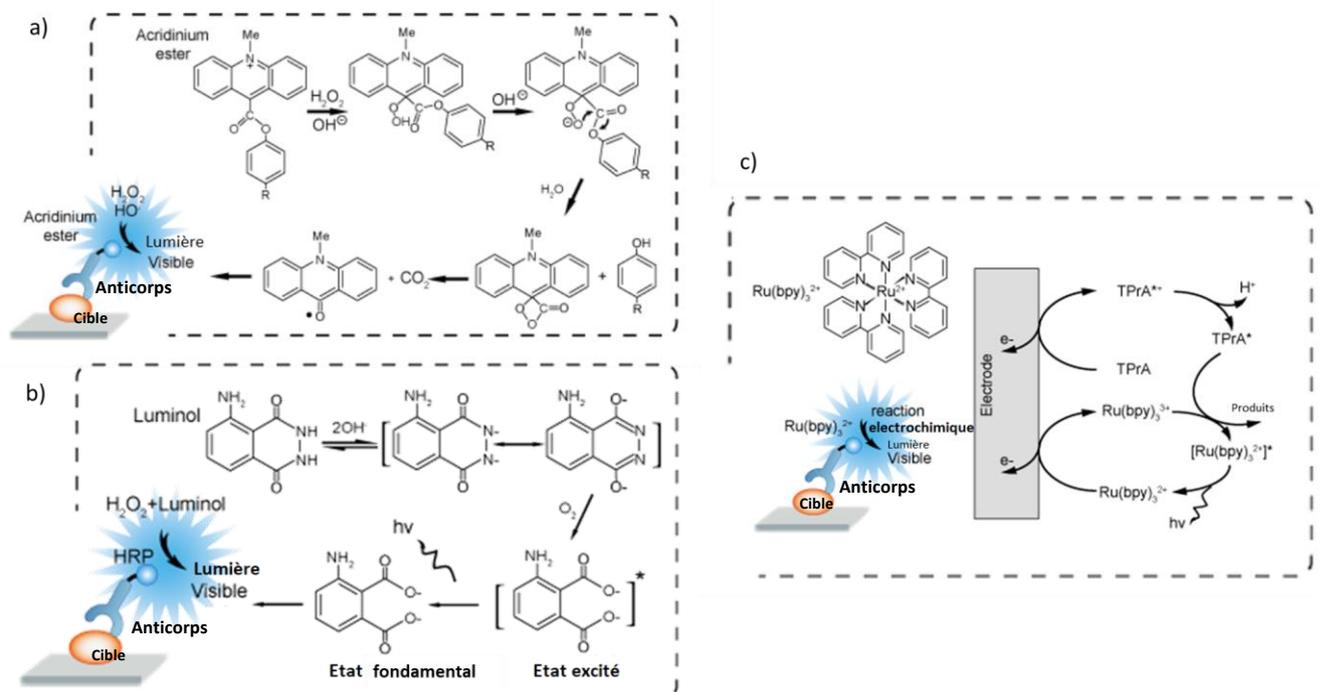


Figure 1.6 : Les types de systèmes chimiluminescents: a) la chimiluminescence directe, b) la chimiluminescence indirecte , c) l'électrochimiluminescence [97]

La technique CLIA se prête aisément à l'automatisation et elle est très répandue pour le dosage du PSA [98-102].

3.3. La PCR (pour Polymerase Chain Reaction)

La PCR est une technique de répliation ciblée in vitro qui consiste en une succession de réactions de répliation d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier, des

désoxyribonucléotides : briques nécessaires à la construction de nouveaux brins d'ADN et une enzyme : ADN polymérase (Taq polymérase) résistante aux températures élevées qui catalyse la réaction de polymérisation de l'ADN.

Un cycle PCR est constitué de 3 étapes illustrées dans la figure 1.7 : (i) dénaturation par chauffage à une température de 95°C qui permet la séparation des deux brins d'ADN (ii) hybridation des amorces sur les brins séparés à des températures plus basses (entre 50 et 70 °C), (iii) élongation où la Taq polymérase en présence des désoxyribonucléotides dans le milieu réactionnel complète la synthèse des brins d'ADN à partir des amorces. A la fin, une réaction de n cycles permet d'obtenir 2^n copies d'ADN.

Ainsi, à partir d'un échantillon peu abondant, cette technique donne rapidement une quantité importante et exploitable d'un segment précis d'ADN.

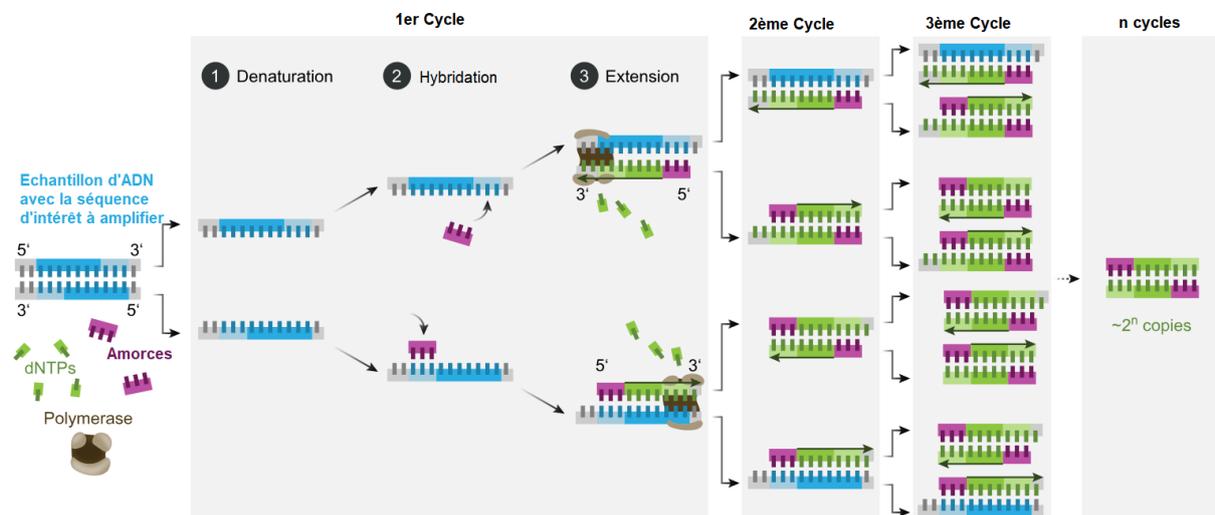


Figure 1.7 : Principe de la réaction PCR

La PCR quantitative ou la PCR en temps réel est une variante PCR qui permet de suivre en continu (« en temps réel ») le processus d'amplification PCR en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR néo formés [103].

Cette technique innovante a été largement exploitée dans la recherche et la quantification des marqueurs tumoraux du CP à base d'ADN tel que le gène de fusion Tmprss2: ERG [37-39, 104] et ceux à base d'ARN après une étape de transcription reverse dont nous citons les micro ARN [31, 105-107] et le PCA3 [104, 108-110].

3.4. Spectrométrie de masse (SM)

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet la détermination des masses moléculaires des composés présents dans l'échantillon étudié ainsi que leur identification et leur quantification [111]. L'analyse débute par l'ionisation du composé en espèces individuelles

entières ou fragmentées. Le choix de la méthode d'ionisation (bombardement avec des électrons, des atomes, des photons) dépend de l'étude projetée, de la nature du composé et de son état (gaz, liquide ou solide) [112]. Les ions obtenus sont alors soumis, sous un vide, à l'action d'un champ électrique et /ou magnétique. Un ou plusieurs analyseurs de masse vont fournir en sortie des informations sous la forme d'un spectre de masse contenant des pics d'intensité variable, localisés à des positions représentant le ratio entre la masse m et la charge z des molécules (m/z). L'interprétation de l'information portée par ce spectre peut permettre d'identifier la ou les molécule(s) analysée(s) [112, 113]. Le principe de la SM est illustré par la figure 1.8.

Les méthodes séparatives (électrophorèse capillaire, chromatographies en phases liquide et gazeuse) sont fréquemment couplées à la spectrométrie de masse. Elles permettent d'introduire dans le spectromètre de masse un échantillon relativement pur et exempt de composés qui pourraient perturber l'ionisation des solutés d'intérêt dans la source [111, 114].

Les nouvelles méthodes d'ionisation douces (causant peu ou pas de fragmentation aux molécules analysées) notamment l'ionisation par électro nébulisation (ESI) et la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) sont actuellement les plus populaires dans les analyses de différentes macromolécules biologiques, principalement les protéines.[115]

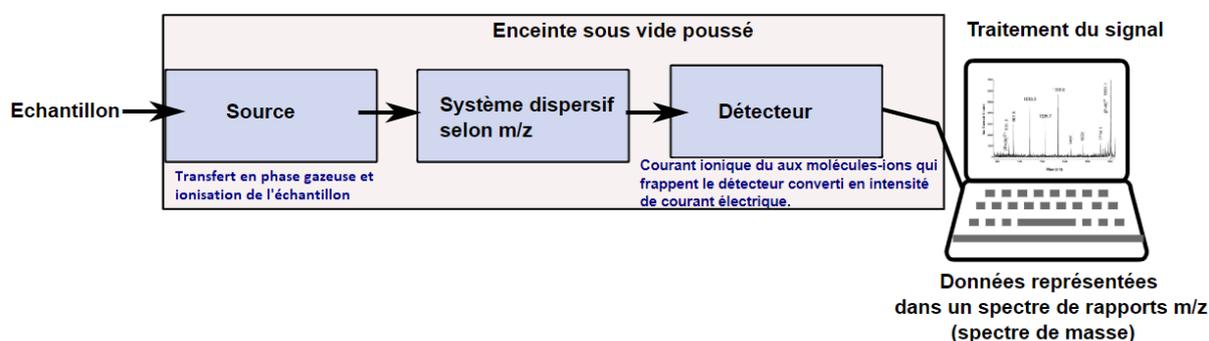


Figure 1.8 : Principe simplifié de la spectrométrie de masse [116]

Cette méthode, qui s'applique à une large gamme de molécules, convient au screening de marqueurs tumoraux potentiels du CP [117] dans le sérum et les urines tels que les glycoprotéines (la fibrilline 1 par exemple) [118, 119], les phospholipides [120], les composés organiques volatils [121, 122], les acides organiques (acide citrique, acide succinique, acide lactique, acide 2 cétooglutarique) [123] et certains métabolites de la voie de synthèse des hormones stéroïdiennes [124]. De même divers biomarqueurs protéiques ont été étudiés par

Larkin et al. [125] dont le PSA, la protéine sérique amyloïde A, la proto-oncogène tyrosine-protéine kinase (c-Src) et la cystatine C.

Partie 2 : Les biocapteurs électrochimiques pour la détection des biomarqueurs du cancer de la prostate

Le diagnostic précoce du cancer est crucial pour une meilleure prise en charge de la maladie. Il est donc nécessaire de disposer de méthodes très sensibles et rapides pour détecter les marqueurs tumoraux présents à des taux faibles pendant les premiers stades de la maladie. La technologie des biocapteurs propose des solutions analytiques qui répondent à ces exigences [1].

4. Définition d'un biocapteur

Les biocapteurs sont des dispositifs analytiques formés d'un biorécepteur, un élément biologique capable de reconnaître spécifiquement ou sélectivement l'analyte d'intérêt, et d'un transducteur qui transforme cette reconnaissance en un signal physique mesurable qui sera transmis à un système d'analyse des données pour être traité. Un schéma explicatif des différentes parties d'un biocapteur est présenté sur la figure 1.9.

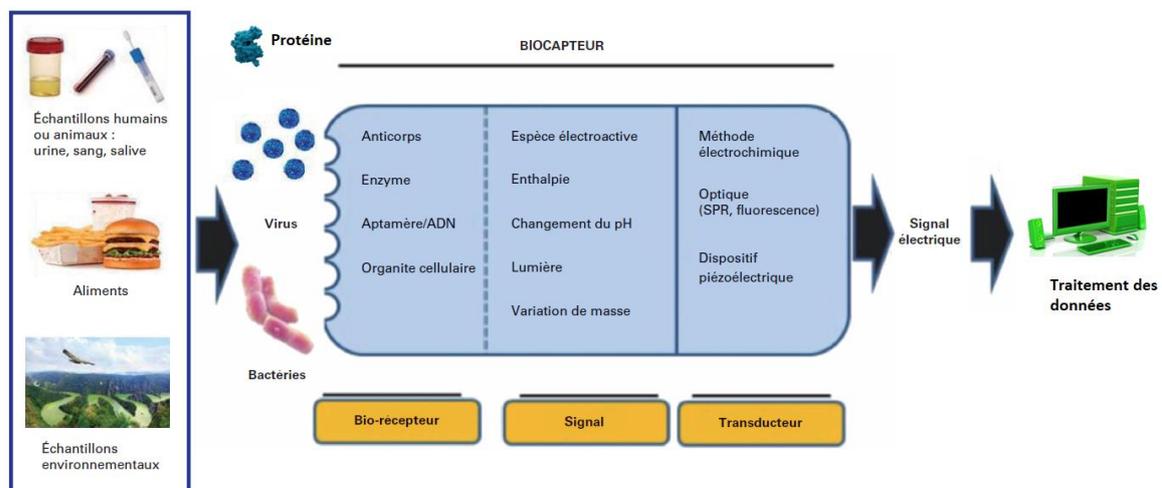


Figure 1.9 : Schéma représentatif d'un biocapteur (sur la base de [126])

Ci-après sont présentés les principaux paramètres analytiques qui caractérisent un biocapteur :

- La sensibilité analytique S : elle correspond au quotient de l'accroissement de la grandeur de sortie ΔY par l'accroissement correspondant du mesurande ΔX (équation. 1.1).

$$S = \frac{\Delta Y}{\Delta X} \quad \text{Équation 1-1}$$

- La limite de détection : c'est la plus petite concentration qui peut être distinguée du blanc avec un risque de 0,13 % de les confondre (incapacité de quantification avec un niveau de confiance

acceptable). C'est son acronyme anglais LOD (pour Limit Of Detection) qui est souvent utilisé. Elle est estimée de différentes façons selon les applications et la méthode retenue. On peut citer celle basée sur le rapport signal sur bruit, celle utilisant l'analyse des blancs, ou encore celle basée sur la sensibilité, définie à partir de la relation :

$$\text{LOD} = \frac{3 \times S_a}{b} \quad \text{Équation 1-2}$$

S_a est l'écart-type sur l'ordonnée à l'origine et b est la pente de la droite d'étalonnage. Le facteur multiplicatif 3 correspond à un risque de 0,13 % de conclure à la présence de la substance recherchée alors qu'elle est absente.

- Limite de quantification : c'est la plus petite valeur de concentration pouvant être mesurée, avec une incertitude acceptable, pour obtenir un signal de sortie non nul. Dans ce manuscrit, nous avons retenu cette définition pour estimer les plus faibles valeurs détectées.
- La reproductibilité : c'est l'étroitesse de l'accord entre les résultats des mesures d'une même grandeur par différents opérateurs dans différentes conditions usuelles d'emploi de l'instrument ou du dispositif à des intervalles de temps assez longs par rapport à la durée d'une seule mesure.
- La répétabilité : c'est l'étroitesse de l'accord entre les résultats de mesures successives, d'un même mesurande, effectuées avec la même technique et au même laboratoire, par le même opérateur, avec les mêmes instruments de mesure et à des intervalles de temps assez courts.
- Les grandeurs d'influence : grandeurs susceptibles de modifier les caractéristiques métrologiques d'un biocapteur. Elles peuvent être d'origine thermique, électrique, biologique, chimique, etc.
- La sélectivité : c'est la capacité d'une méthode à distinguer un analyte donné des autres substances présentes dans le milieu de détection. C'est l'un des principaux paramètres qui caractérisent et décrivent une procédure analytique, en particulier dans le cas de l'analyse de traces.
- La spécificité : il est assez courant de confondre la sélectivité avec la spécificité et vice versa ; cependant, les deux termes diffèrent de manière significative. La spécificité décrit une situation idéale, dans laquelle un seul et unique composé influence la réponse du dispositif de mesure.
- La stabilité : c'est la capacité d'un biocapteur à conserver ses performances métrologiques dans le temps
- Le temps de réponse : c'est la durée nécessaire pour obtenir, avec une incertitude acceptable, un signal de sortie non nul.

Pour mettre en évidence les avantages de la technologie des biocapteurs, nous avons établi une étude comparative résumée dans le tableau 1.4 entre cette dernière et les techniques usuelles de dosage des biomarqueurs tumoraux.

Tableau 1.4 : Comparaison entre les différentes techniques de dosage des biomarqueurs tumoraux

<i>TECHNIQUE</i>	<i>AVANTAGES</i>	<i>LIMITATIONS</i>	<i>CIBLES</i>
<i>ELISA</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilité • Précision 	<ul style="list-style-type: none"> • Cout élevé • Nécessite un incubateur, un système de lavage et un lecteur spectrophotométrique de microplaques • Réalisé en 96 puits ⇒ Inapproprié pour les tests uniques et rapides 	Protéines
<i>RADIOIMMUNOASSAY</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Grande sensibilité • Pas sensible aux effets du pH, de la force ionique et des inhibiteurs 	<ul style="list-style-type: none"> • Nécessite d'utilisation d'hormones marquées avec des éléments radioactifs • Courte Durée de vie des radiomarqueurs • Génération de déchets radioactifs 	Antigènes
<i>PCR</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Grande sensibilité • Large gamme dynamique 	<ul style="list-style-type: none"> • Cout élevé • Dépendant de la disponibilité des réactifs 	ADN et ARN
<i>Spectrométrie de masse</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Grande sensibilité 	<ul style="list-style-type: none"> • Possibilité de contamination des échantillons par les précédents tests • Limitations par l'instrumentation (calibration, type de LASER, ...) 	Protéines, métabolites, phospholipides, acides organiques
<i>Biocapteurs</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Grande sensibilité • Précision • Versatilité • Dispositifs miniaturisables et utilisables in-situ • Mesure rapide • Faible coût. 	<ul style="list-style-type: none"> • Qualité des électrodes variable selon les fournisseurs • Reproductibilité non aisée des process de fonctionnalisation de surface • Nécessité de créer de nouveaux dispositifs de lecture en vue d'une utilisation à grande échelle. 	Tout type de biomolécules

5. Les Biorécepteurs

Les bio-récepteurs, qui sont les éléments de reconnaissance d'un biocapteur, peuvent être divisés en deux catégories [127]

5.1. Les biorécepteurs naturels

Ce sont les biomolécules les plus couramment utilisées dans la fabrication des biocapteurs. On distingue :

- Les enzymes, qui sont des biocatalyseurs de nature protéinique synthétisés par la cellule vivante, et spécifiques d'une réaction donnée. Elles accélèrent les réactions biochimiques en abaissant leur énergie d'activation et en agissant en quantité infime sans être modifiées par la réaction. Leur activité varie en fonction de certains facteurs comme la température, le pH et leur concentration.

- Les anticorps, qui sont des protéines de la famille des immunoglobulines en forme de Y formées de deux paires de chaînes lourdes et légères reliées par des ponts disulfures. Ces molécules peuvent être divisées en deux régions, une constante et une variable (figure 1.10). Secrétés par les plasmocytes, les anticorps sont impliqués dans l'immunité. Ils ont la capacité de reconnaître un antigène étranger (un agent infectieux par exemple) et de s'y fixer de manière spécifique pour le neutraliser. Cette spécificité est conférée par la présence de domaines situées aux extrémités des anticorps (dans la région variable) appelés paratopes. Ces derniers reconnaissent un ou plusieurs sites bien définis dans l'antigène appelés épitopes. Quand l'anticorps ne reconnaît qu'un seul épitope sur un antigène donné, on parle d'anticorps monoclonal (polyclonal dans le cas inverse).

L'interaction entre l'antigène et les acides aminés du site résulte de diverses forces attractives (liaisons hydrogène, hydrophobes, forces de Van der Waals et électrostatiques). Bien que ces forces soient faibles de nature, leur grand nombre permet une énergie de liaison élevée [128][127][127][127][126][125][125][125][125][124][124].

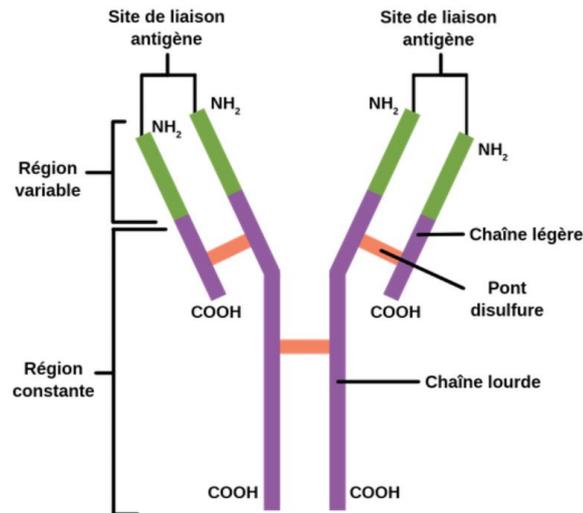


Figure 1.10 : Structure simplifiée d'un anticorps

- Les Micro-organismes, qui sont des organismes dont la taille est généralement inférieure à 1 mm de diamètre. Ils sont souvent unicellulaires, et lorsqu'ils sont multicellulaires, ils n'ont pas de tissus différenciés. Cette classe englobe une variété d'espèces différentes qu'on peut classer en trois catégories : (i) les procaryotes dont la structure cellulaire ne comporte pas de noyaux (les bactéries), (ii) les eucaryotes qui se caractérisent par la présence de noyau cellulaire et d'organites cellulaires (champignons, protozoaires tels que les amibes, les algues vertes, les planctons...) et (iii) les virus (particules biologiques formées de support génétique et d'une enveloppe protéique) [129].

- L'acide désoxyribonucléique (ADN) : support de l'information génétique, il comporte une succession d'unités appelées nucléotides composés chacun de trois éléments : (i) un sucre à 5 carbones "désoxyribose", (ii) un groupement phosphate attaché au désoxyribose par l'atome de carbone 3' ou 5' et (iii) une base azotée purique et pyrimidique liée à la molécule de sucre par le carbone 1' comme décrit dans la figure (1.11a).

Il existe 4 types de bases azotées : l'adénine (A), la thymine (T), la guanine (G) et la cytosine (C). Pour former la structure secondaire en double hélices de l'ADN (figure 1.11b), deux chaînes de polynucléotides vont se lier grâce à des liaisons hydrogènes entre les différentes bases azotées selon une complémentarité adénine/thymine et cytosine/guanine. Les unités sucre-phosphate qui relient les bases azotées vont former alors une enveloppe extérieure et les bases azotées sont orientées vers l'intérieur du double brin d'ADN. [130]

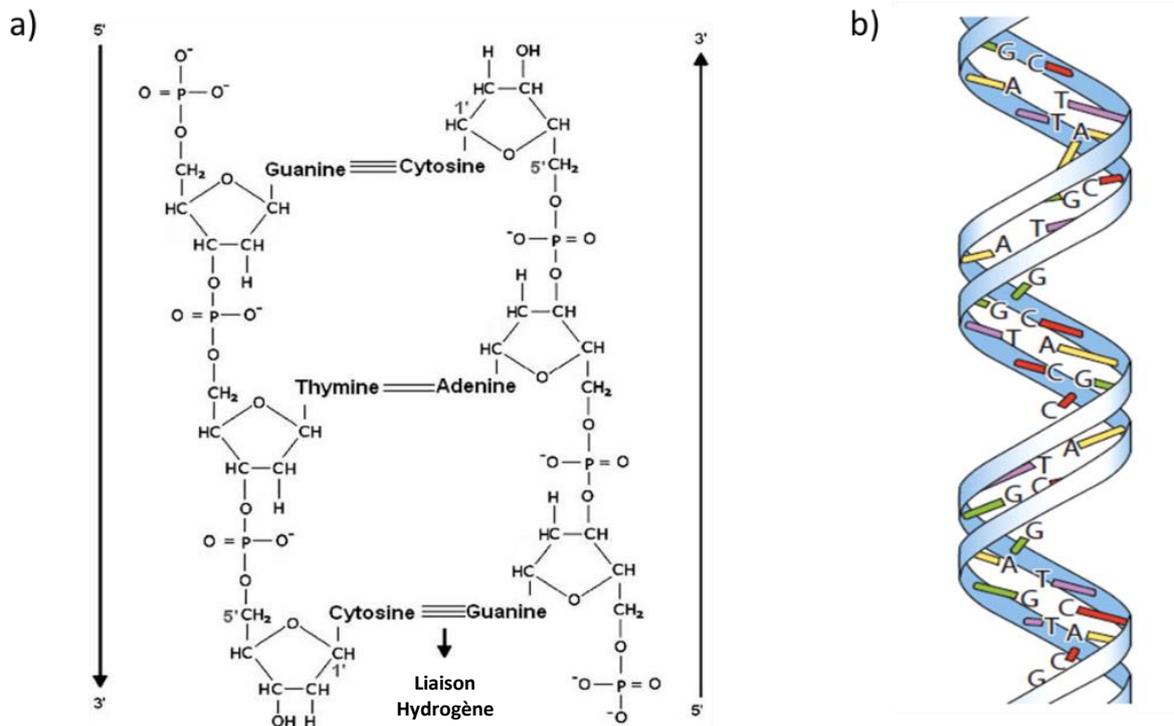


Figure 1.11 : a) Structure des nucléotides formant l'ADN ; b) Représentation de la structure de l'ADN à double hélice

5.2. Les biorécepteurs artificiels

5.2.1. L'impression moléculaire

Il s'agit d'un procédé qui permet la synthèse de récepteurs artificiels pour une molécule cible donnée (Figure. 1.12). L'impression moléculaire est une technique par laquelle des monomères fonctionnels judicieusement sélectionnés s'auto-assemblent autour de la molécule d'intérêt (template) et sont ensuite polymérisés (parfois en présence d'un agent de réticulation) par voie chimique ou électrochimique. Une fois les templates extraits du polymère résultant, des cavités complémentaires en forme, en taille et en groupements chimiques fonctionnels apparaissent dans la matrice, et fixeront ultérieurement des molécules identiques (analytes). On peut parler ainsi d'un système de clé-serrure, à l'image des enzymes [131-133].

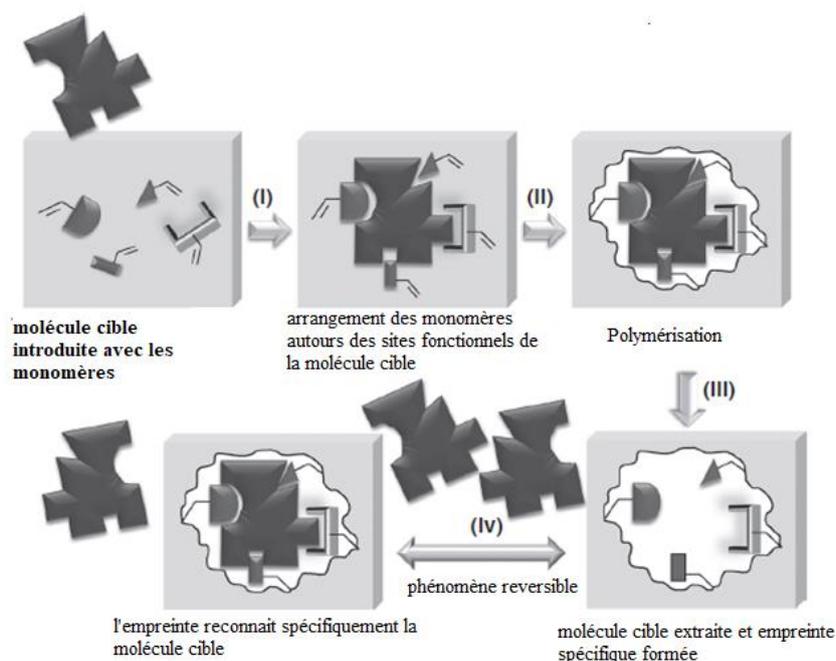


Figure 1.12 : Principe de l'élaboration du polymère à empreintes moléculaires (sur la base de [131])

5.2.2. Les aptamères

Il s'agit de séquences d'oligonucléotides, ARN ou ADN, généralement identifiés par SELEX (pour Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment), une méthode combinatoire de sélection *in vitro*. Ils peuvent être générés contre différents types de cibles : peptides, protéines, acides nucléiques, et même des petites molécules [134]. Ils ont en général des affinités élevées vis-à-vis de leurs cibles, ce qui peut leur conférer une spécificité remarquable. Faciles à synthétiser, ils sont de plus en plus utilisés, depuis quelques années, dans différentes techniques de diagnostic [135].

6. Les méthodes d'immobilisation des biorécepteurs

L'adsorption physique ou chimique, la liaison covalente, l'adhésion par affinité et la réticulation sont les méthodes les plus utilisées pour immobiliser les éléments de reconnaissance sur la surface d'un transducteur donné [136, 137]. Le choix de la stratégie d'immobilisation repose sur une connaissance approfondie des propriétés de l'élément de reconnaissance.

La sensibilité, la stabilité, la spécificité et le coût d'un capteur dépendent certes de l'élément de biorecognition, mais aussi de son accessibilité via un choix judicieux de la technique de fonctionnalisation et de la nature de la surface de travail et du mécanisme de transduction impliqué [137].

Dans cette partie, nous allons décrire les méthodes de fonctionnalisation fréquemment utilisées pour la construction de biocapteurs.

6.1. Les monocouches auto-assemblées (Self-assembled monolayers : SAMs)

Ce sont des assemblages moléculaires ordonnés qui se forment spontanément par adsorption chimique de molécules présentant une affinité spécifique avec un substrat donné. Leur structure générale, présentée dans la Figure 1.13, est constituée d'un groupement d'ancrage (ou réactif) ayant une affinité spécifique pour la surface, d'un bras espaceur constitué de chaînes alcanes, dont la longueur détermine l'épaisseur de la monocouche (de 1 à 3 nm), et d'un groupement fonctionnel terminal (appelé également groupement de tête) qui détermine les propriétés physicochimiques de la surface et conditionne l'organisation moléculaire de la SAM. [138].

Les molécules d'une SAM s'auto-assemblent pour adopter une orientation commune favorisée par les interactions de Van der Waals entre chaînes alkyles.

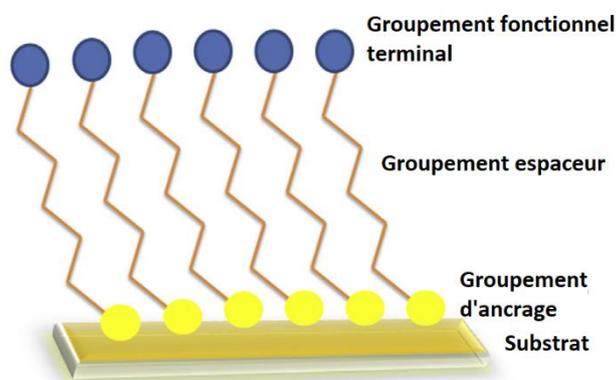


Figure 1.13: Schéma d'une monocouche auto-assemblée

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la préparation des SAMs sur des substrats métalliques. La plus simple consiste à immerger le substrat (ou l'électrode) dans une solution diluée de la molécule adsorbée [137]. En raison de l'interaction spécifique entre la molécule et le substrat, l'adsorption peut souvent être réalisée dans une variété de solvants, polaires et non polaires, ce qui permet une plus grande flexibilité dans la conception moléculaire et, par conséquent, la nature et les propriétés des surfaces qui peuvent être modifiées et contrôlées [139].

Dans la formation des SAM, il doit donc y avoir une évolution de l'ordre moléculaire au fur et à mesure que l'adsorption progresse et que la couverture de la surface augmente. D. K Schwartz [139] a rapporté que dans les premières étapes, les molécules sont adsorbées de façon isolée et désordonnée ; elles sont donc distribuées de manière aléatoire sur le substrat. Les molécules se réarrangent progressivement par la suite, elles se redressent et se tiennent approximativement

perpendiculaires au plan de la surface avec un angle d'inclinaison polaire possible d'environ 30°[140].

Différents types de composés peuvent être utilisés dans le cas de substrat en or, principalement à base de soufre : des organosoufrés des thiols (ou mercaptans) de formule générale R-SH, des dérivés sulfurés, disulfurés, des xanthate, des thiocarbamates, ou encore des cycles aromatiques porteurs d'une fonction thiol tel que le thiophénol, la mercaptopyridine, la mercaptoaniline ou encore la mercaptoimidazole (figure 1.14) [141-144].

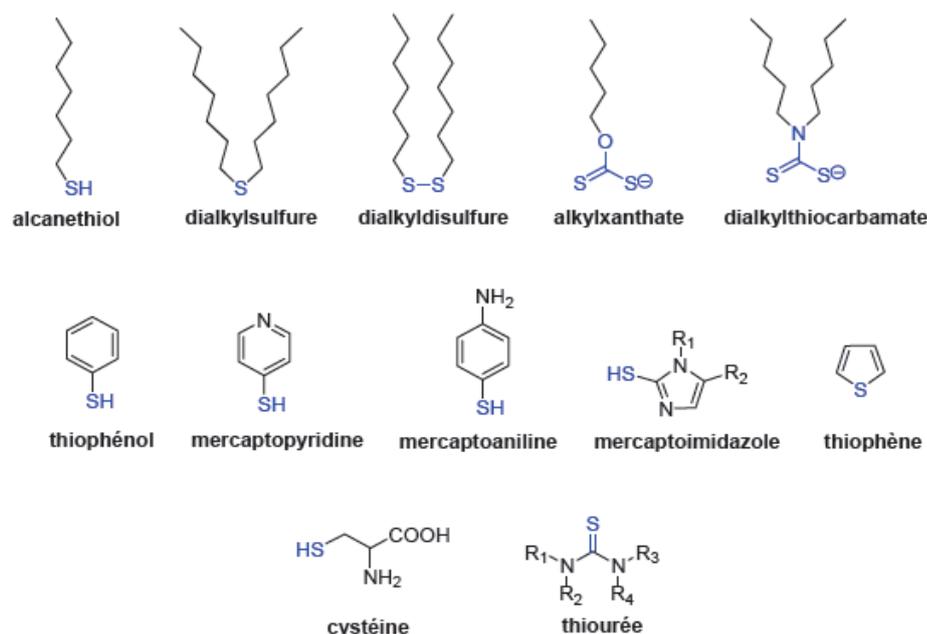


Figure 1.14 : Composés organosoufrés pouvant être utilisés pour l'élaboration de SAMs sur un substrat en or

Plusieurs méthodes ont été développées pour greffer les biomolécules sur des surfaces SAMs. Elles peuvent être classées essentiellement en deux catégories en fonction du mécanisme de fixation : (i) greffage par interaction non covalente entre les biomolécules et les groupes de tête de la SAM (telle que l'interaction électrostatique, hydrophile, hydrophobe ou une combinaison de celles-ci), (ii) greffage par la formation de liaisons covalentes entre les biomolécules et les groupements fonctionnels des SAMs [140].

Un choix judicieux de la méthode de fixation est important pour la conception d'un biocapteur, car l'activité des biomolécules peut diminuer en raison de l'orientation aléatoire ou de la déformation de leur structure native [140].

6.2. Les films de polymères conducteurs

Les polymères conducteurs ont suscité ces dernières années beaucoup d'intérêt dans le domaine des biocapteurs car ils ont l'avantage d'être biocompatibles, pour une partie, et de posséder des propriétés électroniques similaires à celles des métaux, tout en conservant les propriétés des polymères organiques classiques.[145]

Ils peuvent être classés selon leurs structures en 4 familles représentées dans la figure 1.15: (i) polyéniques, (ii) aromatiques, (iii) hétérocycliques aromatiques et (iv) systèmes mixtes [146, 147].

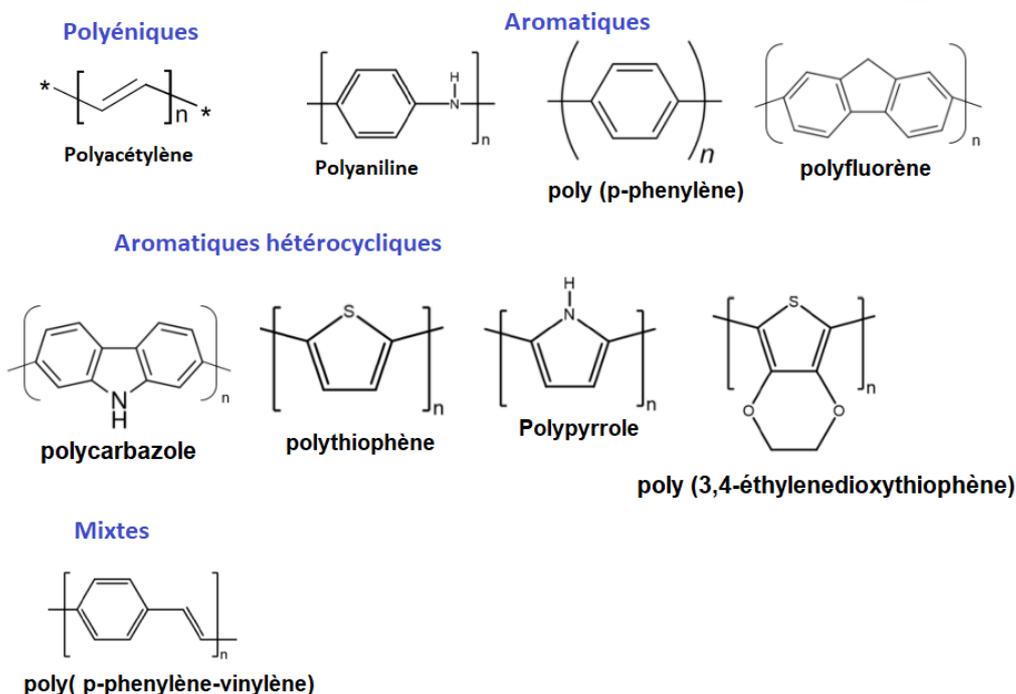


Figure 1.15 : Structure chimique des polymères conducteurs les plus courants

Leur structure commune formée d'une chaîne principale conjuguée, avec une alternance de liaisons simples et doubles, permet l'établissement d'un réseau π délocalisé responsable de leur conductivité électronique [148].

Ils peuvent être oxydés ou réduits, c'est-à-dire dopés sous une forme qui est conductrice de façon relativement réversible, en même temps un anion ou cation (dopant) s'insère dans le polymère pour assurer la neutralité électrique. Le passage de la forme oxydée à la forme réduite se fait soit par expulsion d'anions soit par insertion de cations dans la matrice polymérique[149, 150].

Le dépôt d'un film conducteur à la surface d'un transducteur peut être réalisé via plusieurs méthodes. La plus courante est la voie électrochimique qui consiste à appliquer un potentiel

approprié à l'électrode de travail immergée dans une solution contenant le monomère sélectionné. On obtient ainsi un film homogène, reproductible et stable au cours du temps [151]. D'autres techniques sont utilisées pour la réalisation de polymères conducteurs dont le « dip-coating » qui consiste à tremper l'électrode dans une solution de polymérisation, ou le « spin-coating », technique pendant laquelle une solution est déposée sur un substrat en rotation jusqu'à l'évaporation du solvant et la formation du film [152]

Chacune des techniques présentées dans cette section présente des avantages et des inconvénients (tableau 1.5). La réussite d'un biocapteur repose donc sur un choix judicieux de la technique de fonctionnalisation selon la molécule à détecter.

