



HAL
open science

Optimisation d'aptacapteurs impédancemétriques pour la détection de l'arginine vasopressine : l'enjeu des techniques d'immobilisation

Essohanam Beke

► **To cite this version:**

Essohanam Beke. Optimisation d'aptacapteurs impédancemétriques pour la détection de l'arginine vasopressine : l'enjeu des techniques d'immobilisation. Autre. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALV108 . tel-04625726

HAL Id: tel-04625726

<https://theses.hal.science/tel-04625726>

Submitted on 26 Jun 2024

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Chimie Physique Moléculaire et Structurale

Unité de recherche : Département de Chimie Moléculaire

Optimisation d'aptacapteurs impédancemétriques pour la détection de l'arginine vasopressine : l'enjeu des techniques d'immobilisation.

Optimization of impedimetric aptasensors for arginine vasopressin detection: the challenge of immobilization techniques.

Présentée par :

Essohanam BEKE

Direction de thèse :

Michael HOLZINGER

Directeur de recherche CNRS, Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

Corinne RAVELET

Professeure des Universités, Université Grenoble Alpes

Co-directrice de thèse

Chantal GONDRAN

Professeure des Universités, Université Grenoble Alpes

Co-encadrante de thèse

Rapporteurs :

Murielle ROCHELET

Professeure des Universités, Université Bourgogne Franche-Comté

Thierry NOGUER

Professeur des Universités, Université de Perpignan Via Domitia

Thèse soutenue publiquement le 18 décembre 2023, devant le jury composé de :

Michael HOLZINGER

Directeur de recherche CNRS, Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

Corinne RAVELET

Professeure des Universités, Université Grenoble Alpes

Co-directrice de thèse

Laurent DESSEMOND

Professeur des Universités, Université Grenoble Alpes

Président

Carole BAFFERT

Maitre de conférences, Aix-Marseille Université

Examinatrice

Murielle ROCHELET

Professeure des Universités, Université Bourgogne Franche-Comté

Rapporteuse

Thierry NOGUER

Professeur des Universités, Université de Perpignan Via Domitia

Rapporteur

Invités :

Chantal GONDRAN

Professeure des Universités, Université Grenoble Alpes

Eric PEYRIN

Professeur des Universités, Université Grenoble Alpes



Remerciements

Je tiens dans un premier à exprimer ma profonde gratitude envers les membres du jury qui ont consacré leur temps et leur expertise pour évaluer ma thèse. Leurs commentaires éclairés et leurs questions stimulantes auront contribué à enrichir mon travail de recherche et à élever mon niveau d'exigence. Je commencerai par Laurent Dessemond qui, avant même d'accepter de présider ce jury, m'a prodigué de précieux conseils aussi bien pendant les comités de suivi de thèse que les discussions autour des chromatographes de l'IUT lors des séances de Travaux Pratiques que j'ai pu y donner. Je remercie également mes deux rapporteurs Murielle Rochelet et Thierry Noguer, pour avoir accepté de relire mon travail afin d'y apporter de précieuses corrections mais aussi de soulever de pertinentes questions qui ne feront qu'étoffer mes connaissances scientifiques. Enfin je remercie Carole Baffert dont le rôle d'examinatrice dans ce jury ne fait qu'enrichir les discussions autour de mon sujet de thèse.

Si ces travaux ont été possibles, c'est grâce à une super équipe d'encadrants. Je commencerai par mon Directeur de thèse **Michael Holzinger**. Ce que j'aimais beaucoup dans nos discussions c'est qu'on arrivait à swicther de l'électrochimie au bricolage avec une facilité déconcertante. Si je voyais déjà la science de la même manière que toi, à chaque nouvelle discussion j'étais encore plus heureux que tu diriges cette thèse. Merci encore de m'avoir fait confiance pour ce projet de thèse.

Merci à ma co-directrice de thèse, **Corinne Ravelet**. C'est vrai que j'ai finalement passé très peu de temps au DPM mais mes visites impromptues dans ton bureau ont contribué à corriger à plusieurs reprises le cheminement de cette thèse. Merci à toi aussi de m'avoir fait confiance, depuis le début de mon aventure avec les aptamères. Je ne sais pas si Luc voudra finalement se lancer dans des projets d'électrochimie mais on lui dira que ça marche plutôt bien avec les aptamères...Tu craignais que je n'aime pas trop l'électrochimie mais finalement je pense que j'ai trouvé ma voie grâce à toi.

Etant une actrice principale de ces travaux, je remercie également **Chantal Gondran**. Je dois t'avouer que les premiers jours tu m'intimidais énormément et j'ai fini par comprendre pourquoi : ton expérience en électrochimie est tout simplement monstrueuse. J'ai énormément appris à tes côtés et je pense continuer encore à apprendre de toi, même de loin. Merci pour tes conseils, tes explications limpides, ton investissement, ta patience mais aussi ton exigence

pendant mon encadrement. Tu peux souffler maintenant, je ne te ferai plus travailler les week-ends...

Enfin dans cette super équipe d'encadrants je tiens à remercier *Eric Peyrin* qui avait toujours les mots pour positiver les choses. La chimie analytique est très amusante quand on travaille avec toi. J'attends toujours l'occasion de prendre ma revanche au football, rétablis-toi vite !

Ces travaux ont été aussi possibles grâce à la super équipe BEA. Je pense que j'ai tout simplement eu la chance de tomber sur la meilleure équipe de scientifiques, tant pour les compétences que pour l'atmosphère de travail. Je remercie Arielle, qui parcourrait le laboratoire pour trouver une aiguille. Ta disponibilité particulière et ta patience m'ont vraiment marqué. Merci à Yannig, qui était également toujours disponible pour tous les soucis techniques, que ce soit pour l'électrochimie ou pour un barbecue. Merci à Karine, Alan et Fabien pour leur gentillesse et leur disponibilité. Merci également à Serge qui a accepté que je partage son bureau à la seule et unique condition d'arroser ses plantes...des bananes ont finalement poussé même si ce n'est pas grâce à moi.

L'équipe, ce sont aussi des personnes avec qui j'ai fini par tisser des liens bien plus que professionnels. Je commencerai par Déborah, qui depuis mon premier jour dans le laboratoire s'est assurée que je m'intègre parfaitement. Merci pour tes explications, scientifiques ou moins...Ton départ a laissé un grand vide dans l'équipe mais heureusement qu'on nos liens vont au-delà. Il en est de même pour Anastasiia, qui prenait des nouvelles de moi chaque semaine et me permettait même de partager son dîner parfois. Merci de m'avoir soutenu jusqu'au bout. Un grand merci à Paulo, qui est devenu comme un frère ; les aventures avec toi sont légendaires et il en reste encore beaucoup à partager « mon garçon » ... Merci à Bastien pour les fous rires dans le bureau, merci à Léonard et Chab pour leur oreille attentive ; merci à Maria et Monica pour la tonne de chocolat et de thé qu'elles m'ont fait déguster histoire de me maintenir en forme pendant les périodes compliquées. Merci aux anciens de l'équipe : Anurag pour ta grande gentillesse et tes conseils, Marie les super moments d'échanges professionnels comme personnels (je te dois beaucoup de tasses de café, c'est pour très bientôt...).

Enfin merci à ma famille, au sens large du terme. J'y inclus bien sûr mes parents qui n'ont pas arrêté de se sacrifier pour que je puisse avancer comme il se doit. Merci pour vos prières,

j'espère continuer à vous rendre encore plus fiers. Merci à mes grandes sœurs Abidé et Leleng qui n'ont pas cessé de me mater pendant toute cette période et continuent de le faire jusqu'aujourd'hui. Merci à mon frère, David qui m'encourage en me prenant comme modèle.

Merci à la famille que je me suis moi-même constituée, mes cousins » comme j'aime les appeler. Poetesse, aucun mot ne serait assez fort pour t'exprimer ma gratitude. Je pense que toi et moi sommes partis pour l'aventure de toute une vie ; une amie, une sœur et parfois une mère, tu as joué et continue de jouer tous ces rôles. Merci au « Boss », Timothée, avec qui je partage l'amour pour la science depuis les bancs du collège et qui est devenu un frère. « Je suis dans quoi... ? », si ce n'est l'une des plus belles fraternités qui puisse exister. Merci à la cousine Chaty qui me prêtait oreille attentive à l'aube comme de nuit, tu as été d'un soutien infaillible. Merci à Rebecca pour ses conseils « crus » mais vrais, merci d'avoir su être à la fois franche et compréhensible avec moi ; merci à Wilfried pour ses encouragements ; je n'aurai pas de prix Nobel comme tu le souhaiterais mais je me débrouille comme je peux. Merci à Médard, présent de jour comme de nuit pour de précieux conseils et qui n'hésite pas à mettre les mains à la pâte quand j'ai besoin d'aide. Merci à Alexandre avec qui j'ai partagé les joies et les douleurs du doctorat, qui de mieux pour comprendre tout ç a qu'un coloc doctorant ; merci « tang » !

« La vie n'est peut-être pas la fête que tu imaginais mais maintenant que tu y es tu dois danser... »

Table des matières

Table des matières

Table des matières	7
Liste des abréviations	13
Introduction générale	1
Chapitre I: Etat de l'art	7
I. Intérêt médical de l'arginine vasopressine	7
II. Les techniques de dosage conventionnelles pour l'arginine vasopressine	9
1. Les essais biologiques	9
2. L'immunodosage	10
2.1. L'immunodosage enzymatique	11
2.2. Le dosage radio-immunologique	12
3. Les méthodes chromatographiques.....	15
4. Les biocapteurs	18
4.1. Les outils de reconnaissance moléculaire.....	19
4.2. Les techniques d'immobilisation des éléments de biorecognition.....	31
4.3. Les méthodes de transduction.....	33
III. Les aptamères comme éléments de reconnaissance moléculaire pour la détection de l'arginine vasopressine: état de l'art	49
IV. Objectifs de la thèse.....	53
Chapitre II : Biocapteurs impédancemétriques à base de polymères électrogénérés	57
I. Les polymères conducteurs en électrochimie : exemple du polypyrrole	57
II. Elaboration d'un biocapteur à base de polypyrrole NHS pour la détection de l'AVP ..	59
1. Préparation des électrodes.....	60
1.1. Choix de la technique d'électropolymérisation	60
1.1.1. Caractérisation du monomère	60
1.1.2. Electropolymérisation par voltampérométrie cyclique.....	61
1.1.3. Electropolymérisation par chronoampérométrie	62

1.2.	Greffage de l'aptamère anti-AVP	64
1.3.	Caractérisation des différentes étapes de fonctionnalisation	66
2.	Caractérisation de la reconnaissance aptamère-vasopressine par titrage calorimétrique isotherme (ITC).....	68
3.	Performances analytiques.....	71
III.	Elaboration d'un biocapteur à base de polypyrrole adamantane pour la détection de l'AVP	74
1.	Préparation des électrodes.....	74
1.1.	Caractérisation du monomère	74
1.2.	Polymérisation par voltampérométrie cyclique	75
1.3.	Polymérisation par chronoampérométrie.....	76
1.4.	Greffage de l'aptamère	77
1.5.	Caractérisation des différentes étapes de fonctionnalisation	79
2.	Performances analytiques du biocapteur.....	81
IV.	Elaboration de biocapteurs à base de polypyrrole NTA	84
1.	Préparation des électrodes.....	84
1.1.	Etude du monomère en solution.....	84
1.2.	Greffage de l'aptamère basé sur l'interaction NTA/Cu ²⁺ /biotine	87
2.	Performances du biocapteur	93
	Conclusion.....	114
	Chapitre III : Biocapteurs impédancemétriques à base d'une monocouche autoassemblée sur électrodes d'or.	119
I.	Principe de l'immobilisation de l'aptamère	119
II.	Biocapteur à base d'électrodes d'or pour la détection de l'adénosine.....	123
1.	Préparation des électrodes.....	123
1.1.	Nettoyage des électrodes d'or.....	123
1.2.	Dépôt de l'aptamère	123

2. Performances analytiques.....	127
III. Biocapteur à base d'électrodes d'or pour la détection de l'AVP	131
1. Biocapteur à base d'électrodes d'or polycristallin.....	131
1.1. Fonctionnalisation des électrodes par co-immobilisation aptamère-MCH	131
1.2. Fonctionnalisation des électrodes par « backfilling » avec le MCH.....	137
2. Biocapteur à base de monocouches autoassemblées sur des électrodes d'or SPE (Screen Printed Electrodes)	141
2.1. Préparation des électrodes	142
2.2. Performances analytiques dans le tampon phosphate	145
2.3. Performances analytiques dans les urines	149
2.4. Optimisation de la réponse du biocapteur	153
Conclusion	164
Conclusion générale	169
Références bibliographiques	175
Experimental Part	201
I. Electrogenerated polymers based aptasensors.....	201
1. Materials.....	201
2. Electrochemical measurements	201
3. Preparation of the sensor electrodes	202
3.1. Polypyrrole NHS based sensor	202
3.2. Polypyrrole adamantane based sensor.....	202
3.3. Polypyrrole NTA based sensors.....	203
4. Target detection	204
II. Impedimetric biosensors based on a self-assembled monolayer on gold electrodes...204	
1. Materials.....	204
2. Electrochemical measurements	204
3. Preparation of the sensor electrodes	204

4. Preparation of the sensor electrodes	205
Résumé	208

Liste des abbréviations

ADH	Hormone antidiurétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Adénosine-monophosphate
AP	Phosphatase alcaline
APTES	(3-Aminopropyl)triéthoxysilane
ARN	Acide ribonucléique
ARNA	Acides nucléiques : Régulations naturelles et artificielles
AVP	Arginine vasopressine
BES	Sodium 2-[bis(2- hydroxyéthyl)amino]éthane sulfonate
BSA	Bovine serum albumine
CCM	Chromatographie sur couche mince
CD	Cyclodextrine
CEDIA	Cloned enzyme donor immunoassay
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CLIA	Chemiluminescence immunoassay
CNLS	Complex nonlinear least squares
CPE	Constant Phase Element
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CV	Cyclovoltammogramme
CV	Cyclic Voltammetry
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Département de Chimie Moléculaire
DNA	Desoxyribonucleic acid
DPM	Département de pharmacochimie moléculaire
DPV	Differential pulse voltammetry
DSP	Dithiobis (succinimidyl propionate)
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDL	Electrical double layer

EIA	Enzymatic immunoassay
EIS	Electrochemical impedance spectroscopy
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMIT	Enzyme-multiplied immunoassay technique
EMMIA	Enzyme modulator mediated immunoassay
ESI	Electrochemical Spectroscopy Impedance
FET	Field effect transistor
FIA	Fluorescence immunoassay
FSH	Follicle-Stimulating hormone
GCE	Glassy carbon electrode
GEIS	Galvanostatic electrochemical impedance spectroscopy
GH	Growth hormone
GOx	Glucose oxydase
HAAA	Human anti-animal antibodies
HPLC	High-performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
ISE	Ion selective electrode
ITC	Isothermal titration calorimetry
ITO	Indium tin oxide
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KOH	Hydroxyde de potassium
LED	Light Emitting Diode
LC	Liquid chromatography
LH	Luteizing hormone
LOD	Limit of detection
LSV	Linear sweep voltammetry
MB	Methylene Blue
MCH	Mercapto-1-hexanol
MES	Magnetoelastic sensor

MIP	Molecular imprinted polymer
MPA	Mercaptopropionic acid
MS	Mass pectroscopy
NHS	N-hrdoxysuccinimide
NTA	Nitrilotracétique
NOVA	Nouveaux outils de vectorisation et d'analyse
OCP	Open Circuit Potential
OHP	Outer Helmholtz plane
OLED	Organic light-emitting diode
OT	Ocytocine
PCR	Polymerase chain reaction
PDDA	Poly (diallyldimethylammonium chloride)
PEG	Polyéthylène Glycol
PEIS	Potentiostatic electrochemical impedance spectroscopy
PHE	Plan de Helmholtz externe
PHI	Plan de Helmholtz interne
PSS	Polystyrene sulfonate
QCM	Quartz crystal microbalance
RE	Reference electrode
RIA	Radioimmunoassay
SAM	Self assembled monolayer
SAV	Surface acoustic wave
SCE	Saturated calomel electrode
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment
SERS	Surface Enhanced Raman Scattering
SPE	Screen printed electrode
SFC	Supercritical fluid chromatography
SHE	Standard hydrogen electrode
SWV	Square wave voltammetry

TSH Thyroid Stimulating Hormone
UPLC Ultra Performance Liquid Chromatography
WE Working electrode

Introduction générale

Introduction

Bien plus qu'un outil, le diagnostic médical constitue indéniablement le socle de la médecine car il joue un rôle essentiel à plusieurs niveaux. Il fournit aux professionnels de la santé une base solide pour recommander des traitements appropriés à une époque où l'accent est de plus en plus porté sur la médecine personnalisée et la surveillance continue des patients. A cet effet, les diagnostics rapides sont devenus le pilier de la pratique médicale moderne car un diagnostic médical précoce est un atout majeur pour améliorer la qualité de vie des patients, réduire la morbidité et la mortalité, et optimiser l'utilisation des ressources médicales de sorte à construire un système de santé performant.