Tableau 1.5 : Avantages et inconvénients des différentes techniques de fonctionnalisation

Méthode	Avantages	Inconvénients
Les monocouches auto assemblées	<ul style="list-style-type: none"> - Méthode de préparation simple - Stabilité des monocouches formées 	<ul style="list-style-type: none"> - Temps d'assemblage lent - Possibilité d'utilisation de solvants toxiques
Les polymères conducteurs	<ul style="list-style-type: none"> - Méthode de synthèse rapide et reproductible 	<ul style="list-style-type: none"> - Possibilité de vieillissement du polymère au cours du temps, ce qui conduit à l'altération des performances du capteur - Plusieurs étapes d'optimisation sont nécessaires pour la réussite du PC

7. Application des biocapteurs pour la détection des marqueurs tumoraux du cancer de la prostate

Diverses techniques de transduction ont été utilisées pour le design de capteurs dédiés à la détection de biomarqueurs de cancer de la prostate : la gravimétrie [153-157], la colorimétrie [158-161], et l'optique [162-167].

Notre travail étant dédié aux biocapteurs électrochimiques, nous avons donc fait le choix d'axer cette section de l'état de l'art sur les dispositifs à transduction électrochimique. Dans le tableau 1.6 nous avons présenté la stratégie de fonctionnalisation et les performances métrologiques des biocapteurs développés par différentes équipes travaillant dans ce domaine.

Tableau 1.6 : Exemples de biocapteurs électrochimiques pour la détection des marqueurs tumoraux du cancer de la prostate

Marqueur tumoral	Méthode électrochimique	Stratégie de fonctionnalisation	Domaine de linéarité	Sensibilité	Constante d'affinité	Limite de détection	Références
PSA	SWV	Polymère à empreintes moléculaires à base de polypyrrole synthétisé par CV	0,01 à 4 ng/mL	4,8 $\mu\text{A}/\text{mL}\cdot\text{ng}^{-1}$	26×10^{-14} M	$2 \cdot 10^{-3}$ ng/mL	[168]
	SWV	Aptamère greffé directement sur une électrode en or	10 pg/mL à 500 ng/mL	non déterminée	non déterminée	1,24 pg/mL	[169]
	EIS et CV	Anticorps greffés sur une électrode en carbone vitreux fonctionnalisée par un nanocomposite (AuNPs-ATPGO)	0,01 à 1 pg mL	45,17 $\mu\text{A}\cdot\text{mL}/\text{ng}$	non déterminée	3 fg/mL	[170]
Sarcosine	EIS et CV	La sarcosine oxydase greffée sur une électrode en carbone vitreux dopée par un composite : phosphate de manganèse, 3,4-éthylènedioxythiophène (EDOT) et acide indole-6-carboxylique	1 à 55 μM	0.014 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	non déterminée	11 μM	[171]
	CV	Immobilisation covalente de la sarcosine oxydase sur une	0,001 μM à 100 μM	non déterminée	non déterminée	0,001 μM	[172]

Marqueur tumoral	Méthode électrochimique	Stratégie de fonctionnalisation	Domaine de linéarité	Sensibilité	Constante d'affinité	Limite de détection	Références
		électrode en or fonctionnalisée par un nanocomposite de chitosane et des nanotubes de graphène					
α -Methylacyl-CoA Racemase (AMACR)	SWV	Un anticorps de capture primaire greffé sur la zone de détection via un film de polyaniline et un anticorps de détection secondaire conjugué à HRP	100 ng/mL à 1 ng/mL	0,048 mA/mL. ng (serum) 12,9 mA/mL. ng (urines)	non déterminée	100 pg/mL	[173]
	SWV	Aptamère modifié par (polyhistidine) greffé sur une électrode en or fonctionnalisée par un film de polypyrrole	1 fM à 10 nM	non déterminée	non déterminée	1,4 fM	[174]
Microseminoprotéine beta (MSMB)	EIS	MIP à base d'acide caféique comme monomère	0.5 à 100 ng/mL	non déterminée	6,38 μ A par décade	0,12 ng/mL	[175]
Engrailed 2	EIS	Aptamères greffées sur des électrodes en or modifiées par des nanoparticules d'or	10 fM à 1 nM	non déterminée	61,03 à 98,84 nM	5,62 fM	[176]

Marqueur tumoral	Méthode électrochimique	Stratégie de fonctionnalisation	Domaine de linéarité	Sensibilité	Constante d'affinité	Limite de détection	Références
	CV	Aptamères greffés sur une électrode en carbone-graphène	35 à 185 nM	non déterminée	66 nM	38,5 nM	[177]
PCA3	EIS	ADN biotinylé greffé sur une électrode en carbone fonctionnalisé par des couches de nanoparticules en or et de sulfate de chondroïtine	non précisé	non déterminée	non déterminée	0,12 nM	[178]
	EIS	ADN thiolé pour une double reconnaissance PSA et PCA3 greffé sur une électrode en or, ajout du para-aminothiophénol pour bloquer l'adsorption non spécifique	10^{-12} M à 10 μ M.	non déterminée	non déterminée	83 pM	[179]
	CA	Sonde d'ADN modifiée par un groupement NH ₂ greffée sur une électrode en or fonctionnalisée par des	25 pM à 10 nM	0.01 μ A / nM	non déterminée	4,4 pM	[180]

Marqueur tumoral	Méthode électrochimique	Stratégie de fonctionnalisation	Domaine de linéarité	Sensibilité	Constante d'affinité	Limite de détection	Références
		couches de chitosane et des nanotubes de carbone					
	EIS et CV	Aptamères en ARN thiolé greffé sur une électrode en or	0,1 ng/mL à 1 µg/mL	non déterminée	40 nM	0,26 pM	[181]
micro ARN	Voltammétrie différentielle à impulsions	Sonde ADN thiolé greffé sur une électrode en ITO dopée par du fluor et fonctionnalisée par des nanotubes en carbone et des nanoparticules en or	0,01 fM à 1 µM	non déterminée	non déterminée	0,01 fM	[182]
	EIS	Sonde d'ADN thiolé, greffé sur une électrode en carbone vitreux	10 nM à 10 fM	non déterminée	non déterminée	20 fM	[183]

Objectif de notre travail :

Nous proposons dans ce manuscrit le développement de biocapteurs électrochimiques pour le dosage de trois biomarqueurs du cancer de la prostate. L'idée est de poser les premiers jalons pour une prise en compte des résultats issus de l'ensemble des biomarqueurs plutôt que de les considérer individuellement, ce qui permettrait d'augmenter de façon significative la spécificité et la sélectivité du test, et par conséquent une meilleure détection du cancer de la prostate. Cela passe bien évidemment par la mise en œuvre de trois biocapteurs distincts et une fine caractérisation de ces biocapteurs d'un point de vue métrologique avant de se projeter et d'envisager leur possible utilisation simultanée pour une détection efficiente du CP. Notre choix s'est porté naturellement sur le PSA, le biomarqueur de référence, et deux autres biomarqueurs urinaires plus sensibles et plus spécifiques : l'Engrailed 2 (EN2) et le PCA3.

Références :

1. The Global Cancer Observatory. World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2020: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2020. 2020.
2. Gobrane HLB, Hajjem S, Aounallah-Skhiri H, Achour N, Hsairi M. Mortalité par cancer en Tunisie : calcul des années de vies perdues. *Santé Publique*. 2011;23(1):31-40.
3. Ferlay J EM. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2020.
4. Gandaglia G, Leni R, Bray F, Fleshner N, Freedland SJ, Kibel A, et al. Epidemiology and Prevention of Prostate Cancer. *Eur Urol Oncol*. 1 déc 2021;4(6):877-92.
5. STOM. Cancer de la prostate. In: Olfa Gharbi, éditeur. *Référentiel de la STOM Société Tunisienne d'oncologie médicale*. Tunisie; 2019. p. 78-87.
6. Rozet F, Mongiat-Artus P, Hennequin C, Beauval JB, Beuzeboc P, Cormier L, et al. Recommandations françaises du Comité de cancérologie de l'AFU—actualisation 2020–2022: Cancer de la prostate. *Prog En Urol*. 2020;30(12):S136-251.
7. Tamboli V. Detection of prostate cancer biomarker using molecularly imprinted polymers [Thesis]. [United Kindom]: Cardiff University; 2017.
8. de Santé HA. Cancer de la prostate: Identification des facteurs de risque et pertinence d'un dépistage par dosage de l'antigène spécifique de la prostate (PSA) de population d'hommes à haut risque. *Rapp D'orientation St-Denis Plaine HAS*. 2012;
9. Santé HA de. Détection précoce du cancer de la prostate: Actualisation du référentiel de pratiques de l'examen périodique de santé (EPS). Mai; 2013.
10. Braverman L. «Il n'y jamais rien qui est entré par là!» Résistances et malaises masculins face au toucher rectal. *Rech Sociol Anthropol*. 2017;(48-1):45-64.
11. You J, Cozzi P, Walsh B, Willcox M, Kearsley J, Russell P, et al. Innovative biomarkers for prostate cancer early diagnosis and progression. *Crit Rev Oncol Hematol*. janv 2010;73(1):10-22.
12. Adhyam M, Gupta AK. A Review on the Clinical Utility of PSA in Cancer Prostate. *Indian J Surg Oncol*. 2012;3(2):120-9.
13. Fulla Y. Test PSA et historique des marqueurs sériques. *Corresp En Onco-Urol*. 2010;1(1):27-32.
14. El Fegoun AB, Villers A. Les formes moléculaires du PSA. *Prog En Urol*. 2007;17(2):165-71.

15. Mangin P. Place du PSA et des marqueurs prostatiques dans le dépistage et le diagnostic du cancer de la prostate. *Hegel*. 2011;(1):26-31.
16. Bell N, Gorber SC, Shane A, Joffres M, Singh H, Dickinson J, et al. Recommendations on screening for prostate cancer with the prostate-specific antigen test. *Cmaj*. 2014;186(16):1225-34.
17. Canadian Task Force on Preventive Health Care. The Canadian Task Force on Preventive Health Care recommends against screening for prostate cancer with the PSA test. 2014.
18. PLAN POUR LA LUTTE CONTRE LE CANCER EN TUNISIE 2015-2019. Ministère de la Santé de la Tunisie;
19. Auffenberg GB, Meeks JJ. Application of the 2013 American Urological Association early detection of prostate cancer guideline: Who will we miss? *World J Urol*. 2014;32(4):959-64.
20. Vashi AR, Oesterling JE. Percent Free Prostate-Specific Antigen: Entering a New Era in the Detection of Prostate Cancer. *Mayo Clin Proc*. 1 avr 1997;72(4):337-44.
21. Mirimanoff RO. Revue Médicale Suisse : Récidive biochimique après traitement à visée curative d'un cancer localisé de la prostate. *Rev Médicale Suisse*. 2005;1(44):2844-8.
22. El Fegoun AB, Villers A, Moreau JL, Richaud P, Rebillard X, Beuzeboc P. PSA et suivi après traitement du cancer de la prostate. *Prog En Urol*. 2008;18(3):137-44.
23. Eskra JN, Rabizadeh D, Pavlovich CP, Catalona WJ, Luo J. Approaches to urinary detection of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2019;22(3):362-81.
24. Cernei N, Heger Z, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Babula P, et al. Sarcosine as a potential prostate cancer biomarker—A review. *Int J Mol Sci*. 2013;14(7):13893-908.
25. Yousefi M, Qujeq D, Shafi H, Tilaki KH. Serum and urine levels of sarcosine in benign prostatic hyperplasia and newly diagnosed prostate cancer patients. *J Kermanshah Univ Med Sci*. 2020;24(1).
26. Jiang Y, Cheng X, Wang C, Ma Y. Quantitative determination of sarcosine and related compounds in urinary samples by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2010;82(21):9022-7.
27. Gumulec J, Raudenska M, Pacik D, Plevova M, Sorokac-Kubolkova A, Lackova Z, et al. Post-treatment urinary sarcosine as a predictor of recurrent relapses in patients with prostate cancer. *Cancer Med*. 2018;7(11):5411-9.
28. Bianchi F, Dugheri S, Musci M, Bonacchi A, Salvadori E, Arcangeli G, et al. Fully automated solid-phase microextraction-fast gas chromatography-mass spectrometry method using a new ionic liquid column for high-throughput analysis of sarcosine and N-ethylglycine in human urine and urinary sediments. *Anal Chim Acta*. 30 nov 2011;707(1-2):197-203.

29. Kanwal R, Plaga AR, Liu X, Shukla GC, Gupta S. MicroRNAs in prostate cancer: Functional role as biomarkers. *Cancer Lett.* 2017;407:9-20.
30. Mohammadi H, Yammouri G, Amine A. Current advances in electrochemical genosensors for detecting microRNA cancer markers. *Curr Opin Electrochem.* 2019;16:96-105.
31. Mahn R, Heukamp LC, Rogenhofer S, von Ruecker A, Müller SC, Ellinger J. Circulating microRNAs (miRNA) in Serum of Patients With Prostate Cancer. *Urology.* 1 mai 2011;77(5):1265.e9-1265.e16.
32. Ouyang B, Bracken B, Burke B, Chung E, Liang J, Ho SM. A duplex quantitative polymerase chain reaction assay based on quantification of α -methylacyl-CoA racemase transcripts and prostate cancer antigen 3 in urine sediments improved diagnostic accuracy for prostate cancer. *J Urol.* 2009;181(6):2508-14.
33. Suzue K, Montag AG, Tretiakova M, Yang XJ, Sahoo S. Altered expression of α -methylacyl-coenzyme A racemase in prostatic adenocarcinoma following hormone therapy. *Am J Clin Pathol.* 2005;123(4):553-61.
34. Ji J, Chen X. Prostate Cancer Diagnosis Using Urine Sediment Analysis-Based α -Methylacyl-CoA Racemase Score: A Single-Center Experience. *déc 2019;26(1):1073274819887697.*
35. Sjöblom L, Saramäki O, Annala M, Leinonen K, Nättinen J, Tolonen T, et al. Microseminoprotein-Beta Expression in Different Stages of Prostate Cancer. *PLOS ONE.* 2016;11(3):e0150241.
36. Oyibo EU. Comparison of Serum Microseminoprotein-Beta (MSMB) with Total Prostate Specific Antigen (TPSA) in the Diagnosis of Prostate Cancer in African Men. *Int J Innov Sci Res Technol.* 2022;15:16.
37. Sanda MG, Feng Z, Howard DH, Tomlins SA, Sokoll LJ, Chan DW, et al. Association between combined TMPRSS2: ERG and PCA3 RNA urinary testing and detection of aggressive prostate cancer. *JAMA Oncol.* 2017;3(8):1085-93.
38. Tomlins SA, Day JR, Lonigro RJ, Hovelson DH, Siddiqui J, Kunju LP, et al. Urine TMPRSS2: ERG plus PCA3 for individualized prostate cancer risk assessment. *Eur Urol.* 2016;70(1):45-53.
39. Salami SS, Schmidt F, Laxman B, Regan MM, Rickman DS, Scherr D, et al. Combining urinary detection of TMPRSS2:ERG and PCA3 with serum PSA to predict diagnosis of prostate cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 1 juill 2013;31(5):566-71.

40. Morgan R, Boxall A, Bhatt A, Bailey M, Hindley R, Langley S, et al. Engrailed-2 (EN2): a tumor specific urinary biomarker for the early diagnosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 1 mars 2011;17(5):1090-8.
41. Li Q, Shi Y, Sa R, Hao J, Hu J, Xiao M, et al. Altered staining patterns and expression level of Engrailed-2 in benign prostatic hyperplasia and prostate Cancer predict prostatic disease progression. *BMC Cancer.* 15 juin 2020;20(1):555.
42. Wang T, Qu X, Jiang J, Gao P, Zhao D, Lian X, et al. Diagnostic significance of urinary long non-coding PCA3 RNA in prostate cancer. *Oncotarget.* 2017;8(35):58577.
43. Haese A, de la Taille A, van Poppel H, Marberger M, Stenzl A, Mulders PF, et al. Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. *Eur Urol.* nov 2008;54(5):1081-8.
44. Marks LS, Fradet Y, Deras IL, Blase A, Mathis J, Aubin SM, et al. PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy. *Urology.* 2007;69(3):532-5.
45. Auprich M, Chun FKH, Ward JF, Pummer K, Babaian R, Augustin H, et al. Critical Assessment of Preoperative Urinary Prostate Cancer Antigen 3 on the Accuracy of Prostate Cancer Staging. *Eur Urol.* 1 janv 2011;59(1):96-105.
46. Ploussard G, Durand X, Xylinas E, Moutereau S, Radulescu C, Forgue A, et al. Prostate cancer antigen 3 score accurately predicts tumour volume and might help in selecting prostate cancer patients for active surveillance. *Eur Urol.* mars 2011;59(3):422-9.
47. Leyten GHJM, Wierenga EA, Michiel Sedelaar JP, van Oort IM, Futterer JJ, Barentsz JO, et al. Value of PCA3 to Predict Biopsy Outcome and Its Potential Role in Selecting Patients for Multiparametric MRI. *Int J Mol Sci.* 28 04/01/received 05/21/revised 05/23/accepted 2013;14(6):11347-55.
48. Chikouche A. Les marqueurs tumoraux en pratique courante. *Batna J Med Sci.* 2021;8(2):128-35.
49. Dhondt B, Van Deun J, Vermaerke S, de Marco A, Lumen N, De Wever O, et al. Urinary extracellular vesicle biomarkers in urological cancers: From discovery towards clinical implementation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018;99:236-56.
50. Zhou Y, Li Y, Li X, Jiang M. Urinary biomarker panel to improve accuracy in predicting prostate biopsy result in Chinese men with PSA 4–10 ng/ml. *BioMed Res Int.* 2017;2017.
51. Wood SL, Knowles MA, Thompson D, Selby PJ, Banks RE. Proteomic studies of urinary biomarkers for prostate, bladder and kidney cancers. *Nat Rev Urol.* avr 2013;10(4):206-18.

52. Nguy TP, Van Phi T, Tram DT, Eersels K, Wagner P, Lien TT. Development of an impedimetric sensor for the label-free detection of the amino acid sarcosine with molecularly imprinted polymer receptors. *Sens Actuators B Chem.* 2017;246:461-70.
53. Bussemakers MJ, Van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, et al. DD3:: A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.* 1999;59(23):5975-9.
54. Hessels D, Schalken JA. The use of PCA3 in the diagnosis of prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2009;6(5):255-61.
55. Clarke RA, Zhao Z, Guo AY, Roper K, Teng L, Fang ZM, et al. New genomic structure for prostate cancer specific gene PCA3 within BMCC1: implications for prostate cancer detection and progression. *PLOS ONE.* 2009;4(3):e4995.
56. Xavier Filella, Laura Foj. Emerging biomarkers in the detection and prognosis of prostate cancer. *Clin Chem Lab Med CCLM.* 2015;53(7):963-73.
57. van Gils MP, Hessels D, van Hooij O, Jannink SA, Peelen WP, Hanssen SL, et al. The time-resolved fluorescence-based PCA3 test on urinary sediments after digital rectal examination; a Dutch multicenter validation of the diagnostic performance. *Clin Cancer Res.* 1 févr 2007;13(3):939-43.
58. Tinzl M, Marberger M, Horvath S, Chypre C. DD3PCA3 RNA Analysis in Urine – A New Perspective for Detecting Prostate Cancer. *Eur Urol.* 1 août 2004;46(2):182-7.
59. Vlaeminck-Guillem V, Ruffion A, Andre J. Place du test urinaire PCA3 pour le diagnostic du cancer de la prostate. *Prog En Urol.* 2008;18(5):259-65.
60. Groskopf J, Aubin SM, Deras IL, Blase A, Bodrug S, Clark C, et al. APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem.* 2006;52(6):1089-95.
61. Wernecke M, Mullen C. MOLECULAR BIOLOGY | Molecular Biology in Microbiological Analysis. In: Batt CA, Tortorello ML, éditeurs. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. Oxford: Academic Press; 2014. p. 808-14.
62. Wisard M. *Revue Médicale Suisse : Urologie*. Pescia G, éditeur. *Rev Médicale Suisse.* 2010;6(232):145-9.
63. Lee D, Shim SR, Ahn ST, Oh MM, Moon DG, Park HS, et al. Diagnostic performance of the prostate cancer antigen 3 test in Prostate Cancer: A systematic review and meta-analysis. *Clin Genitourin Cancer.* 2020;

64. Dijkstra S, Hamid ARAH, Leyten G, le H. J. M, Schalken JA. Personalized Management in Low-Risk Prostate Cancer: The Role of Biomarkers. *Prostate Cancer*. 2012;2012:7.
65. Alexandre de la Taille. Marqueurs urinaires du cancer de la prostate PCA3, TMPRSS2:ERG, AMACR, LOH, GSTP1 : quelles indications? 2016.
66. Hessels D, Gunnewiek JMK, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van Balken B, et al. DD3PCA3-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol*. 2003;44(1):8-16.
67. Vlaeminck-Guillem V, Devonec M, Champetier D, Decaussi-Petrucci M, Paparel P, Perrin P, et al. Test urinaire PCA3 et diagnostic du cancer prostatique: étude à partir de 1015 patients. *Prog En Urol*. 2015;25(16):1160-8.
68. Yang Z, Yu L, Wang Z. PCA3 and TMPRSS2-ERG gene fusions as diagnostic biomarkers for prostate cancer. *Chin J Cancer Res*. 2016;28(1):65.
69. Lemos AEG, da Rocha Matos A, Ferreira LB, Gimba ERP. The long non-coding RNA PCA3: an update of its functions and clinical applications as a biomarker in prostate cancer. *Oncotarget*. 2019;10(61):6589.
70. Tosoian JJ, Patel HD, Mamawala M, Landis P, Wolf S, Elliott DJ, et al. Longitudinal assessment of urinary PCA3 for predicting prostate cancer grade reclassification in favorable-risk men during active surveillance. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 1 sept 2017;20(3):339-42.
71. Nakanishi H, Groskopf J, Fritsche HA, Bhadkamkar V, Blase A, Kumar SV, et al. PCA3 molecular urine assay correlates with prostate cancer tumor volume: implication in selecting candidates for active surveillance. *J Urol*. 2008;179(5):1804-10.
72. Whitman EJ, Groskopf J, Ali A, Chen Y, Blase A, Furusato B, et al. PCA3 score before radical prostatectomy predicts extracapsular extension and tumor volume. *J Urol*. 2008;180(5):1975-9.
73. Durand X, Moutereau S, Xylinas E, de la Taille A. ProgenesaTM PCA3 test for prostate cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 1 mars 2011;11(2):137-44.
74. Durand X, Xylinas E, Radulescu C, Haus-Cheymol R, Moutereau S, Ploussard G, et al. The value of urinary prostate cancer gene 3 (PCA3) scores in predicting pathological features at radical prostatectomy. *BJU Int*. 2012;110(1):43-9.
75. van Poppel H, Haese A, Graefen M, de la Taille A, Irani J, de Reijke T, et al. The relationship between Prostate CAncer gene 3 (PCA3) and prostate cancer significance. *BJU Int*. 2012;109(3):360-6.

76. McGrath SE, Michael A, Morgan R, Pandha H. EN2 in prostate cancer. *Adv Clin Chem.* 2015;71:47-76.
77. Rissling I, Strauch K, Höft C, Oertel WH, Möller JC. Haplotype Analysis of the Engrailed-2 Gene in Young-Onset Parkinson's Disease. *Neurodegener Dis.* 2009;6(3):102-5.
78. Martin NL, Saba-El-Leil MK, Sadekova S, Meloche S, Sauvageau G. EN2 is a candidate oncogene in human breast cancer. *Oncogene.* 2005;24(46):6890-901.
79. Bose SK, Bullard RS, Donald CD. Oncogenic role of engrailed-2 (en-2) in prostate cancer cell growth and survival. *Transl Oncogenomics.* 2008;3:37.
80. Gómez-Gómez E, Jiménez-Vacas JM, Pedraza-Arévalo S, López-López F, Herrero-Aguayo V, Hormaechea-Agulla D, et al. Oncogenic Role of Secreted Engrailed Homeobox 2 (EN2) in Prostate Cancer. *J Clin Med.* sept 2019;8(9):1400.
81. Killick E, Morgan R, Launchbury F, Bancroft E, Page E, Castro E, et al. Role of Engrailed-2 (EN2) as a prostate cancer detection biomarker in genetically high risk men. *Sci Rep.* 2013;3:2059.
82. Marszall MP, Sroka W, Adamowski M, Slupski P, Jarzemski P, Siodmiak J, et al. Engrailed-2 protein as a potential urinary prostate cancer biomarker: a comparison study before and after digital rectal examination. *Eur J Cancer Prev.* janv 2015;24(1):51-6.
83. Clark J, Hurst R, Winterbone MS, Pandha H, Perry A, McGrath S, et al. Urine Biomarkers for Prostate Cancer Diagnosis and Progression. *Société Int Urol J.* 2021;2(3):159-70.
84. Hardev Pandha, Karen D. Sorensen, Thorsten F. Orntoft, Stephen Langley, Soren Hoyer, Michael Borre, et al. Urinary engrailed-2 (EN2) levels predict tumour volume in men undergoing radical prostatectomy for prostate cancer. *BJU Int.* 2012;110(6b):E287-92.
85. Pandha HS, Javed S, Sooriakumaran P, Bott S, Montgomery B, Hutton A, et al. Correlation of urinary Engrailed-2 levels to tumour volume and pathological stage in men undergoing radical prostatectomy. 2013;
86. Alhabbab RY. Enzyme Immunoassay (EIAs) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In: Alhabbab RY, éditeur. *Basic Serological Testing.* Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 83-95.
87. Dosage d'immunoabsorption enzymatique (ELISA). *Molecular Devices*; [cited 2022; 23 Octobre]. Available from: <https://fr.moleculardevices.com/applications/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa#gref>.
88. Hussein AA, Baban R, Hussein A. Prostate-specific antigen and free prostate-specific antigen/prostate-specific antigen ratio in patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Baghdad J Biochem Appl Biol Sci.* 2020;1(01):18-26.

89. Łupicka-Słowik A, Grzywa R, Leporowska E, Procyk D, Oleksyszyn J, Sieńczyk M. Development and evaluation of an immunoglobulin Y-based ELISA for measuring prostate specific antigen in human serum. *Ann Lab Med.* 2019;39(4):373-80.
90. Acevedo B, Perera Y, Ruiz M, Rojas G, Benitez J, Ayala M, et al. Development and validation of a quantitative ELISA for the measurement of PSA concentration. *Clin Chim Acta.* 2002;317(1-2):55-63.
91. Sophie E McGrath, Agnieszka Michael, Richard Morgan, Hardev Pandha. EN2: a novel prostate cancer biomarker. *Biomark Med.* 2013;7(6):893-901.
92. Cinquanta L, Fontana DE, Bizzaro N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Autoimmun Highlights.* 2017;8(1):1-8.
93. Wang C, Wu J, Zong C, Xu J, Ju HX. Chemiluminescent Immunoassay and its Applications. *Chin J Anal Chem.* 1 janv 2012;40(1):3-10.
94. Geneviève B JL DURAND. *Biochimie médicale - Marqueurs actuels et perspectives* (2e ed.). Lavoisier; 2011. 643 p.
95. Wang YF (Wayne), Kobayashi M. Antibody Detection: Principles and Applications. In: Tang YW, Stratton CW, éditeurs. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2013 [cité 22 janv 2023]. p. 53-73. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3970-7_4
96. Miao W, Choi JP, Bard AJ. Electrogenerated Chemiluminescence 69: The Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II), (Ru(bpy)₃²⁺)/Tri-n-propylamine (TPrA) System Revisited A New Route Involving TPrA^{•+} Cation Radicals. *J Am Chem Soc.* 1 déc 2002;124(48):14478-85.
97. Creative Diagnostic. Chemiluminescence Immunoassay Guide [Internet]. [cité 10 janv 2023]. Disponible sur: <https://www.creative-diagnostics.com/Chemiluminescence-Immunoassay-guide.htm>.
98. Liu R, Wang C, Jiang Q, Zhang W, Yue Z, Liu G. Magnetic-particle-based, ultrasensitive chemiluminescence enzyme immunoassay for free prostate-specific antigen. *Anal Chim Acta.* 1 nov 2013;801:91-6.
99. da Silva Junior MM, Capibaribe DM, Avilez ND, Jalalizadeh M, Dias LB, Laranja WW, et al. Digital rectal examination impact on PSA derivatives and prostate biopsy triggers: a contemporary study. *Int Urol Nephrol.* sept 2022;54(9):2117-23.
100. Ghosh S, Dawn I, Kundu SK. Assesment of serum ferritin along with serum PSA in differential diagnosis of benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. *J Cardiovasc Dis Res.* 13(5):1628-34.

101. Kobayashi M, Kijima T, Yashi M, Kamai T. Prostate-specific antigen kinetics contributes to decision making for biopsy referral: the predictive implication for PSA retest in patients with elevated PSA levels. *Prostate Int* [Internet]. 24 août 2022 [cité 23 janv 2023]; Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2287888222000459>
102. Garrido MM, Marta JC, Ribeiro RM, Pinheiro LC, Holdenrieder S, Guimarães JT. Comparison of Three Assays for Total and Free PSA Using Hybritech and WHO Calibrations. *Vivo Athens Greece*. 2021;35(6):3431-9.
103. Stirling D. Qualitative and Quantitative PCR. *PCR Protoc*. 2003;181-3.
104. Hendriks RJ, Dijkstra S, Jannink SA, Steffens MG. Comparative analysis of prostate cancer specific biomarkers PCA3 and ERG in whole urine, urinary. *Diagn Progn Biomark*. 2021;54(3):37.
105. Zhou Y, Ji Z, Yan W, Zhou Z, Li H. The biological functions and mechanism of miR-212 in prostate cancer proliferation, migration and invasion via targeting Engrailed-2. *Oncol Rep*. 2017;38(3):1411-9.
106. Stuopelytė K, Daniūnaitė K, Jankevičius F, Jarmalaitė S. Detection of miRNAs in urine of prostate cancer patients. *Medicina (Mex)*. 1 janv 2016;52(2):116-24.
107. Seputra KP, Purnomo BB, Susianti H, Kalim H, Purnomo AF. miRNA-21 Serum Evaluation in BPH, Hormone Sensitive Prostate Cancer, and Castrate Resistant Prostate Cancer: Attempt for Diagnostic Biomarker Evaluation. *Acta Inf Med*. déc 2021;29(4):266-9.
108. Mao Z, Ji A, Yang K, He W, Hu Y, Zhang Q, et al. Diagnostic performance of PCA3 and hK2 in combination with serum PSA for prostate cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(42).
109. Li M, Zhou D, Zhang W, Gao S, Zhou X. Urine PCA3 mRNA level in diagnostic of prostate cancer. *J Cancer Res Ther*. 2018;14(4):864-6.
110. Fang Z, He F, Feng H, Jia W, Sun M, Chen T, et al. Comparative Assessment of the Diagnostic Performance of PCA3 in Urinary Sediments and Exosomes for Prostate Cancer in Chinese Population with the Total PSA range of 4-10 ng/ml. 2020;
111. Menet MC. Principes de la spectrométrie de masse. *Rev Francoph Lab*. 2011;2011(437):41-53.
112. Rouessac F, Rouessac A, Daniel Cruch?? Analyse chimique. Dunod; 2004.
113. Cliquet F. Des spectres MS/MS à l'identification des protéines-Interprétation des données issues de l'analyse d'un mélange de protéines d'un organisme non séquencé. Université de Nantes; 2011.

114. Chen D, McCool EN, Yang Z, Shen X, Lubeckyj RA, Xu T, et al. Recent advances (2019–2021) of capillary electrophoresis-mass spectrometry for multilevel proteomics. *Mass Spectrom Rev.* 2021;
115. Jelonek K, Ros M, Pietrowska M, Widlak P. Cancer biomarkers and mass spectrometry-based analyses of phospholipids in body fluids. *Clin Lipidol.* 2013;8(1):137-50.
116. Jean-François Perrin. *Spectromètres de masse.*
117. Latosinska A, Frantzi M, Merseburger AS, Mischak H. Promise and implementation of proteomic prostate cancer biomarkers. *Diagnostics.* 2018;8(3):57.
118. Kawahara R, Ortega F, Rosa-Fernandes L, Guimarães V, Quina D, Nahas W, et al. Distinct urinary glycoprotein signatures in prostate cancer patients. *Oncotarget.* 4 sept 2018;9(69):33077-97.
119. Jia X, Chen J, Sun S, Yang W, Yang S, Shah P, et al. Detection of aggressive prostate cancer associated glycoproteins in urine using glycoproteomics and mass spectrometry. *Proteomics.* déc 2016;16(23):2989-96.
120. Bandu R, Mok HJ, Kim KP. Phospholipids as cancer biomarkers: mass spectrometry-based analysis. *Mass Spectrom Rev.* 2018;37(2):107-38.
121. Khalid T, Aggio R, White P, De Lacy Costello B, Persad R, Al-Kateb H, et al. Urinary volatile organic compounds for the detection of prostate cancer. *PLOS ONE.* 2015;10(11):e0143283.
122. Gao Q, Su X, Annabi MH, Schreiter BR, Prince T, Ackerman A, et al. Application of Urinary Volatile Organic Compounds (VOCs) for the Diagnosis of Prostate Cancer. *Clin Genitourin Cancer.* 1 juin 2019;17(3):183-90.
123. Klupczynska A, Plewa S, Sytek N, Sawicki W, Dereziński P, Matysiak J, et al. A study of low-molecular-weight organic acid urinary profiles in prostate cancer by a new liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *J Pharm Biomed Anal.* 10 sept 2018;159:229-36.
124. Ossoliński K, Nizioł J, Arendowski A, Ossolińska A, Ossoliński T, Kucharz J, et al. Mass spectrometry-based metabolomic profiling of prostate cancer - a pilot study. *J Cancer Metastasis Treat.* 2019;5:1.
125. Larkin SE, Johnston HE, Jackson TR, Jamieson DG, Roumeliotis TI, Mockridge CI, et al. Detection of candidate biomarkers of prostate cancer progression in serum: a depletion-free 3D LC/MS quantitative proteomics pilot study. *Br J Cancer.* 25 oct 2016;115(9):1078-86.
126. Vidic Jasmina. Application des biocapteurs pour la détection des pathogènes. *Tech Ing Technol Pour Santé.* 2016;base documentaire : TIP597WEB(ref. article : bio7115).

127. Sassolas Audrey, Marty Jean-Louis. Biocapteurs au service du diagnostic médical. Tech Ing Technol Pour Santé. 2013; base documentaire : TIP597WEB (ref. article : bio7110).
128. Anticorps: Structure, fonction et application [Internet]. Disponible sur: <https://www.anticorps-enligne.fr/resources/16/1208/anticorps/>
129. Prescott LM, Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Microbiologie. De Boeck Supérieur; 2018.
130. Ozkan-Ariksoysal D, Kara P, Ozsoz M. Electrochemical DNA Biosensors for Detection of Compound-DNA Interactions. In: Electrochemical DNA Biosensors. Pan Stanford Publishing Singapore; 2012. p. 379-402.
131. Alvarez-Lorenzo C. Handbook of Molecularly Imprinted Polymers. Smithers Rapra; 2013. 402 p.
132. Haupt K, Medina Rangel PX, Bui BTS. Molecularly Imprinted Polymers: Antibody Mimics for Bioimaging and Therapy. Chem Rev. 2020;120(17):9554-82.
133. Rajendraprasad N. Applications of Pyrrole Based Molecularly Imprinted Polymers as Analytical Sensors: a Review. Port Electrochimica Acta. 2022;40:273-303.
134. Toulmé JJ, Da Rocha S, Dausse E, Azéma L, Lebars I, Moreau S. Les aptamères : du concept à l'outil. Médecine Nucl. 1 sept 2007;31(9):478-84.
135. Kumar Kulabhusan P, Hussain B. Current Perspectives on Aptamers as Diagnostic Tools and Therapeutic Agents. 9 juill 2020;12(7).
136. Aydemir N, Malmström J, Travas-Sejdic J. Conducting polymer based electrochemical biosensors. Phys Chem Chem Phys. 2016;18(12):8264-77.
137. Sandhyarani N. Surface modification methods for electrochemical biosensors. In: Electrochemical Biosensors. Elsevier; 2019. p. 45-75.
138. Castonguay C. Étude de la déflexion électrochimique de micro-leviers fonctionnalisés d'une monocouche auto-assemblée électroactive. 2019;
139. Schwartz DK. Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation. Annu Rev Phys Chem. 2001;52:107.
140. Samanta D, Sarkar A. Immobilization of bio-macromolecules on self-assembled monolayers: methods and sensor applications. Chem Soc Rev. 2011;40(5):2567-92.
141. Singh M, Kaur N, Comini E. The role of self-assembled monolayers in electronic devices. J Mater Chem C. 2020;8(12):3938-55.
142. Hong M, Yokota Y, Hayazawa N, Kazuma E, Kim Y. Homogeneous Dispersion of Aromatic Thiolates in the Binary Self-Assembled Monolayer on Au(111) via Displacement

- Revealed by Tip-Enhanced Raman Spectroscopy. *J Phys Chem C*. 18 juin 2020;124(24):13141-9.
- 143.Kaur S, Kaur I. Self-assembly of p-Aminothiophenol on Gold Surface: Application for Impedimetric and Potentiometric Sensing of Cobalt (II) Ions—A Comparative Study. *Electroanalysis*. 2019;31(12):2507-17.
- 144.Rosenberg RA, Rozhkova EA, Novosad V. Investigations into Spin-and Unpolarized Secondary Electron-Induced Reactions in Self-Assembled Monolayers of Cysteine. *Langmuir*. 2021;37(9):2985-92.
- 145.Qin X, Xiao-Ya H, Shi-Rong H. Electrochemical sensors based on electropolymerized films. *Electropolymerization InTech*. 2011;187-98.
- 146.Tajik S, Beitollahi H, Nejad FG, Shoaie IS, Khalilzadeh MA, Asl MS, et al. Recent developments in conducting polymers: Applications for electrochemistry. *RSC Adv*. 2020;10(62):37834-56.
- 147.Fakhry A. Synthèse par voie électrochimique de nanostructures de polymères conducteurs sans emploi d'une matrice support: applications aux (bio) capteurs. Paris 6; 2014.
- 148.Lakard B. Electrochemical biosensors based on conducting polymers: A review. *Appl Sci*. 2020;10(18):6614.
- 149.Malev VV, Kondratiev VV. Charge transfer processes in conducting polymer films. *Russ Chem Rev*. 2006;75(2):147.
- 150.Nezakati T, Seifalian A, Tan A, Seifalian AM. Conductive polymers: opportunities and challenges in biomedical applications. *Chem Rev*. 2018;118(14):6766-843.
- 151.Heck J, Goding J, Lara RP, Green R. The influence of physicochemical properties on the processibility of conducting polymers: A bioelectronics perspective. *Acta Biomater*. 2021;
- 152.Kausar A. Polymer coating technology for high performance applications: Fundamentals and advances. *J Macromol Sci Part A*. 4 mai 2018;55(5):440-8.
- 153.Blel N, Yaakoubi N, Omezzine A, Fourati N, Zerrouki C, Othmane A, et al. Self assembled monolayers versus iron oxide nanoparticles modified surfaces: two functionalization strategies for femtomolar detection of prostate specific antigen: comparative study between two electrochemical biosensors for femtomolar detection of prostate specific antigen. In *IEEE*; 2016. p. 1-3.
- 154.Su L, Fong CC, Cheung PY, Yang M. Development of Novel Piezoelectric Biosensor Using PZT Ceramic Resonator for Detection of Cancer Markers. In: Prickril B, Rasooly A, éditeurs. *Biosensors and Biodetection: Methods and Protocols, Volume 2: Electrochemical, Bioelectronic, Piezoelectric, Cellular and Molecular Biosensors*. New York, NY: Springer New York; 2017. p. 277-91.
- 155.Pohanka M. QCM biosensor for Prostate Specific Antigen assay using antibody–gold particle conjugate. *Int J Electrochem Sci*. 2021;16:21051.
- 156.Kwak J, Lee SS. Highly sensitive piezoelectric immunosensors employing signal amplification with gold nanoparticles. *Nanotechnology*. 1 nov 2019;30(44):445502.
- 157.Yu Z, Gong H, Xu J, Li Y, Zeng Y, Liu X, et al. Exploiting Photoelectric Activities and Piezoelectric Properties of NaNbO₃ Semiconductors for Point-of-Care Immunoassay. *Anal Chem*. 22 févr 2022;94(7):3418-26.
- 158.Abarghoei S, Fakhri N, Borghei YS, Hosseini M, Ganjali MR. A colorimetric paper sensor for citrate as biomarker for early stage detection of prostate cancer based on peroxidase-like

activity of cysteine-capped gold nanoclusters. *Spectrochim Acta Mol Biomol Spectrosc.* 5 mars 2019;210:251-9.