Dans ce contexte, au cours des dernières décennies, la recherche en biotechnologie a connu une transformation profonde, ouvrant de nouvelles perspectives pour la détection et la quantification de molécules d'intérêt biologique. Parmi ces avancées, les biocapteurs électrochimiques ont émergé comme une technologie prometteuse qui marie les principes de la biologie et de l'électrochimie pour la détection spécifique et sensible de composés biomédicaux.

Les biocapteurs électrochimiques présentent une série d'avantages considérables. Tout d'abord, ils offrent une sensibilité élevée, permettant la détection de concentrations infimes de substances cibles, ce qui est particulièrement précieux dans le diagnostic précoce de maladies. De plus, ils sont connus pour leur spécificité élevée, la rapidité de leur réponse, leur compacité, leur portabilité et leur faible coût, facilitant leur utilisation dans des environnements variés. Enfin, les biocapteurs électrochimiques peuvent être adaptés pour détecter une large gamme de molécules, allant des pathogènes aux biomarqueurs, offrant ainsi une polyvalence significative pour de nombreuses applications, de la surveillance des patients au contrôle de la qualité alimentaire.

Un biocapteur électrochimique repose sur l'immobilisation de composants biologiques (enzymes, anticorps, aptamères) ou chimiques (polymères à empreinte moléculaire) à la surface d'une électrode et qui sont capables d'interagir de manière spécifique avec des molécules d'intérêt. Cette reconnaissance spécifique entre les molécules peut être détectée grâce à des réactions électrochimiques qui génèrent des signaux électriques. La diversité des composants biologiques immobilisés et celle des techniques de transduction électrochimique offrent une multitude de possibilités pour la conception de ces biocapteurs.

Il va sans dire néanmoins que tout choix d'assemblage du biocapteur est dicté par la nature de la cible et que, pour chaque cible, l'obtention des meilleures performances repose principalement sur l'étape de reconnaissance moléculaire.

Ainsi, le dosage des petites molécules (à l'exception des petites molécules à activité enzymatique) présente un défi complexe en raison de plusieurs facteurs. Tout d'abord, la faible taille de ces composés les rend difficiles à détecter et à quantifier avec précision, d'autant plus lorsque les concentrations sont extrêmement faibles. De plus, les petites molécules ont souvent des structures chimiques simples, ce qui signifie qu'elles partagent des caractéristiques communes avec d'autres composés, ce qui peut entraîner des résultats de dosage peu spécifiques. Dans ces circonstances, du fait de leur petite taille, leur grande affinité et leur grande spécificité, les aptamères sont de plus en plus utilisés comme outil de reconnaissance moléculaire à la place d'autres outils tels que les anticorps.

Les aptamères sont des séquences d'ADN ou d'ARN monobrin capables de reconnaître de manière spécifique une molécule. Etant facilement modifiables avec des fonctions chimiques, les aptamères offrent une panoplie de possibilités pour leur immobilisation à la surface des électrodes. Les nouveaux biocapteurs ainsi assemblés sont appelés « aptacapteurs ».

Les travaux de cette thèse se consacrent à l'exploration de différentes techniques d'ancrage des aptamères à la surface d'électrodes, en vue du développement d'un aptacapteur électrochimique dédié à la détection d'une petite molécule, l'arginine vasopressine, qui est une hormone essentielle dans la régulation de l'homéostasie corporelle et dans la compréhension des mécanismes neuroendocriniens.

Le premier chapitre de ce mémoire présente l'état de l'art sur les techniques de dosage de l'arginine vasopressine et leurs performances avec un intérêt particulier pour les techniques utilisant les aptamères.

Le deuxième chapitre est consacré à l'élaboration d'aptacapteurs électrochimiques pour la détection de l'arginine vasopressine par immobilisation de l'aptamère *via* des polymères organiques électrogénérés à motif pyrrolique : le polypyrrole N-hydroxysuccinimide, le polypyrrole adamantane et le polypyrrole nitrilotriacétique. Pour chaque polymère, les propriétés électrochimiques ainsi que les performances électrochimiques pour la détection de l'arginine vasopressine sont présentées et comparées. Afin de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu dans la réponse des capteurs, le polypyrrole nitrilotriacétique sera

Introduction

aussi utilisé pour la réalisation d'aptacapteurs pour la détection d'autres cibles de petite taille qui sont la tyrosinamide et l'adénosine.

Enfin, le troisième et dernier chapitre de ce mémoire portera sur l'utilisation d'une monocouche auto-assemblée sur électrodes d'or pour la mise au point d'aptacapteurs pour la détection de l'adénosine et de l'arginine vasopressine et dont les performances seront comparées à celles des aptacapteurs à base de polymères électrogénérés du deuxième chapitre.

Pour tous les capteurs mis au point, la spectroscopie d'impédance électrochimique est utilisée comme technique de transduction.

Chapitre I : Etat de l'art

Chapitre I: Etat de l'art

I. Intérêt médical de l'arginine vasopressine

Ne représentant que 4 des 1400 g d'un cerveau humain adulte, l'hypothalamus est considéré comme « le cœur du cerveau » [1]. Il contrôle en effet grâce à ses circuits neuronaux d'importantes fonctions physiologiques telles que le métabolisme énergétique, l'équilibre des fluides et des électrolytes, la thermorégulation, les cycles veille-sommeil et les réactions d'urgence aux facteurs de stress dans l'environnement et la reproduction [2]. La gestion de ces différentes fonctions est opérée par une gamme de différentes hormones sécrétées en son sein (« releasing hormones ») qui à leur tour déclenchent, de manière spécifique, la libération d'autres hormones à partir de la glande pituitaire rattachée à l'hypothalamus par la tige pituitaire et où se trouvent leurs récepteurs. De la taille d'un haricot, la glande pituitaire communément appelée hypophyse, est composée d'un lobe antérieur (antéhypophyse ou adénohypophyse) et d'un lobe postérieur (posthypophyse ou neurohypophyse) [3].

La GH (growth hormone), la TSH (thyroid-stimulating hormone), l'ACTH (adrenocorticotropin hormone), la FSH (follicle-stimulating hormone), la LH (luteinizing hormone), la beta endorphine et la prolactine sont sécrétées par l'adénohypophyse tandis que l'ocytocine et l'arginine vasopressine sont sécrétées par la neurohypophyse (Figure 1). Contrairement aux hormones de l'adénohypophyse qui doivent leur sécrétion à une « releasing hormone » spécifique, l'ocytocine et la vasopressine sont sécrétées par l'hypothalamus lui-même sous forme de preprohormones avant d'être acheminées dans l'hypophyse à partir de laquelle elles sont libérées dans le flux sanguin [4].

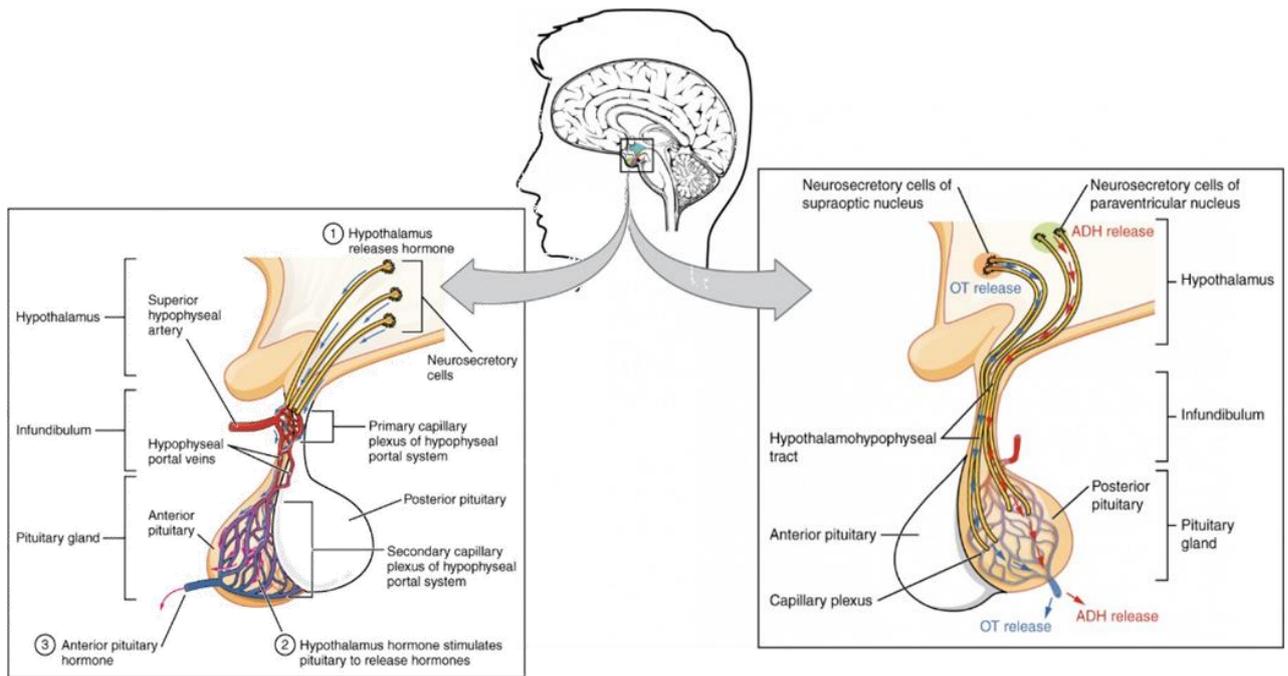


Figure 1: Circuit de sécrétion de la vasopressine (notée ADH) et de l'ocytocine (notée OT) par le complexe hypothalamo-hypophysaire. Reproduit de [3].

L'arginine vasopressine (AVP) ou hormone anti-diurétique (ADH) est une petite hormone (1084 Da) libérée en réponse à une hyperosmolarité plasmatique. Elle est constituée de 9 acides aminés dont deux groupements cystéine reliés par un pont disulfure (Figure 2) [5]. Il existe deux énantiomères de cette hormone : l'énantiomère L (L-AVP) qui est l'énantiomère naturel de l'hormone et l'énantiomère D (D-AVP) qui est l'énantiomère synthétique.

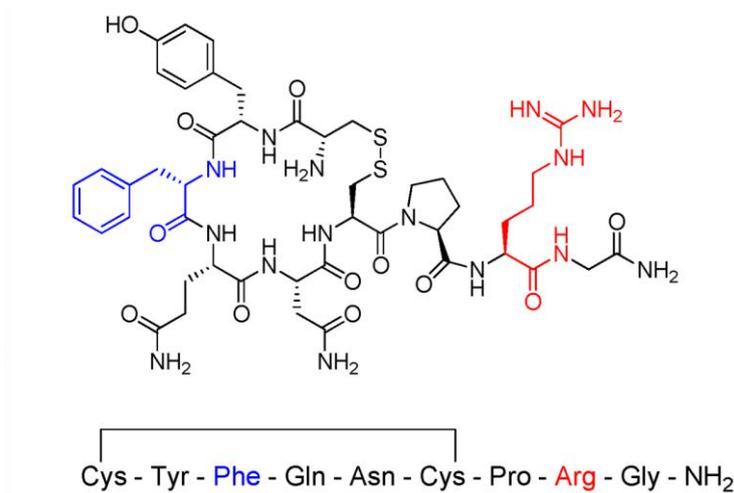


Figure 2: Structure de l'arginine vasopressine. Reproduit de [5].

L'arginine vasopressine assure l'homéostasie de l'eau et du sodium par son action antidiurétique médiée par les récepteurs V2 situés au niveau du tube contourné distal du néphron. Sa sécrétion est stimulée par diminution du volume sanguin ou le stress. Grâce à ses

récepteurs V1 situés au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires, elle est également responsable de la vasoconstriction et de l'augmentation de la libération de prostaglandines pouvant ainsi avoir un effet sur la régulation de la pression artérielle sanguine [6]. Les concentrations physiologiques (valeurs de référence) de cette hormone sont de 35 à 79 pmol/24h (calcul permettant de prendre en compte le volume d'urines et d'en tenir compte pour le diagnostic différentiel) et de 0,5 à 13 pmol.L⁻¹ dans le plasma [7].

Au vu de ses actions physiologiques, l'arginine vasopressine est un biomarqueur d'intérêt pour le diagnostic de pathologies telles que le diabète insipide, le syndrome de sécrétion inappropriée de l'hormone antidiurétique [8], le syndrome de l'apnée du sommeil [9], ou encore le mal aigu des montagnes [10]. Dans le cas du diabète insipide et du syndrome de l'apnée du sommeil, on assiste à une diminution des concentrations physiologiques de l'hormone anti diurétique traduite par une polyurie tandis qu'à l'opposé, une rétention hydrosodée, consécutive à un excès de sécrétion de l'hormone, est associée au syndrome de sécrétion inappropriée de l'hormone antidiurétique et au mal aigu de montagnes.

De cet intérêt biomédical, des concentrations relativement faibles et de sa petite taille, est né le défi de développer des techniques de détection performantes pour l'arginine vasopressine.

II. Les techniques de dosage conventionnelles pour l'arginine vasopressine

L'une des caractéristiques principales d'une hormone est de pouvoir exercer une activité à très faible dose. Ainsi, dans les conditions physiologiques, les hormones sont retrouvées à des concentrations très faibles dans les fluides biologiques. Leur détection requiert des techniques qui doivent répondre à un certain niveau de performance en termes de sensibilité mais aussi de simplicité de mise en œuvre (temps, coût, faisabilité en routine). Pour répondre à ce besoin, plusieurs approches ont été mises au point au fil des années et ne cessent d'être améliorées. Ces techniques seront classées ici en quatre grands types : les essais biologiques, l'immunodosage, la chromatographie et la bio-détection.

1. Les essais biologiques

Un essai biologique, dans le sens analytique du terme, est une méthode permettant de déterminer la concentration ou l'activité d'une substance en fonction de ses effets sur des animaux, des plantes ou des tissus vivants. Utilisés tout d'abord pour l'exploration des effets

des hormones [11] [12], les essais biologiques sont vite devenus un outil pour leur quantification [13] [14].

Pour l'arginine vasopressine en particulier, le bio-essai "presseur" consistait à mesurer la pression sanguine en réponse à l'injection en intra veineuse d'extraits de la glande pituitaire [15]. Cet essai était cependant confronté à un problème de spécificité lié à l'influence d'autres composants de l'extrait pituitaire sur la pression sanguine. D'autres essais biologiques étaient basés sur l'exploration de l'activité antidiurétique de l'AVP [16]–[20]. Ils consistaient à mesurer le degré de concentration de l'urine ou la diurèse provoquée par l'injection d'extrait de plasma humain ou de vasopressine de synthèse. Bien que certains de ces essais fussent assez sensibles pour détecter l'hormone à l'échelle picomolaire [18]–[20], ceux menés chez des animaux comme ceux menés chez l'homme étaient longs, coûteux et d'une grande complexité notamment concernant la préparation des sujets. Ces techniques n'étaient donc pas viables pour une utilisation en routine et ont très vite été remplacées par les techniques d'immunodosage qui permettent d'analyser rapidement de nombreux échantillons.

2. L'immunodosage

L'immunodosage est une méthode bio-analytique qui utilise la spécificité d'une réaction antigène-anticorps pour détecter et quantifier des molécules cibles dans des échantillons biologiques [21]. Du fait de la haute spécificité de l'interaction antigène-anticorps, les immunodosages sont souvent utilisés directement avec des matrices biologiques complexes, trouvant ainsi un vaste champ d'application allant du diagnostic clinique aux laboratoires industriels en passant par l'environnement [22]–[24].

L'utilisation des anticorps comme outils de reconnaissance sera abordée ultérieurement dans le chapitre I.4.1.1. Seules les techniques d'immunodosage appliquées à la détection de l'AVP seront décrites dans cette partie. Ce sont des techniques d'immunodosage avec marquage. Elles consistent à marquer (ou tracer) l'antigène ou l'anticorps à l'aide d'un radioélément, d'une enzyme ou d'un luminophore de sorte qu'il soit aisément identifiable et quantifiable par des méthodes physico-chimiques. Etant intéressés ici par le dosage de l'AVP, la classification de ces techniques se limitera aux dosages d'antigènes.

Les techniques d'immunodosage avec marquage peuvent être distinguées en deux types :

- **Les techniques en phase homogène** : elles ne nécessitent pas d'étape de séparation physique préalable de la fraction libre de la fraction engagée dans le complexe antigène-anticorps, ce qui permet un gain de temps considérable.
- **Les techniques en phase hétérogène** : elles requièrent l'immobilisation de l'anticorps ou de l'antigène sur un support solide et une étape de séparation de la fraction libre de la fraction engagée dans le complexe antigène-anticorps. Cette étape de séparation est en général suivie d'une étape de rinçage qui permet d'éliminer la fraction libre.

Qu'elles se déroulent en phase homogène ou hétérogène, ces techniques peuvent être compétitives ou non compétitives. Les techniques dites compétitives, mettent en compétition l'antigène d'intérêt (l'analyte) avec une quantité spécifique d'antigène marqué pour l'anticorps tandis que les techniques dites non compétitives utilisent un excès d'anticorps marqués qui vont se lier à l'analyte [25]. Le dosage immunologique non compétitif est cependant plus sensible.