159. Xiao L, Zhu A, Xu Q, Chen Y, Xu J, Weng J. Colorimetric biosensor for detection of cancer biomarker by Au nanoparticle-decorated Bi₂Se₃ nanosheets. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2017;9(8):6931-40.

160. Karami P, Khoshsafar H, Johari-Ahar M, Arduini F, Afkhami A, Bagheri H. Colorimetric immunosensor for determination of prostate specific antigen using surface plasmon resonance band of colloidal triangular shape gold nanoparticles. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2019;222:117218.

161. Cao X, Liu M, Zhao M, Li J, Xia J, Zou T, et al. Synergetic PtNP@Co₃O₄ hollow nanopolyhedrals as peroxidase-like nanozymes for the dual-channel homogeneous biosensing of prostate-specific antigen. *Anal Bioanal Chem.* 2022;414(5):1921-32.

162. Liyanage T, Alharbi B, Quan L, Esquela-Kerscher A, Slaughter G. Plasmonic-Based Biosensor for the Early Diagnosis of Prostate Cancer. *ACS Omega.* 2022;7(2):2411-8.

163. Turan E, Zengin A, Suludere Z, Kalkan NÖ, Tamer U. Construction of a sensitive and selective plasmonic biosensor for prostate specific antigen by combining magnetic molecularly-imprinted polymer and surface-enhanced Raman spectroscopy. *Talanta.* 2022;237:122926.

164. Ertürk G, Özen H, Tümer MA, Mattiasson B, Denizli A. Microcontact imprinting based surface plasmon resonance (SPR) biosensor for real-time and ultrasensitive detection of prostate specific antigen (PSA) from clinical samples. *Sens Actuators B Chem.* 1 mars 2016;224:823-32.

165. Chen W, Li J, Wei X, Fan Y, Qian H, Li S, et al. Surface plasmon resonance biosensor using hydrogel-AuNP supramolecular spheres for determination of prostate cancer-derived exosomes. *Microchim Acta.* 2020;187(11):1-10.

166. Kim HM, Uh M, Jeong DH, Lee HY, Park JH, Lee SK. Localized surface plasmon resonance biosensor using nanopatterned gold particles on the surface of an optical fiber. *Sens Actuators B Chem.* 1 févr 2019;280:183-91.

167. Sun T, Zhang Y, Zhao F, Xia N, Liu L. Self-assembled biotin-phenylalanine nanoparticles for the signal amplification of surface plasmon resonance biosensors. *Microchim Acta.* 2020;187(8):1-7.

168. Yazdani Z, Yadegari H, Heli H. A molecularly imprinted electrochemical nanobiosensor for prostate specific antigen determination. *Anal Biochem.* 2019;566:116-25.

169. Zhao B, Miao P, Hu Z, Zhang X, Geng X, Chen Y, et al. Signal-on electrochemical aptasensors with different target-induced conformations for prostate specific antigen detection. *Anal Chim Acta.* 1 avr 2021;1152:338282.

170. Medetalibeyoglu H, Kotan G, Atar N, Yola ML. A novel and ultrasensitive sandwich-type electrochemical immunosensor based on delaminated MXene@AuNPs as signal amplification for prostate specific antigen (PSA) detection and immunosensor validation. *Talanta.* 1 déc 2020;220:121403.

171. Zhang X, Chen J, Wang Q, Du B, Fan G, Zheng W, et al. Amperometric sarcosine biosensors based on electrodeposited conductive films contain indole-6-carboxylic acid. *Electroanalysis.* 2022;34(2):345-51.

- 172.Deswal R, Narwal V, Kumar P, Verma V, Dang AS, Pundir CS. An improved amperometric sarcosine biosensor based on graphene nanoribbon/chitosan nanocomposite for detection of prostate cancer. *Sens Int.* 1 janv 2022;3:100174.
- 173.Wang J, Yau ST. Detection of α -Methylacyl-CoA Racemase in Serum and Urine Using a Highly Sensitive Electrochemical Immunodetector. *Electroanalysis.* 2014;26(7):1441-4.
- 174.Jolly P, Miodek A, Yang DK, Chen LC, Lloyd MD, Estrela P. Electro-engineered polymeric films for the development of sensitive aptasensors for prostate cancer marker detection. *ACS Sens.* 2016;1(11):1308-14.
- 175.Rebello TS, Pereira CM, Sales MGF, Noronha JP, Silva F. Protein imprinted materials designed with charged binding sites on screen-printed electrode for microseminoprotein-beta determination in biological samples. *Sens Actuators B Chem.* 2016;223:846-52.
- 176.Lee S, Jo H, Her J, Lee HY, Ban C. Ultrasensitive electrochemical detection of engrailed-2 based on homeodomain-specific DNA probe recognition for the diagnosis of prostate cancer. *Biosens Bioelectron.* 15 avr 2015;66:32-8.
- 177.Settu K, Liu JT, Chen CJ, Tsai JZ. Development of carbon-graphene-based aptamer biosensor for EN2 protein detection. *Anal Biochem.* 1 oct 2017;534:99-107.
- 178.Soares JC, Soares AC, Rodrigues VC, Melendez ME, Santos AC, Faria EF, et al. Detection of the Prostate Cancer Biomarker PCA3 with Electrochemical and Impedance-Based Biosensors. *ACS Appl Mater Interfaces.* 18 déc 2019;11(50):46645-50.
- 179.Rodrigues VC, Soares JC, Soares AC, Braz DC, Melendez ME, Ribas LC, et al. Electrochemical and optical detection and machine learning applied to images of genosensors for diagnosis of prostate cancer with the biomarker PCA3. *Talanta.* 15 janv 2021;222:121444.
- 180.Sánchez-Salcedo R, Miranda-Castro R, de-Los-Santos-Álvarez N, Lobo-Castañón MJ. Dual electrochemical genosensor for early diagnosis of prostate cancer through lncRNAs detection. *Biosens Bioelectron.* 2021;192:113520.
- 181.Nabok A, Abu-Ali H, Takita S, Smith DP. Electrochemical Detection of Prostate Cancer Biomarker PCA3 Using Specific RNA-Based Aptamer Labelled with Ferrocene. *Chemosensors.* 2021;9(4):59.
- 182.Sabahi A, Salahandish R, Ghaffarinejad A, Omidinia E. Electrochemical nano-genosensor for highly sensitive detection of miR-21 biomarker based on SWCNT-grafted dendritic Au nanostructure for early detection of prostate cancer. *Talanta.* 1 mars 2020;209:120595.
- 183.Smith DA, Newbury LJ, Drago G, Bowen T, Redman JE. Electrochemical detection of urinary microRNAs via sulfonamide-bound antisense hybridisation. *Sens Actuators B Chem.* 2017;253:335-41.

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

1. Introduction

Ce chapitre est dédié à la présentation des techniques et produits utilisés dans le cadre de ces travaux de thèse. Nous allons donc présenter brièvement les dispositifs expérimentaux utilisés pour les mesures électrochimiques et la microscopie à force atomique. Sera également détaillé le protocole de traitement des échantillons urinaires et les méthodes d'amplification et d'extraction du PCA3 urinaire.

2. La transduction électrochimique

L'électrochimie est l'étude de la réponse chimique d'un système à une stimulation électrique. Cette réponse est constituée d'un ensemble de phénomènes associés à la production d'un transfert de charge électrique à travers une interface formée par la mise en contact d'un « conducteur » électronique (qui peut être en métal, en céramique, en polymère ou des allotropes du carbone) avec un conducteur ionique (solutions ioniques aqueuses ou non aqueuses, sels fondus ionisés, ou certains solides ioniques) [1, 2]. Ce transfert de charge se fait soit via une perte d'électrons, et donc une réaction d'oxydation, soit via un gain d'électrons, et donc une réaction de réduction. Le dispositif expérimental utilisé dans les mesures électrochimiques est constitué d'un système à trois électrodes : une référence, une contre électrode et une électrode de travail.

Plusieurs stratégies électrochimiques prometteuses ont été mises en œuvre pour la détection des biomarqueurs du cancer dont des techniques voltammétriques (voltampérométrie cyclique, à balayage linéaire, différentielle à impulsions ou à ondes carrées), l'ampérométrie et l'impédimétrie [3]. Dans cette étude, nous avons utilisé trois techniques électrochimiques avec des finalités différentes : la chronoampérométrie, pour la réalisation de l'ensemble des films polymériques, la voltammétrie cyclique aussi bien pour l'électrodéposition des films polymériques que pour la caractérisation des étapes de construction des biocapteurs et la voltammétrie à ondes carrées pour le suivi de la détection des analytes. Seules ces trois techniques seront donc développées dans les sections suivantes.

2.1. La chronoampérométrie (CA)

La chronoampérométrie est une technique qui consiste à appliquer un potentiel constant au système d'électrodes et d'enregistrer la variation temporelle du courant résultant (Figure. 2.1).

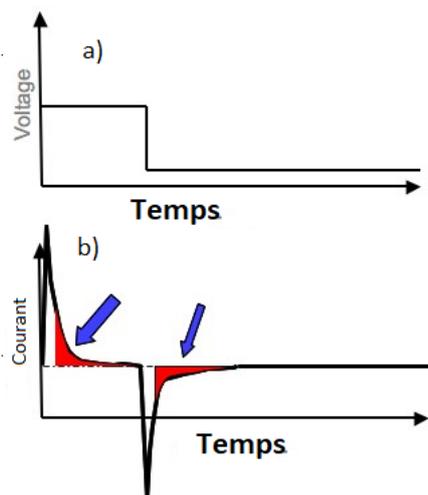


Figure 2.1 : Allure du potentiel appliqué (a) et la réponse en courant (b)

Le flux de courant est corrélé avec la concentration de l'espèce oxydée ou réduite à la surface de l'électrode de travail par l'équation de Cottrell (équation.2.1.) :

$$I_t = \frac{n F A C_0 D_0}{\sqrt{\pi \times T}} \quad \text{Équation 2.1}$$

I_t est le courant au temps t , n est le nombre d'électrons, F est la constante de Faraday, A est la surface géométrique de l'électrode, C_0 est la concentration de l'espèce oxydée et D_0 est le coefficient de diffusion de l'espèce oxydée[4].

Étant donné le fait que le courant détecté est régi par le processus de transfert de masse (correspondant au transfert d'espèces de la solution à l'interface électrode-solution) et de transfert de charge (correspondant au transfert d'électrons vers la surface de l'électrode de travail), la technique de chronoampérométrie est souvent utilisée pour expliquer le processus de nucléation et de croissance des polymères conducteurs.

Un exemple type de chronoampérogramme est présenté sur la figure 2.2 On distingue ainsi : i) une étape de nucléation qui se traduit par une forte diminution de l'intensité du courant et qui correspond à la formation de cations radicalaires ; ii) une étape de couplage, pendant laquelle le courant augmente progressivement, liée à la croissance continue et graduelle du polymère conducteur, et iii) une étape de stabilisation liée à des réactions de transfert de masse.

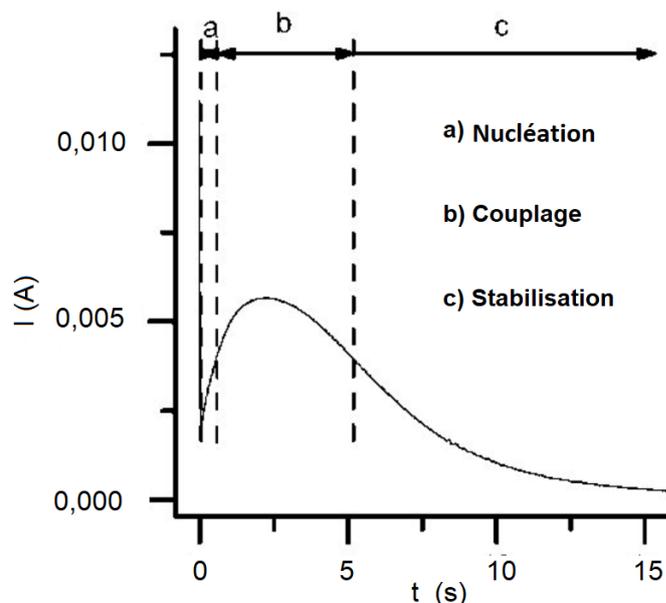


Figure 2.2 : Exemple d'un chronoampéromètre correspondant à l'électropolymérisation du pyrrole [5]

2.2. La voltammétrie cyclique (CV)

Cette technique repose sur un balayage triangulaire linéaire d'un potentiel E_1 vers un potentiel E_2 suivi par un second balayage en sens inverse (de E_2 vers E_1) tout en maintenant la vitesse de balayage constante (figure 2.3a)

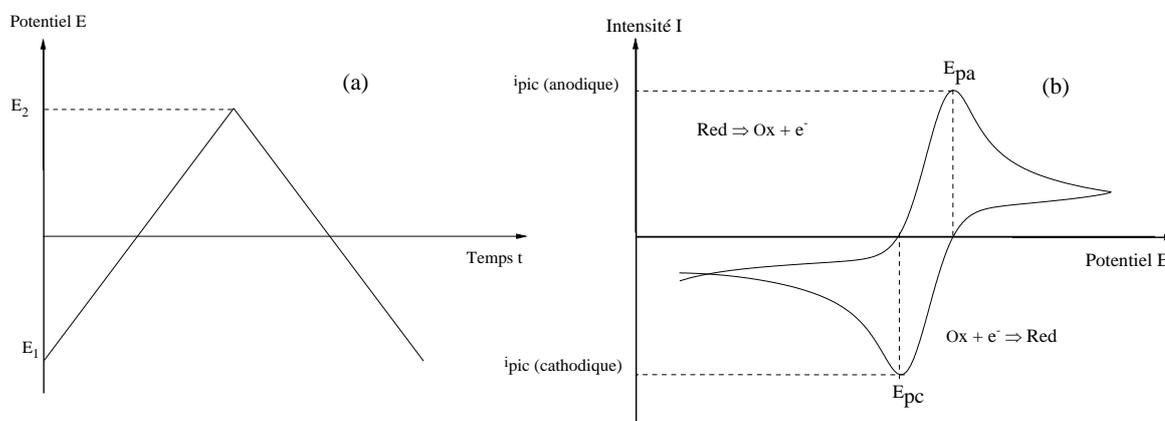


Figure 2.3 : a) Principe de la voltammétrie cyclique (variation du potentiel en fonction du temps) ; et b) exemple type d'un voltammogramme enregistré suite à une réaction d'oxydoréduction (E_{pa} : potentiel anodique, E_{pc} : potentiel cathodique, i_{pic} (anodique) intensité du courant anodique ; i_{pic} (cathodique) intensité du courant cathodique)

Un exemple de voltammogramme cyclique, c'est-à-dire la réponse du courant mesuré en fonction du potentiel pour un système réversible, est présenté à la figure 2.3b. Le courant enregistré est la somme de deux courants : un courant capacitif lié aux changements de charge de

la double couche électrique lors du balayage du potentiel, la charge, et un courant faradique associé aux processus d'oxydo-réduction. Ces deux courants ont par ailleurs tendance à augmenter avec la vitesse de balayage. Selon l'application ou l'information recherchée, un ou plusieurs cycles consécutifs peuvent être réalisés.

La voltammétrie cyclique est généralement utilisée à des fins exploratoires pour étudier les propriétés d'entités qui peuvent être oxydées ou réduites en échangeant des électrons avec l'électrode de travail. Sa faible sensibilité la rend inappropriée pour les mesures quantitatives, à cause de l'importance du courant capacitif qui peut masquer le signal utile : le courant faradique [6]. Pour réduire au minimum la contribution du courant capacitif et donc augmenter la sensibilité des méthodes voltampérométriques, des méthodes à impulsions de potentiel ont été mises au point, dont la voltampérométrie à ondes carrées (ou SWV pour Square Wave Voltammetry).

2.3. La voltammétrie à ondes carrées (SWV)

La SWV est l'une des méthodes électrochimiques les plus rapides et les plus sensibles. Les limites de détection peuvent être comparées à celles des techniques chromatographiques et spectroscopiques. Elle est basée sur la combinaison d'une modulation d'onde carrée d'amplitude ΔE et d'une durée τ (période) et de période $1/f$ (typiquement la fréquence $f = 50$ à 200 Hz) avec une rampe de potentiel comme illustré dans la figure 2.4a.

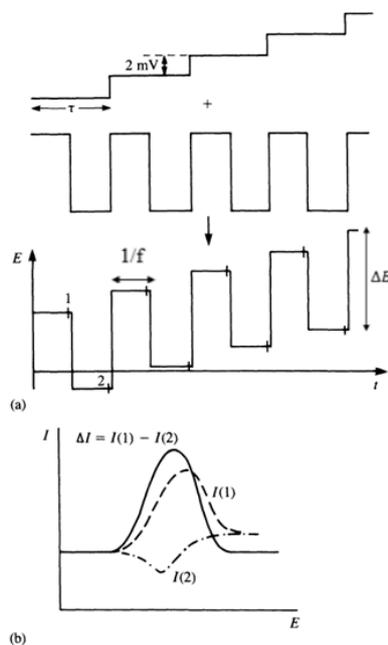


Figure 2.4: Voltampérométrie à onde carrée : a) Schéma d'application des potentiels somme d'un escalier et d'une onde carrée et (b) Représentation typique d'un voltamogramme à ondes carrées [7]

En SWV, les courants électriques sont mesurés à la fin des impulsions directes (I_1) et inverses (I_2), et le signal est obtenu à partir du courant différentiel résultant (ΔI), comme illustré sur la Figure 2.4b. Les courbes courant-potential présentent généralement des profils bien définis et sont généralement symétriques. Ceci est dû au fait que tous les courants ne sont mesurés qu'à la fin de chaque demi-période et que les variations de la hauteur et de la largeur de l'impulsion de potentiel sont toujours constantes pour une gamme de potentiel déterminée.

2.4. Dispositifs expérimentaux pour les mesures électrochimiques

Toutes les mesures électrochimiques ont été réalisées à l'aide d'un potentiostat CHI 650 (figure 2.5) piloté par un ordinateur et un logiciel spécifique pour l'acquisition et le traitement des données.



Figure 2.5 : Le dispositif de mesures électrochimiques CHI 650

Nous avons utilisé une cellule électrochimique conventionnelle à trois électrodes représenté par la figure 2.6, avec une électrode de référence en Ag/AgCl/KCl (saturé) une contre électrode en platine, et une électrode de travail en or (or évaporé sur du verre ou or massif)



Figure 2.6 : Montage électrochimique à trois électrodes

2.5. Nettoyage de l'électrode de travail

Une des étapes clés de la réussite d'un biocapteur est un nettoyage quasi-parfait des trois électrodes, et principalement de l'électrode de travail. Comme précisé ultérieurement, nous avons utilisé deux types d'électrode de travail : de l'or massif (électrodes de la marque CHI) et de l'or déposé sur verre. Nous avons donc adopté le protocole de nettoyage en fonction de la nature de l'électrode.

Le nettoyage des surfaces d'or déposé sur le verre a consisté à incuber les électrodes dans un bain d'acétone pendant 5 min puis dans un bain d'éthanol pendant 5 min également. Un mélange piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2$, v/v, 2/1) fraîchement préparé est ensuite déposé sur la surface durant 20 min (figure 2.7a). Les électrodes sont par la suite rincées avec de l'eau ultra pure puis avec l'éthanol pendant 5 min et finalement séchées à température ambiante.

Ce protocole n'étant pas adapté pour les électrodes de type CHI du fait que l'or est protégé par une gaine polymérique, nous avons donc opté pour un polissage mécanique (figure 2.7b) avec des grains d'alumine de trois tailles différentes (1, 0,3 et 0,05 μm), suivi par un rinçage avec de l'eau ultra pure puis avec l'éthanol afin d'éliminer les traces d'alumine. L'électrode est finalement séchée à température ambiante.

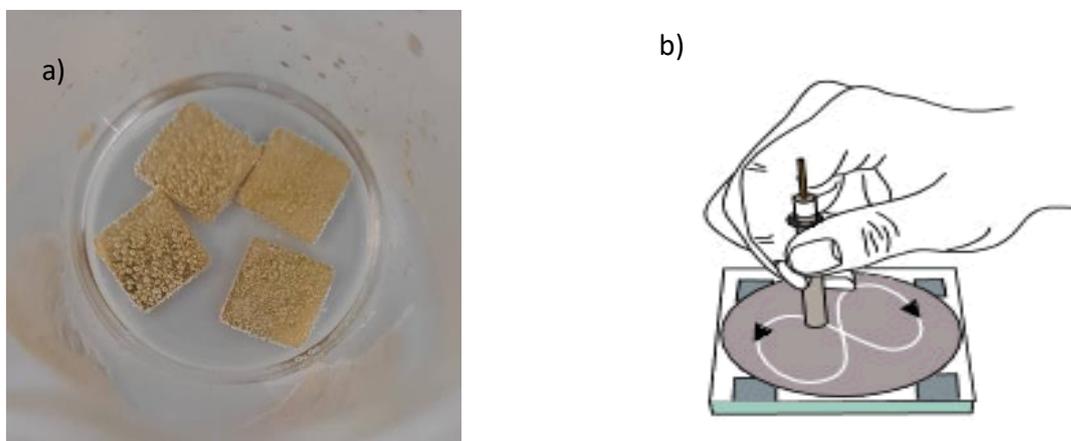


Figure 2.7: a) Photo d'un mélange piranha déposé sur la surface d'électrodes en or/verre, b) un schéma représentatif d'un polissage mécanique d'électrodes de type CHI

3. La microscopie à force atomique (AFM)

Le microscope à force atomique (AFM pour Atomic Force Microscopy) fait partie de la famille des microscopes à sonde locale qui permettent d'étudier à l'échelle atomique la topographie de tout type de surfaces : organique ou minérale, céramique, composite, ou même biologique. Les informations sont recueillies en enregistrant les déplacements d'une sonde mécanique (pointe à l'extrémité d'un micro-levier) en « contact » avec l'échantillon (Figure 2.8). De plus, des

éléments piézo-électriques facilitent le contrôle, et l'asservissement de la distance sonde-surface au cours du balayage. La plupart des AFM fonctionnent selon un principe basé sur la déviation d'un faisceau laser réfléchi par la face arrière du levier de l'AFM, détectée par une photodiode à quatre quadrants. Les cantilevers sont fabriqués à partir de Si ou de Si_3N_4 avec des rayons de courbure typiques d'une dizaine de nanomètres.

Les forces mises en jeu entre la pointe et les atomes de la surface de l'échantillon peuvent être des forces attractives (les forces capillaires, électrostatiques, magnétiques et de van der Waals) ou bien des forces répulsives (forces coulombiennes).

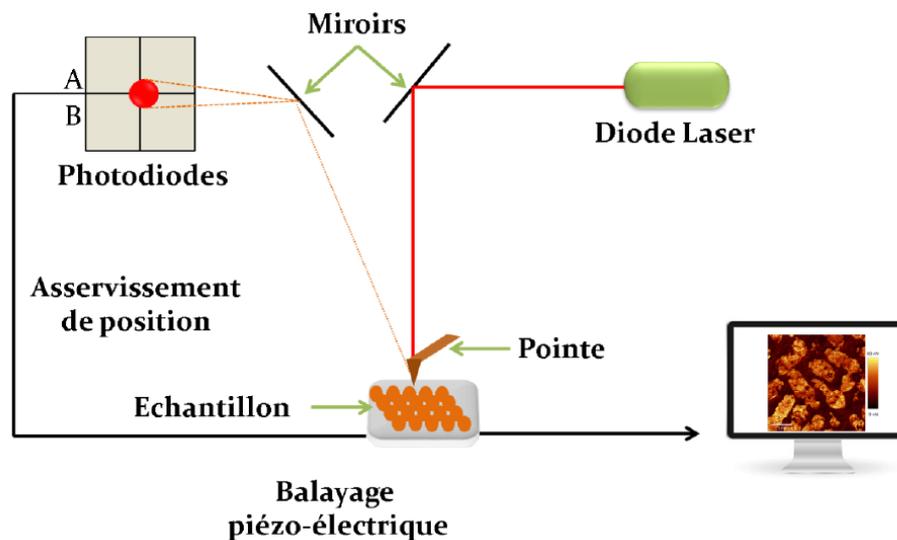


Figure 2.8 : Principe de la microscopie à force atomique

Trois modes peuvent être utilisés pour réaliser une topographie de surface :

- Le mode contact : dans lequel la pointe « appuie » dans ce cas sur la surface. Le cortège électronique des atomes de la pointe et celles de la surface provoquent des forces répulsives (coulombiennes).
- Le mode non-contact : dans ce cas la pointe n'est pas en contact avec la surface. On fait dans ce cas appel aux forces attractives très faibles entre la pointe et la surface. Cela nécessite néanmoins des conditions d'utilisation particulières (à froid et sous vide) pour éviter l'humidité et l'agitation thermique.
- Le mode contact intermittent (tapping) qui correspond à une combinaison des deux modes précédents. Ce mode consiste à faire vibrer le levier à sa fréquence propre de résonance (de l'ordre d'une centaine de kHz). Lorsque la pointe approchera de la surface

de l'échantillon à étudier, la résonance du levier est modifiée par l'interaction pointe-surface, ce qui se traduit par la suite par des variations d'amplitude et de phase du levier.

Nous avons utilisé dans ce travail un microscope Nanosurf easyScan 2 Flex (en mode tapping) piloté par un ordinateur qui permet de paramétrer, contrôler, visualiser le mouvement du microlevier et donc de la pointe (Figure 2.9).

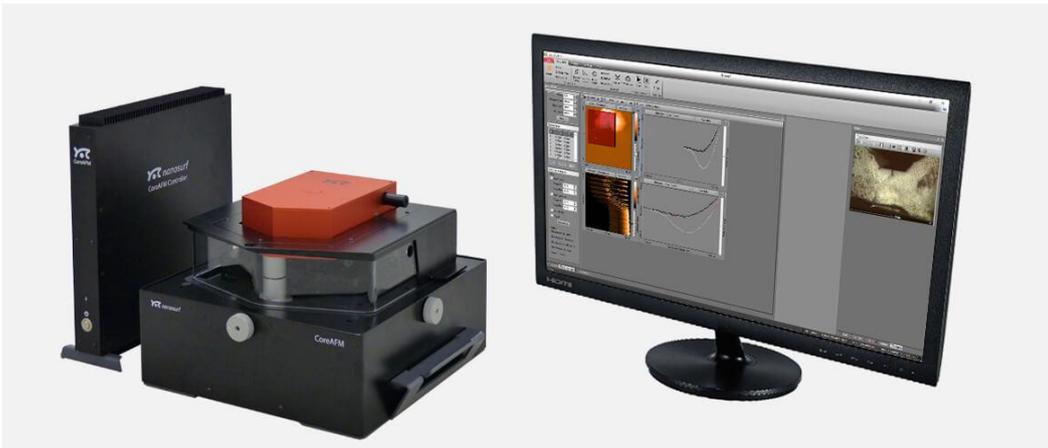


Figure 2.9: Microscope à Force Atomique easyScan 2

4. Recueil des échantillons urinaires et extraction du PCA3

4.1. Protocole de recueil, traitement et conservation des échantillons urinaires

Nous avons eu l'autorisation du comité d'éthique du CHU Sahloul de Sousse et obtenu un consentement écrit et signé par les patients avant tout prélèvement. Notre étude a porté sur 25 patients venus aux consultations externes du service d'urologie au CHU Sahloul de Sousse pour des biopsies prostatiques. La décision de faire une biopsie est basée sur des concentrations sériques de PSA_T supérieurs à 10 ng/mL, ou comprise entre 4 et 10 ng/mL avec un ratio $PSA_L/PSA_T < 10$.

Nous avons suivi le protocole de collecte et de traitement des échantillons urinaires publié par Mearini et al. [8]. Ainsi, pour faciliter la libération des cellules tumorales (si elles existent) dans les urines, un massage prostatique avec balayage trois fois sur le lobe droit, puis trois fois sur le lobe gauche et enfin trois fois de la base à l'apex de la prostate conformément à la méthode de Tinzl et al.[9] a été effectué par l'urologue. Nous avons demandé par la suite au patient d'uriner spontanément dans un tube stérile (DNase, RNase free), en évitant de toucher

l'intérieur du tube (un volume entre 20 et 30 mL). Le tube a été par la suite étiqueté et immédiatement acheminé au laboratoire dans de la glace.

Une première centrifugation à 4°C et à une vitesse de 700 G pendant 10 minutes a été réalisée (centrifugeuse Hettich MIKRO 220R). Cette centrifugation a pour but de séparer l'urine en :

- Sédiment : lavé deux fois avec PBS glacial (par centrifugation de nouveau 700 G pendant 10 minutes) avant d'être stocké dans du TRIzol® à -80°C (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) [8] pour une utilisation ultérieure. Ce réactif sert à la fois comme conservateur et comme réactif d'extraction de la PCA3 après la décongélation.
- Surnageant : qui a été divisé en aliquotes et stocké à -80°C.

4.2. Extraction de l'ARN total urinaire

4.2.1. Principe de l'extraction de l'ARN à partir des prélèvements biologiques

Les protocoles d'isolement de l'ARN commencent par une lyse cellulaire médiée par des tampons qui appartiennent généralement à l'une des deux catégories suivantes : (i) ceux constitués d'agents chaotropes durs, notamment les sels de guanidinium, le dodécylsulfate de sodium (SDS), la N-laurylsarcosine (sarcosyl), l'urée, le phénol ou le chloroforme, qui engendrent une destruction de la membrane plasmique et les organelles subcellulaires, et qui inactivent simultanément la ribonucléase (RNase) et (ii) ceux qui solubilisent doucement la membrane plasmique tout en maintenant l'intégrité nucléaire, comme les tampons de lyse hypotoniques Nonidet P-401. Les noyaux intacts, les autres organelles et les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation différentielle [2].

Depuis son introduction, la méthode "one step" est largement utilisée pour isoler l'ARN total à partir d'échantillons biologiques de différentes sources. Le principe à la base de la méthode est que l'ARN est séparé de l'ADN après extraction avec une solution acide contenant du thiocyanate de guanidinium, de l'acétate de sodium, du phénol et du chloroforme, suivie d'une centrifugation. Dans des conditions acides, l'ARN total reste dans la phase aqueuse supérieure, tandis que la plupart de l'ADN et des protéines restent soit dans l'interphase, soit dans la phase organique inférieure. L'ARN total est ensuite récupéré par précipitation avec de l'isopropanol et peut être utilisé pour plusieurs applications [10].

4.2.2. Protocole opératoire de l'extraction de l'ARN urinaire

L'extraction du PCA3 a été faite avec le réactif Trizol® (contenant du phénol et du thiocyanate de guanidine) selon le protocole du fournisseur :

Après décongélation à température ambiante de l'échantillon conservé dans le Trizol, 0,2 mL de chloroforme a été ajouté. Après une incubation pendant 5 minutes, une centrifugation pendant 15 minutes à $12,000 \times g$ à 4°C a été réalisée. La phase aqueuse contenant l'ARN a été par la suite transférée dans un nouveau Tube et à laquelle on a ajouté 0,5 mL d'isopropanol avant d'être incubée pendant 10 minutes à -20°C puis centrifugée de nouveau pendant 15 minutes à $12,000 \times g$ à 4°C . Durant cette étape l'ARN a été récupéré par précipitation après avoir éliminé le surnageant dissout dans de l'éthanol à 70%. Une nouvelle centrifugation pendant 5 minutes à $1000 \times g$ à 4°C a été faite pour assurer sa purification. Après élimination du surnageant le précipité a été laissé sécher à température ambiante pendant 10 minutes. Avant de conserver l'ARN obtenu à -80°C , un traitement par la DNase est nécessaire pour éliminer toute trace d'ADN interférant issu de l'échantillon biologique.

Le tableau 2.1 décrit le rôle de chaque substance utilisée dans l'extraction de l'ARN

Tableau 2.1 : Rôles des réactifs utilisés pour l'extraction de l'ARN

Substance	Rôle
Thiocyanate de Guanidine	Lyse cellulaire et destruction du noyau afin de libérer l'ADN et l'ARN.
Phénol	Faire précipiter les protéines
Chloroforme	Dissolution des lipides
Isopropanol	Précipitation de l'ARN
Ethanol	Purifier l'ARN et dissoudre les impuretés organiques surtout le phénol qui est un inhibiteur de l'amplification

➤ **Dosage de l'ARN et l'étude de sa pureté**

Après dilution au $1/70^{\text{ème}}$ de la solution mère d'ARN, un dosage par spectrophotométrie a été réalisé à 260 nm. Sachant qu'une unité d'absorbance correspond à $40 \mu\text{g/mL}$ d'ARN simple brin, la concentration de l'ARN génomique en $\mu\text{g/mL}$:

$$A_{260} \times 40 \times (1/\text{dilution}) [10]$$

A_{260} étant l'absorbance à 260 nm.

Après extraction de l'ARN, nous avons vérifié sa pureté par lecture spectrophotométrique en UV à 260 nm et 280 nm puis par le calcul du rapport des absorbances ($R=A_{260nm}/A_{280nm}$) ; le rapport doit être compris entre 2 et 2,2 [10].

4.3. La transcription reverse et la synthèse de l'ADNc

4.3.1 Principe et intérêt de la transcription reverse

La transcription reverse (ou inverse) a pour but de synthétiser de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir des molécules d'ARN. Vu la nature labile de l'ARN, sa conversion en ADNc plus stable facilite le stockage à long terme de ces séquences. De plus, le passage à l'ADNc permet de reproduire l'échantillon à partir d'une source unique selon les besoins, notamment du fait qu'il n'est pas possible d'amplifier directement les molécules d'ARN notamment en cas d'échantillon à l'état de traces [11].

La synthèse de l'ADNc a été réalisée par une réaction enzymatique *in vitro* à la reverse transcriptase (ADN polymérase ARN dépendante) en utilisant l'ARN comme matrice (de l'ordre de quelques microgrammes). Cette réaction nécessite que l'échantillon soit d'une bonne qualité [11].

La réaction commence par une dénaturation à la chaleur pour dissocier les structures secondaires de l'ARN. Par la suite, une courte amorce poly(T), communément appelée oligo(dT), est hybridée à la queue poly(A) de l'ARN messager (ARNm) (figure 2.10) [11].

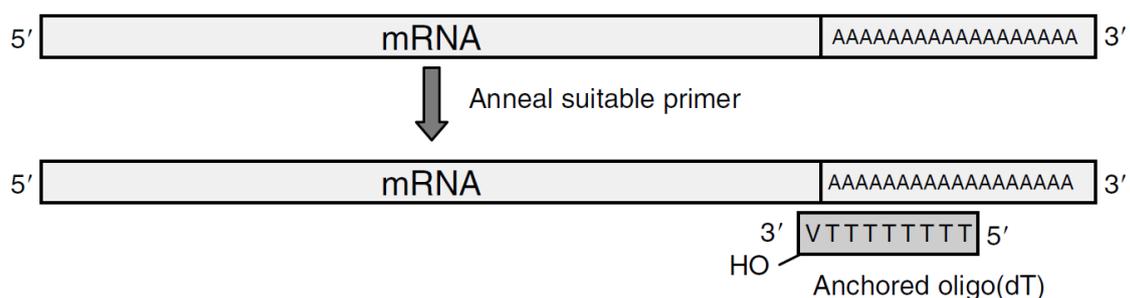


Figure 2.10: Hybridation de l'amorce oligo(dT) à la queue poly A de l'ARNm[11].

Si on travaille avec de l'ARN total, le choix des amorces oligo(dT) a pour but la transcription reverse uniquement de l'ARN messager et éliminer les autres types d'ARN [11]. En effet, la queue poly (A) est ajoutée aux ARN pré-messager au cours de la maturation post transcriptionnelle pour protéger l'ARN m de la digestion par les nucléases [12].

L'enzyme requise pour la synthèse de l'ADNc ADN polymérase ARN dépendante de l'ARN est plus communément appelée transcriptase reverse, ou simplement "RT". Il existe plusieurs variétés de transcriptase reverse dont on peut citer celles issues du virus de la myéloblastose aviaire (AMV), du virus de la leucémie murine de Moloney (MMLV) ; de *Thermus thermophilus* (rTth ; dépendante du Mn^{2+}) et Enzymes RNase -H modifiées.

La transcriptase inverse de M-MLV est préférée pour la transcription reverse des matrices longues contrairement à l'AMV qui, elle, présente généralement des niveaux beaucoup plus faibles d'activité RNase H. Elle n'est généralement active qu'entre 37 et 40°C [11].

4.3.2. Protocole M-MLV de la transcription reverse

Nous avons utilisé l'enzyme du virus Moloney de la leucémie murine (M-MLV : Moloney Murine Leukemia Virus ; Thermo Fisher®). La transcription reverse a été réalisée selon le protocole du fournisseur.

Deux mélanges réactionnels (Mélange 1 et Mélange 2) ont été préparés comme décrit dans le tableau 2.2. Un volume d'ARN (équivalent à une masse entre 1 ng et 5 µg) a été ajouté au mélange 1 puis le tout a été chauffé pendant 5 minutes à 65° C et rapidement refroidi dans de la glace. Par la suite, le mélange 2 réactionnel 2 a été ajouté avec une incubation de 37°C pendant 2 minutes. La transcriptase reverse M-MLV est ensuite ajoutée à raison de 1 µL (200unités) mélangée par un léger pipetage et enfin laissée agir en incubant le mélange pendant 50 minutes à 37°C. Pour mettre fin à la réaction, l'enzyme est inactivée par incubation à 70°C pendant 15 minutes. L'ADNc obtenu a été conservé à -20°C.

Tableau 2.2 : Les mélanges réactionnels pour la transcription reverse

Mélanges	Composants	Volume
Mélange 1	Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ (500 µg/mL)	1 µL
	10 mM dNTP	1 µL
	Eau bidistillée stérile	qsp 12 µL
Mélange 2	Composants	Volume
	5X First-Strand Buffer	4 µL
	100 mM DTT	2 µL
	RNaseOUT™ (40 unités/µL)	1 µL

Dans le tableau 2.3 nous avons décrit le rôle de chaque composant dans la réaction de la transcription reverse.