Enfin, qu'elles soient homogènes ou hétérogènes, compétitives ou non compétitives, la nature du marqueur utilisé permet de distinguer quatre grands groupes de techniques d'immunodosage avec marquage qui sont l'immunodosage enzymatique (EIA), l'immunodosage par fluorescence (FIA), l'immunodosage par chimiluminescence (CLIA) et le dosage radio-immunologique (RIA). Seuls seront décrits ici l'EIA et le RIA qui sont ceux utilisés pour la détection de l'AVP.

2.1. L'immunodosage enzymatique

L'immunodosage enzymatique est probablement l'un des tests immunologiques les plus simples et les plus utilisés. Dans ce type de dosage, le complexe anticorps-antigène est détecté à l'aide de réactions enzymatiques d'une enzyme (par exemple HRP, AP, GOx) couplée à un anticorps. Ces enzymes permettent souvent la détection parce qu'elles produisent un changement de couleur observable en présence de certains réactifs de substrat et de chromogène. S'il existe plusieurs techniques d'immunodosage enzymatique, à savoir, CEDIA (Cloned enzyme donor immunoassay), ARIS (Apoenzyme reactivation immunoassay), EMIT[®] (Enzyme-multiplied immunoassay technique), EMMIA (Enzyme modulator mediated immunoassay), le test ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) reste de loin la plus connue [26].

L'ELISA est une technique d'immunodosage enzymatique sur support solide (technique en phase hétérogène). Il existe quatre principaux types d'ELISA : direct, indirect, de type sandwich et compétitif. Dans chaque type, le principe de base de la détection reste le même, mais la disposition de l'antigène et de l'anticorps change (Figure 3).

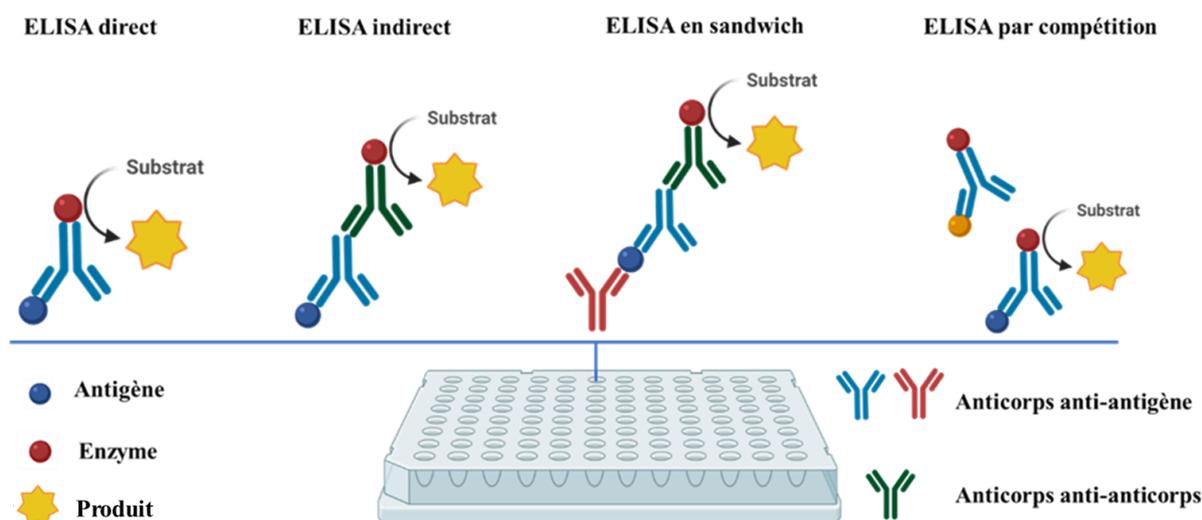


Figure 3: Schéma descriptif des différents types d'ELISA.

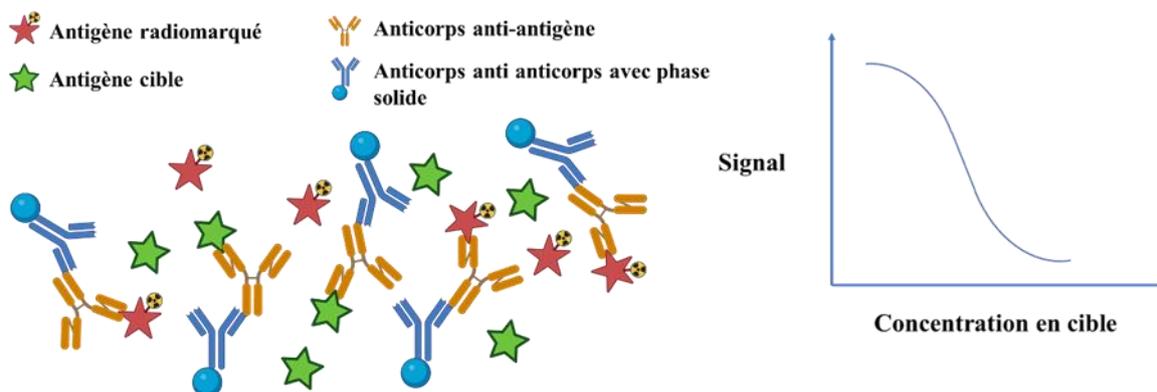
En plus d'être sensibles et de requérir un équipement peu coûteux, les techniques d'immunodosage enzymatique présentent l'avantage de permettre une grande cadence d'analyse et de ne présenter aucun risque de radiation aussi bien lors du marquage ou de l'élimination des déchets. Le principal inconvénient est que l'activité de certaines enzymes peut être affectée par des constituants du plasma [25].

Pour le dosage de l'AVP dans le plasma humain avec l'ELISA, plusieurs études sont reportées dans la littérature [27]–[29]. Les valeurs trouvées sont cependant largement supérieures (parfois jusqu'à 2 ordres de grandeur) aux valeurs reportées avec les bioessais et le dosage radioimmunologique avec étape d'extraction (Chapitre I.2.2.2). Ceci pourrait partiellement être expliqué par le fait que ces études aient été menées sur du plasma sans extraction préalable, ce qui augmente fortement les risques d'interférences.

2.2. Le dosage radio-immunologique

Le dosage radio-immunologique (RIA) utilise des antigènes ou des anticorps marqués à l'aide d'un radio-isotope (^{125}I , ^3H). La technique décrite ici sera celle de l'antigène radiomarqué (méthode compétitive).

L'antigène radiomarqué ("traceur") entre en compétition avec l'antigène d'intérêt (provenant de l'échantillon à analyser) non radioactif pour un nombre fixe de sites de liaison d'anticorps. Pour des concentrations croissantes d'antigène non marqué, peu de sites de liaison d'anticorps sont disponibles pour l'antigène radiomarqué, entraînant une diminution du signal radioactif (Figure 4).



Appliqué au dosage de l'arginine vasopressine depuis déjà longtemps [30]–[33], le dosage radio immunologique reste aujourd'hui la méthode de référence pour cette hormone [7] et a nécessité pour cela plusieurs améliorations. Peu immunogène, elle rend difficile la production d'anticorps de haute affinité. Une attention particulière a donc été accordée aux procédures d'extraction et de concentration.

Dans la technique de référence actuelle, pour le dosage dans le plasma, une première étape d'extraction en phase solide ou par alcool éthylique est nécessaire tandis que la vasopressine urinaire peut être mesurée directement. En fonction du rendement d'extraction une correction est appliquée aux valeurs des échantillons soumis à l'extraction. Un antisérum de lapin (anti-vasopressine) est employé à l'étape de liaison et de l'iode ^{125}I comme radio marqueur. Un second anticorps (anti-lapin) lié à des particules de phase solide est utilisé pour éliminer la fraction liée au premier anticorps de celle non liée par centrifugation. Il est à préciser que ces différentes étapes sont en général assez longues (des temps d'incubation pouvant aller de 18 à 24 heures et à répéter).

Bien que sensibles et relativement simples dans le principe, les techniques d'immunodosage présentent plusieurs difficultés notamment celle des interférences conduisant à la non-spécificité. Ces interférents proviennent notamment de l'échantillon analysé [34]. Il s'agit en général :

- **des anticorps hétérophiles** : ce sont des anticorps naturels, poly spécifiques, qui sont en général de faible affinité mais qui peuvent être remplacés par des anticorps de haute affinité après exposition à l'antigène [35].
- **des anticorps humains anti-animaux (HAAA)** : contrairement aux anticorps hétérophiles, les HAAA sont des anticorps de haute affinité dirigés contre des immunoglobulines animales spécifiques [36]. L'exposition à des animaux utilisés pour la préparation des anticorps utilisés dans les tests immunologiques est l'élément déclencheur. S'il est vrai que les anticorps murins sont les plus utilisés dans les essais immunologiques commerciaux, ce qui fait des anticorps humains anti-souris les plus importants vu l'omniprésence des souris, il a également été reporté l'existence d'anticorps humains anti-lapin [37] [38].
- **des auto-anticorps** : ce sont des anticorps endogènes dirigés contre des éléments naturellement présents dans l'organisme. Surtout connus pour être à l'origine des maladies auto-immunes [39] [40], ils peuvent aussi être des interférents dans l'immunodosage, notamment le facteur rhumatoïde [41] [42].