Tableau 2.3 : Rôles des réactifs utilisés pour la transcription reverse

Réactif	Rôle
M-MLV Reverse Transcriptase	Une enzyme qui catalyse la synthèse de l'ADNc
First-Strand Buffer	Un tampon qui fournit les conditions favorables à la transcription reverse
Dithiothréitol (DTT)	Le dithiothréitol est un agent réducteur qui aide à décompacter la structure secondaire de l'ARN et faciliter l'initiation de la transcription.

4.4. Amplification de la PCA3 par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

4.4.1. Principe de la réaction PCR

La PCR est utilisée pour amplifier une partie courte et bien définie d'un brin d'ADN. Il peut s'agir d'un seul gène, ou juste d'une partie d'un gène. Contrairement aux organismes vivants, le processus de PCR ne peut copier que de courts fragments d'ADN, généralement jusqu'à 10kb [13]. Les composants principaux de la réaction PCR sont :

- Une matrice d'ADN, ou ADNc, qui contient la région du fragment d'ADN à amplifier ;
- Deux amorces, qui déterminent le début et la fin de la région à amplifier ;
- *Taq* polymérase, une ADN polymérase thermorésistante qui synthétise l'ADN en copiant la matrice et en allongeant l'amorce à 3'OH libre ;
- Des désoxyribonucléotides, incorporés par la *Taq* polymérase selon les lois de complémentarité pour synthétiser le nouveau brin d'ADN ;
- Un tampon, qui fournit un environnement chimique approprié pour l'ADN-polymérase [13].

Après amplification, la révélation a été effectuée par électrophorèse sur un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium (BET). L'électrophorèse a pour but de séparer des molécules chargées au travers du gel sous l'effet d'un champ électrique dans un tampon : Tris-Borate-EDTA (TBE : pH=8) un marqueur de taille de pas de 100pb ou de 25 pb qui contient un nombre

défini de fragments d'ADN connus allant respectivement de 100 à 1000pb ou de 25 à 500pb, ce qui permet de déterminer plus facilement la taille des ADN amplifiés et vérifier la spécificité de l'amplification.

Le BET qui s'intercale entre les deux brins d'ADN produit une fluorescence de couleur rose à rougeâtre lorsqu'il est exposé aux ultraviolets ce qui permet de les visualiser. Ainsi la révélation consiste à vérifier la présence d'une bande unique à la longueur attendue (en se référant au marqueur de taille) par une lecture qualitative : il y a ou non présence du fragment de la longueur attendue.

L'extraction et la PCR ont été effectuées dans les salles pré-PCR alors que la révélation a été effectuée dans la salle post-PCR

4.4.2. Dispositifs expérimentaux

La réaction PCR a été réalisée dans le thermocycleur "Proflex PCR System" (Figure 2.11) : il s'agit d'un appareil qui chauffe et refroidit les tubes de réactions à des cycles de températures programmables, précises, requises pour chaque étape de la réaction. Il est muni de 3 blocs thermiques indépendants avec 32 puits chacun, où l'on peut insérer les tubes contenant le mélange réactionnel de la PCR. Il est doté d'une interface à écran tactile qui permet de programmer chaque bloc thermique et sauvegarder les différents programmes.



Figure 2.11: Thermocycleur "Proflex PCR System" (Thermo Fisher®)

L'électrophorèse du produit de la réaction PCR a été réalisée à l'aide d'un montage d'électrophorèse horizontale de la marque Apelex® (figure 2.12). Il est composé d'une cuve horizontale munie d'électrodes et remplie par le tampon de migration, et un générateur de courant continu relié aux électrodes qui va fournir un courant créant un champ électrique pour assurer la migration des molécules d'ADN.

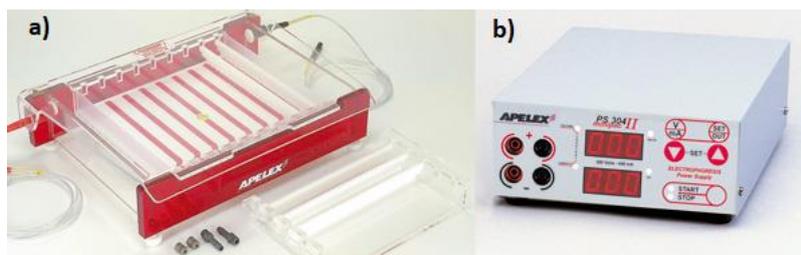


Figure 2.12 : a) cuve d'électrophorèse horizontale Apelex® ; b) Générateur d'électrophorèse Apelex®

4.4.3. Protocole expérimental l'amplification de la PCA3

a) Le contrôle de la qualité de l'ADNc : par la détection d'un gène ubiquitaire :

Afin de vérifier la qualité de l'ADNc synthétisé, des réactions de contrôle ont été réalisées en utilisant des amorces spécifiques pour amplifier un fragment d'un gène ubiquitaire : Bêta2 microglobuline (B2M). Ces gènes sont capables de s'exprimer d'une façon constante quelles que soient les conditions expérimentales et ils sont souvent utilisés comme témoins dans les réactions de réverse transcription PCR [14, 15].

Pour l'amplification d'une séquence du témoin B2M, nous avons choisi le couple d'amorces publié par Robinson et al. [16] :

- Amorce sens : 5'-AGGCTATCCAGCGTACTCCA -3'
- Amorce anti-sens : 5'-ATGGATGAAACCCAGACACA -3'.

Ce couple se situe sur deux exons différents pour s'assurer de l'amplification de l'ADNc et non de l'ADN total génomique. Il a été testé sur le site : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, la taille attendue du fragment amplifié est de 102 paires de bases qui s'étend sur l'exon 1 et l'exon 2 du gène.

Le mélange réactionnel utilisé pour toutes les réactions PCR de ce travail est présenté par le tableau 2.4.

Tableau 2.4: Composition du mélange réactionnel des réactions PCR

Composants	Quantité en volume	concentration finale
Amorces sens (10µM)	0,5 µL	0,2 µM
Amorces anti-sens (10µM)	0,5 µL	0,2 µM
dNTP (10mM)	0,5 µL	0,2 mM
Taq polymérase	0,5 µL	2,5 U
Tampon (10X)	5 µL	1 X
Eau bidistillée stérile	48 µL	QSP 50 µL

Un témoin négatif composé du mélange réactionnel exempté de l'ADN, a été utilisé dans chaque série de PCR. Ce témoin a permis la vérification de l'absence d'une éventuelle contamination. Nous avons programmé le thermocycleur en utilisant les paramètres présentés dans le tableau 2.5.

Tableau 2.5: Programme du thermocycleur pour l'amplification d'un fragment du gène B2M

Etape	Durée et température
Etape 1 : Dénaturation initiale	5 minutes à 95°C
Etape 2 : Amplification	30 secondes à 95°C (dénaturation) 45 secondes à 60°C (hybridation) 45 secondes à 72°C (extension) } (35 cycles)
Etape 3 : Extension finale	5 minutes à 72°C

b) Amplification du PCA3

Nous avons choisi de travailler selon le protocole décrit par Bussemakers et al. [17] . Les amorces utilisées par ces derniers sont les suivantes :

- Amorce sens :5'-AGA TTT GTG TGG CTG CAG CC-3'
- Amorce antisens: 5'-TCC TGC CCA TCC TTT AAG G-3'

L'une est située sur l'exon 1 et l'autre sur l'exon 4. Nous avons de même testé ce couple sur le site : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, la taille attendue du fragment amplifié est de 543 paires de bases couvrant les 4 exons du PCA3. Le principe de l'amplification de ce fragment est illustré par la figure 2.13 et les paramètres du thermocycleur sont présentés dans le tableau 2.6.

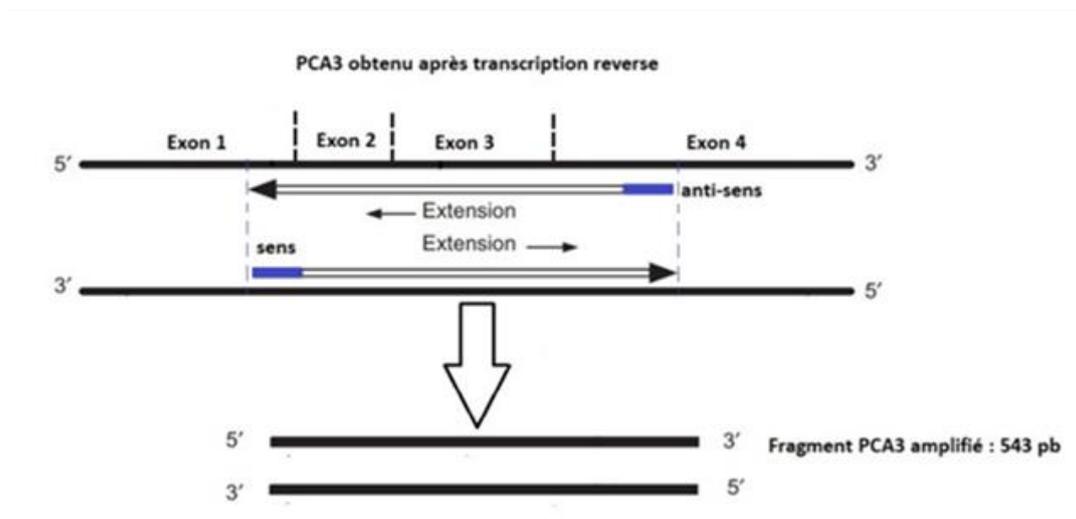


Figure 2.13 : Localisation des amorces pour l'amplification du fragment du PCA3

Tableau 2.6 : Programme du thermocycleur pour l'amplification d'un fragment du PCA3

Etape	Durée et température
Etape 1 : Dénaturation initiale	1 minute à 95°C
Etape 2 : Amplification	30 secondes à 95°C (dénaturation) 30 secondes à 60°C (hybridation) 30 secondes à 72°C (extension) } (35cycles)
Etape 3 : Extension finale	10 minutes à 72°C

4.4.4. La révélation de l'ADN amplifié sur gel d'agarose par électrophorèse

L'ADN amplifié obtenu est révélé par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% contenant du bromure d'éthidium (BET) avec visualisation sous lumière UV. Nous avons vérifié la taille des fragments d'ADN obtenu en déposant en parallèle un marqueur de taille de 100 paires de base

4.5. Extraction et purification de la PCA3

Après amplification de la séquence spécifique de PCA3 et vérification de la conformité de sa taille par électrophorèse en présence du marqueur de taille, une extraction de la bande correspondante a été nécessaire afin de s'assurer de l'utilisation de cette séquence spécifique amplifiée pour la conception du biocapteur sans interférences de séquences non spécifiques ou d'excès d'amorce.

4.5.1. Buts et principes de l'extraction et la purification de l'ADN

Cette méthode implique généralement un ADN issu d'une réaction PCR suivie par une électrophorèse sur gel d'agarose pour séparer les mélanges des différents fragments suivie ensuite de l'extraction du fragment d'intérêt du gel [18]. Pour réaliser l'extraction, différents kits commerciaux existent sur le marché dont on peut citer « Wizard Genomic DNA Purification Kit » de la marque Promega®, « MinElute Gel Extraction » (QIAGEN®) « ZymoClean™ Gel DNA Recovery » (Zymo Research®) GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE healthcare) [19, 20]. Ces kits ont l'avantage d'être faciles à utiliser et permettent d'obtenir de l'ADN de bonne qualité avec un bon rendement d'extraction mais ils sont plus coûteux que les méthodes « maison » ou « artisanales » [21]. La plupart utilisent la technologie à base de silice.

Cette technologie consiste à l'adsorption de l'ADN sur des membranes, particules ou nanosphères de silice incorporées dans des colonnes de centrifugation en présence de sels chaotropiques (tels que l'urée, le perchlorate de lithium et les sels de guanidine) à un pH défini. Ces sels sont inclus dans les tampons des kits pour faciliter la dénaturation du gel d'agarose et l'extraction de l'ADN. Par la suite, les différents contaminants sont éliminés par des étapes de lavage. L'ADN est en fin élué dans un tampon à faible teneur en sel ou tampon d'élution [19].

4.5.2 Protocole de l'extraction de la bande PCA3 à partir du gel d'agarose

L'extraction a été effectuée par le kit "The Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System"[20] qui se base sur la technique d'absorption de l'ADN à des membranes de silice en présence d'un sel de l'isothiocyanate de Guanidine.

Après électrophorèse du produit PCR sur le gel d'agarose, la bande correspondant à l'amplicon du ADNc de PCA3 (taille 543pb) visualisée par rayons UV est découpée par une lame propre nettoyée avec de l'éthanol.

Nous avons ajouté 10 µl de tampon (solution d'acétate de potassium à 0,5 M et isothiocyanate de Guanidine à 4,5 M à un pH de 5) pour 10mg de gel découpé et nous l'avons incubé au bain marie à une température de 65°C jusqu'à fusion totale du gel. Le liquide obtenu est versé dans la colonne de silice insérée dans un tube collecteur stérile. Une incubation à l'air ambiant pendant une minute permet l'adhésion de l'ADN à la membrane de silice.

Une centrifugation à 16 000 g pendant une minute permet d'éliminer le mélange de gel et de tampon. Par la suite les impuretés sont éliminées dans un premier temps par 700µ L d'une solution de lavage qui est constituée par 10mM d'acétate de potassium (pH 5,0) et 16,7 µM EDTA (pH 8,0) avec de l'éthanol à 80%. Après une centrifugation à 16000 g pendant 1 minute un deuxième lavage est fait avec 500 µl de la même solution et une centrifugation à la même vitesse pendant 5 minutes.

Enfin la colonne en silice est transférée dans un nouveau tube de 1,5 mL et une élution de l'ADN par 50 µL d'eau stérile « DNase free » est réalisée par centrifugation pendant 1 minute à 16 000 g.

5. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons décrit les techniques de caractérisation morphologique ainsi que des techniques et des dispositifs expérimentaux électrochimiques pour la conception et la caractérisation des différents biocapteurs électrochimiques (biocapteur à base de MIP, immunocapteur et génocapteur). Les chapitres suivants seront consacrés aux protocoles de conception de ces derniers ainsi que l'interprétation et la discussion des différents résultats expérimentaux.

Nous avons aussi détaillé le protocole et les méthodes d'amplification et d'extraction de PCA3 urinaire qui sera par la suite utilisé comme échantillon réel pour tester les performances du génocapteur.

Références

1. Tremillon B, Durand G. *Électrochimie: Préliminaires à l'étude de l'électrolyse*. Tech Ing Génie Procédés. 1999;1(1602):1-18.
2. Elbadawi M, Ong JJ, Pollard TD, Gaisford S, Basit AW. Additive manufacturable materials for electrochemical biosensor electrodes. *Adv Funct Mater*. 2021;31(10):2006407.
3. Topkaya SN, Azimzadeh M, Ozsoz M. Electrochemical biosensors for cancer biomarkers detection: Recent advances and challenges. *Electroanalysis*. 2016;28(7):1402-19.
4. Simões FR, Xavier MG. Electrochemical sensors. *Nanosci Its Appl*. 2017;155-78.
5. Otero TF, Martinez JG. Activation energy for polypyrrole oxidation: Film thickness influence. *J Solid State Electrochem*. 2011;15(6):1169-78.
6. Marken F, Neudeck A, Bond AM. Cyclic voltammetry. In: *Electroanalytical methods*. Springer; 2010. p. 57-106.
7. Brett CM, Brett O, Electrochemistry AM. Principles, methods, and applications. Oxf Univ Press N Y. 1993;31:3941.
8. Mearini E, Antognelli C, Del Buono C, Cochetti G, Giannantoni A, Nardelli E, et al. The combination of urine DD3PCA3 mRNA and PSA mRNA as molecular markers of prostate cancer. *Biomarkers*. 2009;14(4):235-43.
9. Tinzl M, Marberger M, Horvath S, Chypre C. DD3PCA3 RNA Analysis in Urine – A New Perspective for Detecting Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2004;46(2):182-7.
10. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nat Protoc*. 01 2006;1:581-5.
11. Farrell RE. CHAPTER 18 - cDNA Synthesis. In: Farrell RE, éditeur. *RNA Methodologies (Third Edition)*. Burlington: Academic Press; 2005. p. 421-38.
12. Cullen P, Lorkowski S, Kratz M, Werner M, Marschall C, Klein HG, et al. Basic Concepts of Gene Expression. In: *Analysing Gene Expression*. 2002. p. 1-95.
13. Rahman MT, Uddin MS, Sultana R, Moue A, Setu M. Polymerase chain reaction (PCR): a short review. *Anwer Khan Mod Med Coll J*. 2013;4(1):30-6.

14. Meller M, Vadachkoria S, Luthy DA, Williams MA. Evaluation of housekeeping genes in placental comparative expression studies. *Placenta*. 2005;26(8-9):601-7.
15. Watson S, Mercier S, Bye C, Wilkinson J, Cunningham AL, Harman AN. Determination of suitable housekeeping genes for normalisation of quantitative real time PCR analysis of cells infected with human immunodeficiency virus and herpes viruses. *Virol J*. 3 déc 2007;4(1):130.
16. Robinson CM, Neary R, Levendale A, Watson CJ, Baugh JA. Hypoxia-induced DNA hypermethylation in human pulmonary fibroblasts is associated with Thy-1 promoter methylation and the development of a pro-fibrotic phenotype. *Respir Res*. 2012;13(1):74.
17. Bussemakers MJ, Van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, et al. DD3:: A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 1999;59(23):5975-9.
18. Downey N. Extraction of DNA from Agarose Gels. In: Casali N, Preston A, éditeurs. *E coli Plasmid Vectors: Methods and Applications*. Totowa, NJ: Humana Press; 2003. p. 137-9.
19. Dhaliwal A. DNA extraction and purification. *Mater Methods*. 2013;3:191.
20. Betz N, Strader T. Clean-up with Wizard SV for gel and PCR. Promega; 2002.
21. Yalçınkaya B, Yumbul E, Mozioglu E, Akgoz M. Comparison of DNA extraction methods for meat analysis. *Food Chem*. 2017;221:1253-7.

Chapitre 3

Biocapteur électrochimique à empreintes moléculaires pour la détection du PSA

1. Introduction

Comme mentionné dans le chapitre 1, le cancer de la prostate (CP) est parmi les cancers masculins les plus diagnostiqués aussi bien en France qu'en Tunisie. Son diagnostic et le suivi de l'évolution de traitements de cette pathologie repose, entre autres, sur le dosage de l'Antigène Spécifique de la Prostate (PSA pour Prostate Specific Antigen). Malgré le fait que ce test présente plusieurs inconvénients dont le problème de la standardisation des méthodes de dosage et une faible sensibilité [1], le dosage du PSA reste une des « techniques de routine » les plus utilisées en milieu clinique. Il était donc « trivial » que le premier capteur à réaliser dans le cadre de ces travaux de thèse soit dédié à la détection du PSA.

Les chercheurs des laboratoires SATIE et LIMA (Faculté de Médecine de Monastir) et du CHU Sahloul (Tunisie) avaient déjà réalisé des immunocapteurs pour le dosage du PSA [2], nous avons donc fait le choix de développer, dans le cadre de cette thèse, un biocapteur électrochimique fonctionnalisé avec un polymère à empreintes moléculaires (MIP) de PSA.

Dans la première partie de ce chapitre, nous présenterons les différentes étapes d'optimisations nécessaires à la réalisation du MIP-PSA ainsi que les différentes caractérisations morphologiques par microscopie à force atomique. La seconde partie est dédiée à la détermination des paramètres métrologiques du capteur électrochimique et aux tests de détection dans un milieu tampon puis dans des sérums humains. Ces derniers résultats seront confrontés à ceux issus de la technique ELISA, considérée comme la « golden standard » en milieu clinique.

2. Optimisation des paramètres de réalisation d'un MIP-PSA

2.1. Choix du monomère fonctionnel

La réussite de la conception d'un MIP dépend de plusieurs paramètres, dont un choix judicieux d'un monomère fonctionnel. En raison de sa stabilité chimique, sa biocompatibilité et sa haute conductivité, le pyrrole (figure 3.1) a été largement utilisé dans la conception de biocapteurs en général et pour l'impression des protéines en particulier.

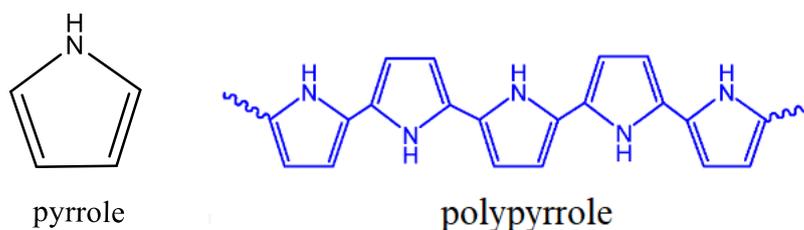


Figure 3.1 : Structures chimiques du pyrrole et du polypyrrole

Les pyrroles (PPy) peuvent en effet être électropolymérisés à partir de milieux aqueux à pH neutre ce qui permet l'incorporation d'une large gamme de contre-ions dans les polymères résultants, et ce contrairement à d'autres monomères fonctionnels comme l'aniline (soluble uniquement dans les milieux acides) et le thiophène (soluble dans les solvants organiques). Les polypyrroles sont par ailleurs intrinsèquement conducteurs, ce qui permet leur utilisation comme des matériaux d'électrode, et donc de détecter les processus conventionnels de transfert de charges [3].

Des MIPs à matrice polymérique en PPy ont été développées pour la détection de différentes protéines dont le SARS-CoV-2 spike glycoprotéine [4], la protéine gp51 du virus de la leucémie bovine [5], l'antigène carcinoembryonnaire (CEA) et l'alpha-foetoprotéine (AFP), considérés tous les deux comme biomarqueurs du cancer du poumon [6], l'interleukine 6 [7] ou encore l'antigène du cancer du sein (CA 15-3) [8].

2.2. Choix de la technique de polymérisation du pyrrole

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour la réalisation d'un polymère conducteur en polypyrrole : (i) la polymérisation chimique initiée par des oxydants tels que FeCl_3 ou H_2O_2 , [9] (ii) la polymérisation enzymatique [10] et (iii) la polymérisation électrochimique [11]. C'est cette dernière voie qui est le plus souvent utilisée pour la fonctionnalisation des capteurs chimiques et biologiques [5].

De nombreuses méthodes électrochimiques ont été mises à profit pour former les matrices polymériques en PPy des MIPs, dont la voltammétrie cyclique (CV) et la chronoamérométrie (CA). La CV est probablement la technique la plus populaire en raison de sa disponibilité dans la quasi-totalité des dispositifs électrochimiques commerciaux. Au cours de ce processus d'électropolymérisation, le monomère de Py est exposé à des variations cycliques sur la surface de l'électrode de travail (passage d'un mode oxydatif à un mode réducteur). Il en résulte la formation d'un film polymère qui peut « alterner » entre une phase non conductrice (PPy non dopé) et conductrice (PPy dopé) selon la direction du balayage cyclique [12]. L'épaisseur du film formé dépend, quant à elle, du nombre de cycles effectués. Cependant, la CV peut entraîner une hétérogénéité significative de la couche de PPy formée [5].

La chronoampérométrie (CA) est la technique de choix pour l'électrodéposition de polymères électroactifs dont les potentiels de suroxydation sont proches du potentiel d'oxydation du monomère, comme dans le cas du PANI et du PPy [13]. Elle consiste à appliquer un potentiel constant entre l'électrode de travail et l'électrode de référence pendant un temps bien défini, et de suivre la variation temporelle du courant, qui sont en lien direct avec l'augmentation ou à la diminution de l'épaisseur de la couche diffuse à la surface de l'électrode de travail. Notre choix

s'est donc porté sur cette technique pour la réalisation de polymères à empreintes moléculaires de PSA.

2.3. Choix du sel de fond de polymérisation

Le choix de la nature du sel de fond revêt une importance particulière en électrochimie, puisqu'il doit être à la fois stable au potentiel d'oxydation de monomère et fournir un milieu conducteur. Par ailleurs, la vitesse de croissance du polymère, la morphologie et les propriétés des films polymères déposés sur l'électrode de travail sont fortement influencés par la nature de l'électrolyte de support [14]. C'est donc un paramètre important qui doit être pris en compte et optimisé lors de la conception d'un polymère conducteur en général, et d'un polymère à empreintes moléculaires en particulier.

De nombreuses études ont identifié les milieux aqueux comme idéal pour l'électrosynthèse de polymères conducteurs en raison de leur faible pollution et de leur aptitude à des applications à grande échelle [12]. Dans cette étude, nous avons synthétisé trois films de PSA-PPy dans un tampon phosphate salin PBS (pour Phosphate Buffer Solution, avec une force ionique de 0,16 M et un pH de 7.4) en présence de pyrrole à une concentration de 10^{-2} M et du template PSA à une concentration de $3 \cdot 10^{-8}$ M. La seule différence entre eux est liée à la nature du sel de fond, vu que nous en avons testé trois : NaCl, KCl et LiClO₄. Les voltamogrammes correspondants sont présentés dans la Figure 3.4.

Il en ressort que le pic d'oxydation du PSA du film préparé dans NaCl/PBS est le plus intense des trois mais il est cependant moins résolu que celui préparé dans le LiClO₄/PBS. L'intensité de ce dernier est par ailleurs supérieure à celle du film réalisé dans le KCl/PBS. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les anions de grande taille, tel que ClO₄⁻, confèrent au film synthétisé une plus grande conductivité [15-17].

Signalons que pour toutes les mesures réalisées par voltammétrie à ondes carrées (SWV) nous avons utilisé les paramètres suivants : incrément = 5 mV, amplitude = 25 mV, fréquence = 25 Hz, temps de repos = 5 s et sensibilité = 10^{-4} A.

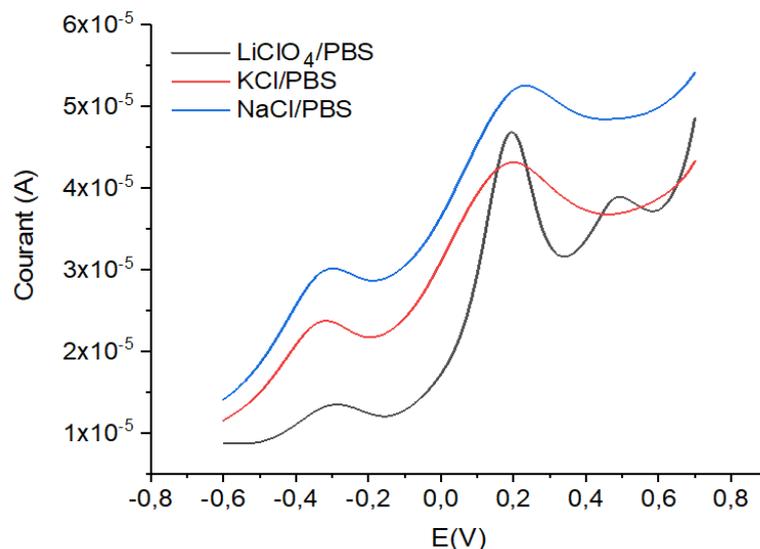


Figure 3.2 : Caractérisation par voltammétrie à onde carrée de trois films de PSA-PPy avec trois sels de fond différents : $\text{LiClO}_4 / \text{PBS}$, KCl / PBS , et NaCl / PBS . La caractérisation a été faite dans une solution aqueuse de LiClO_4 0,1M

Pour mieux comprendre l'effet des anions Cl^- et ClO_4^- , nous avons réalisé des caractérisations morphologiques par microscopie à force atomique des trois films de PSA-PPy. Les images AFM correspondantes sont présentées dans la figure 3.5.

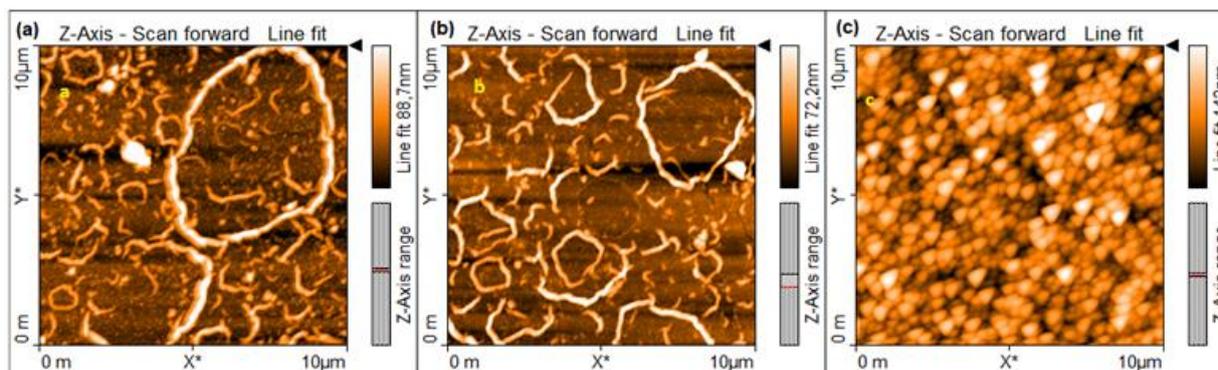


Figure 3.3 : Images AFM correspondant aux films de PSA-PPy réalisés dans des solutions de PBS contenant les électrolytes support suivants : a) NaCl, b) KCl et c) LiClO_4

Les figures 3.4a et 3.4b montrent que les deux films réalisés dans du KCl et du NaCl présentent des structures en anneaux avec des diamètres moyens de $3,5 \mu\text{m}$ pour le premier et $4,9 \mu\text{m}$ pour le second. Le film réalisé dans du LiClO_4 (Figure 3.4c) présente, quant à lui, une structure granulaire uniforme confirmant ainsi le fait que plus la taille d'anion est grande, plus le film

formé est uniforme [15]. Notre choix s'est donc porté sur le LiClO_4 , comme sel de fond pour l'élaboration des polymères à empreintes moléculaires de PSA [16].

2.4. Optimisation de la durée d'électropolymérisation

2.4.1 : Electropolymérisation de la couche protectrice

La couche protectrice a pour rôle d'éviter une éventuelle complexation de l'analyte d'intérêt sur la surface de l'électrode de travail [17, 18]. Les paramètres de son dépôt ont été optimisés lors de travaux antérieurs réalisés au sein des Laboratoires SATIE et LIMA. Concrètement, nous procédons à une électropolymérisation par CA d'un fin film de polypyrrole à un potentiel imposé de 1.05 V/ECS (qui correspond au potentiel d'oxydation du pyrrole), durant 2 s et en présence de LiClO_4 0,1 M. Le chronoampérogramme correspondant est présenté dans la Figure 5.3.

2.4.2. Optimisation de la durée du dépôt par chronoampérométrie de la matrice polymérique en PPy

Différents films de PSA-PPy ont été réalisés dans les mêmes conditions, mais avec une seule variable : la durée de l'électropolymérisation par chronoampérométrie.

Nous avons, dans un premier temps, incubé durant une durée optimisée de 20 minutes [17] une solution aqueuse contenant 0,1 M de LiClO_4 , 10^{-2} M de pyrrole et $3 \cdot 10^{-8}$ M de PSA préalablement dissout dans le PBS (0,16 M à pH = 7,4). Cette étape est en effet nécessaire pour former le complexe de pré-polymérisation. L'étape suivante a consisté à électropolymériser le précomplexe formé pendant une durée bien déterminée (3, 5, 7, 10, 15 ou 20 secondes) par CA à un potentiel imposé de 1,05 V/ECS.

Sur la Figure 3.5, nous avons représenté deux courbes chrono-ampérométriques obtenues suite à l'électrodéposition de la couche protectrice en PPy et d'un film de PSA-PPy dont la durée d'électropolymérisation est égale à 7 s. L'allure générale des deux courbes est quasi-comparable : une chute de l'intensité du courant, due à l'oxydation du pyrrole qui s'adsorbe à la surface de l'électrode d'or selon le processus de diffusion, suivie par une augmentation du signal provoquée par une croissance progressive de la couche conductrice du polypyrrole, limitée par le transfert de masse [18].

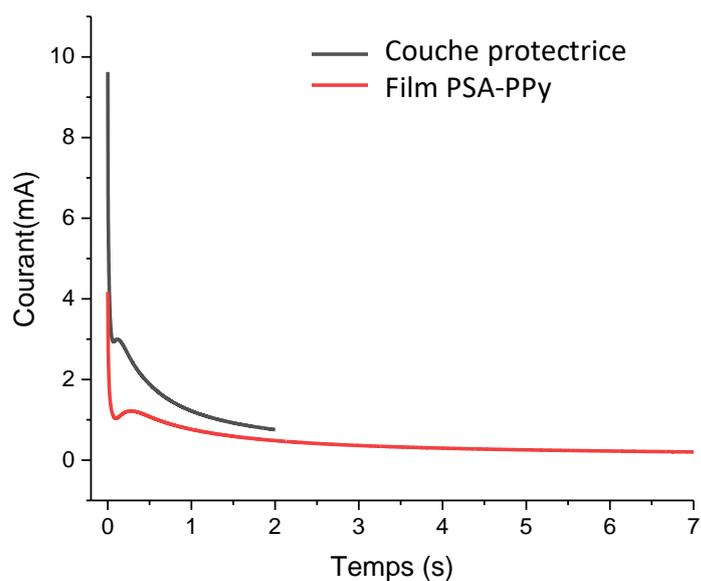


Figure 3.4 : Chronoampérogrammes de l'électropolymérisation de la couche protectrice (pendant 2 s) et d'un film de PSA-PPy (pendant 7 s) .

Des mesures par SWV ont été ensuite réalisées pour caractériser chacun des films de PSA-PPy (Figure 3.5a).

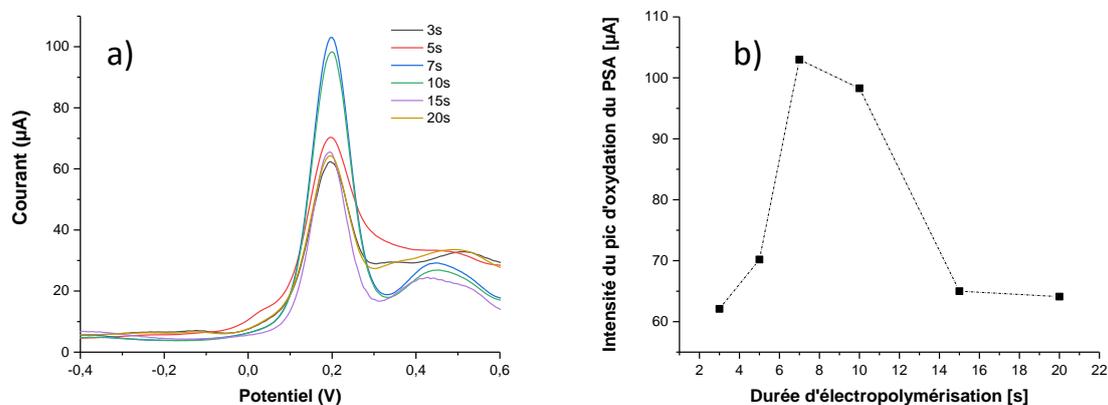


Figure 3.5 : a) Caractérisation par SWV des différents films de PSA-PPy (dans 0,1M de LiClO_4) ;
b) Variations des intensités des pics d'oxydation du PSA en fonction de la durée d'électropolymérisation par CA

Sur la Figure 3.5b, nous avons représenté les variations des intensités du pic d'oxydation de PSA en fonction de la durée d'électropolymérisation. Le maximum était atteint pour une durée de 7 s. L'ensemble des films développés dans le cadre de ces travaux de thèse ont été donc réalisés par CA à un potentiel de 1,05 V/ECS et pendant une durée de 7 s.

2.6. Choix de l'agent extracteur

L'extraction est l'étape ultime pour l'élaboration d'un polymère à empreintes moléculaires. L'agent d'extraction doit en effet assurer une extraction complète de la protéine, en préservant les structures des cavités imprimées et de la matrice polymérique. Sur la Figure 3.6 sont représentées de façon schématique les problèmes qui peuvent être rencontrés lors de l'extraction d'un template donné, ce qui rend impossible une détection sélective des analytes.

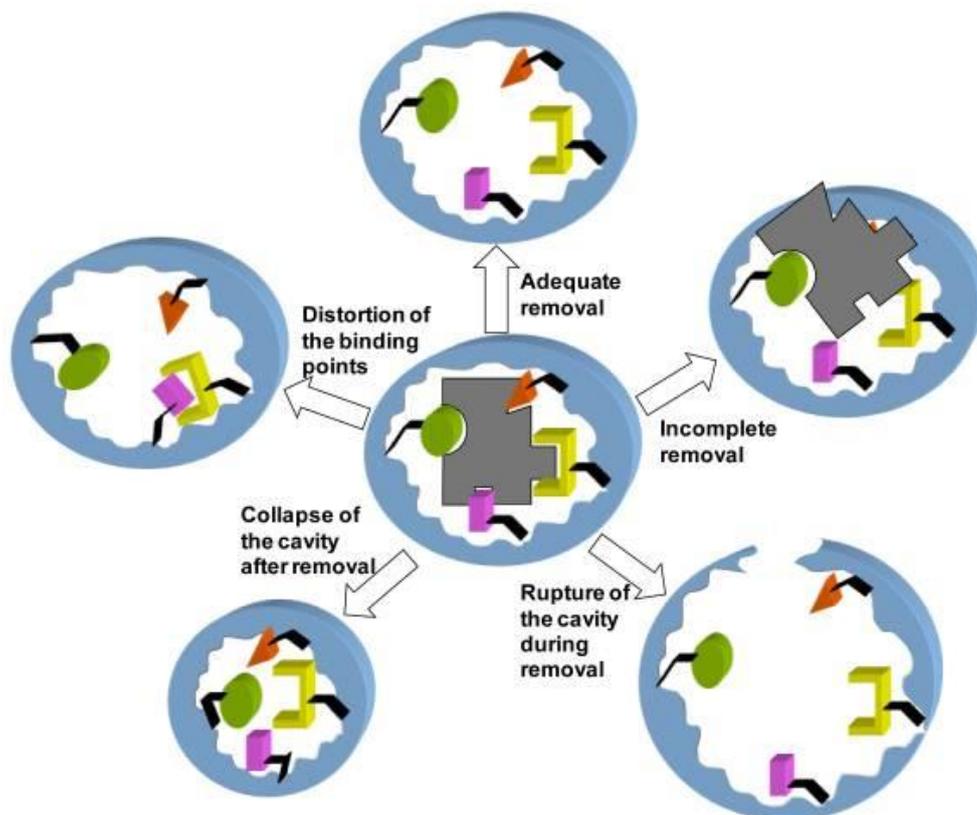


Figure 3.6 : Représentation schématique des différents problèmes qui peuvent être rencontrés lors de l'étape d'extraction [19]

Différentes stratégies d'extraction de protéines ont été rapportées dans la littérature : i) l'utilisation de solvants qui peuvent interagir avec le polymère ce qui conduit à son gonflement, et donc la libération de la protéine [20, 21], ii) la modification du pH du milieu afin de perturber les interactions électrostatiques entre la protéine et la matrice polymérique [19], et iii) l'extraction « physique » notamment par ultrasons ou micro-ondes.

Dans le Tableau 3.2 sont présentés, à titre indicatif, des données sur l'extraction de protéines d'une matrice polymérique en PPy.

Tableau 3.1 : Etude comparative des méthodes d'extraction des protéines d'une matrice polymérique en PPy

Analyte	Méthode d'extraction	Temps d'extraction	Référence
Troponine	- Immersion des électrodes dans une solution d'acide oxalique d'une concentration de 5 mmol/L	10 h à 4°C	[22]
Ovalbumine	-Immersion des électrodes modifiées dans un mélange d'acide acétique à 5% et une solution SDS à 10% sous agitation magnétique	1,5 h	[23]
PSA	- Immersion des électrodes dans une solution d'acide oxalique d'une concentration de 5 mmol/L	une nuit	[24]
PSA	-Immersion dans une solution de sel NaCl sursaturé -Rinçage avec l'eau ultrapure	33 minutes	notre travail

Dans ce travail, nous avons opté pour une stratégie « moins agressive » et « plus verte » : l'immersion de l'électrode de travail, fonctionnalisé avec un film de PSA-PPy, dans une solution sursaturée en NaCl. En effet, les fortes concentrations d'électrolytes peuvent affecter la stabilité physique des protéines en modifiant leurs conformations et en modulant la force des interactions électrostatiques en leur sein [25]. Cela peut entraîner le « dépliement » des protéines, et donc leur extraction de la matrice polymérique en PPy.

Différentes expérimentations ont été menées afin d'optimiser aussi bien la durée d'immersion dans la solution de NaCl sursaturée que la durée de rinçage. Les résultats, rassemblés dans le Tableau 3.3, montrent qu'un temps d'immersion de 3 minutes, suivi par un rinçage à l'eau ultrapure pendant 30 minutes, conduisent au meilleur taux d'extraction, estimé à 99%.

Tableau 3.2 : Paramètres des différents tests menés pour l'extraction du PSA

Durée d'immersion dans une solution de NaCl sursaturée	1 min			3 min			5 min		
	Durée de rinçage à l'eau ultrapure (min)	15	20	30	15	20	30	15	20
Pourcentage d'extraction du PSA (%)	19	25	96	76	80	99	20	74	98

Afin de s'assurer de l'efficacité de l'extraction, nous avons synthétisé un polymère non imprimé (NIP pour Non imprinted Polymer), synthétisé dans les mêmes conditions que le PSA-PPy, mais en l'absence de la protéine d'intérêt. Nous avons caractérisé par la suite, par voltammétrie cyclique, les réponses des capteurs fonctionnalisés avec un film de PSA-PPy et un NIP avant et après immersion dans la solution de NaCl.

Le voltammogramme du capteur fonctionnalisé avec un film de PSA-PPy, présenté dans la Figure 3.7 montre un pic d'oxydation à 0,29 V qui est lié à la présence de la protéine PSA. L'absence de ce pic caractéristique pour les capteurs fonctionnalisés avec un MIP et un NIP, avant et après son immersion dans la solution de NaCl sursaturée, confirme : i) que la voie d'extraction que nous avons adoptée permet l'élimination quasi-totale du PSA de la matrice en PPy, et iii) l'absence de sites de liaison spécifiques pour le capteur fonctionnalisé avec un NIP.

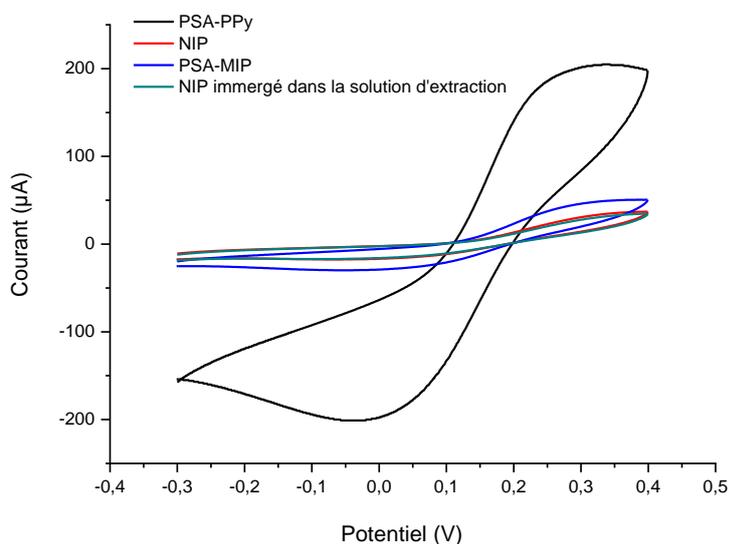


Figure 3.7 : Voltammogrammes cycliques des capteurs fonctionnalisés avec un film de PSA-PPy avant (courbe noire) et après (courbe bleue) l'extraction du PSA, un NIP avant (courbe rouge) et après (courbe verte) l'immersion dans la solution de NaCl sursaturé. La caractérisation a été faite dans une solution aqueuse de LiClO₄ 0,1M.

Pour confirmer ces résultats, nous avons caractérisé la morphologie des films de PSA-PPy et le NIP, avant et après immersion dans la solution d'extraction, par microscopie à force atomique. Les images, présentées dans la Figure 3.8, montrent que la morphologie du film de PSA-PPy change considérablement après immersion dans le NaCl sursaturé alors que celle du NIP reste quasi inchangée.

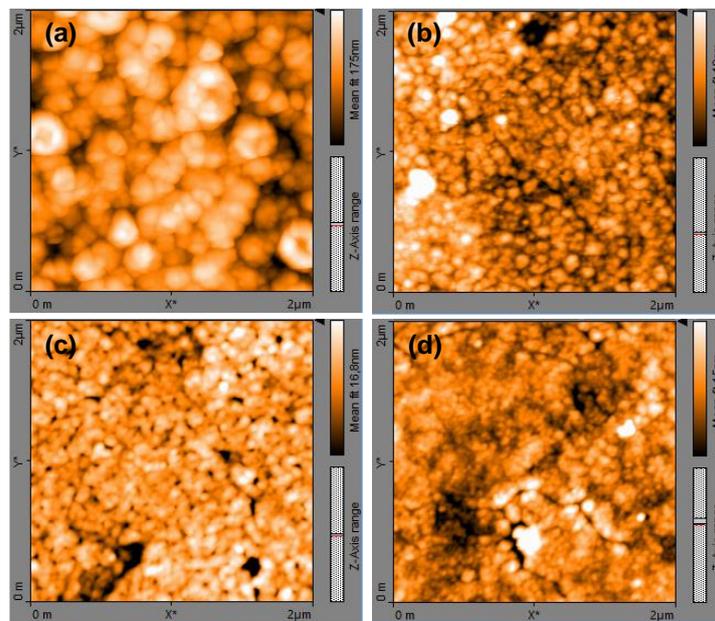


Figure 3.8 : Images AFM de $(2 \times 2) \mu\text{m}^2$ des surfaces de : PSA-PPy (a), MIP-PSA (b) NIP avant (c) et après (d) l'immersion dans la solution d'extraction

Pour mieux comprendre la différence morphologique entre ces différents films, nous avons considéré trois paramètres statistiques représentatifs de la rugosité des surfaces : la hauteur quadratique moyenne, S_q , la hauteur maximale du pic de surface, S_p , et la profondeur maximale de la vallée de surface, S_v . Estimés dans la plage de fréquences spatiales de $0,5$ à $512 \mu\text{m}^{-1}$, les valeurs de S_q , S_p et S_v du film de PSA-PPy étaient de l'ordre de $32,6 \text{ nm}$, $93,4 \text{ nm}$ et $102,5 \text{ nm}$ respectivement. Ces valeurs diminuent significativement, après le processus d'extraction, et donc la formation du MIP, pour atteindre les valeurs de $4,0 \text{ nm}$, $31,6 \text{ nm}$ et $15,0 \text{ nm}$ (pour les valeurs S_q , S_p et S_v respectivement).

Dans le cas du NIP, les valeurs de S_q , S_p et S_v étaient respectivement de l'ordre de $3,1 \text{ nm}$, $11,4 \text{ nm}$ et $26,1 \text{ nm}$. Ces paramètres restaient quasi constants après l'immersion dans la solution de NaCl sursaturée (de l'ordre de $2,8 \text{ nm}$, $23,4 \text{ nm}$ et $14,9 \text{ nm}$ respectivement pour les valeurs S_q , S_p et S_v).

Ces résultats confirment ceux obtenus par voltammétrie cyclique (Figure. 3.7) et prouvent que la procédure d'extraction n'a aucun effet sur les films non imprimés alors qu'elle élimine efficacement les templates de PSA de la matrice polymérique en PPy.

3. Performances analytiques du biocapteur MIP-PSA

3.1. Détection du PSA

La voltampérométrie à onde carrée a été utilisée dans cette partie pour suivre la réponse du capteur électrochimique fonctionnalisé avec un polymère à empreintes de PSA à des concentrations croissantes de PSA, allant de 3×10^{-8} ng/mL à 300 ng/mL. Les voltamogrammes correspondants sont présentés dans la Figure 3.9.

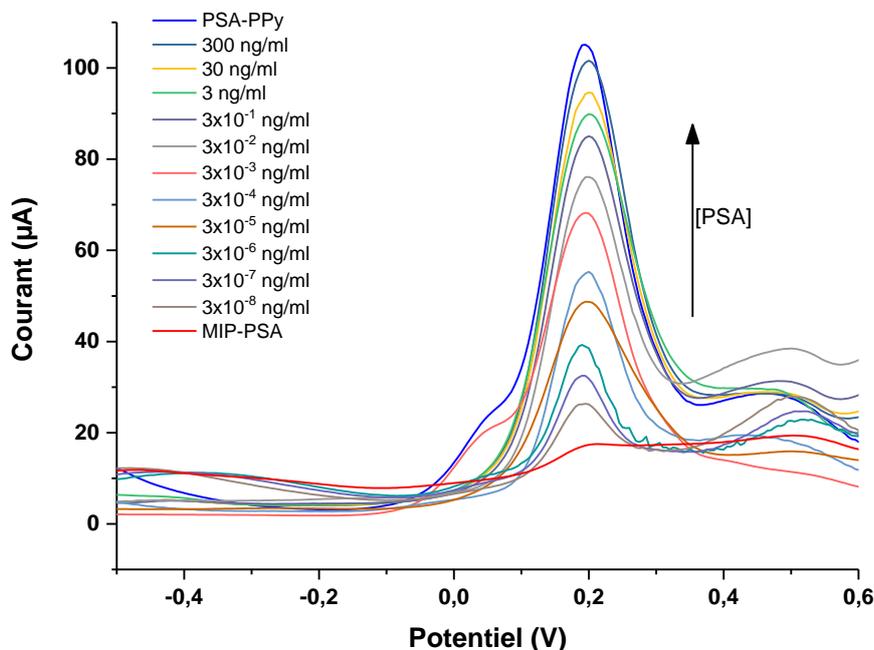


Figure 3.9 : Voltammogrammes de détection des différentes concentrations de PSA. La caractérisation a été faite dans une solution aqueuse de LiClO_4 0,1M.

La figure 3.9 montre une augmentation de l'intensité de courant en fonction de la concentration de PSA, suggérant la reconnaissance de la protéine par ses empreintes.

Nous avons relevé par la suite les variations des pics de courant en fonction des concentrations cumulatives du PSA (figure 3.10) et tracé la courbe d'étalonnage en moyennant trois relevés expérimentaux.

Afin de mieux évaluer les performances du capteur électrochimique, nous avons réalisé des tests de détection avec le NIP, et porté sa courbe d'étalonnage (moyenne de trois courbes expérimentales) sur la Figure 3.10. Il en ressort que la valeur d'intensité du courant du NIP est quasi-constante pour toute la gamme de concentration de PSA. De plus, cette valeur est beaucoup moins importante que celle enregistrée pour un MIP incubé dans une concentration de PSA de 3.10^{-8} ng/mL. Ces résultats confirment donc que l'adsorption non spécifique est négligeable.

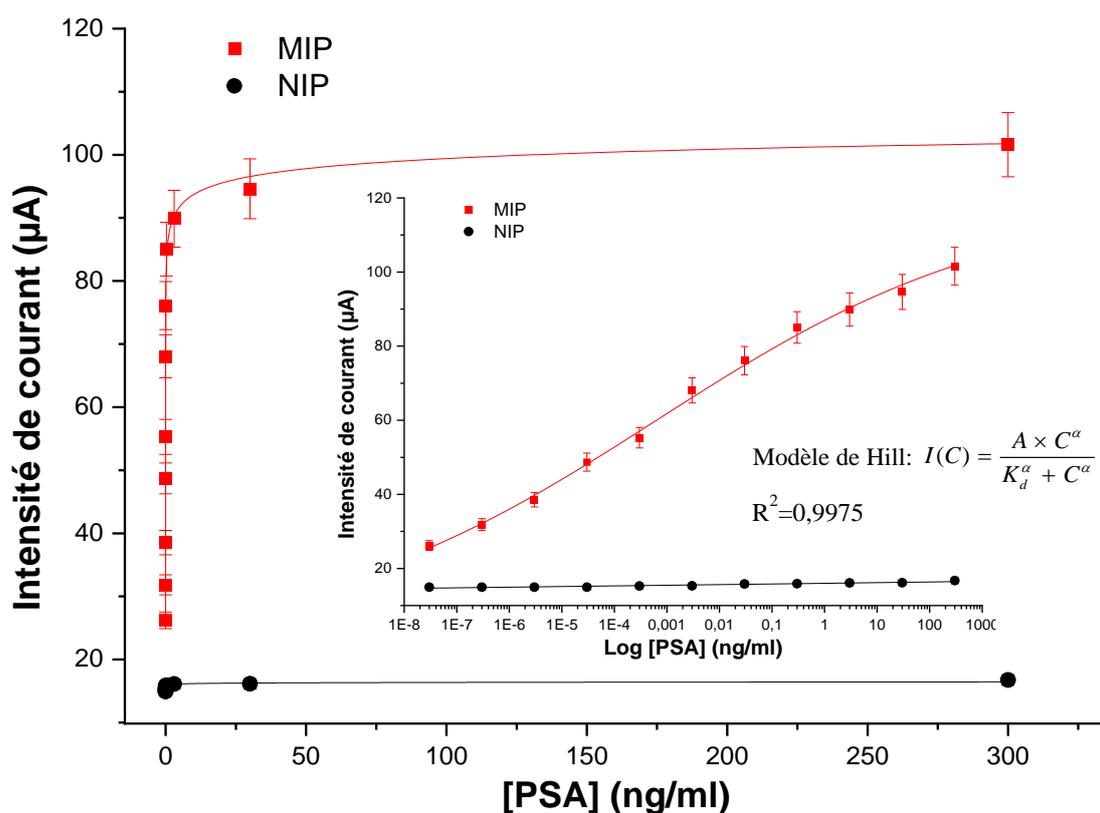


Figure 3.10 : Courbes d'étalonnage des capteurs fonctionnalisés avec un MIP et un NIP et incubés dans des concentrations croissantes de PSA. L'insert correspond à la représentation en semi-log.

A partir de la courbe d'étalonnage du capteur fonctionnalisé avec un MIP nous pouvons accéder à plusieurs paramètres, dont la sensibilité, la limite de détection et la constante de dissociation K_d qui renseigne sur l'affinité entre le PSA et les cavités formées au sein de la matrice polymérique.

La sensibilité du capteur a été estimée à partir de la pente à l'origine. La valeur trouvée, de l'ordre de $(8.19 \pm 0.30) \mu\text{A} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, est comparable à celle de l'équipe Yazdani et al. [24] qui

a réalisé un biocapteur électrochimique fonctionnalisé avec un MIP pour la détection sélective de PSA.

La valeur de constante de dissociation K_d a été estimée à partir d'un ajustement de la courbe d'étalonnage représentée dans le figure 3.10. Nous avons retenu le modèle Hill couramment utilisé par les biologistes pour étudier les interactions ligand-récepteur (équation 3.1) :

$$I(C) = \frac{A \times C^\alpha}{K_d^\alpha + C^\alpha} \quad \text{Équation 3-1}$$

I est l'intensité du courant pour une concentration C de PSA, K_d est la constante de dissociation, A est une constante empirique (égale à la valeur maximale de l'intensité de courant à la saturation), et α est le coefficient de Hill.

La valeur de K_d , estimée à $(1,02 \pm 0,54) \times 10^{-14}$ M, est inférieure à celles rapportées dans d'autres études concernant la détection de PSA avec des capteurs fonctionnalisés avec des MIPs [24, 26], des aptamères [27], ou des anticorps anti-PSA [2].

La limite de détection de ce capteur, définie dans ce travail comme étant la plus faible concentration détectée, était de l'ordre de 3×10^{-8} ng/mL.

Afin de situer notre travail par rapport aux travaux précédents nous présentons dans le tableau 3.4 une revue bibliographique des biocapteurs réalisés pour la détection du PSA.

Tableau 3.3 : Revue bibliographique des biocapteurs pour la détection du PSA

Type de biocapteur	Méthode de transduction	Méthode de fonctionnalisation	K_d	Limite de détection	Sensibilité	Référence
Biocapteurs à base de MIP	Voltammétrie à ondes carrées	Electrolymérisation par chronoampérométrie Monomère : Pyrrole	$(1.02 \pm 0.54) \times 10^{-14}$ M	3×10^{-8} ng/mL	$(8,19 \pm 0,30) \mu\text{A} / \text{ng.mL}^{-1}$	Notre travail
	Spectroscopie Raman Exaltée de Surface	Polymérisation chimique sur des nanoparticules en Fe_3O_4 Monomère : acide tannique Réticulant : diéthylènetriamine	Non déterminée	9×10^{-4} ng/mL	$76,49 \text{ mL.ng}^{-1}$	[28]
	Voltammétrie à ondes carrées	Electrolymérisation par voltammétrie cyclique Monomère : Pyrrole	26×10^{-14} M	2×10^{-3} ng/mL	$(8,40 \pm 0,14) \mu\text{A} / \text{ng mL}^{-1}$	[24]
	Résonance de plasmons de surface	Polymérisation UV Monomère : acide methacrylique (MAA) Réticulant : Dimethacrylate d'éthylene glycol (EGDMA)	Non déterminée	91×10^{-3} ng/mL	$1,23 \text{ mL.ng}^{-1}$	[29]

Type de biocapteur	Méthode de transduction	Méthode de fonctionnalisation	K_d	Limite de détection	Sensibilité	Référence
Biocapteurs à base de MIP	Voltampérométrie différentielle pulsée	Monomère fonctionnel : Bleu de Toluidine électrodéposé par voltammétrie cyclique sur une électrode en or pré-fonctionnalisée par deux monomères glutaraldehyde et cysteamine	Non déterminé	1×10^{-3} ng/mL	$0,13 \mu\text{A}/\text{ng.mL}^{-1}$	[30]
	Raisonnance des plasmons de surface	Electrode en or fonctionnalisée avec des SAM mixtes : bis[2-(2-bromoisobutyryloxy)undecyl] disulfide et hydrochloryre de 11-amino-PEG6- undecanethiol. PSA greffé sur la surface et le MIP préparé par polymérisation radicalaire par transfert d'atome de l'acide 4-	10^{-9} M	5,4 ng/mL	non déterminée	[26]

Type de biocapteur	Méthode de transduction	Méthode de fonctionnalisation	K_d	Limite de détection	Sensibilité	Référence
Biocapteur à base de MIP	Spectroscopie d'impédance	<p>carboxy-3-fluorophénylboronique. Protection les sites de reconnaissance non spécifique du MIP par le polyéthylène glycol</p> <p>Electrode en or fonctionnalisée avec une SAM (acide 3,3'-dithiodipropionique di(ester de N-hydroxysuccinimide. PSA greffée par liaison covalente sur les SAMs Reconnaissance de la cible faite par ajout d'un nanocomposite</p>	$3,55 \times 10^{-9} \text{ M}$	$54 \times 10^{-3} \text{ ng/mL}$	$355,42 \text{ } \Omega / \text{ ng. mL}^{-1}$	[31]

Type de biocapteur	Méthode de transduction	Méthode de fonctionnalisation	K_d	Limite de détection	Sensibilité	Référence
Immunocapteur	Voltampérométrie différentielle pulsée	Electrode en carbone vitreux fonctionnalisée avec des nanoparticules en or puis greffage des anticorps anti PSA primaires Détection mise en évidence par des anticorps secondaires marqués par des particules MOF-235	Non déterminée	3×10^{-3} ng/mL	$0,14 \mu\text{A}/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	[32]
Immunocapteur	Voltammétrie à ondes carrées	Deux techniques de fonctionnalisations pour greffer les anticorps anti PSA : 1-monocouches auto-assemblées (avec GPTMS : 3-glycidypxypropyltriméthoxysilane) 2- nanoparticules d'oxyde de fer modifiées avec de l'APTES (3-minopropyltriéthoxysilane).	<u>Technique 1:</u> $(6.1 \pm 0.9) \times 10^{-9}$ M <u>Technique 2:</u> $(1.8 \pm 0.2) \times 10^{-9}$ M	10×10^{-6} ng/mL pour les deux techniques	<u>Technique 1 :</u> $0,04 \mu\text{A}/\text{fg} \cdot \text{mL}^{-1}$. <u>Technique 2 :</u> $0,13 \mu\text{A}/ \text{fg} \cdot \text{mL}^{-1}$	[2]

Type de biocapteur	Méthode de transduction	Méthode de fonctionnalisation	K_d	Limite de détection	Sensibilité	Référence
Immuno-capteurs	Voltammétrie cyclique et spectroscopie d'impédance	Anticorps anti PSA greffés sur une électrode en carbone fonctionnalisée par des nanoparticules en or	Non déterminée	1×10^{-3} ng/mL	$3,23 \mu\text{A}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	[33]
Immuno-capteur	Voltampérométrie différentielle pulsée	Anticorps anti PSA greffés sur une électrode en graphène fonctionnalisée avec un film de paraaminophénol et des nanoparticules en or. Détection mise en évidence par des anticorps secondaires marqués par un composite MXene+ nanoparticules en or	Non déterminée	3×10^{-6} ng/mL	$54,17 \mu\text{A}/\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$	[34]
Capteurs à aptamères	Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) et Voltampérométrie différentielle pulsée (DPV)	Une électrode en carbone fonctionnalisée avec des nanotubes en carbone, une couche de chitosane/fullerène 60 puis des nanoparticules en or. Sur ces dernières sont greffés les aptamères.	Non déterminée	0,5 pg/mL par EIS 1,5 pg/mL par DPV	$1246,9 \Omega/\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (EIS) $30,42 \mu\text{A}/\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (DPV)	[35]

Type de biocapteur	Méthode de transduction	Méthode de fonctionnalisation	K_d	Limite de détection	Sensibilité	Référence
Capteur à aptamères	Voltammétrie cyclique et spectroscopie d'impédance	Aptamères greffés sur une électrodes en ITO fonctionnalisée par des SAMs en carboxyethyl silanetriol.	(46.28 ± 5.63) nM	$8,47 \times 10^{-3}$ ng/mL	non déterminée	[27]
	Voltampérométrie différentielle pulsée	Aptamères d'origine virale greffés sur une électrodes en or fonctionnalisée avec SAMs thiolées (acide mercaptopropionique)	non déterminée	3×10^{-3} ng/mL	2×10^{-3} mL/ng	[36]
Capteurs à aptamère +MIP	Spectroscopie d'impédance	Electrodes en or fonctionnalisées avec un polymère à base de dopamine capable de reconnaitre le complexe aptamère PSA .	non déterminée	1×10^{-3} ng /mL	non déterminée	[37]

3.4. Test de sélectivité

Afin d'évaluer la capacité du capteur réalisé à discriminer la protéine PSA des autres espèces interférentes, nous avons étudié la réponse du MIP à 3 protéines différentes : l'albumine de sérum bovin (BSA, analogue à l'albumine humaine), l'immunoglobuline M (IgM) et l'immunoglobuline G (IgG).

Trois capteurs fonctionnalisés avec des MIPs ont donc été préparés, puis incubés séparément, pendant 20 min, dans une solution 10^{-8} M de chaque analyte d'intérêt (600 ng/mL de BSA, 1,5 μ g/mL d'IgG et 10 μ g/mL d'IgM). Ces capteurs ont été par la suite caractérisés par SWV (résultats non montrés ici) et nous avons relevé les valeurs de pic de courant pour chaque protéine (Figure 3.11). Il en ressort que la réponse en courant du capteur vis-à-vis du PSA était environ un ordre de grandeur plus élevée que celle du BSA, de l'IgG et de l'IgM. De plus, les réponses électrochimiques de ces trois interférents étaient du même ordre de grandeur que celle obtenue en incubant un NIP dans une solution de PSA.

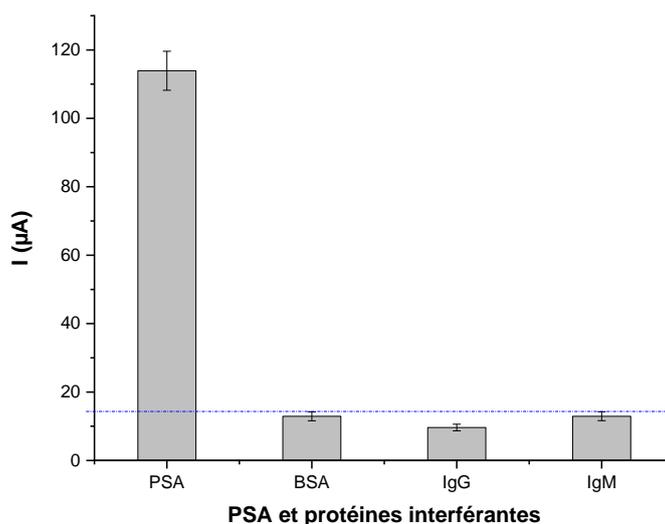


Figure 3.11 : Valeurs des pics de courant de capteurs fonctionnalisés avec un polymère à empreintes moléculaires de PSA incubé dans des solutions contenant du PSA, du BSA, de l'IgG ou de l'IgM, à une même concentration de 10^{-8} M. La ligne pointillée horizontale correspond à la réponse du capteur fonctionnalisé avec un NIP vis-à-vis du PSA à 10^{-8} M.

Le capteur réalisé est donc suffisamment sélectif pour que son signal de sortie soit considéré comme un paramètre pertinent pour quantifier la concentration de PSA dans n'importe quel milieu.

4. Application : détection à l'aveugle du PSA dans des sérums humains

Afin d'évaluer la fiabilité du capteur réalisé, nous avons réalisé des tests à l'aveugle pour déterminer la concentration de PSA dans 35 sérums de patients. La concentration de PSA de chaque échantillon a été estimée à partir de la courbe semi-logarithmique d'étalonnage du capteur (Figure 3.10). L'inversion de la courbe $I = f([PSA])$ en $[PSA] = f(I)$ permet d'obtenir directement la concentration en PSA à partir de la mesure du courant. Les résultats obtenus ont été confrontés à ceux issus de la technique de référence des cliniciens : l'ELISA (pour Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Sur la Figure 3.12 sont portées les valeurs de concentrations de PSA obtenues à partir du capteur électrochimique fonctionnalisé avec un MIP (axe des abscisses) et à partir d'ELISA (axe des ordonnées). Les résultats obtenus à partir des deux techniques de mesure sont en parfaite concordance : la pente de la droite « de concordance » étant égale à $0,990 \pm 0,017$.

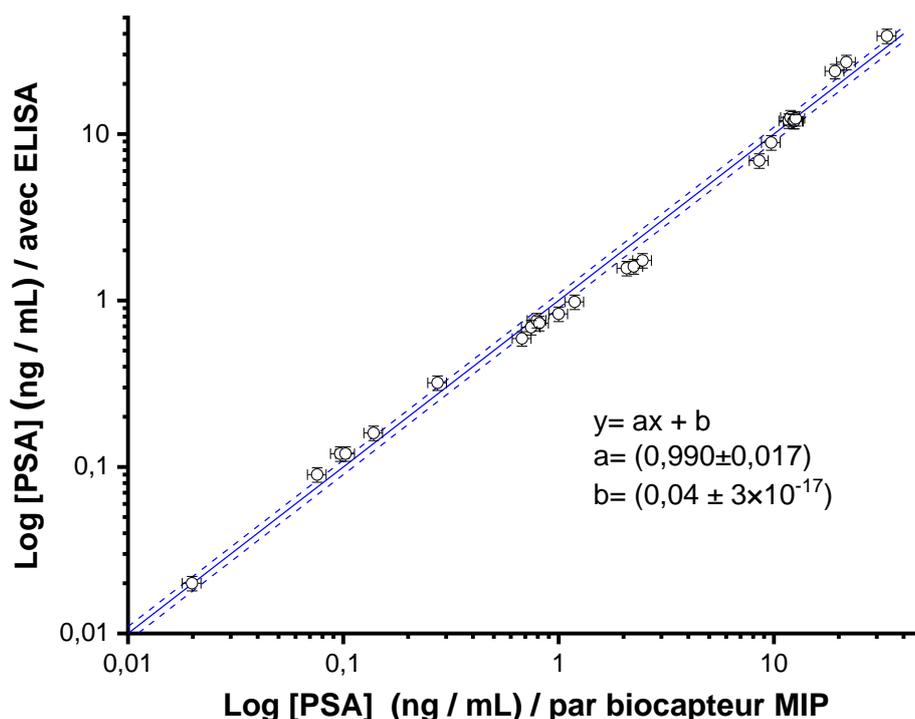


Figure 3.12: Comparaison entre les valeurs sériques obtenues avec le biocapteur et celles avec la technique ELISA

Ces résultats très encourageants ouvrent la voie vers une nouvelle méthode fiable qui utilise des polymères à empreintes moléculaires comme récepteurs artificiels. La robustesse, la fiabilité et la relative facilité d'utilisation de ces capteurs biomimétiques en font des outils adaptés au diagnostic précoce du cancer de la prostate.

5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la conception d'un capteur électrochimique fonctionnalisé avec un polymère à empreintes moléculaires pour la détection du PSA, un biomarqueur sérique du cancer de la prostate.

Différents paramètres ont été optimisés (conditions d'électropolymérisation, nature de l'extracteur, durée d'élution...) pour répondre aux exigences du domaine analytique. Le capteur conçu présente de nombreux avantages, dont une faible limite de détection, une haute sélectivité, une mise en œuvre simple, et un coût de fabrication plus faible que celui des immunocapteurs.

Le capteur développé dans le cadre de cette étude a été utilisé avec succès pour la détermination à l'aveugle de concentrations de PSA dans des échantillons de sérums humains. Les résultats obtenus étaient en parfaite concordance avec ceux issus de la méthode standard ELISA.

In fine, le biocapteur développé, basé sur le MIP, peut être considéré comme un candidat attractif pour la détection de protéines à l'état de traces et fournir des informations précieuses pour le diagnostic clinique précoce.

Etant donné que le PSA présente plusieurs limitations en termes de sensibilité et de spécificité, nous présenterons dans les deux chapitres à suivre des capteurs pour la détection de deux biomarqueurs urinaires du cancer de la prostate : l'Engrailed 2 et le PCA3.

Références

1. Synthèse sur les bénéfices et les risques d'un dépistage du cancer de la prostate par dosage du PSA [Internet]. Institut National du Cancer. 2016. Available from: https://www.e-cancer.fr/content/download/145111/1813851/file/Synth%C3%A8se-benefices-risques-depistage-cancer-prostate-par-dosage-psa_2016.pdf.
2. Blél N, Fourati N, Souiri M, Zerrouki C, Omezzine A, Bouzlama A, et al. Ultrasensitive electrochemical sensors for psa detection: related surface functionalization strategies. *Curr Top Med Chem*. 2017;17(26):2913-25.
3. Adeloju SB, Wallace GG. Conducting polymers and the bioanalytical sciences: new tools for biomolecular communications. A review. *Analyst*. 1996;121(6):699-703.
4. Ratautaite V, Boguzaitė R, Brazys E, Ramanaviciene A, Ciplys E, Juozapaitis M, et al. Molecularly imprinted polypyrrole based sensor for the detection of SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Electrochimica Acta*. 2022;403:139581.
5. Ramanavicius A, Oztekin Y, Ramanaviciene A. Electrochemical formation of polypyrrole-based layer for immunosensor design. *Sens Actuators B Chem*. 5 juill 2014;197:237-43.
6. Taheri N, Khoshshafar H, Ghanei M, Ghazvini A, Bagheri H. Dual-template rectangular nanotube molecularly imprinted polypyrrole for label-free impedimetric sensing of AFP and CEA as lung cancer biomarkers. *Talanta*. 1 mars 2022;239:123146.
7. Gonçalves M de L, Truta LA, Sales MGF, Moreira FT. Electrochemical point-of care (PoC) determination of interleukin-6 (IL-6) using a pyrrole (Py) molecularly imprinted polymer (MIP) on a carbon-screen printed electrode (C-SPE). *Anal Lett*. 2021;54(16):2611-23.
8. Santos AR, Moreira FT, Helguero LA, Sales MGF. Antibody biomimetic material made of pyrrole for CA 15-3 and its application as sensing material in ion-selective electrodes for potentiometric detection. *Biosensors*. 2018;8(1):8.
9. Ramanavicius A, Oztekin Y, Balevicius Z, Kausaite-Mikstimiene A, Krikstolaityte V, Baleviciute I, et al. Conducting and Electrochemically Generated Polymers in Sensor Design (Mini Review). *Procedia Eng*. 2012;47:825-8.
10. Ramanaviciene A, Kausaite-Minkstimiene A, Oztekin Y, Carac G, Voronovic J, German N, et al. Visualization of red-ox proteins on the gold surface using enzymatic polypyrrole formation. *Microchim Acta*. 2011;175(1):79.

11. Ramanaviciene A, Ramanavicius A, Finkelsteinas A. Basic electrochemistry meets nanotechnology: electrochemical preparation of artificial receptors based on nanostructured conducting polymer, polypyrrole. *J Chem Educ.* 2006;83(8):1212.
12. Fomo G, Waryo T, Feleni U, Baker P, Iwuoha E. Electrochemical Polymerization. In: Jafar Mazumder MA, Sheardown H, Al-Ahmed A, éditeurs. *Functional Polymers.* Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 105-31.
13. Fourati N, Blel N, Lattach Y, Ktari N, Zerrouki C. Chemical and Biological Sensors from Conducting and Semiconducting Polymers. In: *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering.* Elsevier; 2016.
14. Duić LJ, Mandić Z, Kovačiček F. The effect of supporting electrolyte on the electrochemical synthesis, morphology, and conductivity of polyaniline. *J Polym Sci Part Polym Chem.* 1994;32(1):105-11.
15. Paramo-García U, Ibanez JG, Batina N. AFM analysis of polypyrrole films synthesized in the presence of selected doping agents. *Int J Electrochem Sci.* 2013;8:2656-69.
16. Mokni M, Mazouz Z, Attia G, Fourati N, Zerrouki C, Othmane A, et al. Prime importance of the supporting electrolyte in the realization of molecularly imprinted polymers. *Proc MOL2NET18 Conf Mol Biomed Comput Sci Eng.* 2018;
17. Mazouz Z, Mokni M, Fourati N, Zerrouki C, Barbault F, Seydou M, et al. Computational approach and electrochemical measurements for protein detection with MIP-based sensor. *Biosens Bioelectron.* 2020;151:111978.
18. Ktari N, Fourati N, Zerrouki C, Ruan M, Seydou M, Barbaut F, et al. Design of a polypyrrole MIP-SAW sensor for selective detection of flumequine in aqueous media. Correlation between experimental results and DFT calculations. *RSC Adv.* 2015;5:88666-74.
19. Lorenzo RA, Carro AM, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A. To remove or not to remove? The challenge of extracting the template to make the cavities available in molecularly imprinted polymers (MIPs). *Int J Mol Sci.* 2011;12(7):4327-47.
20. El-Sharif HF, Stevenson D, Reddy SM. MIP-based protein profiling: A method for interspecies discrimination. *Sens Actuators B Chem.* 2017;241:33-9.

21. Erdóssy J, Horváth V, Yarman A, Scheller FW, Gyurcsányi RE. Electrosynthesized molecularly imprinted polymers for protein recognition. *TrAC Trends Anal Chem.* 2016;79:179-90.
22. Silva BV, Rodríguez BA, Sales GF, Maria Del Pilar TS, Dutra RF. An ultrasensitive human cardiac troponin T graphene screen-printed electrode based on electropolymerized-molecularly imprinted conducting polymer. *Biosens Bioelectron.* 2016;77:978-85.
23. Zeng Q, Huang X, Ma M. A molecularly imprinted electrochemical sensor based on polypyrrole/carbon nanotubes composite for the detection of S-ovalbumin in egg white. *Int J Electrochem Sci.* 2017;12:3965-81.
24. Yazdani Z, Yadegari H, Heli H. A molecularly imprinted electrochemical nanobiosensor for prostate specific antigen determination. *Anal Biochem.* 2019;566:116-25.
25. Tlili A. Développement de Biocapteurs Electrochimiques Fonctionnalisés avec des Empreintes Moléculaires pour la Détection de Protéines. Thèse de Doctorat en dn Chimie Spécialité « Synthèse Physico-chimique des Matériaux » Faculté des Sciences de Monastir; 2021.
26. Matsumoto H, Sunayama H, Kitayama Y, Takano E, Takeuchi T. Site-specific post-imprinting modification of molecularly imprinted polymer nanocavities with a modifiable functional monomer for prostate cancer biomarker recognition. *Sci Technol Adv Mater.* 2019;20(1):305-12.
27. Özyurt C, Uludağ İ, Sezgintürk MK. An ultrasensitive and disposable electrochemical aptasensor for prostate-specific antigen (PSA) detection in real serum samples. *Anal Bioanal Chem.* 2022;1-14.
28. Turan E, Zengin A, Suludere Z, Kalkan NÖ, Tamer U. Construction of a sensitive and selective plasmonic biosensor for prostate specific antigen by combining magnetic molecularly-imprinted polymer and surface-enhanced Raman spectroscopy. *Talanta.* 2022;237:122926.
29. Ertürk G, Özen H, Tümer MA, Mattiasson B, Denizli A. Microcontact imprinting based surface plasmon resonance (SPR) biosensor for real-time and ultrasensitive detection of prostate specific antigen (PSA) from clinical samples. *Sens Actuators B Chem.* 2016;224:823-32.

30. Abbasy L, Mohammadzadeh A, Hasanzadeh M, Razmi N. Development of a reliable bioanalytical method based on prostate specific antigen trapping on the cavity of molecular imprinted polymer towards sensing of PSA using binding affinity of PSA-MIP receptor: A novel biosensor. *J Pharm Biomed Anal.* 2020;188:113447.
31. Karami P, Khoshshafar H, Johari-Ahar M, Arduini F, Afkhami A, Bagheri H. Colorimetric immunosensor for determination of prostate specific antigen using surface plasmon resonance band of colloidal triangular shape gold nanoparticles. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2019;222:117218.
32. Zhang M, Hu X, Mei L, Zhang L, Wang X, Liao X, et al. PSA detection electrochemical immunosensor based on MOF-235 nanomaterial adsorption aggregation signal amplification strategy. *Microchem J.* 2021;171:106870.
33. Suresh L, Brahman PK, Reddy KR, Bondili JS. Development of an electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles incorporated chitosan biopolymer nanocomposite film for the detection of prostate cancer using PSA as biomarker. *Enzyme Microb Technol.* 2018;112:43-51.
34. Medetalibeyoglu H, Kotan G, Atar N, Yola ML. A novel and ultrasensitive sandwich-type electrochemical immunosensor based on delaminated MXene@AuNPs as signal amplification for prostate specific antigen (PSA) detection and immunosensor validation. *Talanta.* 1 déc 2020;220:121403.
35. Jalalvand AR. Fabrication of a novel and ultrasensitive label-free electrochemical aptasensor for detection of biomarker prostate specific antigen. *Int J Biol Macromol.* 2019;126:1065-73.
36. Han L, Xia H, Yin L, Petrenko VA, Liu A. Selected landscape phage probe as selective recognition interface for sensitive total prostate-specific antigen immunosensor. *Biosens Bioelectron.* 2018;106:1-6.
37. Jolly P, Tamboli V, Harniman RL, Estrela P, Allender CJ, Bowen JL. Aptamer-MIP hybrid receptor for highly sensitive electrochemical detection of prostate specific antigen. *Biosens Bioelectron.* 2016;75:188-95.