Ces différents interférents peuvent induire des faux positifs ou des faux négatifs (Figure 5) [43] qui se traduiront par une surestimation ou une sous-estimation de la quantité d'analyte dans l'échantillon.

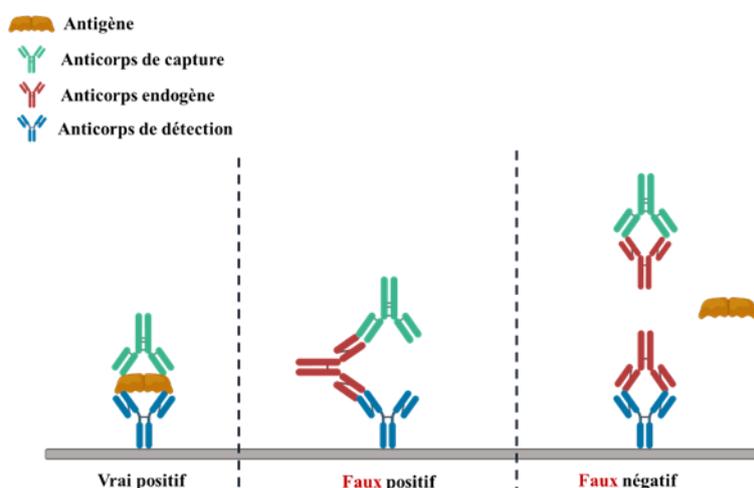


Figure 5: Schéma des différents types d'interférences dues aux anticorps endogènes. Inspiré de [43].

Les immunodosages en sandwich, bien que plus sensibles, sont sujets à ces interférences dues aux anticorps endogènes mais aussi à la biotine [44]–[46] et à l'effet crochet qui se traduit par une baisse paradoxale du signal mesuré en présence d'une forte concentration de

l'antigène à doser, résultant en une courbe en cloche [47] [48]. Ils restent néanmoins généralement plus robustes du fait de l'usage d'un excès d'anticorps.

Pour les molécules de petite taille (< 2000 Da) seul l'immunodosage compétitif est utilisable, vu l'absence d'un deuxième épitope pour la réalisation d'une technique de type sandwich. En plus de l'interférence des anticorps endogènes, ce type de dosage est sensible aux réactions croisées avec les précurseurs ou les métabolites de l'analyte ou avec les médicaments, ainsi qu'à l'interférence de la biotine lorsque le complexe biotine-streptavidine est utilisé pour séparer l'immunocomplexe [48]. S'il existe des solutions pour réduire ces interférences, notamment celles dues aux anticorps endogènes (tubes de blocage des hétérophiles HBTs, précipitation au polyéthylène glycol 6000, dilutions successives) [47] [49], celles-ci ne sont pas toujours efficaces [50] [51] et peuvent complexifier la technique d'immunodosage utilisée.

Par rapport à d'autres techniques d'immunodosage, des précautions supplémentaires sont nécessaires en raison des substances radioactives impliquées, mais la sensibilité et la spécificité élevées de la RIA font qu'elle est toujours utilisée aujourd'hui.

3. Les méthodes chromatographiques

Les méthodes chromatographiques sont des méthodes séparatives basées sur différents processus physico-chimiques. Introduites par M. Tswett qui travaillait sur la séparation de pigments végétaux de la chlorophylle [52], les méthodes chromatographiques ont aujourd'hui une place incontournable dans le milieu de la chimie analytique notamment avec les différentes améliorations et les différents couplages qui ont émergé au fil des années.

Elles mettent en jeu un nombre d'équilibres des constituants de l'échantillon à analyser entre une phase dite stationnaire ou fixe et une autre dite mobile [53]. Entraîné par la phase mobile, chaque constituant parcourt la phase stationnaire avec une vitesse qui lui est propre grâce à ce jeu d'équilibres. Pour une distance parcourue dans la phase stationnaire identique pour tous les constituants, à vitesses différentes, le paramètre permettant de distinguer les différents constituants est le temps mis à migrer dans la phase stationnaire. Ce temps est appelé temps de rétention et constitue le paramètre qualitatif de la chromatographie.

En fonction de la nature de la phase mobile, on distingue la chromatographie liquide (LC), la chromatographie gazeuse (CPG) et la chromatographie en phase supercritique (SFC).

De loin la plus utilisée, la LC est basée sur l'utilisation d'une phase mobile liquide. Elle regroupe la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie sur papier, la chromatographie en phase liquide en colonne ouverte et la chromatographie liquide haute performance (HPLC). En fonction des interactions physico-chimiques des analytes avec la phase stationnaire, on distingue [53] :

- **La chromatographie d'adsorption** : elle est basée sur l'adsorption de l'analyte de la surface de la phase stationnaire grâce aux forces de Van der Waals et aux interactions polaires. Du fait des interactions peu spécifiques, ce type de chromatographie est peu utilisée.
- **La chromatographie d'exclusion-diffusion** : elle permet la séparation des molécules en fonction de leur taille grâce à un gel poreux exerçant un effet tamis vis-à-vis des grosses molécules. Les molécules de faible poids moléculaire diffusent librement dans la phase stationnaire et ont un temps de rétention supérieur aux molécules de grande taille qui elles progressent plus rapidement car elles ne peuvent pas diffuser dans les pores trop petits de la phase stationnaire. Ce type de chromatographie est utilisé pour l'analyse de polymères.
- **Les chromatographies d'échange d'ions et de paires d'ions** : elles sont réservées à l'analyse d'espèces ionisées. La première permet la séparation de cations et d'anions de l'échantillon grâce à une résine échangeuse d'ions greffée sur la phase stationnaire. La seconde est appliquée à des ions opposés (soluté et contre ion ajoutés à la phase mobile) dits « appariés ».
- **La chromatographie de partage** : dans ce type de chromatographie les analytes sont séparés en fonction de leur affinité pour les phases stationnaire et mobile, affinité définie par la polarité des analytes et des phases. On parle de chromatographie en mode normale pour une phase stationnaire polaire et de chromatographie en mode inverse pour une phase stationnaire apolaire.

Permettant à la fois la séparation et la quantification d'analytes, l'HPLC est la plus utilisée des chromatographies liquides. La phase mobile entraîne l'échantillon jusqu'à la colonne chromatographique constituée de particules de 3 à 5 μm de diamètre, avec une pression maximale entre 400 et 600 bars. On parle depuis quelques années d'UHPLC ou UPLC (Ultra high performance liquid chromatography) où la taille des particules de la phase stationnaire est inférieure à 2 μm , ce qui permet une amélioration de l'efficacité et du temps d'analyse

mais nécessitant en contrepartie des systèmes de pompage pouvant atteindre les 1000 bars [54].

Une fois les molécules séparées dans la colonne elles sont identifiées et/ou quantifiées en sortie de colonne grâce à un détecteur adapté au type d'analyte. Ce dernier peut être spectrophotométrique, spectrofluorimétrique, électrochimique ou un spectromètre de masse (MS). Les détecteurs utilisant la spectrométrie de masse sont de loin les plus performants car ils permettent l'analyse d'un large spectre de cibles et ce à des états de traces. La spectrométrie de masse permet la séparation d'analytes préalablement ionisés grâce à leur rapport masse sur charge (m/z). On parle aujourd'hui de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) où l'analyse se produit en deux temps en sortie de la colonne chromatographique.

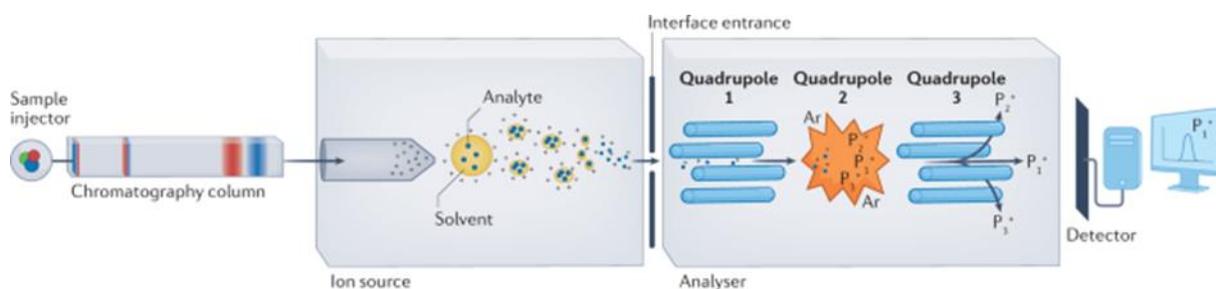


Figure 6: Schéma du principe de la LC-MS/MS. Reproduit de [55].