Chapitre 4

Immunocapteur électrochimique pour la détection de la protéine Engrailed 2 dans les urines

1. Introduction

Depuis la découverte de la protéine engrailed 2 (EN2) comme marqueur tumoral du cancer de la prostate, seule la technique ELISA est utilisée dans les études de cohorte pour son dosage dans les urines des patients [1, 2]. Cette technique qui est amplement utilisée dans la pratique courante, a des avantages indéniables dont la spécificité puisqu'elle repose sur la reconnaissance antigène-anticorps. En contrepartie, cette méthode est laborieuse puisqu'elle fait appel, entre autres, à de nombreuses étapes de lavage. S'ajoute à ceci le coût élevé de certains kits commerciaux et la nécessité d'un volume d'échantillon relativement important (environ 200 μL) [3-5]. Cette méthode a par ailleurs une limite de détection de l'ordre du nano molaire, une valeur qui peut être considérée comme « peu satisfaisante » pour la détection des protéines à un stade précoce de plusieurs maladies [4].

L'alternative aux techniques immuno-enzymatiques classiques est l'avènement des biocapteurs en général et des immunocapteurs électrochimiques en particulier. Ces dispositifs offrent en effet de nombreux avantages en termes de grande sensibilité et de faibles limites de détection, et pourraient donc être envisagés pour la détection de biomarqueurs de cancer à l'état de trace [6]. Ces capteurs ont gardé l'approche de couplage antigène-anticorps mais ce couplage est révélé par des techniques électrochimiques au lieu de la colorimétrie. Grâce à cette technologie moderne et évolutive, les immunocapteurs électrochimiques sont devenus des candidats attrayants pour de larges applications dans le domaine médical [7]. Idéalement, un immunocapteur est conçu pour assurer les tâches suivantes : (i) une formation spontanée de l'immunocomplexe sans besoin de réactifs supplémentaires ou de marquage préalable (ii) une détection rapide et spécifique des antigènes d'intérêt dans les milieux réels (iii) la génération de résultats fiables et reproductibles [7].

Tenant compte de ces exigences, nous présentons dans ce chapitre le protocole d'élaboration d'un immunocapteur électrochimique dédié à la détection sensible et sélective de la protéine EN2, un biomarqueur urinaire du cancer de la prostate. A notre connaissance, seules deux études ont rapporté la conception de biocapteurs pour la détection de EN2 en faisant appel à des aptamères immobilisés sur des électrodes en or [8] ou en graphène [9].

2. Optimisation des paramètres d'élaboration de l'immunocapteur pour la détection de l'EN2

2.1. Choix de la méthode de fonctionnalisation des surfaces des électrodes de travail

L'étape clé de l'élaboration d'un immunocapteur est la fonctionnalisation de la surface de l'électrode de travail en or massif. Le choix de la méthode est primordial afin de garantir la stabilité du capteur ainsi que sa fiabilité. Nous avons opté pour l'électrodéposition d'un polymère à base d'acide para aminobenzoïque (4-ABA) (Figure 4.1).

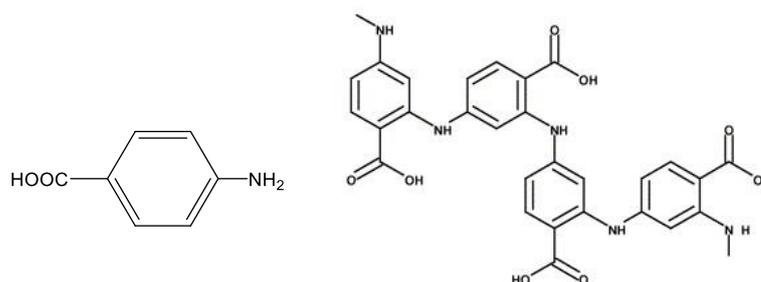


Figure 4.1 : Structure de l'acide para amino benzoïque (à gauche) et du PABA : poly (acide para-amino-benzoïque)

Les films de PABA peuvent en effet être aisément électrodéposés sur différents types d'électrodes notamment en or [10-13] en graphène [14-17] ou en carbone [18-20]. Ils présentent par ailleurs une bonne stabilité chimique et mécanique et offrent de nombreux groupements carboxyles réactifs qui peuvent être mis à profit pour une immobilisation stable et irréversible de divers types de biomolécules [21-23].

Les films de PABA ont ainsi été utilisés pour la fonctionnalisation de divers immunocapteurs dédiés à la détection de l'interleukine 6, un marqueur du cancer colorectal [17], de l'interféron γ , un marqueur des pathologies rhumatologiques [24], la TGF- β , un biomarqueur de la fibrose du foie et de cancer de la vessie [11], du peptide YY chez les personnes obèses [23], de l'aflatoxine B1 (une toxine cancérigène) [25], et du RANKL, Ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B, un biomarqueur des métastases osseuses [19].

Wan et al. [20] ont, quant à eux, utilisé le PABA pour réaliser un génocapteur dédié à la détection des gènes de résistances bactériennes aux antibiotiques.

Le 4-ABA a été utilisé également comme monomère fonctionnel pour l'élaboration de polymères à empreintes moléculaires destinés à des applications médicales, dont le dosage de la thyronamine dérivée des hormones thyroïdiennes [18], de la naloxone chez les toxicomanes en cours du sevrage [26], et la trazdone, un antidépresseur pour le suivi thérapeutique des patients [27].

Cette grande variété d'applications dans le domaine médical nous a conforté dans le choix du PABA pour la fonctionnalisation d'immunocapteurs dédiés à la détection de l'EN2.

2.2. Choix de la technique de polymérisation du PABA

Comme mentionné dans le chapitre précédent, la voltammétrie cyclique est l'une des techniques les plus populaires pour l'électropolymérisation de films conducteurs. C'est d'ailleurs la méthode la plus courante pour la fonctionnalisation des électrodes de travail avec des films de PABA en vue de l'élaboration d'immunocapteurs [22, 23, 28-30].

L'étude de Ferreira et al. [21] pourrait expliquer le choix de cette technique. Les auteurs ont testé deux méthodes d'électropolymérisation du 4-ABA sur des électrodes en graphite, la chronoampérométrie (CA) et la voltammétrie cyclique (CV), et ont suivi la qualité du greffage des bases puriques adénine et guanine sur la surface fonctionnalisée. Leurs résultats indiquent que les biomolécules greffées sur des films synthétisés par CV avaient un meilleur signal électrochimique que celles greffées sur des films synthétisés par CA.

Nous avons ainsi choisi la voltammétrie cyclique comme technique électrochimique pour l'électrogreffage des films de PABA sur des surfaces en or et nous avons effectué des balayages entre -0,8 et 0,9 V à une vitesse de 50 mV/s. Ces valeurs ont été choisies sur la base de nombreuses études bibliographiques dont celles de Liu et al. [28] et Da Cruz Santos et al. [31].

Les tracés des densités de courant, rapports entre les valeurs de courant et la surface active de l'électrode de travail, en fonction du potentiel sont représentés dans la Figure 4.2a. Ces voltammogrammes sont comparables à ceux rapportés par Liu et al. [28], Florea et al. [32] et Wu et al. [33]. On observe tout d'abord un pic irréversible à 0,86 V qui est attribué à l'oxydation du PABA et la formation d'un cation radicalaire [34, 35] (étape 1 de la figure 4.2b). Cette étape est suivie par l'apparition d'un pic cathodique à 0,26 V et d'un pic anodique à 0,21 V qui sont associées à la formation d'un dimère par un couplage en position ortho soit avec un deuxième radical cationique ou avec un monomère non oxydé (étape 2 de la figure 4.2b) [31, 34, 35].

Au cours de la polymérisation nous avons constaté une diminution de l'intensité du courant qui s'explique par la formation progressive d'un film homogène à la surface de l'électrode en or [34, 35] (étape 3 de la figure 4.2b).

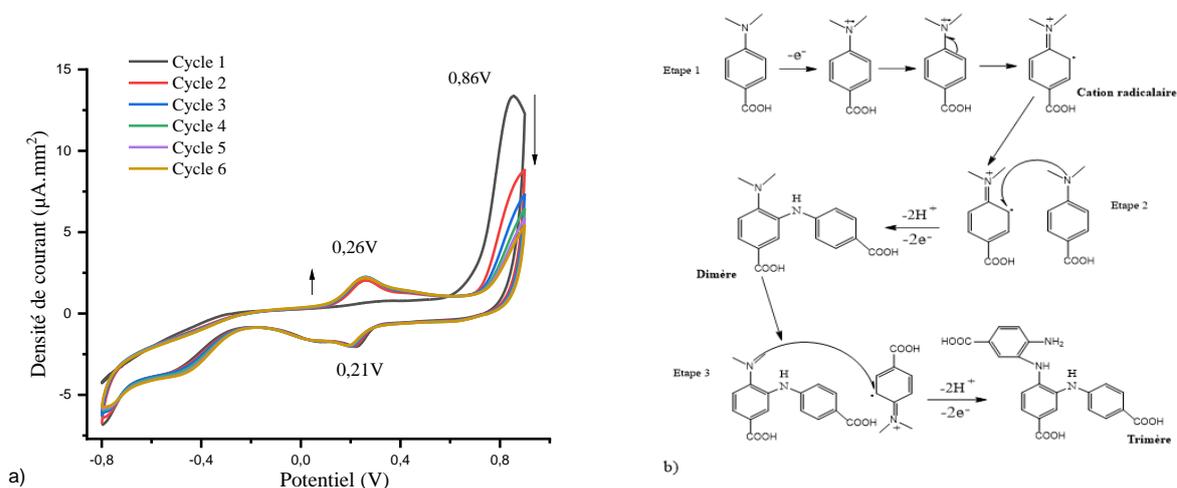


Figure 4.2 a) Voltammogrammes cycliques enregistrés au cours de l'électropolymérisation du film PABA sur des électrodes de travail en or, b) Proposition d'un mécanisme d'électropolymérisation du PABA

2.3. Optimisation de l'épaisseur du film de PABA

L'optimisation de l'épaisseur du film est une étape clé dont va dépendre la stabilité du capteur. Pour ce faire, nous avons varié le nombre de cycles, réalisés par CV, de 1 à 10 (Figure 4.3a). Les caractérisations électrochimiques ont été effectuées en présence d'un couple rédox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ à 5 mM dans un tampon PBS 0,1 M et à pH 7,3.

Sur la Figure 4.3b, nous avons reporté les variations des valeurs moyennes de densité de courant du pic d'oxydation du film PABA (issues de trois mesures) en fonction du nombre de cycles de polymérisation.

Cette dernière montre que l'augmentation du nombre de cycles conduit à une diminution de la densité de courant qui témoigne de la formation d'un film bloquant jusqu'à la valeur optimale de 6 cycles au-delà de laquelle la valeur de densité de courant du pic d'oxydation du film est pratiquement constante.

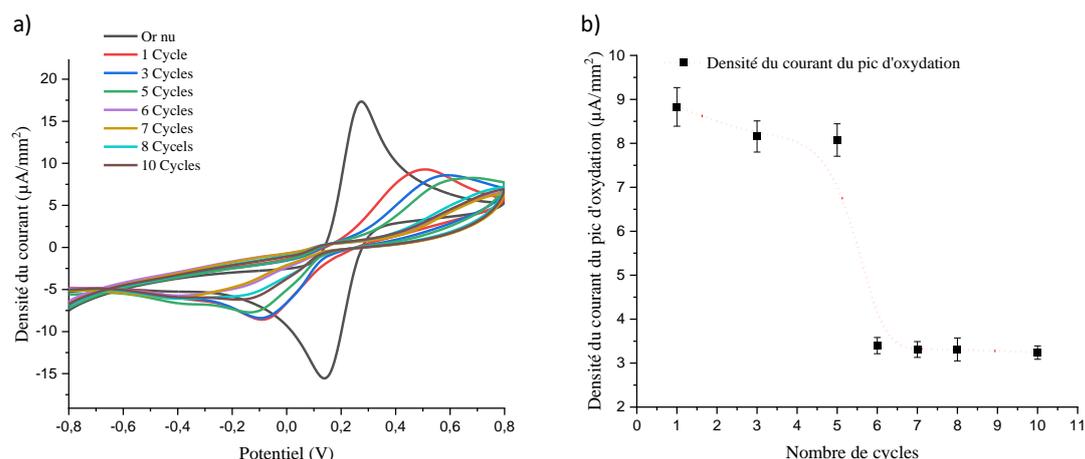


Figure 4.3: a) Voltammogrammes cycliques après l'électropolymérisation de 1, 3, 5, 6, 7, 8 et 10 cycles de 4-ABA ; b) Variation de la densité de courant (du pic d'oxydation) en fonction du nombre de cycles.

2.4. Choix du sel de fond de polymérisation

Un deuxième paramètre important pour la polymérisation électrochimique est le choix du sel de fond. Nous avons testé trois solutions pour lesquelles nous avons varié la composition et la concentration en sels du milieu réactionnel, ce qui revient à en varier la force ionique (tableau 4.1). Pour chaque solution, l'électrodéposition a été effectuée sur trois électrodes afin de vérifier la reproductibilité.

Tableau 4.1 : Composition des solutions de sel de fond de polymérisation testés dans cette étude

Solution testée	Composition et teneur en sels
Solution 1	KCl 1 M + PBS 0,1 M
Solution 2	KCl 1 M + PBS 0,05 M
Solution 3	KCl 0,1 M

Les films obtenus ont été par la suite caractérisés par SWV (Figure 4-6). Nous avons utilisé les paramètres suivants pour les caractérisations par SWV : incrément = 5 mV, amplitude = 25 mV, fréquence = 25 Hz, temps de repos = 5 s et sensibilité = 10^{-4} A.

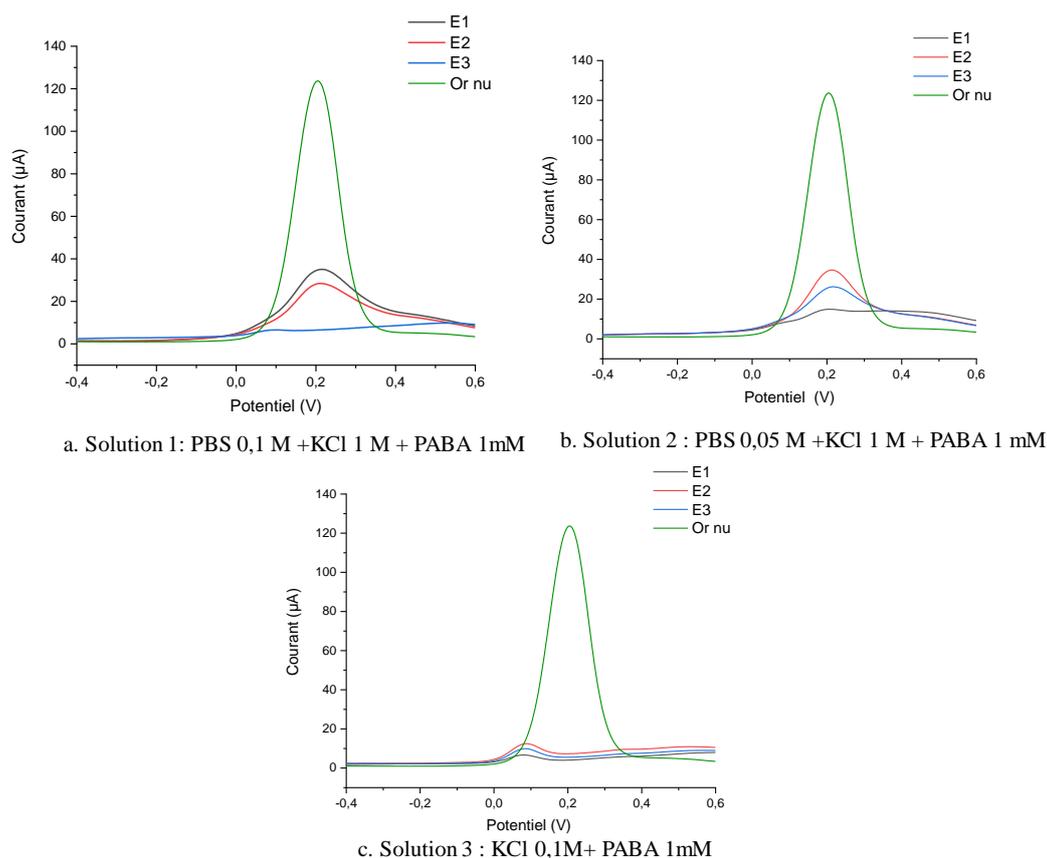


Figure 4.4: Voltammogrammes de caractérisation par SWV des films obtenus pour les différentes solutions (E1 : électrode 1, E2 : électrode 2, E3 : électrode 3)

En comparant les différents voltammogrammes correspondant à chaque solution, nous avons constaté que seule la solution 3 (contenant uniquement du KCl à 0,1 M) a permis l'obtention de trois films reproductibles parfaitement homogènes et bloquants (figure 4.4c). C'est donc ce sel de fond qui a été retenu pour la suite de l'étude.

2.5. Greffage des anticorps sur la surface

Afin de greffer les anticorps de manière covalente au film de PABA, nous avons eu recours à une étape d'activation des groupements carboxyliques par le couple 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) et le N hydroxysuccinimide (NHS) (0,15 M/0,75 M dans PBS à pH=7,3) pendant 20 minutes à 4°C. Ces paramètres ont été optimisés dans des études antérieures réalisées au sein du SATIE.

10 µL d'une solution d'anticorps anti-EN2 à une concentration de 10 µg/mL ont été par la suite déposés sur la surface et laissés réagir pendant une durée de 45 minute à 4°C. Enfin, un rinçage avec du PBS est réalisé pour éliminer les anticorps en excès n'ayant pas été greffés.

Le recouvrement total de la surface avec les anticorps n'étant pas garanti, les groupements carboxyliques libres poseraient un problème d'adsorption non spécifique de la protéine à doser. Ce phénomène qui affecte considérablement les performances des immunocapteurs a été largement étudié [36] et diverses molécules bloquantes ont été employées dont la l'albumine bovine, BSA, [30, 37, 38] et l'éthanolamine [39-41]. Grâce à son groupement amine, cette dernière a été utilisée dans le développement d'immunocapteurs à base de PABA [22, 29] car il est possible de le greffer d'une manière covalente aux groupement carboxyliques.

Dans ce travail, nous avons testé différentes molécules bloquantes : BSA, éthanolamine, propylamine et histamine (figure 4.5a). Les résultats de caractérisations électrochimiques par voltammétrie à onde carrée, illustrés dans la figure 4.5b, indiquent que l'histamine permet un meilleur transfert de charges, comparée aux autres molécules. Sur la base de ces résultats, nous avons choisi d'utiliser l'histamine comme molécule bloquante.

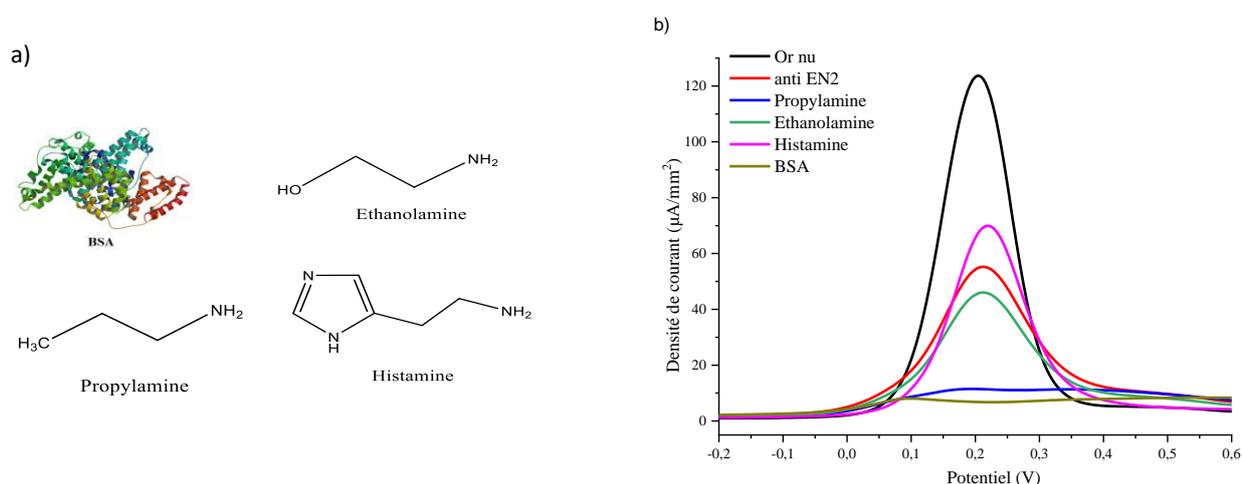
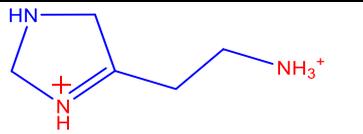
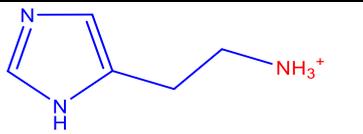
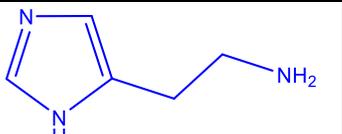


Figure 4.5: Optimisation du choix de la molécule de blocage : (a) structure des molécules bloquantes étudiées (b), Caractérisation électrochimique par voltammétrie à ondes carrées

La protéine EN2 étudiée dans ce travail possède une particularité qui la distingue des autres protéines : un point isoélectrique de l'ordre de 9,1 [42, 43] ce qui la rend chargée positivement à pH physiologique. L'idée proposée est d'ajuster le pH de l'histamine à 5 pour que les deux groupements amines soient chargés positivement (tableau 4.2) et donc empêcher l'adsorption de l'analyte à la surface par répulsion électrostatique [44, 45].

Tableau 4.2: Variation des charges de l'histamine en fonction du pH

pH	5	6-8	11
Charges de l'histamine			

Après chaque étape de fonctionnalisation, une caractérisation électrochimique a été réalisée afin de suivre l'évolution de l'état de surface comme le montre la figure 4.6.

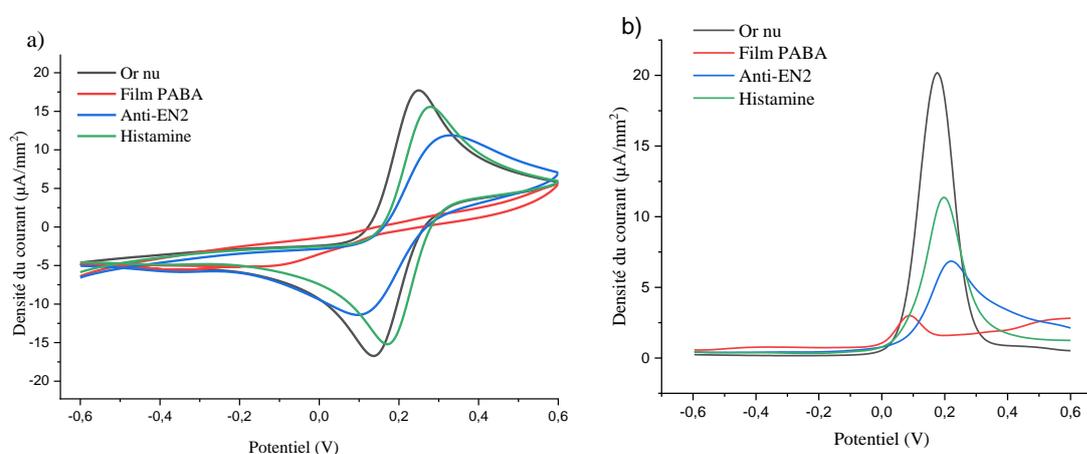


Figure 4.6: Caractérisation électrochimique des étapes de l'élaboration du capteur par (a) voltammétrie cyclique (b) voltammétrie à ondes carrées

La caractérisation de l'électrode nue par voltammétrie cyclique a révélé un rapport égal à 1 entre la valeur du pic de courant cathodique et celle du pic de courant anodique, montrant un processus électrochimique réversible [46] et indiquant une surface bien propre. Le dépôt du film PABA à la surface a engendré une diminution de la densité de courant. Ceci peut être attribué à la charge négative des groupements carboxyliques (COO^-) à $\text{pH}=7,3$, qui minimise le transfert de charge vers la surface en or [47, 48]. En revanche, la densité de courant a augmenté de 63% après l'immobilisation des anticorps anti-EN2 par une liaison covalente aux groupements carboxyliques. Cela peut être lié à la charge positive à $\text{pH} 7,3$ des groupes amines (NH_3^+) de ces derniers. Enfin, le blocage du reste des acides carboxyliques avec les molécules d'histamine conduit à une augmentation supplémentaire de la densité de courant de 20% en raison, là aussi, de leur charge positive.

Pour conclure cette partie, nous présentons dans la figure 4.7 un schéma simplifié qui résume les différentes étapes de l'élaboration de l'immunocapteur EN2.

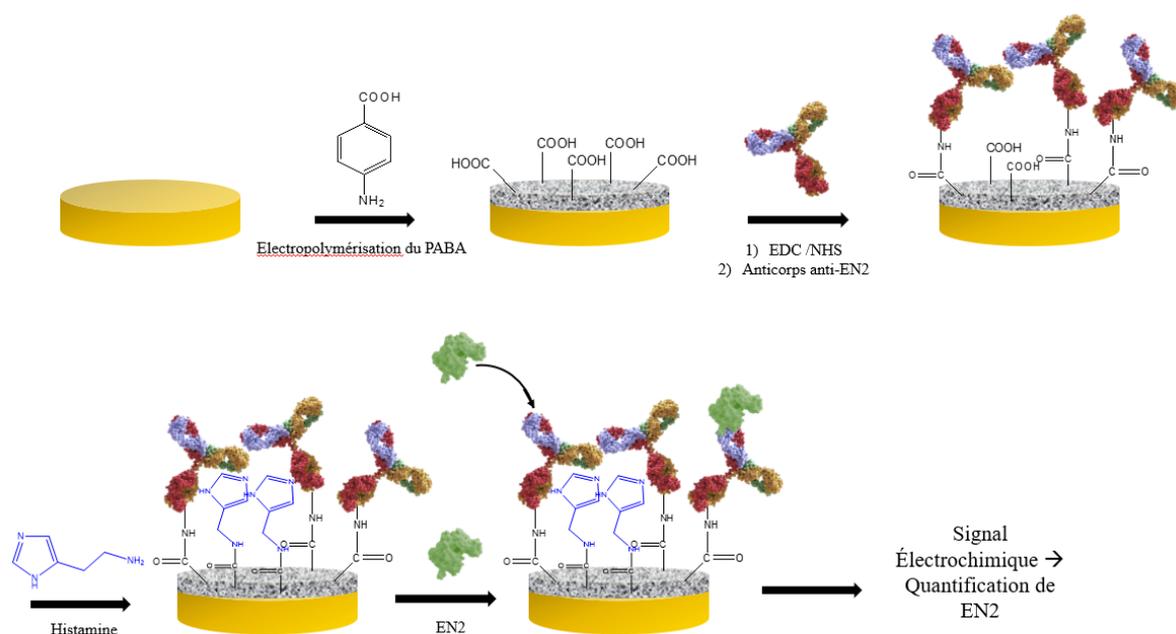


Figure 4.7 : Schéma simplifié des différentes étapes de l'élaboration de l'immunocapteur

3. Les performances analytiques de l'immunocapteur

3.1. Etalonnage du capteur

Nous avons testé la réponse du capteur conçu par SWV à des concentrations croissantes de EN2 dans du PBS (pH=7,3) allant de 10^{-5} ng/mL à 1 μ g/mL.

A l'image du protocole du biocapteur à empreintes moléculaire, celui-ci n'a pas nécessité l'utilisation de sondes redox puisque l'EN2 est une molécule électroactive. Les mesures électrochimiques ont été faites dans un milieu aqueux contenant un tampon PBS. La Figure 4.8 montre clairement un pic d'oxydation caractéristique de la protéine à 0,1 V.

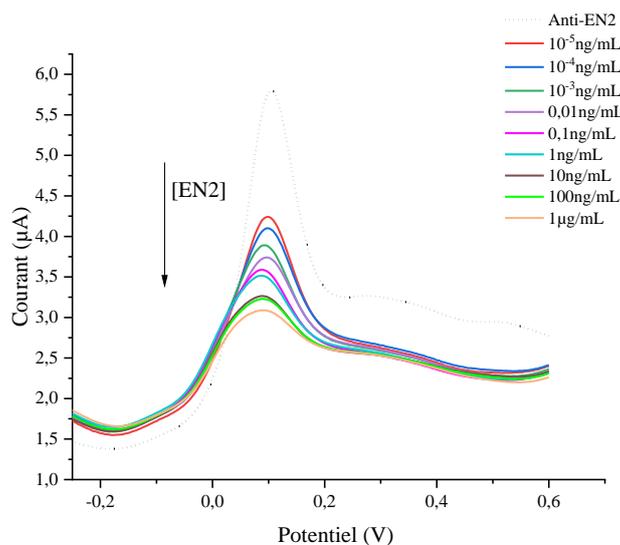


Figure 4.8: Détection par SWV de concentrations croissantes en EN2 dans PBS

Au cours du dosage cumulatif de la gamme étalon, nous avons remarqué une diminution de l'intensité du courant avec l'augmentation des concentrations de EN2. Ceci peut être attribué à une réduction progressive du transfert de charges vers la surface de l'électrode. De plus, la formation du « complexe EN2/anti-EN2 » peut masquer les entités électroactives des anticorps ce qui contribue à la diminution du signal.

La courbe d'étalonnage a été ensuite tracée en relevant la réponse du capteur en fonction des concentrations cumulatives de EN2 (Figure 4.9). Nous avons choisi d'exprimer cette réponse en variation relative de l'intensité du courant $(I_0 - I)/I_0$, où I_0 est le courant mesuré après le greffage des anticorps et I est la valeur du courant obtenue après incubation de chaque concentration de EN2.

La valeur de la sensibilité, calculée à partir de la pente à l'origine, a été estimée à $(29 \pm 2) \mu\text{L}/\text{ng}$. La limite de détection est égale à 10^{-5} ng/mL (0,32 fM). Cette dernière est largement inférieure à celles rapportées dans les travaux précédents des équipes de Settu (38,5 nM) [9] et Lee (5,62 fM) [8]. Notons que la valeur du cut-off de la protéine EN2 dans les urines est de 42,5 ng/mL, une valeur largement supérieure à la limite de détection du capteur ce qui rendrait possible la détection de la protéine dans les urines à des stades précoces du cancer de la prostate.

La constante de dissociation K_d a été estimée à partir de la modélisation des données expérimentales avec un modèle de Hill (équation 4.1) :

$$S(C) = \frac{A \times C^\alpha}{K_d^\alpha + C^\alpha} \quad \text{Équation 4-1}$$

où S est le signal de sortie du capteur exprimé en variation de courant normalisée $I_0 - I/I_0$ pour une concentration C d'EN2, K_d est la constante de dissociation, A est une constante empirique (égale à la valeur maximale du signal à la saturation), et α est le coefficient de Hill.

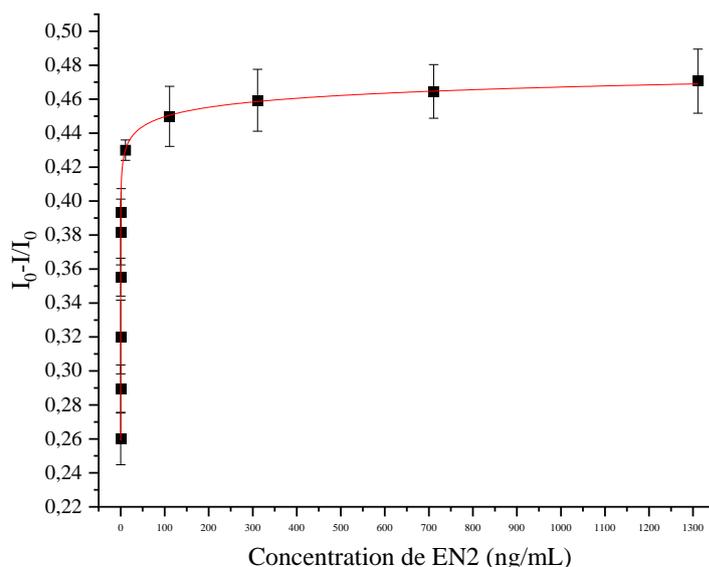


Figure 4.9 : Courbe d'étalonnage de l'immunocapteur EN2

La valeur du coefficient de Hill a été estimée à $0,010 \pm 3 \cdot 10^{-3}$ et la constante de dissociation K_d s'est révélée de l'ordre de $(3,15 \pm 0,70) \times 10^{-11}$ mg/mL ou $(0,9 \pm 0,2)$ fM. Grâce à cette valeur, nous pouvons conclure que l'affinité de cet immunocapteur dépasse nettement celle des capteurs à aptamères dont les valeurs des constantes d'affinité rapportées dans la littérature variaient entre 66 et 98,84 nM [8, 9].

Pour valider notre choix de l'histamine comme molécule bloquante, nous avons étudié son effet sur la sensibilité du capteur. Pour cela, nous avons testé la même gamme de concentrations de EN2 sur un capteur fabriqué sans ajout d'histamine et nous avons tracé la courbe d'étalonnage, en la superposant à celle avec l'histamine tel que décrit dans la figure 4.10. Nous avons noté que ces deux courbes se prêtent à l'ajustement par le modèle de Hill. Ce qui est remarquable en revanche c'est que le blocage par l'histamine a contribué à une augmentation de 100 fois environ de l'affinité exprimée par la constante K_d ce qui montre de façon indéniable la contribution de l'histamine à la réduction de l'adsorption non spécifique. La diminution des

barres d'incertitudes en présence de la molécule bloquante est un autre point en faveur de son utilisation, en vue de l'amélioration des performances du capteur.

Figure 4.10: Représentation semi-Log des courbes de détections de la protéine EN2 avec un capteur élaboré sans dépôt d'histamine (courbe noire) et avec dépôt d'histamine (courbe rouge)

3.2. Test de sélectivité

Pour évaluer la sélectivité de l'immunocapteur conçu, nous avons testé trois protéines interférentes : l'albumine humaine (HSA), PSA et IgG. Pour chacune, nous avons étudié la réponse du capteur sur une gamme de concentration allant de 10^{-5} ng / mL à 1 μ g / mL. Les courbes de détection correspondantes, représentées dans la figure 4.11, indiquent que la réponse électrochimique de EN2 se détache clairement des autres réponses non spécifiques. Ce qui est primordial à noter est que la réponse obtenue pour une concentration de EN2 de 0,1 μ g/mL seulement, est supérieure à celle obtenue pour une concentration de molécules interférentes aussi élevée que 1 μ g/mL ce qui est en faveur de notre nouvelle technique permettant de disposer d'un capteur sélectif présentant une limite de détection très basse.

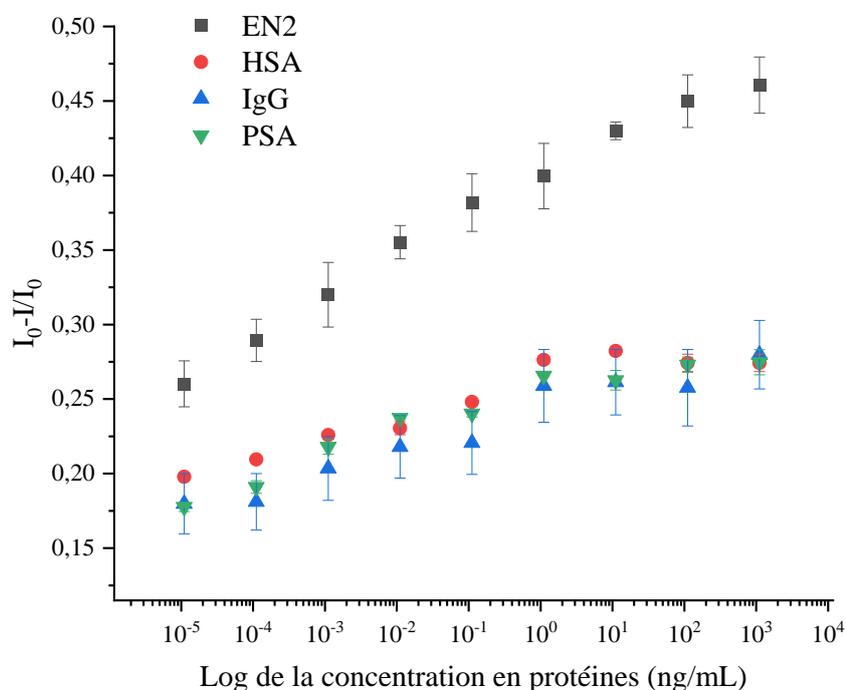


Figure 4.11 : Courbes de détection des protéines interférentes comparées à celle de la détection de EN2, en représentation semi-Log.

3.3. Test de compétitivité

Les études de compétitivité viennent compléter ceux de sélectivité en évaluant la capacité de détecter EN2 dans un mélange de protéines. Nous avons donc suivi la réponse électrochimique de EN2 qui coexiste à différentes concentrations avec les 3 protéines considérées auparavant : le PSA à 300 ng/mL, le HSA à 50 µg/mL et l'IgG à 50 µg/mL. Ces concentrations ont été choisies pour correspondre aux ordres de grandeur de celles trouvées dans l'urine de patients atteints de diverses maladies auto-immunes, inflammatoires et/ou cancéreuses. Nous avons constaté d'après les courbes de détection représentées dans la figure 4.12 que la réponse dans le mélange de protéines est similaire à celle enregistrée dans le tampon PBS, dans la limite des incertitudes, confirmant ainsi la capacité du capteur conçu à détecter sélectivement la protéine EN2 dans des milieux complexes comme simples.