Les ions fragments (ions précurseurs ou parents) provenant d'un premier analyseur sont de nouveau fragmentés (ions produits) pour être analysés par spectrométrie de masse dans un second analyseur (Figure 6) [55]. Cette technique présente de nombreux avantages par rapport aux immunodosages traditionnels, tels qu'une meilleure spécificité, des gammes linéaires étendues, la capacité de multiplexage (possibilité d'analyser des analytes et leurs apparentés) et cadence élevée par rapport aux autres types de LC [55].

La LC-MS/MS a été utilisée pour doser de manière sensible des molécules de petite taille [56]–[59] dont l'AVP [60]–[62]. Pour cette dernière, après une étape d'extraction en phase solide, les différentes équipes ont réussi à détecter la molécule à l'échelle picomolaire (LOD allant jusqu'à 0,2 pmol/L pour Tsukazaki et al. [62]) avec de petits volumes d'échantillon (plasma ou urines), résultats corrélés par le RIA et les bioessais. Néanmoins, les coûts d'achat, de maintenance et d'exploitation élevés, le manque de portabilité et la nécessité d'un personnel qualifié font de la LC-MS une technique à usage limité dans l'analyse clinique de routine [63], d'où la nécessité de développer des techniques alternatives tout aussi performantes mais avec une meilleure ergonomie.

4. Les biocapteurs

Un biocapteur est défini comme un dispositif analytique qui transforme des informations chimiques en un signal analytiquement utile. Il est constitué généralement de deux composants de base connectés : un système de biorecognition moléculaire (biorécepteur) et un transducteur physicochimique [64] [65] (Figure 7) . Un biocapteur étant un dispositif intégré autonome, il est recommandé de le distinguer clairement d'un système analytique qui comprend des étapes de séparation supplémentaires, telle que la LC-MS, ou du matériel supplémentaire et/ou le traitement de l'échantillon [66].

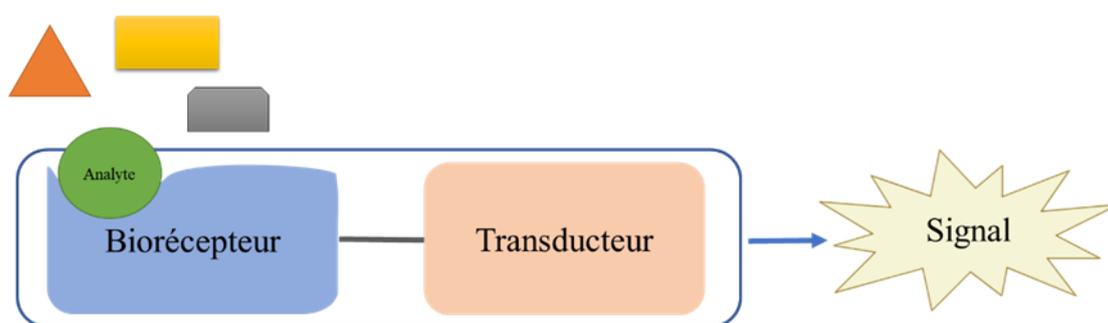


Figure 7: Schéma descriptif d'un biocapteur.

Les biocapteurs trouvent leur application dans un large éventail de domaines tels que le diagnostic clinique, l'agroalimentaire, l'environnement et l'industrie pharmaceutique [67]. S'ils présentent le principal avantage d'être relativement moins coûteux que les techniques d'analyse conventionnelles, c'est surtout la possibilité de les miniaturiser et leur facilité d'utilisation qui en font aujourd'hui un outil de grand intérêt dans le domaine de la chimie analytique.

On distingue deux familles de biocapteurs, les biocapteurs catalytiques et les biocapteurs d'affinité. Dans les biocapteurs catalytiques, le catalyseur biologique (enzyme) est immobilisé sur le transducteur et transforme l'analyte en une espèce qui, en général, est détectée par le transducteur. Il arrive aussi, mais plus rarement, que ce soit la disparition du substrat de l'enzyme qui soit détectée par le transducteur. Dans un biocapteur d'affinité, c'est une association par reconnaissance moléculaire (liaison spécifique) qui s'opère à la surface du transducteur entre l'analyte en solution et l'espèce biologique immobilisée sur le transducteur. C'est ce type de biocapteur qui sera évoqué dans la suite de nos travaux.

4.1. Les outils de reconnaissance moléculaire

Les outils de reconnaissance moléculaire jouent un rôle clé dans la conception réussie d'un biocapteur. La reconnaissance moléculaire fait référence à une liaison spécifique non covalente entre des molécules, dont l'une est généralement une macromolécule ou un assemblage moléculaire immobilisé sur le transducteur (sonde), et l'autre est la molécule cible en solution (analyte). Cette reconnaissance est généralement régie par de nombreuses interactions faibles telles que la liaison hydrogène, la coordination métallique, les forces hydrophobes, les forces de van der Waals, les interactions π - π [68]. Les performances d'un biocapteur sont évaluées par la sensibilité, la sélectivité, la reproductibilité et la stabilité de la réponse du transducteur ainsi que par la linéarité de la courbe d'étalonnage [69]. La sensibilité et la sélectivité sont des paramètres influencés par la qualité de reconnaissance moléculaire entre la sonde et la cible.

La sensibilité peut être liée à l'affinité de la sonde vis-à-vis de sa cible [70]. Cette affinité est évaluée par la constante de dissociation (K_d) [71] dont des valeurs faibles traduisent une forte affinité sonde-cible. La sélectivité quant à elle se définit comme la capacité du biocapteur à détecter un analyte spécifique dans un échantillon contenant un mélange de molécules ; elle nécessite de ce fait une spécificité de la reconnaissance sonde-cible qui peut être évaluée par le calcul du pourcentage de réactivité croisée [72].

Il existe un grand panel d'outils de reconnaissance moléculaire [68], seuls les plus utilisés seront abordés dans cette partie.

4.1.1. Les anticorps

Produits par le système immunitaire des organismes animaux pour reconnaître des antigènes étrangers, les anticorps sont des outils incontournables dans le domaine analytique. Quand ils sont utilisés dans la conception de biocapteurs, ils donnent naissance à des immunocapteurs qui sont à distinguer des techniques d'immunodosage décrites précédemment car ils répondent à la définition d'un biocapteur selon l'IUPAC [66].

Les anticorps appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Celles-ci se composent de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères identiques et reliées par des ponts disulfures.

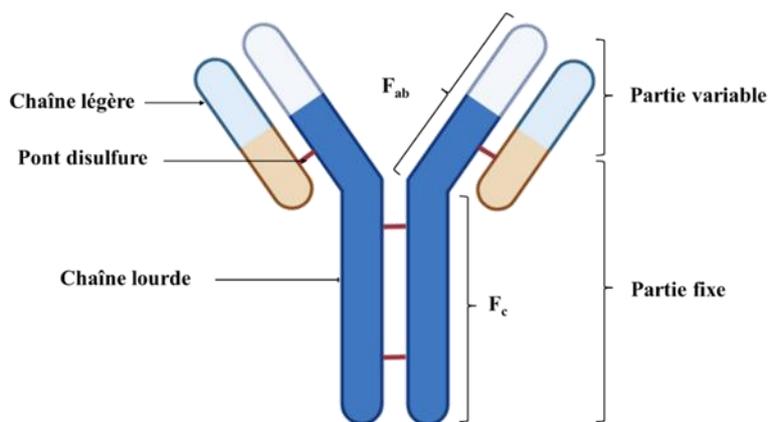


Figure 8: Représentation schématique d'une immunoglobuline

Le fragment de liaison à l'antigène dits F_{ab} (fragment antigen-binding) est constitué par une chaîne légère complète combinée à une partie de la chaîne lourde (Figure 8). Le fragment cristallisable (F_c) héberge le reste (domaines fixes) de la chaîne lourde. Il est le siège des différentes modifications (greffage de groupements fonctionnels) qui permettent l'utilisation des anticorps comme outil de biorecognition. La structure des domaines constants de la chaîne lourde permet une classification des immunoglobulines en 5 types : IgG, IgA, IgM, IgE et IgD ayant chacune une fonction immunitaire définie. Pratiquement n'importe quel composant peut servir d'antigène s'il est capable d'induire une réponse immunitaire. Les anticorps dirigés contre des molécules de grande taille (> 2000 Da) sont produits en injectant la macromolécule correspondante à un vertébré (le plus souvent : souris, rats, lapins, chèvres, chevaux) [73]. Les anticorps dirigés contre des molécules de petite taille et donc non immunogènes, tels que les pesticides, sont générés par conjugaison à de grands vecteurs immunogènes pour l'immunisation [74].