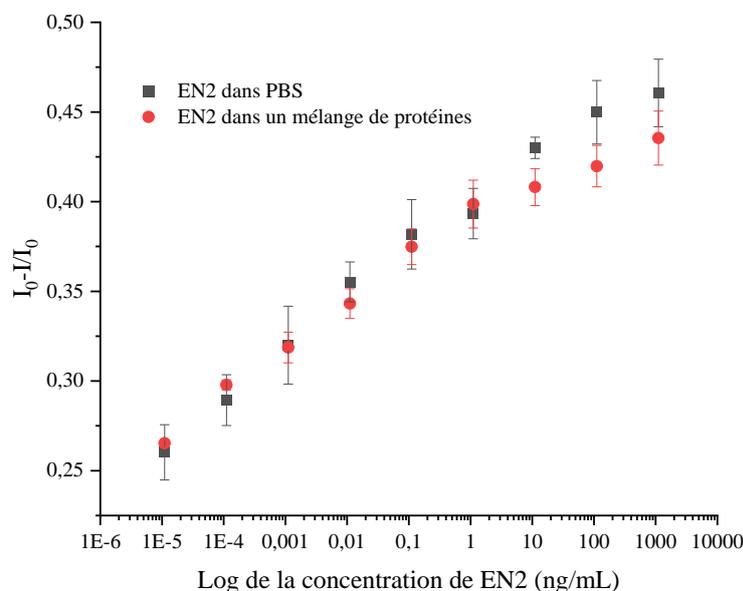


Figure 4.12 : Test de compétitivité de l'immuncapteur (courbe semi-Log)

4. L'applicabilité du capteur : détection dans les urines artificielles

Etant donné que les urines sont des milieux biologiques très complexes, il est important de tester la fiabilité et la précision du biocapteur dans les conditions réelles du dosage, ou du moins s'en approcher.

À cette fin, nous avons opté pour des essais dans des solutions d'urines artificielles, préparées selon la formule de Chutipongtanate et al.[49]. La force ionique a été ajustée à 0,18 M, pour la ramener à une valeur proche de celle du PBS (0,16 M). La détection de concentrations

croissantes de la protéine EN2 a été réalisée dans les urines artificielles, selon le même procédé que pour la détection dans le PBS, et les résultats obtenus sont rassemblés dans la Figure 4.13.

Il est remarquable de noter que la courbe d'étalonnage obtenue dans les urines artificielles est relativement proche de celle réalisée dans une solution de PBS. De même, dans les deux cas, les données expérimentales sont ajustables par le même modèle de Hill avec des constantes de dissociation K_d très proches. En effet, la différence relative entre les deux valeurs de K_d est de 6%, ce qui est négligeable, au regard des différentes incertitudes, dont celle de la modélisation.

Ces résultats sont très encourageants car ils mettent en évidence le fait que la réponse de l'immunocapteur n'est pas influencée par la complexité du milieu.

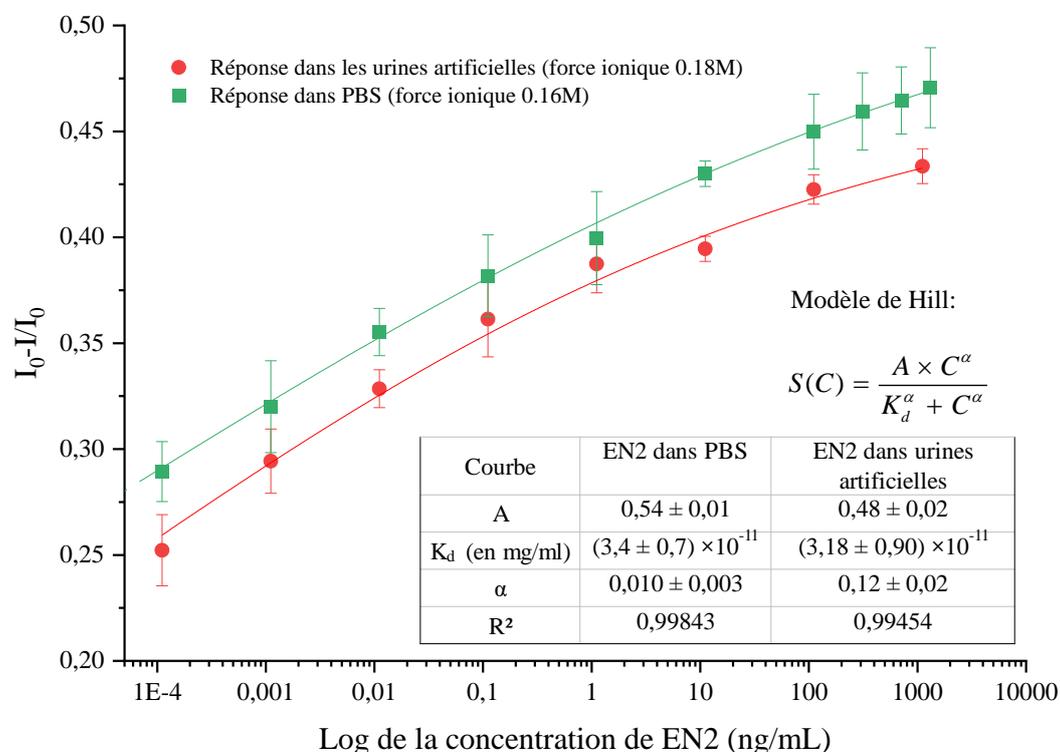


Figure 4.13 : Courbe d'étalonnage dans les urines artificielles et le milieu tamponné PBS

(en semi-Log)

En contrepartie, cette complexité semble encore être un obstacle pour la technique standard ELISA ce qui a été démontré par l'équipe de Chatziharalambous et al [50]. En effet, ces chercheurs ont testé 11 kits ELISA commercialisés pour la détection des biomarqueurs tumoraux urinaires et ils ont constaté que seuls 3 ont franchi les seuils de précision pour être

validés comme outil de dépistage ou de diagnostic. Ces résultats reflètent les difficultés à développer des tests ELISA robustes pour la quantification des biomarqueurs urinaires.

Pour conclure, nous avons mis en évidence les principaux avantages de notre travail par rapport aux publications précédentes, en résumant dans le tableau 4.3 les performances analytiques ainsi que les conditions opératoires des différents tests.

Tableau 4.3 : Comparaison synthétique entre notre travail et des travaux précédents

Performance analytique et conditions de tests	Lee et al [8]	Settu et al [9]	Ce travail
Durée de conception du capteur	22 h	4 h	2 h
Limite de detection (LOD)	5,62 fM	38,5 nM	0,32 fM
Constante de dissociation (K_d)	61,03 à 98,84 nM	66 nM	0,9 ± 0,2 fM
Test de sélectivité	Réalisé pour une seule concentration donnée de EN2	non effectué	Réalisé pour toute la gamme de concentration de EN2
Test de compétitivité	Réalisé pour une seule concentration donnée de EN2	non effectué	Réalisé pour toute la gamme de concentration de EN2
Test d'applicabilité dans des urines artificielles ou réelles	non effectué	non effectué	Validé dans les urines artificielles

L'innovation rapportée ici est par rapports aux tests de sélectivité et de compétitivité qui ont été menées sur toute la gamme de concentration de EN2 afin de mieux mettre en évidence la capacité du capteur conçu à détecter la protéine quelle que soit la nature du milieu de détection et la différencier des autres protéines interférentes, même si elles sont présentes à de très fortes concentrations. Les tests réalisés dans le cadre de ce travail, que nous sommes les seuls à avoir mené dans l'urine artificielle, confirment ces résultats.

5. Conclusion

Nous avons conçu un immunocapteur électrochimique pour la détection sélective de la protéine EN2 dans un milieu simple (tampon PBS) et complexe (urines artificielles). Cet immunocapteur présente des performances analytiques améliorées par rapports aux biocapteurs à aptamères précédemment rapportés notamment de très faibles valeurs de limite de détection et de constante de dissociation à l'équilibre. Les tests de sélectivité et de compétitivité ont été réalisés avec trois protéines urinaires interférentes, PSA, HSA et IgG, qui peuvent être trouvées en forte concentration, dans le cas de maladies graves. Les résultats obtenus indiquent clairement que l'immunocapteur conçu peut distinguer la réponse de EN2 de celles des autres protéines, même dans les cas les plus défavorables où la molécule d'intérêt peut se retrouver en défaut par rapport aux interférents. Les tests dans l'urine artificielle montrent que les constantes de dissociation sont tout à fait comparables à celles obtenues dans le PBS, montrant la pertinence de ce paramètre dans l'identification et la quantification de ce biomarqueur. Ces résultats encourageants permettent d'envisager comme prochaine étape, d'utiliser cet immunocapteur pour la détection fiable des concentrations de EN2 dans les urines des patients.

Notre étude constitue donc une réelle avancée, non seulement en termes de performances mais aussi en termes de facilité et de reproductibilité de mise en œuvre des capteurs. Ces derniers permettent de suivre un biomarqueur du cancer de la prostate plus spécifique que le PSA, même à très faible concentration. La mise à disposition d'un tel outil analytique simple, fiable et robuste, pourrait ouvrir la voie à l'utilisation clinique de EN2 comme biomarqueur du cancer de la prostate.

Références

1. Morgan R, Boxall A, Bhatt A, Bailey M, Hindley R, Langley S, et al. Engrailed-2 (EN2): a tumor specific urinary biomarker for the early diagnosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(5):1090-8.
2. Hardev Pandha, Karen D. Sorensen, Thorsten F. Orntoft, Stephen Langley, Soren Hoyer, Michael Borre, et al. Urinary engrailed-2 (EN2) levels predict tumour volume in men undergoing radical prostatectomy for prostate cancer. *BJU Int.* 2012;110(6b):E287-92.
3. Tsao YT, Sung WH, Chen HC, Hsu MY, Cheng CM. Based ELISA: A Novel Diagnostic Approach for Monitoring Aqueous Humour VEGF Level in Ocular Diseases. In: *Novel Diagnostic Methods in Ophthalmology.* IntechOpen; 2018.
4. Hosseini S, Vázquez-Villegas P, Rito-Palomares M, Martinez-Chapa SO. Advantages, Disadvantages and Modifications of Conventional ELISA. In: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).* Springer; 2018. p. 67-115.
5. Satija J, Punjabi N, Mishra D, Mukherji S. Plasmonic-ELISA: expanding horizons. *RSC Adv.* 2016;6(88):85440-56.
6. Chikkaveeraiah BV, Bhirde AA, Morgan NY, Eden HS, Chen X. Electrochemical Immunosensors for Detection of Cancer Protein Biomarkers. *ACS Nano.* 2012;6(8):6546-61.
7. Lim SA, Ahmed MU. Introduction to immunosensors. In: *Immunosensors.* 2019. p. 1-20.
8. Lee S, Jo H, Her J, Lee HY, Ban C. Ultrasensitive electrochemical detection of engrailed-2 based on homeodomain-specific DNA probe recognition for the diagnosis of prostate cancer. *Biosens Bioelectron.* 2015;66:32-8.
9. Settu K, Liu JT, Chen CJ, Tsai JZ. Development of carbon-graphene-based aptamer biosensor for EN2 protein detection. *Anal Biochem.* 2017;534:99-107.
10. Nai H, Cao L, Sun S, Li R, Liu H, Yan P. Development and characterization of an ultrasensitive label-free electrochemical immunosensor for okadaic acid based on polydimer (p-aminobenzoic acid)-modified gold three-dimensional nanoelectrode ensembles. *Ionics.* 2021;27(12):5323-31.
11. Guerrero S, Agüí L, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón J. Screen-printed Gold Electrodes Functionalized with Grafted p-Aminobenzoic Acid for the Construction of Electrochemical

Immunosensors. Determination of TGF- β 1 Cytokine in Human Plasma. *Electroanalysis*. 2018;30(7):1327-35.

12. Fenoy GE, Scotto J, Azcárate J, Rafti M, Marmisollé WA, Azzaroni O. Powering Up the Oxygen Reduction Reaction through the Integration of O₂-Adsorbing Metal–Organic Frameworks on Nanocomposite Electrodes. *ACS Appl Energy Mater*. 2018;1(10):5428-36.

13. Duran BG, Castañeda E, Armijo F. Development of an electrochemical impedimetric immunosensor for Corticotropin Releasing Hormone (CRH) using half-antibody fragments as elements of biorecognition. *Biosens Bioelectron*. 2019;131:171-7.

14. Martínez-García G, Agüí L, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM. Multiplexed electrochemical immunosensor for obesity-related hormones using grafted graphene-modified electrodes as platforms for antibodies immobilization. *Procedia Technol*. 2017;27:187-9.

15. Tang J, Yan X, Huang W, Engelbrekt C, Duus JØ, Ulstrup J, et al. Bilirubin oxidase oriented on novel type three-dimensional biocathodes with reduced graphene aggregation for biocathode. *Biosens Bioelectron*. 1 nov 2020;167:112500.

16. Serafín V, Valverde A, Martínez-García G, Martínez-Periñán E, Comba F, Garranzo-Asensio M, et al. Graphene quantum dots-functionalized multi-walled carbon nanotubes as nanocarriers in electrochemical immunosensing. Determination of IL-13 receptor α 2 in colorectal cells and tumor tissues with different metastatic potential. *Sens Actuators B Chem*. 2019;284:711-22.

17. Tertis M, Leva PI, Bogdan D, Suciú M, Graur F, Cristea C. Impedimetric aptasensor for the label-free and selective detection of Interleukin-6 for colorectal cancer screening. *Biosens Bioelectron*. 2019;137:123-32.

18. Pacheco JG, Rebelo P, Cagide F, Gonçalves LM, Borges F, Rodrigues JA, et al. Electrochemical sensing of the thyroid hormone thyronamine (T₀AM) via molecular imprinted polymers (MIPs). *Talanta*. 2019;194:689-96.

19. Valverde A, Serafín V, Montero-Calle A, González-Cortés A, Barderas R, Yáñez-Sedeño P, et al. Carbon/Inorganic Hybrid Nanoarchitectures as Carriers for Signaling Elements in Electrochemical Immunosensors: First Biosensor for the Determination of the Inflammatory and Metastatic Processes Biomarker RANK-ligand. *ChemElectroChem*. 2020;7(3):810-20.

20. Wan C, Qu A, Deng L, Liu X, Wu C. Preparation of electrochemical sensor based on glassy carbon electrode and its specificity and sensitivity for directional detection of antibiotic resistance genes spreading in the water environment. *Environ Sci Pollut Res [Internet]*. 1 sept 2022; Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22787-2>

21. Ferreira LF, Santos CC, da Cruz FS, Correa RA, Verly RM, Da Silva LM. Preparation, characterization, and application in biosensors of functionalized platforms with poly (4-aminobenzoic acid). *J Mater Sci*. 2015;50(3):1103-16.

22. Mattos AB, Freitas TA, Kubota LT, Dutra RF. An o-aminobenzoic acid film-based immunoelectrode for detection of the cardiac troponin T in human serum. *Biochem Eng J.* 2013;71:97-104.
23. Guerrero S, Agüí L, Yanez-Sedeno P, Pingarrón JM. Oxidative grafting vs. monolayers self-assembling on gold surface for the preparation of electrochemical immunosensors. Application to the determination of peptide YY. *Talanta.* 2019;193:139-45.
24. Trindade EK, Silva BV, Dutra RF. A probeless and label-free electrochemical immunosensor for cystatin C detection based on ferrocene functionalized-graphene platform. *Biosens Bioelectron.* 2019;138:111311.
25. Shi L, Wang Z, Yang G, Yang H, Zhao F. A novel electrochemical immunosensor for aflatoxin B1 based on Au nanoparticles-poly 4-aminobenzoic acid supported graphene. *Appl Surf Sci.* 2020;527:146934.
26. Lopes F, Pacheco JG, Rebelo P, Delerue-Matos C. Molecularly imprinted electrochemical sensor prepared on a screen printed carbon electrode for naloxone detection. *Sens Actuators B Chem.* 1 mai 2017;243:745-52.
27. Seguro I, Rebelo P, Pacheco JG, Delerue-Matos C. Electropolymerized, Molecularly Imprinted Polymer on a Screen-Printed Electrode. A Simple, Fast, and Disposable Voltammetric Sensor for Trazodone. *Sensors.* janv 2022;22(7):2819.
28. Liu YT, Deng J, Xiao XL, Ding L, Yuan YL, Li H, et al. Electrochemical sensor based on a poly(para-aminobenzoic acid) film modified glassy carbon electrode for the determination of melamine in milk. *Electrochimica Acta.* 30 avr 2011;56(12):4595-602.
29. Sriwichai S, Janmanee R, Phanichphant S, Shinbo K, Kato K, Kaneko F, et al. Development of an electrochemical-surface plasmon dual biosensor based on carboxylated conducting polymer thin films. *J Appl Polym Sci.* 2018;135(1):45641.
30. Liu B, Li M, Zhao Y, Pan M, Gu Y, Sheng W, et al. A sensitive electrochemical immunosensor based on PAMAM dendrimer-encapsulated Au for detection of norfloxacin in animal-derived foods. *Sensors.* 2018;18(6):1946.
31. da Cruz Santos C, Pimenta TC, Thomasini RL, Verly RM, Franco DL, Ferreira LF. Electropolymerization of phenol and aniline derivatives: Synthesis, characterization and application as electrochemical transducers. *J Electroanal Chem.* 2019;846:113163.
32. Florea A, Cowen T, Piletsky S, De Wael K. Polymer platforms for selective detection of cocaine in street samples adulterated with levamisole. *Talanta.* 2018;186:362-7.
33. Wu Q, Zhang H, Wang M, Li H. Porous Para-aminobenzoic Acid Membrane Prepared by Electrochemical Method and Its Application in Voltammetric Determination of Dopamine. In *EDP Sciences;* 2016. p. 06076.
34. Qi P, Wang J, Wang X, Wang Z, Xu H, Di S, et al. Sensitive and selective detection of the highly toxic pesticide carbofuran in vegetable samples by a molecularly imprinted electrochemical sensor with signal enhancement by AuNPs. *RSC Adv.* 2018;8(45):25334-41.

35. Ganjeizadeh Rohani F, Mohadesi A, Ansari M. Electrochemical synthesis, characterization, and spectroelectrochemical evaluation of poly (para amino benzoic acid-co-4, 4-diaminodiphenyl sulfone) film. *J Mater Sci Mater Electron*. 2019;30(9):8686-97.
36. Lichtenberg JY, Ling Y, Kim S. Non-specific adsorption reduction methods in biosensing. *Sensors*. 2019;19(11):2488.
37. Sánchez-Tirado E, González-Cortés A, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM. Electrochemical immunosensor for the determination of the cytokine interferon gamma (IFN- γ) in saliva. *Talanta*. 2020;211:120761.
38. Liu Q, Shi W, Tian L, Su M, Jiang M, Li J, et al. Preparation of nanostructured PDMS film as flexible immunosensor for cortisol analysis in human sweat. *Anal Chim Acta*. 2021;1184:339010.
39. Lamarca RS, de Faria RAD, Zanoni MVB, Nalin M, de Lima Gomes PCF, Messaddeq Y. Simple, fast and environmentally friendly method to determine ciprofloxacin in wastewater samples based on an impedimetric immunosensor. *RSC Adv*. 2020;10(4):1838-47.
40. Barhoumi L, Bellagambi FG, Vivaldi FM, Baraket A, Clément Y, Zine N, et al. Ultrasensitive immunosensor array for TNF- α detection in artificial saliva using polymer-coated magnetic microparticles onto screen-printed gold electrode. *Sensors*. 2019;19(3):692.
41. Wang X, Sun C, Cheng S. All-covalent reduced graphene oxide FET immunosensor optimized by interface engineering. *Biosens Bioelectron X*. 2022;100172.
42. Kozlowski LP. Proteome-pI: proteome isoelectric point database. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(D1):D1112-6.
43. Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*. 1 juill 2003;31(13):3784-8.
44. Mandity IM, Paragi G, Bogár F, Csizmadia IG. A conformational analysis of histamine, and its protonated or deprotonated forms: an ab initio study. *J Mol Struct THEOCHEM*. 2003;666:143-52.
45. Collado JA, Ramirez FJ. Infrared and Raman spectra of histamine-NH₄ and histamine-Nd₄ monohydrochlorides. *J Raman Spectrosc*. 1999;30(5):391-7.
46. Marken F, Neudeck A, Bond AM. Cyclic voltammetry. In: *Electroanalytical methods*. Springer; 2010. p. 57-106.
47. Adamczyk L, Pietrusiak A, Bala H. Corrosion resistance of stainless steel covered by 4-aminobenzoic acid films. *Cent Eur J Chem*. 2012;10(5):1657-68.
48. Tekin-Celebi S, Solak AO, Ustundag Z, Demirci S. Determination of pK_a of benzoic acid- and p-aminobenzoic acid-modified platinum surfaces by electrochemical and contact angle measurements. *Chem Pap*. 2012;66(12):1146-56.

49. Chutipongtanate S, Thongboonkerd V. Systematic comparisons of artificial urine formulas for in vitro cellular study. *Anal Biochem.* 2010;402(1):110-2.
50. Chatziharalambous D, Lygirou V, Latosinska A, Stravodimos K, Vlahou A, Jankowski V, et al. Analytical performance of ELISA assays in urine: one more bottleneck towards biomarker validation and clinical implementation. *PLOS ONE.* 2016;11(2):e0149471.

Chapitre 5

Génocapteur électrochimique pour la détection du PCA3 urinaire

1. Introduction

Au cours de la dernière décennie, nous avons assisté à des progrès considérables dans le développement de biocapteurs électrochimiques à base d'acides nucléiques ou « génocapteurs ». Ces dispositifs présentent un grand intérêt en raison de leur potentiel à fournir des informations spécifiques à la séquence étudiée de manière plus rapide, plus simple et moins coûteuse que les tests conventionnels (PCR ou RT-PCR). A notre connaissance, seuls 4 génocapteurs électrochimiques dédiés au diagnostic du cancer de la prostate, via l'identification et la quantification du marqueur PCA3, ont été rapportés dans la littérature [1-4]. Ces capteurs sont basés sur le marquage avec des molécules électroactives (ferrocène) ou des enzymes (biotine- streptavidine) [2-4] ou encore des nanomatériaux comme éléments d'amplification du signal [1] ; ce qui augmente la complexité et le coût de la conception. En outre, le processus de marquage demande du temps et des efforts supplémentaires, du fait de la nécessaire mise en œuvre des étapes de fonctionnalisation intermédiaires.

Aujourd'hui, la demande accrue et urgente de tests efficaces et portables sur le lieu de soins pose de nouveaux défis aux chercheurs et ingénieurs qui développent les biocapteurs électrochimiques. Par conséquent, la stratégie sans marquage (label free) représente une alternative intéressante pour la fabrication de biocapteurs électrochimiques à base d'ADN [5].

L'utilisation de méthodes d'auto-assemblage à base d'ADN greffé sur la surface à l'aide d'une chaîne alcanethiol, s'est avérée particulièrement intéressante pour fabriquer des surfaces modifiées par des sondes ayant une activité d'hybridation élevée vis-à-vis de brins ADN de séquence complémentaire. Dans ce but, le brin ADN sonde est généralement immobilisé sur l'or en formant des monocouches capables de reconnaître par complémentarité la cible.

Ainsi, nous proposons dans ce chapitre une méthode simple de détection du PCA3 urinaire. La procédure illustrée dans la figure 5.1 est basée sur le greffage de sondes d'ADN thiolé qui vont reconnaître par complémentarité la PCA3. La transduction du signal de détection du marqueur est réalisée par électrochimie.

La première partie de ce chapitre sera dédiée à la présentation de la méthode de l'extraction du PCA3 à partir des urines de patients. La seconde partie est dédiée à l'élaboration du génocapteur et à la détermination de ses paramètres métrologiques.

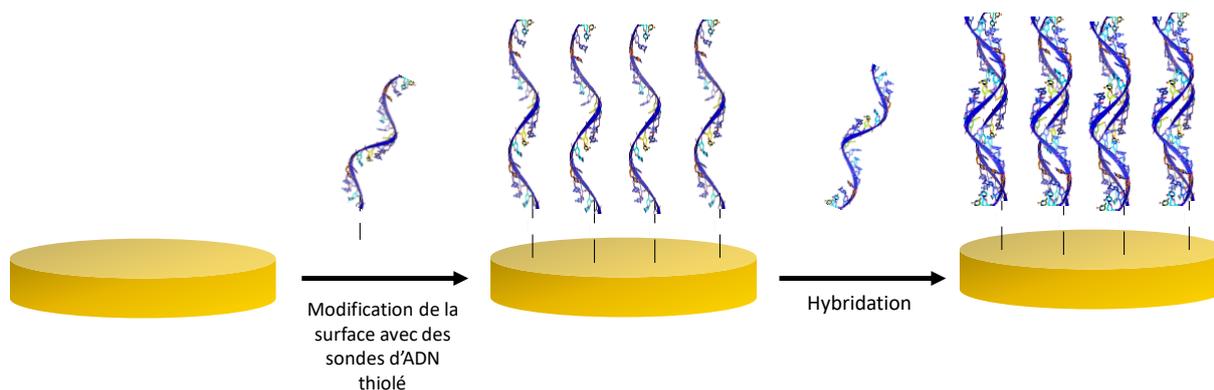


Figure 5.1 : Le principe schématique de l'élaboration et le fonctionnement du génocapteur électrochimique

2. Extraction du PCA3 à partir des échantillons urinaires

2.1. Contrôle de la qualité de l'ADNc par la détection du gène B2M ubiquitaire

Après une première amplification du fragment du gène B2M par la réaction PCR selon le protocole de Robinson et al. [6] la révélation n'a montré aucune bande pour tous les échantillons d'ADN. Ceci pourrait être expliqué par la faible quantité d'ADNc de départ.

Pour augmenter le rendement de cette PCR nous avons opté pour une deuxième PCR dans les mêmes conditions en partant d'un volume de 1 μL du produit de la première amplification, dilué au $1/10^{\text{ème}}$. Après cette deuxième amplification, nous avons réalisé de nouveau une électrophorèse et une révélation sous lumière UV et nous avons observé l'apparition de la bande attendue (102pb) avec des intensités variables selon les échantillons comme le montre la figure 5.2.

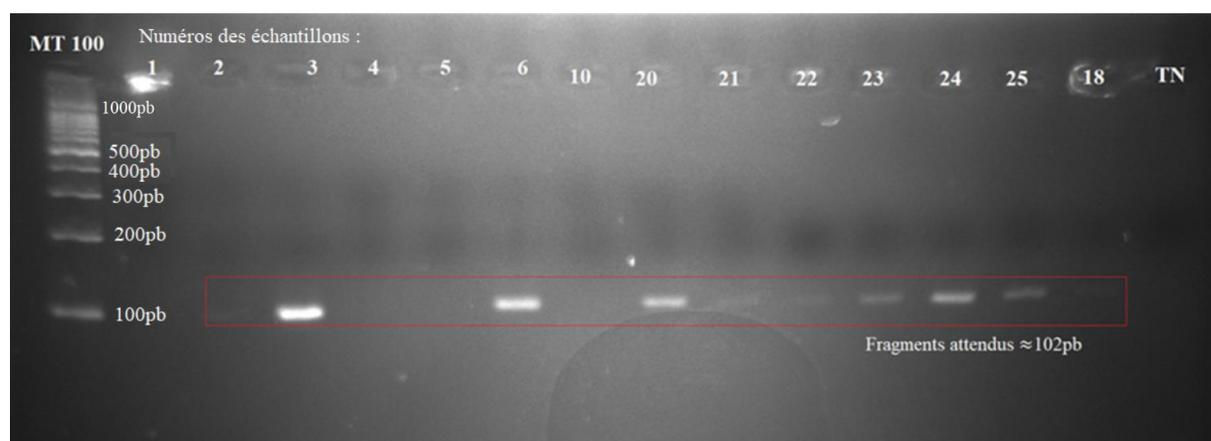


Figure 5.2 : Profil de migration électrophorétique des fragments amplifiés du gène B2M après une deuxième PCR (MT : marqueur de taille, TN : témoin négatif)

Le gène de B2M étant ubiquitaire, l'absence d'amplification du fragment dans le cas des échantillons, 1, 4, 5 et 10 pourrait être attribuée à une (ou à une combinaison) des raisons suivantes :

- Un mauvais prélèvement (massage prostatique inefficace),
- Des conditions d'acheminement ou d'extraction d'ARN urinaire inadéquates, malgré une veille à un acheminement dans la glace et un traitement immédiats,
- Un échec de transcription reverse donnant une mauvaise qualité d'ADNc,
- Un échec de la PCR.

Nous avons donc décidé d'écarter ces échantillons de l'étude.

2.2. Amplification et extraction de la PCA3

L'équipe de Bussemakers et al. [7] a rapporté pour la première fois le PCA3 comme un long ARN non codant surexprimé dans les cellules tumorales prostatiques et absent dans les autres types de cellules tumorales étudiées (foie, muscles, ovaire, placenta, endomètre etc...). Nous avons donc choisi son protocole pour amplifier un fragment du PCA3 en nous assurant que le couple d'amorce utilisé s'étend sur deux exons différents, évitant ainsi une contamination par de l'ADN urinaire.

Tout comme la B2M, la révélation de la réaction PCR n'a montré aucune bande, ce qui nous a incité à essayer une variante de la réaction PCR : la PCR nichée (nested PCR). Cette dernière consiste en une réaction en deux étapes successives, en utilisant des couples d'amorces différents, le deuxième couple d'amorces encadrant une séquence incluse dans celle qui est amplifiée par le premier couple d'amorces. Cette technique permet d'augmenter à la fois la spécificité et le rendement de l'amplification. Elle est particulièrement souhaitée lorsque la quantité d'ADN de départ est faible [8] tel est le cas de notre travail où nous avons de l'ADNc issu d'un ARNm présent en très faible abondance dans les échantillons urinaires tel que l'a montré l'amplification de B2M.

La figure 5.3, décrit la localisation des deux couples d'amorces couple 2 et couple 3 en plus du couple 1 décrit précédemment. :

- Couple 2 : décrit par Wang et al [9]
 - Amorces sens : 5'- ACA CAG GAA GCA CAA AAG G-3'
 - Amorces anti-sens 5'- GAT GAC CCA AGA TGG CGG C-3'

Qui amplifie un fragment de 154 pb de la séquence amplifiée par le couple 1 (Figure 5.3). Pour multiplier les chances de réussite de l'amplification nous avons également testé un autre couple d'amorces pour une PCR semi-nichée (couple3) constitué par l'amorce anti-sens du couple et l'amorce sens du couple 2.

- Couple 3 :
 - Amorce sens : 5'- ACA CAG GAA GCA CAA AAG G-3' (Wang et al [9])
 - Amorce anti-sens 5'-TCC TGC CCA TCC TTT AAG G-3' (décrite par Bussemakers et al. [7])

Ces deux amorces amplifient un fragment de 64 pb également inclus dans les 543pb amplifiés par le couple 1 (Figure 5.3)

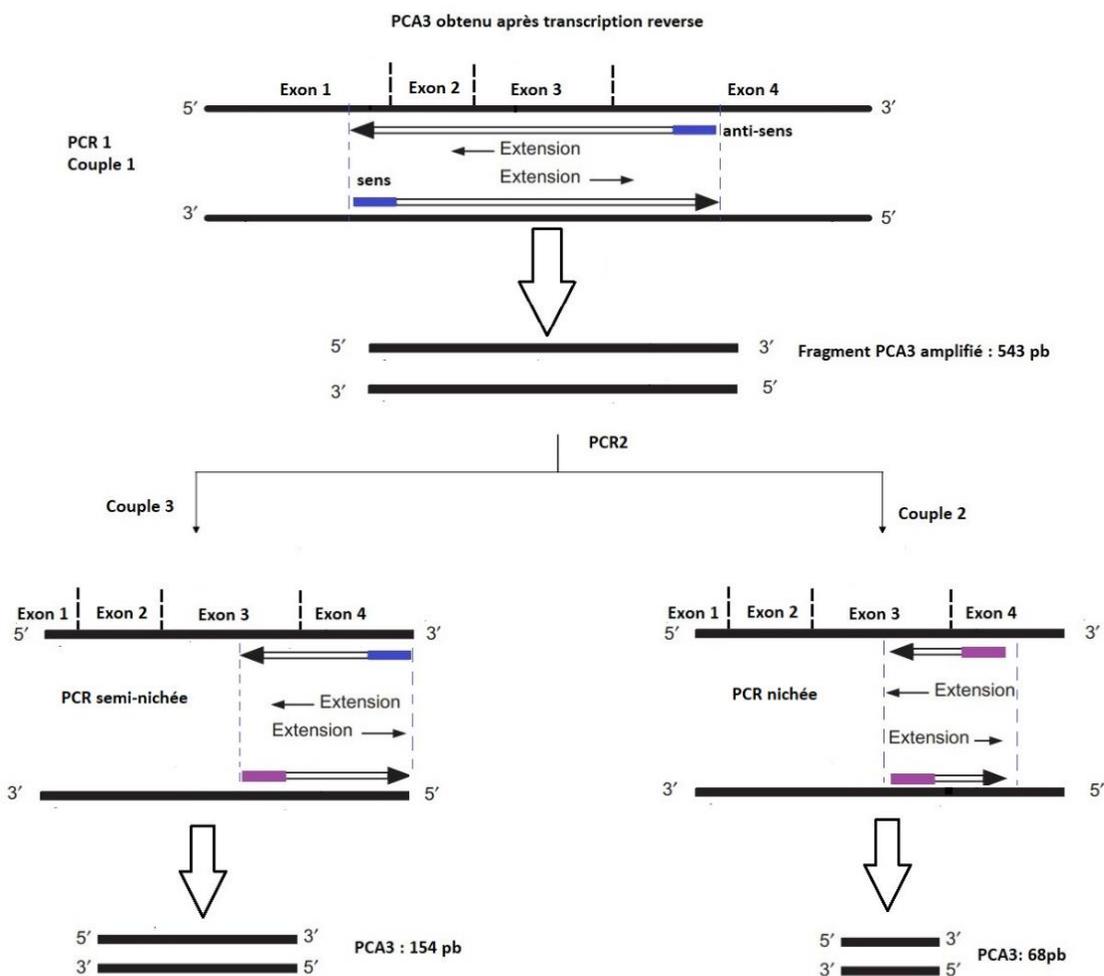


Figure 5.2 : Principe de l'amplification du PCA3 par la PCR nichée

Ainsi un volume de 1 μ L du produit de la première amplification, dilué au 1/10ème, a été ajouté à un volume final de 50 μ l de mélange réactionnel pour la deuxième amplification soit par le couple 2 ou le couple 3 pour tester le plus efficace. Un deuxième programme a été optimisé pour les deux PCR nichées (Tableau 5.1).

Tableau 5.1: Programme de la deuxième PCR pour l'amplification de fragments de PCA3

Etape	Durée et température
Etape 1 : Dénaturation initiale	5 minutes à 95°C
Etape 2 : Amplification	30 secondes à 95°C (dénaturation) 30 secondes à 60°C (hybridation) 45 secondes à 72°C (extension) } (35 cycles)
Etape 3 : Extension finale	5 minutes à 72°C

Afin de tester ces deux PCR nichées, nous avons choisi de travailler avec l'échantillon 3 obtenu à partir d'un échantillon urinaire prélevé d'un patient avec un CP confirmé par une biopsie de la prostate et un score de Gleason calculé à 9 ainsi qu'une métastase osseuse découverte lors d'un examen IRM et qui a donné une bande intense lors de l'amplification de B2M (figure 5.2). La figure 5.4 représente le profil électrophorétique de l'amplification de PCA3 à la fin des deux PCR nichées sur l'amplicon de l'échantillon n°3 obtenu par la première PCR.

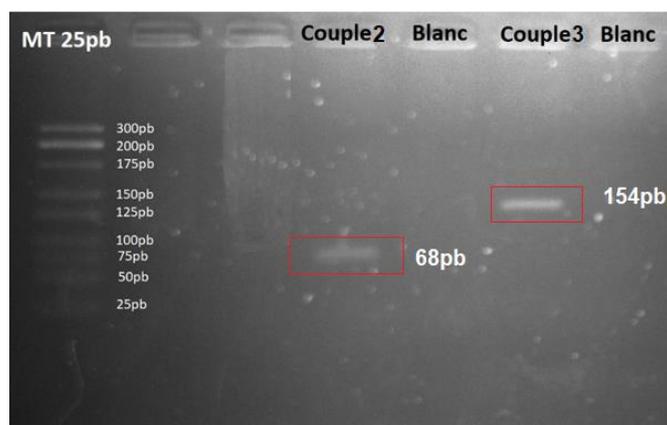


Figure 5.3 : Profil de migration électrophorétique des fragments amplifiés du PCA3 après les deux PCR nichées (fragments attendus : 68 pb par le couple 2 et 154pb par le couple 3)

La révélation par UV a permis de visualiser avec succès les deux fragments attendus (68 pb et 154 pb) par le couple 2 et le couple 3 d'amorces. Cependant l'intensité pour le couple 3 (PCR semi nichée donnant 154pb) était meilleure, c'est pourquoi nous l'avons choisi pour la suite de notre travail.

En appliquant la PCR1 suivie de la PCR semi-nichée utilisant le couple 3 d'autre échantillons d'ADNc, nous avons obtenu le profil électrophorétique représenté dans la figure 5.5.

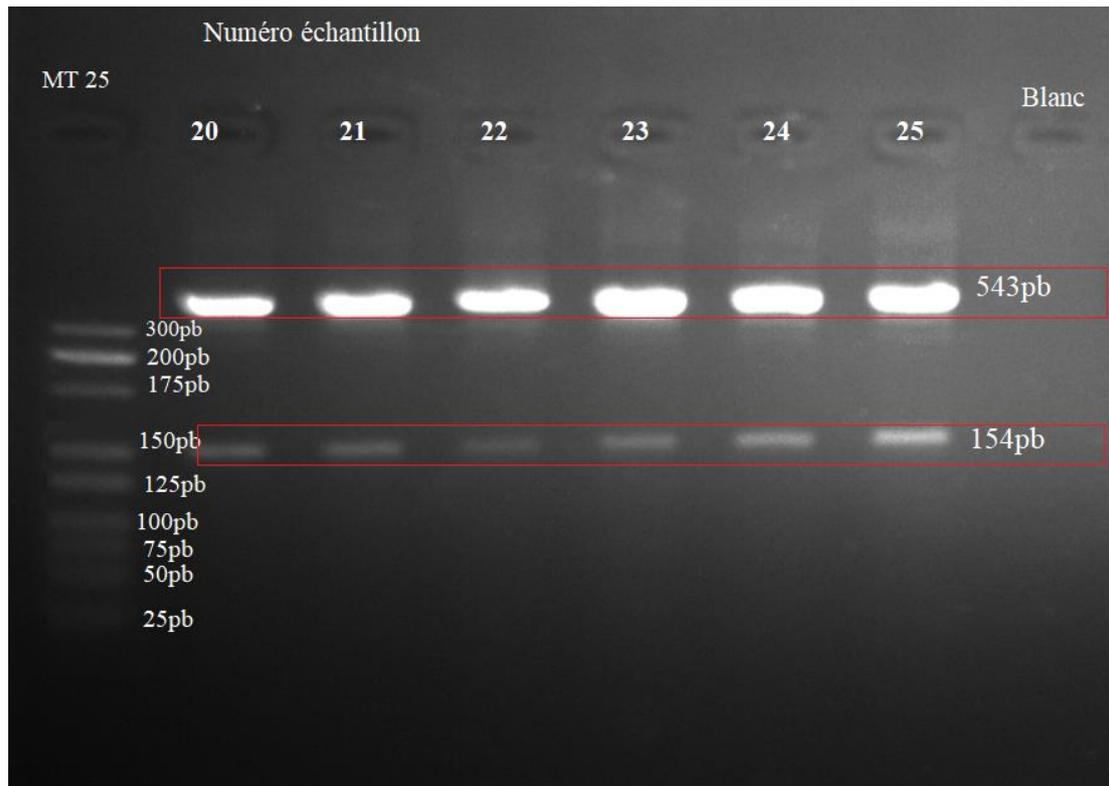


Figure 5.4: Révélation de produits d'amplification des fragments de PCA3 provenant de divers échantillons d'ADNc

Nous avons constaté qu'en plus du fragment de 154 pb attendu pour cette PCR semi nichée le fragment de 543pb est apparu dans tous les échantillons testés et avec une meilleure intensité que la bande 154 pb.

Ceci pourrait être expliqué par un excès d'amorces du couple 1 provenant du produit de la première amplification qui a permis une deuxième amplification du même fragment avec une intensité meilleure que la PCR semi-nichée. Nous avons donc décidé de faire deux réactions PCR successives avec le même couple 1 au lieu d'une PCR nichée ou semi-nichée (figure 5.6).



Figure 5.5 : Révélation de produits d'amplification des fragments de PCA3 par deux PCR successives en utilisant le même couple d'amorces (couple 1)

Enfin, ces fragments PCA3 de taille 543 pb ont été extraits à partir du gel d'électrophorèse (figure 5.7) par le kit et la concentration en ADN des différents échantillons a été déterminée par spectrophotométrie UV à 260 nm. Nous avons obtenu des concentrations d'ADNc de PCA3 amplifié de l'ordre de 1 μ g/mL.

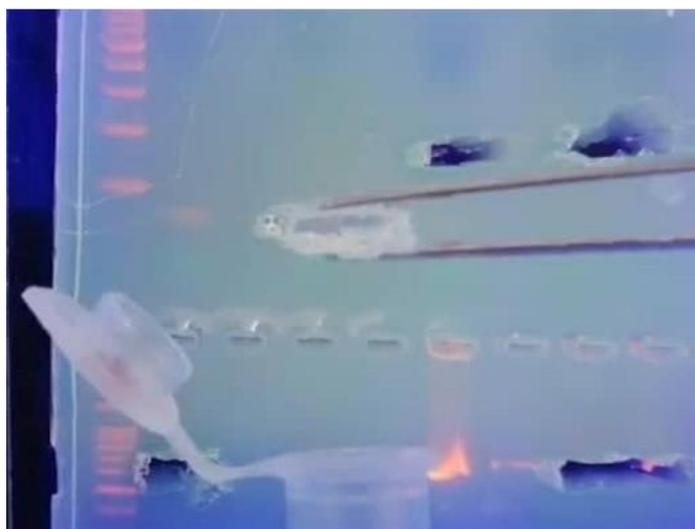


Figure 5.6 : Photo de l'extraction du fragment PCA3 à partir du gel d'électrophorèse

3. Optimisation des paramètres d'élaboration du génocapteur

3.1. Choix des sondes thiolées

La cible d'ADN « réel » utilisée dans cette partie est un fragment de 543 paires de bases (MM = 168,4 kD) qui couvrent les 4 exons du transcrit PCA3.

Nous avons fait le choix de travailler avec 2 sondes thiolées (sonde 1 et sonde 2) de 40 bases de taille, afin d'étudier les deux positions où l'hybridation aura lieu. Les détails des séquences sont présentés ci-après :

- Sonde 1 : H-S-(CH₂)₆-5' AGA TCT TCC TGG TCT CCC TCG GCT GCA GCC ACA CAA ATCT -3' : elle s'hybride à la cible et couvre les 40 premières bases.
- Sonde 2 : (H-S-(CH₂)₆-5'-GGG AAG GAC CTG ATG ATA CAG AGG AAT TAC AAC ACA TAT A 3') : elle s'hybride de la position 47 à la position 86 de la séquence PCA3 en question.

3.2. Méthode de greffage des sondes ADN thiolées sur l'or

Les sondes thiolées ont été tout d'abord diluées à une concentration de 20 µg/mL (1,6 µM) dans une solution de NaCl à 0,3 M.

La fonctionnalisation de la surface consiste à greffer les sondes thiolées sur la surface en or. Ce greffage est possible grâce à l'affinité naturelle entre l'or et le soufre. Nous avons déposé 10 µL d'une des deux sondes sur une électrode de façon à recouvrir entièrement la surface nettoyée au préalable et incubé à température ambiante pendant 1 h. L'opération est menée à l'identique pour l'autre sonde. Par la suite, les électrodes ont été rincées avec un tampon physiologique (tampon phosphate salin : PBS). L'ensemble de ces paramètres a été choisi en bénéficiant de l'expertise de notre équipe dans l'élaboration de biocapteurs à ADN [10-14].

3.3. Choix de la technique électrochimique de transduction

3.3.1. Etude de la réponse électrochimique de l'ADN thiolée

Généralement, la réponse électrochimique des ADN est enregistrée, en utilisant des couples redox tels que le complexe anionique hexacyanoferrate (III/II), [Fe(CN)₆]^{3-/4-}, (qui est repoussé de la surface modifiée par l'ADN) ou le complexe cationique [Ru(NH₃)₆]^{3+/2+} (qui est attiré par les hybrides chargés négativement) [15]. Ces indicateurs redox sont très fréquemment utilisés, à cause de l'idée répandue de l'absence d'électroactivité de l'ADN. Cette idée a été soutenue par des publications depuis 1957 rapportant les difficultés à obtenir un pic d'oxydation voltammétrique des résidus G de l'ADN sur les électrodes en or et par les problèmes rencontrés

avec les électrodes en carbone [16]. Par contre, les premières études oscillographiques sur les bases puriques et pyrimidiques menées par Palecek en 1958, ont montré la possibilité de l'oxydation de bases A et G et la réduction de A, C, et G, allant dans le sens d'une électroactivité de l'ADN [16]. Pour lever cette ambiguïté concernant l'électroactivité (ou pas) des brins d'ADN, nous avons cherché à relever leur réponse électrochimique dans une solution de NaCl (0,3 M) sans utiliser de sondes redox, contrairement à ce qui est couramment rapporté dans la littérature. La caractérisation par CV a été réalisée en appliquant un cycle de balayage de -0,6 V à 0,6 V à une vitesse de 100 mV/s. Quant à la SWV, les mesures sont faites en oxydation par balayage de -0,6 V à 0,8 V et en réduction en allant en sens inverse de 0,6 V à -0,6 V. Les différents voltammogrammes de cette étude électrochimique ont été regroupés dans la figure 5.8.

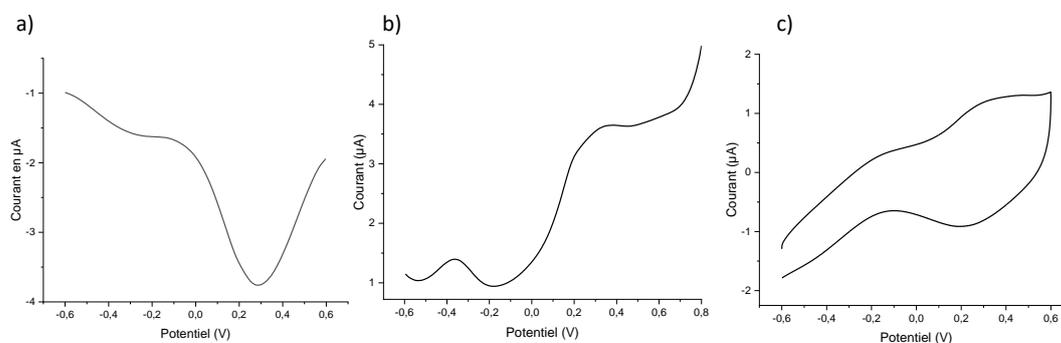


Figure 5.7 : Réponse électrochimique des sondes thiolées par (a) *voltammétrie à ondes carrées* en réduction, (b) *voltammétrie à ondes carrées* en oxydation (c) *voltammétrie cyclique*

Ces tracés confirment que les acides nucléiques présentent une réponse électrochimique bien identifiée avec un potentiel d'oxydation/réduction à 0,28 V/0,28 V en SWV et à 0,3 V/0,19 V en CV. Notons que les pics sont plus résolus dans le cas de la voltammétrie à onde carré, une particularité qui revient à sa sensibilité, comme décrit précédemment dans le premier chapitre.

3.3.2. Etude électrochimique de la détection de PCA3

Nous avons préparé une gamme étalon allant de 0,1 µg/mL à 10 µg/mL de PCA3 réel extrait des urines et converti en ADN selon le protocole détaillé dans la première partie de ce chapitre. La dilution est réalisée dans une solution d'hybridation : une solution aqueuse de 0,3 M de NaCl dans un tampon HEPES à 0,05 M ajusté à un pH7,2. Etant donné que cet ADN à étudier est sous la forme double brin, il doit être prétraité par chauffage à 95°C puis par refroidissement

rapide dans un bain de glace afin de le dénaturer en « simple brin » et faciliter son hybridation à la sonde.

La surface du transducteur, modifiée préalablement par la sonde thiolée a été incubée successivement par les différentes concentrations du PCA3, de la moins à la plus concentrée, en relevant la réponse électrochimique après chaque incubation (figure 5.9). Les voltammogrammes en CV et en SWV présentés sur la figure 5.9, montrent une diminution du signal en augmentant la concentration du PCA3. Cette variation pourrait être expliquée par le fait qu'une reconnaissance entre brin ADN sondes et cibles fait appel aux liaisons hydrogène ainsi qu'un enroulement en hélice qui change de façon conséquente la distribution des charges aux interfaces, variant ainsi leur densité et par conséquent la densité de courant mise en jeu [16, 17].

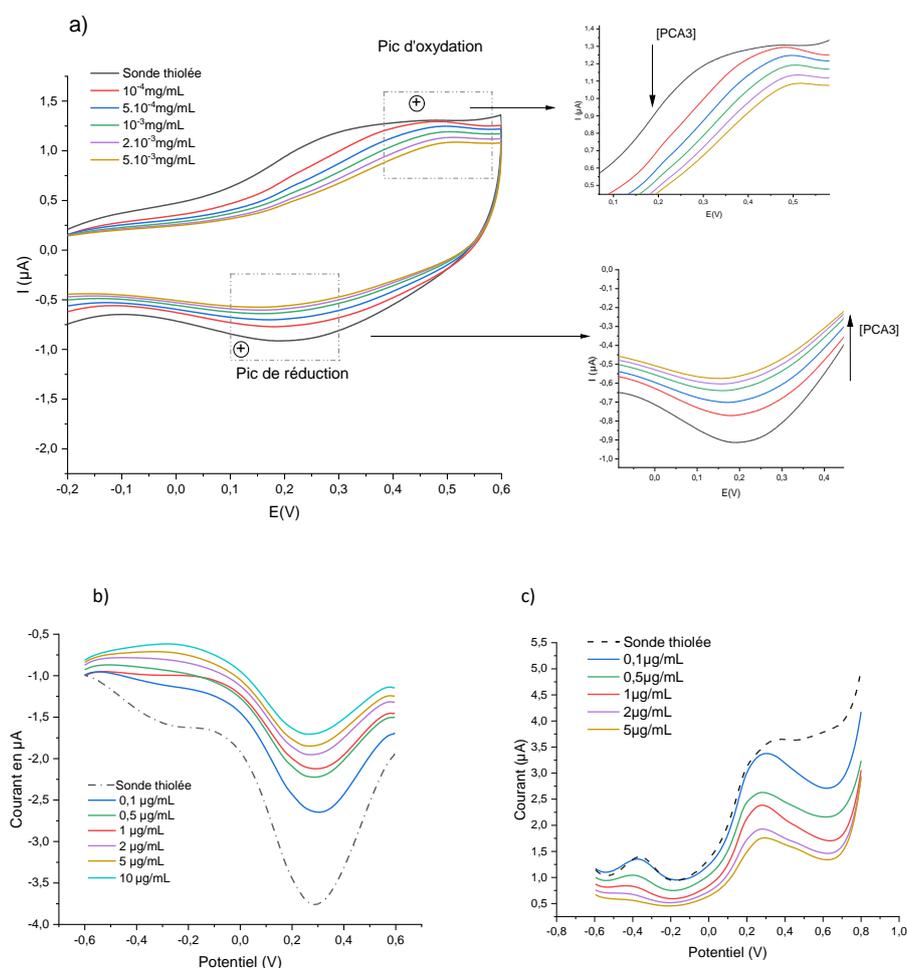


Figure 5.8 : Etude de l'hybridation des sondes par des concentrations cumulatives en PCA3 par : (a) voltammétrie cyclique (b) voltammétrie à ondes carrées en réduction (c) voltammétrie à ondes carrées en oxydation

Pour chaque mode de mesure, nous avons relevé l'intensité des pics (d'oxydation et de réduction) puis tracé les courbes du signal normalisé $(I_0 - I)/I_0$ en fonction de la concentration, regroupées dans la figure 5.10. I est l'intensité du pic d'oxydation (réduction) pour une concentration C donnée de PCA3 et I_0 l'intensité du pic correspondant de la sonde thiolée.

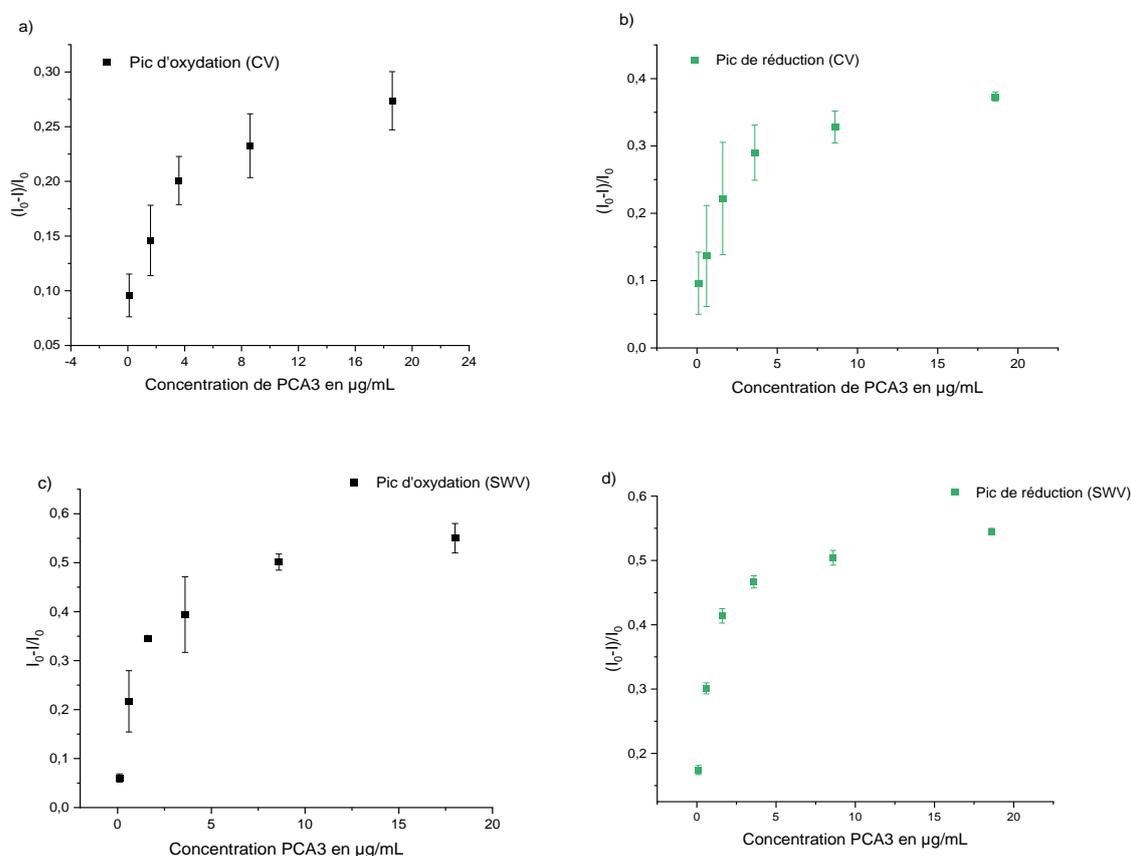


Figure 5.9: Courbes d'étalonnage signal en fonction de la concentration (a) par CV en oxydation, (b) par CV en réduction, (c) par SWV en oxydation et (d) par SWV en déduction

Sur la base de ces résultats, nous avons choisi pour le reste de ce travail la SWV en réduction comme mode de mesure, étant donné que c'est celui qui présente la meilleure sensibilité, associée à une faible dispersion des résultats, comme le montrent les faibles barres d'incertitudes (figure 5.10d).

4. Détection du PCA3 urinaire

4.1. Etude de l'effet de la nature de la sonde sur la détection par hybridation

Nous avons conçu deux capteurs qui diffèrent par la séquence de la sonde thiolée (sonde 1 et sonde 2) et nous avons testé l'hybridation du PCA3 par ces deux sondes avec une gamme de concentration de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ à 10 $\mu\text{g/mL}$.

Les courbes d'étalonnage signal normalisé $(I_0-I)/I_0$ en fonction de la concentration en PCA3 ont été tracées pour les deux sondes (figure 5.11).

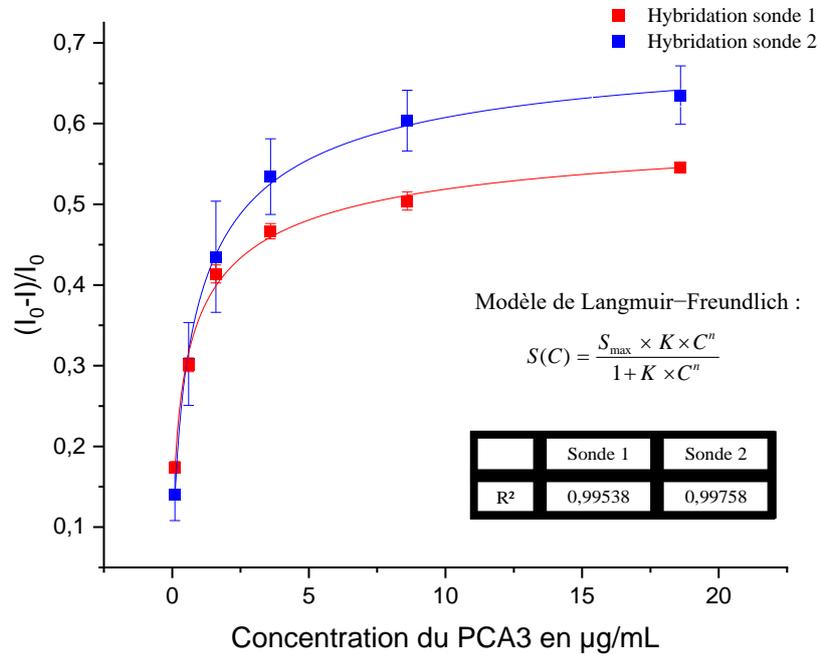


Figure 5.10 : Courbes d'étalonnage du génocapteur (rouge sonde 1, bleu sonde 2)

Ces deux courbes présentent une allure similaire, et se prêtent toutes les deux, par ailleurs, à l'ajustement avec le modèle mathématique de Langmuir–Freundlich représenté par l'équation 5.1. [18] :

$$S(C) = \frac{S_{\max} \times K \times C^n}{1 + K \times C^n} \quad \text{Équation 5.1}$$

Avec S le signal de sortie normalisé du capteur, S_{\max} le signal maximal correspondant à la saturation du capteur et hybridation complète de toutes les sondes greffées à la surface, K une constante et n indice d'hétérogénéité.

Ce choix a été fait sur la base de nombreuses études bibliographiques qui ont rapporté que ce modèle est adéquat à l'ajustement des courbes d'étalonnage de divers aptamères et les génocapteurs [2, 4, 19-21]. Il est valable pour une adsorption monocouche sur une surface contenant un nombre fini de sites identiques tels que les sondes d'ADN thiolées [18].

Comme le montre le tableau 5.2, la détection avec les deux sondes est comparable de point de vue affinité en tenant compte des incertitudes liées à la modélisation. La constante n est inférieure à 1 pour les deux sondes ce qui s'explique par le fait que celles-ci une fois greffées à la surface forment une couche assimilée à une surface hétérogène et cette hétérogénéité aurait comme origine les conformations différentes de l'ADN thiolé greffé dues à des interactions entre les sondes et/ou avec la surface de l'électrode [22, 23].

Tableau 5.2 : Performances analytiques des deux sondes étudiées

Sonde greffée	K ($\mu\text{g/mL}$) ⁻ⁿ / (nM) ⁻ⁿ	n	Sensibilité (mL/ μg)	Limite de détection ($\mu\text{g/mL}$)/(nM)
Sonde 1	(1,36± 0,2)/ (7,7±1,1)	0,57 ± 0,05	0,160 ± 0,008	0,1 / 0,59
Sonde 2	(1,13±0,12)/ (6,7± 0,7)	0,69 ± 0,04	0,22± 0,01	

A ce stade, nous pouvons revenir sur le modèle mathématique choisi pour voir la possibilité d'en proposer un autre équivalent, où figurerait la constante de dissociation, un paramètre plus facile à appréhender du fait que son unité est celle de la concentration, et plus facile également à interpréter en termes d'affinité sonde-cible. En divisant les numérateur et dénominateur du second membre de l'équation 1 par K , on obtient :

$$S(C) = \frac{S_{\max} \times C^n}{\frac{1}{K} + C^n} \quad \text{Équation 5.2}$$

En posant $K_d = \left(\frac{1}{K}\right)^{-n}$, l'équation 2 devient :

$$S(C) = \frac{S_{\max} \times C^n}{K_d^n + C^n} \quad \text{Équation 5.3}$$

On retrouve ainsi une expression s'apparentant au modèle de Hill, ce qui montre l'équivalence mathématique entre les deux modèles. La constante de dissociation K_d dans ce cas est trouvée de l'ordre de 0,57 $\mu\text{g/mL}$ pour la sonde 1 et son brin complémentaire, et de l'ordre de 0,83 $\mu\text{g/mL}$ pour la sonde 2 et son brin complémentaire. Même si ces valeurs sont trouvées

dans un même ordre de grandeur, la différence suggère une certaine dépendance de l'affinité de reconnaissance avec la position de la séquence sur le PCA3.

Pour nous situer par rapport à d'autres travaux, nous avons fait une étude bibliographique sur les génocapteurs conçus pour la détection de PCA3 urinaire au cours des 5 dernières années résumée dans le tableau 5.3.

Tableau 5.3 : Etude comparative des génocapteurs pour la détection du PCA3

Méthode conception du capteur	Transduction électrochimique	Amplification du signal de détection	K_d	LOD	Références
Sondes d'ADN thiolées greffées sur une électrode en or	SWV	Sans marquage Détection dans NaCl (0,3 M)	0,57 à 0,83 $\mu\text{g/mL}$ 3,84 à 4,9 nM	0,59 nM	notre travail
ADN biotinylé greffé sur une électrode en carbone fonctionnalisé par des couches de nanoparticules en or et de sulfate de chondroïtine	EIS	Sonde marquée par la biotine Utilisation d'un couple rédox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$	non déterminée	0,12 nM	[1]
ADN thiolé pour une double reconnaissance PSA et PCA3 greffé sur une électrode en or ;ajout du para-aminothiophénol pour bloquer l'adsorption non spécifique	EIS	Technique sandwich deux hybridations successives : 1. Sonde d'ADN thiolée greffée 2. Une deuxième sonde marquée par une enzyme (fluorescéine)	non déterminée	83 pM	[2]
Sonde d'ADN modifiée par un groupement NH2 greffée sur une électrode en or fonctionnalisée par des couches de chitosane et des nanotubes de carbone	CA	Couple rédox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$	non déterminée	4,4 pM	[3]
Aptamères en ARN thiolé greffé sur une électrode en or	CV et EIS	Marquage des sondes par ferrocène	40 nM	0,26 pM	[4]

4.2. Test de sélectivité

Ce test a pour objectif d'étudier la capacité du capteur à discriminer une complémentarité parfaite d'une non-complémentarité. Pour cela nous avons conçu deux séquences d'ADN artificiel non complémentaires (NC) :

- Séquence NC1 : 5'-GTA ATT CCT CTG TAT CAT CAG GTC CTT CCC-3' pour tester la sonde thiolée 1.
- Séquence NC2 : 5'-AGA TTT GTG TGG CTG CAG CCG AGG GAG ACC AGG AAG ATC T-3' pour tester la sonde thiolée 2.

Pour chaque sonde nous avons superposé la courbe de la détection du PCA3 avec celle de l'hybridation avec la séquence NC correspondante.

Comme illustré dans la figure 5.12, nous avons remarqué, aussi bien pour la sonde 1 que pour la sonde 2, que le signal diminue de la moitié environ lors de l'hybridation avec des séquences non complémentaires en le comparant à celui de l'hybridation avec la PCA3. Mais ce n'est pas ce seul paramètre qui permettra de discriminer de façon univoque les brins complémentaires de ceux présentant une non-complémentarité au niveau d'une ou plusieurs bases. Il est donc plus judicieux de modéliser l'ensemble des mesures présentées sur les deux graphiques de la figure 5.12, avec un même modèle.

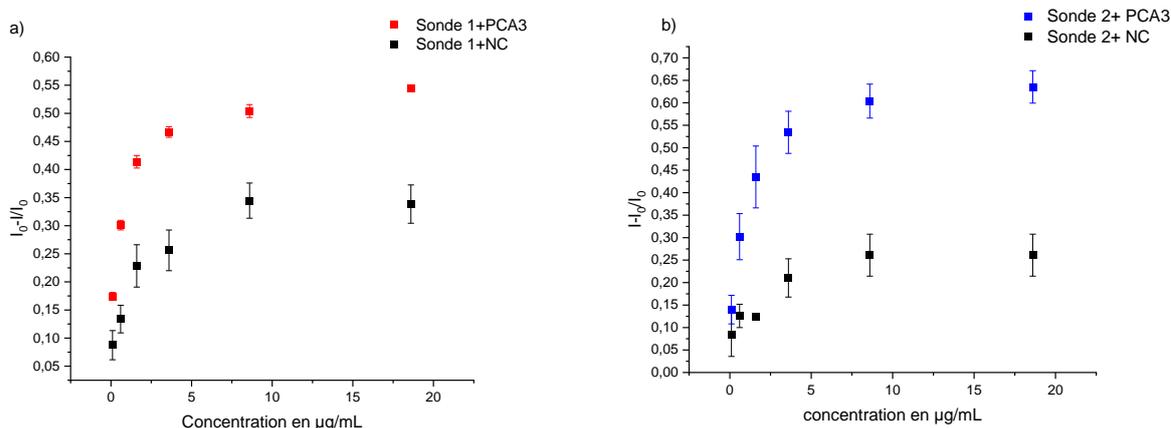


Figure 5.11 : Test de sélectivité avec des brins non-complémentaires (NC) (sonde 1 (a); sonde 2 (b))

Pour accéder à la constante de dissociation, nous avons opté pour le modèle de Hill. Si le modèle décrit parfaitement la reconnaissance entre les sondes et leurs cibles complémentaires (avec un coefficient de corrélation proche de 1), il approche moins bien les points expérimentaux dans le cas d'une non-complémentarité. Dans le cas de la sonde 2 par exemple, le calcul ne pouvait

converger qu'après avoir fixé l'exposant n . Ce choix était basé sur le fait que ce paramètre variait très peu selon la complémentarité ou non de la cible avec la sonde. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 5.4.

Tableau 5.4 : Paramètres de modélisation comparés pour les deux génocapteurs en cas de complémentarité totale ou partielle entre sondes et cibles

	Sonde 1		Sonde 2	
	Cible Complémentaire	Cible Non-complémentaire	Cible Complémentaire	Cible Non-complémentaire
V_{max}	0,62 ± 0,03	0,48 ± 0,16	0,72 ± 0,02	0,38 ± 0,12
K_d (µg/mL)	0,57 ± 0,12	23,6 ± 34,8	0,83 ± 0,13	46,0 ± 31,7
n	0,56 ± 0,07	0,56 ± 0,07	0,69 ± 0,05	0,67 ± ---
R²	0,9972	0,9660	0,9986	0,784

En examinant le tableau 5.4, nous remarquons dans le cas des deux capteurs que le paramètre qui est le plus sensible à la notion de complémentarité est bien la constante de dissociation, comme nous l'avons supposé en proposant le modèle de Hill. Ce paramètre diminue d'un facteur compris entre 41 et 54 lorsqu'on interchange les cibles complémentaires et non-complémentaires.

5. Conclusion

Nous avons présenté dans la première partie de ce chapitre le protocole d'extraction du PCA3 à partir des échantillons d'urine. L'ADN urinaire a été extrait pour être converti en ADNc par transcription reverse. Par la suite deux PCR successives ont été réalisées afin d'amplifier un fragment du PCA3 de taille 543pb. Ce fragment a été enfin extrait à partir du gel d'électrophorèse.

Un protocole simple et reproductible a été ensuite établi pour l'élaboration d'un génocapteur destiné à la quantification du PCA3 urinaire. L'avantage de ce protocole est la mise à profit de l'électroactivité de l'ADN, ce qui nous a épargné l'utilisation d'un couple rédox ou de méthodes de marquage moléculaire souvent onéreuses. La limite de détection de ce capteur était estimée 0,59 nM et la constante d'affinité des sondes thiolées envers la cible était entre 3,84 et 4,9 nM.

Si nous avons montré la faisabilité d'un capteur de PCA3, il n'en demeure pas moins que les efforts sont à poursuivre pour parvenir à l'utiliser de façon directe et sans passer par une phase intermédiaire.

Dans le but de l'utiliser pour des applications cliniques, des optimisations sont à envisager afin d'améliorer les performances analytiques de ce génocapteur. L'idéal aurait d'apporter des modifications pour avoir de la détection simultanée de l'ARN du PSA et PCA3 permettant de calculer le score PCA3 nécessaire pour la stratification du stade de CP.

Références

1. Soares JC, Soares AC, Rodrigues VC, Melendez ME, Santos AC, Faria EF, et al. Detection of the Prostate Cancer Biomarker PCA3 with Electrochemical and Impedance-Based Biosensors. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(50):46645-50.
2. Rodrigues VC, Soares JC, Soares AC, Braz DC, Melendez ME, Ribas LC, et al. Electrochemical and optical detection and machine learning applied to images of genosensors for diagnosis of prostate cancer with the biomarker PCA3. *Talanta*. 2021;222:121444.
3. Sánchez-Salcedo R, Miranda-Castro R, de-Los-Santos-Álvarez N, Lobo-Castañón MJ. Dual electrochemical genosensor for early diagnosis of prostate cancer through lncRNAs detection. *Biosens Bioelectron*. 2021;192:113520.
4. Nabok A, Abu-Ali H, Takita S, Smith DP. Electrochemical Detection of Prostate Cancer Biomarker PCA3 Using Specific RNA-Based Aptamer Labelled with Ferrocene. *Chemosensors*. 2021;9(4):59.
5. Hai X, Li Y, Zhu C, Song W, Cao J, Bi S. DNA-based label-free electrochemical biosensors: From principles to applications. *Trends Anal Chem*. 2020;133:116098.
6. Robinson CM, Neary R, Levendale A, Watson CJ, Baugh JA. Hypoxia-induced DNA hypermethylation in human pulmonary fibroblasts is associated with Thy-1 promoter methylation and the development of a pro-fibrotic phenotype. *Respir Res*. 2012;13(1):74.
7. Bussemakers MJ, Van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, et al. DD3: A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 1999;59(23):5975-9.
8. Green MR, Sambrook J. Nested polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc*. 2019;2019(2):pdb. prot095182.
9. Wang T, Qu X, Jiang J, Gao P, Zhao D, Lian X, et al. Diagnostic significance of urinary long non-coding PCA3 RNA in prostate cancer. *Oncotarget*. 2017;8(35):58577.
10. Mazouz Z, Fourati N, Zerrouki C, Ommezine A, Rebhi L, Yaakoubi N, et al. Discriminating DNA mismatches by electrochemical and gravimetric techniques. *Biosens Bioelectron*. 2013;48:293-8.
11. Mazouz Z, Fourati N, Lucas R, Othmane A, Kalfat R, Zerrouki R, et al. Biocapteurs SH-SAW. ADN et analogues, vers une discrimination de fragments courts et de mutations. *Instrum Mes Métrologie*. 2013;13(3-4):59-80.
12. Fourati N, Lazerges M, Vedrine C, Fournion JM, Zerrouki C, Rousseau L, et al. Surface acoustic waves sensor for DNA-biosensor development. *Sens Lett*. 2009;7(5):847-50.
13. Zerrouki C, Fourati N, Lucas R, Vergnaud J, Fournion JM, Zerrouki R, et al. Biological investigation using a shear horizontal surface acoustic wave sensor: Small “Click generated” DNA hybridization detection. *Biosens Bioelectron*. 2010;26(4):1759-62.
14. Zerrouki C, Fourati N, Lazerges M, Fournion JM, Vedrine C, Pernelle C. Shear horizontal surface acoustic waves sensor for label-free DNA detection. *Sens Lett*. 2010;8(6):813-7.

15. Labuda J, Brett AMO, Evtugyn G, Fojta M, Mascini M, Ozsoz M, et al. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem*. 2010;82(5):1161-87.
16. Palecek E, Scheller F, Wang J. *Electrochemistry of nucleic acids and proteins: towards electrochemical sensors for genomics and proteomics*. Elsevier; 2005.
17. Paleček E. Fifty years of nucleic acid electrochemistry. *Electroanal Int J Devoted Fundam Pract Asp Electroanal*. 2009;21(3-5):239-51.
18. Dada AO, Olalekan AP, Olatunya AM, Dada O. Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin–Radushkevich isotherms studies of equilibrium sorption of Zn²⁺ onto phosphoric acid modified rice husk. *IOSR J Appl Chem*. 2012;3(1):38-45.
19. Jeppu GP, Clement TP. A modified Langmuir-Freundlich isotherm model for simulating pH-dependent adsorption effects. *J Contam Hydrol*. 2012;129:46-53.
20. Elshafey R, Siaj M, Zourob M. DNA aptamers selection and characterization for development of label-free impedimetric aptasensor for neurotoxin anatoxin-a. *Biosens Bioelectron*. 2015;68:295-302.
21. Berto M, Diacci C, D’Agata R, Pinti M, Bianchini E, Lauro MD, et al. EGOFET peptide aptasensor for label-free detection of inflammatory cytokines in complex fluids. *Adv Biosyst*. 2018;2(2):1700072.
22. Figueroa-Miranda G, Liang Y, Suranglikar M, Stadler M, Samane N, Tintelott M, et al. Delineating charge and capacitance transduction in system-integrated graphene-based BioFETs used as aptasensors for malaria detection. *Biosens Bioelectron*. 2022;208:114219.
23. Caglayan MO, Üstündağ Z. Spectrophotometric ellipsometry based Tat-protein RNA-aptasensor for HIV-1 diagnosis. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2020;227:117748.

Conclusion Générale et Perspectives

Conclusion Générale et Perspectives

L'objectif de ces travaux de recherche était de développer trois biocapteurs électrochimiques dédiés à la détection de trois biomarqueurs du cancer de la prostate : l'antigène spécifique de la prostate (PSA), l'Engrailed 2 (EN2) et le prostate cancer antigen (PCA3). Le choix de la technique de fonctionnalisation de chaque capteur a été adapté selon le biomarqueur à détecter.

La première partie de ces travaux a été consacrée à la réalisation d'un biocapteur fonctionnalisé avec des polymères à empreintes moléculaires (MIPs) pour la détection sélective du PSA. Plusieurs paramètres ont été optimisés afin de garantir la reproductibilité et la fiabilité des polymères imprimés : le choix du monomère fonctionnel, l'épaisseur du film, le sel de fond, la technique de polymérisation ainsi que la nature du solvant extracteur. Le capteur réalisé présentait une faible limite de détection de l'ordre de $3 \cdot 10^{-8}$ ng/mL, une valeur de sensibilité de $(8.19 \pm 0.30) \mu\text{A}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, et une constante de dissociation K_d égale à $(1.02 \pm 0.54) \times 10^{-14}$ M, inférieure à celles obtenues dans la littérature concernant la détection de la protéine PSA. Au-delà de ces performances, des tests réalisés à l'aveugle dans le sérum humain d'une quarantaine de patients, ont permis de mettre en évidence la parfaite concordance entre les valeurs fournies par le biocapteur électrochimique que nous avons développé, et celles issues la méthode ELISA.

La deuxième partie est menée dans l'objectif de développer un immunocapteur électrochimique pour la détection sélective de l'EN2 dans du PBS et des urines artificielles. A notre connaissance, c'est le premier immunocapteur dédié à la détection de ce biomarqueur du cancer de la prostate. L'ensemble des résultats électrochimiques ont montré que l'immunocapteur conçu présentait les meilleures performances métrologiques par rapport à d'autres travaux portant sur la conception de biocapteurs pour la détection de EN2: i) une très faible limite de détection de l'ordre de 10^{-5} ng/mL (0,32 fM) ainsi que ii) une valeur de constante de dissociation, de l'ordre de $(3,15 \pm 0,70) \times 10^{-11}$ mg/mL, soit $(0,9 \pm 0,2)$ fM, largement inférieure (plusieurs ordres de grandeur) à celles rapportées dans la littérature, signe de la très grande affinité anti-EN2/EN2 et de l'intérêt des immunocapteurs comparés aux autres modes de reconnaissance.

Des tests de sélectivité et de compétitivité ont été réalisés et ont mis en évidence la capacité de cet immunocapteur conçu à détecter l'EN2 et à la différencier des autres protéines interférentes, même lorsqu'elles sont présentes à de très fortes concentrations. Nous avons également démontré que les performances du capteur évaluées dans un milieu simple (tampon PBS), n'étaient absolument pas affecté par la nature du milieu, même aussi complexe que les urines

artificielles. Cela démontre la robustesse de l'immuncapteur conçu, que nous envisageons d'utiliser prochainement pour détecter et quantifier EN2 dans les urines réelles de patients.

Dans la dernière partie de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à l'élaboration d'un génocapteur destiné à la quantification du PCA3 urinaire. Plusieurs étapes nécessaires ont été tout d'abord réalisées pour l'extraction du PCA3 à partir des échantillons d'urine : la séparation du sédiment urinaire par centrifugation, l'extraction de l'ARN total, la transcription réverse en ADN, l'amplification du fragment de PCA3 par une réaction PCR et l'extraction du fragment amplifié à partir du gel d'électrophorèse.

Une fois l'extraction de PCA3 assurée, deux sondes d'ADN thiolées, qui s'hybrident au PCA3 dans deux positions différentes, ont été envisagées pour la réalisation du génocapteur. Les résultats obtenus ont montré que le choix de la sonde, et plus particulièrement la position de la séquence retenue dans la chaîne totale, influence la réponse du capteur. Si ces résultats sont suffisamment intéressants pour nous encourager à persévérer dans cette voie, il reste toutefois encore du travail à accomplir afin d'améliorer les performances du capteur, notamment en termes de limite de détection.

A l'issue de nos travaux et sur la base de l'ensemble des résultats obtenus, deux perspectives se dessinent assez naturellement

- La première concerne le développement d'une plateforme pour la détection simultanée, rapide et fiable de plusieurs marqueurs urinaires du cancer de la prostate dont l'EN2, le PCA3 et le PSA. Des tests en milieu réel permettraient de statuer sur la pertinence du choix de ces biomarqueurs et de la possibilité d'envisager l'utilisation d'une telle plateforme pour une application clinique.

- La seconde se rapporte à l'exploration de nouveaux biomarqueurs : ADN et ARN circulants (biopsies liquides) qui pourront contribuer à la détection précoce de la maladie et la prédiction de profil d'agressivité et de résistance de la tumeur pour une meilleure prise en charge.