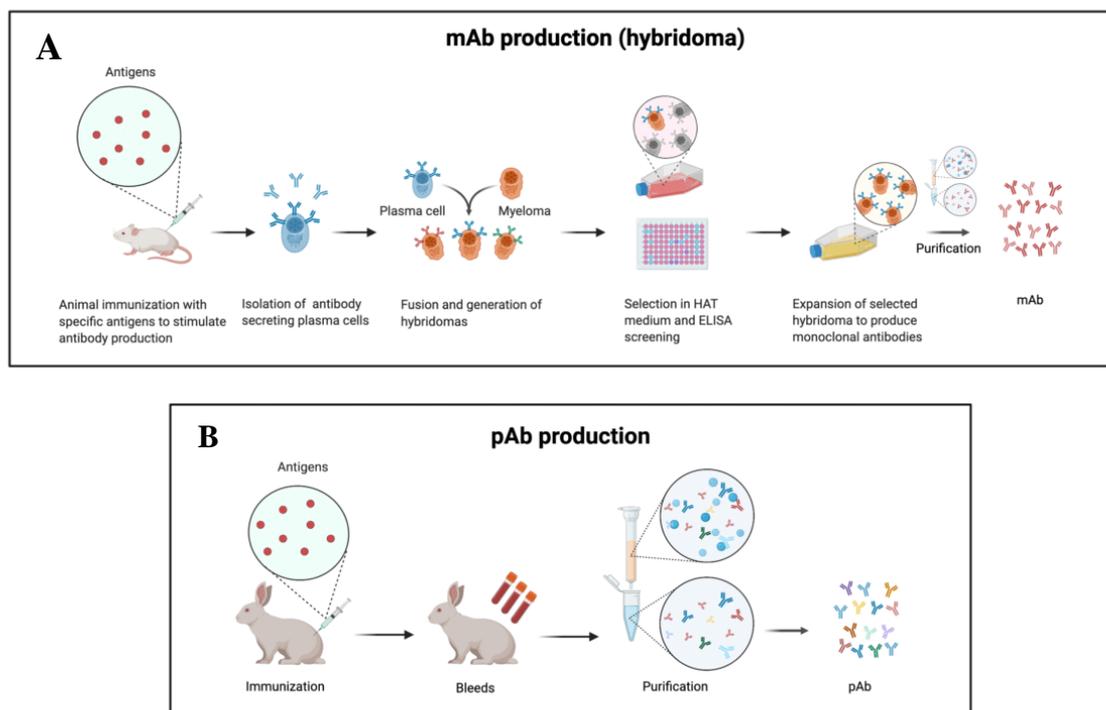


Figure 9: Illustration des étapes de la production d'anticorps monoclonaux par le biais d'hybridomes (panneau supérieur) et d'anticorps polyclonaux (panneau inférieur). Reproduit de [76].

Dans les deux cas, la réponse immunitaire déclenchée est une cascade d'activation et de différenciation des cellules lymphocytaires, qui aboutit finalement à la production d'une multitude d'anticorps capables de se lier à l'antigène avec des affinités et des sélectivités différentes, dits anticorps polyclonaux (pAb), qui sont récupérés après prélèvement du sérum de l'animal (Figure 9B) [75]. S'ils présentent l'avantage d'avoir une production pratique, rapide et économique l'hétérogénéité des anticorps polyclonaux rend difficile la normalisation nécessaire pour la fabrication d'immunocapteurs.

La technologie des hybridomes proposée par Köhler et Milstein [76] a offert une alternative aux anticorps polyclonaux. Celle-ci est basée sur la fusion de lymphocytes B isolés (Figure 9A), de la rate de l'animal ayant été soumis à l'immunogène, avec une lignée cellulaire myéломateuse pour former une lignée cellulaire immortelle dite hybridome capable de produire des anticorps identiques de manière illimitée et normalisée. Les anticorps ainsi obtenus sont dits monoclonaux (mAb). Ceux-ci reconnaissent un épitope précis de l'antigène contrairement aux anticorps polyclonaux qui reconnaissent plusieurs épitopes et sont donc plus adaptés à l'usage en tant qu'outil de reconnaissance moléculaire. Les anticorps monoclonaux peuvent également être produits *in vitro* par génie génétique en récupérant les gènes de l'anticorps à partir de cellules souches. Ces gènes sont amplifiés et clonés dans un

vecteur approprié (un plasmide) avant d'être introduits dans un hôte (phage ou levure), ce qui permet l'expression de grandes quantités d'anticorps purs, dits anticorps recombinants [77]. Ce procédé permet de s'affranchir de l'utilisation d'animaux.

Malgré leur grande affinité pour leur cible, les anticorps présentent des limites pour la conception des biocapteurs. En effet, outre les difficultés liées aux interférents cités dans le cas de l'immunodosage, la taille des anticorps (environ 150 kDa pour les IgG) peut compliquer leur immobilisation sur la surface, que ce soit dans l'orientation ou pour la densité d'immobilisation, ce qui impacte les performances des immunocapteurs [78] [79].

4.1.2. Les polymères à empreinte moléculaire (MIPs)

L'impression moléculaire est un processus au cours duquel des monomères fonctionnels et réticulants sont copolymérisés en présence d'un analyte cible (la molécule d'empreinte), qui sert de modèle moléculaire (Figure 10) [80]. Les monomères forment initialement un complexe avec la molécule d'empreinte et leurs groupes fonctionnels sont maintenus en position par la structure polymère après la polymérisation. L'élimination ultérieure de la molécule d'empreinte révèle des sites de liaison dont la taille et la forme sont complémentaires de celles de l'analyte [81]. Le polymère ainsi formé a une mémoire moléculaire et est capable de lier l'analyte de manière sélective, il peut ainsi être utilisé à des fins de diagnostic, de pharmacologie ou d'administration de médicaments, d'où le surnom d' « anticorps plastiques » [82].

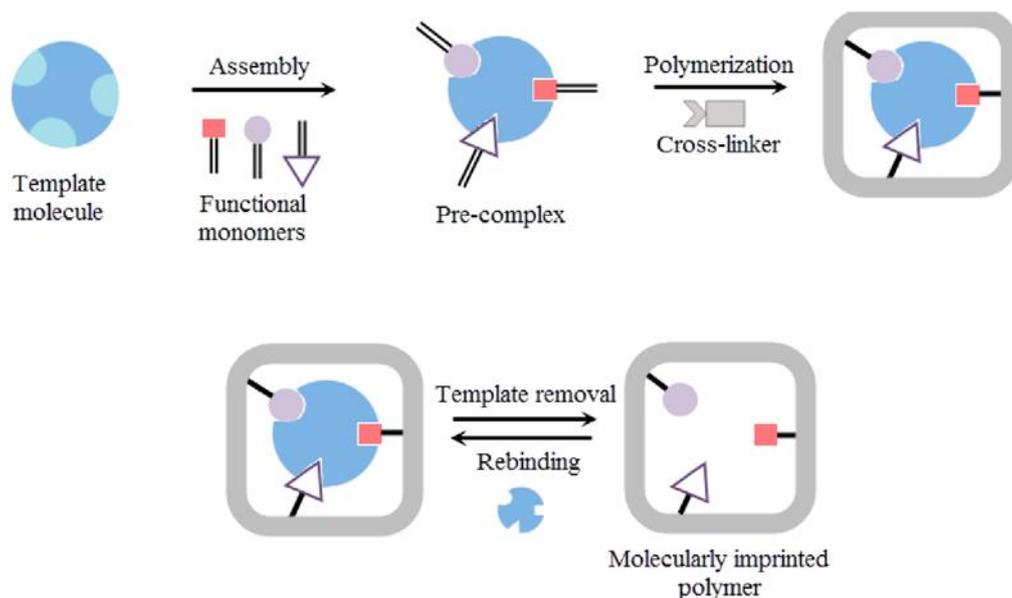


Figure 10: Schéma de synthèse de polymères à empreinte moléculaire. Reproduit de [81].

La taille des particules est l'élément moteur de la sélection des paramètres, les molécules de petite taille offrant une surface et des propriétés de liaison accrues [83]. Ces molécules de petite taille suscitent de plus en plus d'intérêt analytique au fil des années, faisant des MIPs une bonne alternative aux anticorps. Les MIPs présentent de nombreux avantages, notamment une préparation facile et peu coûteuse, une grande stabilité, une affinité élevée et une grande sélectivité vis-à-vis de la molécule modèle [82].

Cependant, leurs inconvénients incluent une faible densité de site de liaison et une cinétique de liaison lente. En outre, les MIPs ont une disponibilité commerciale limitée et une faisabilité interne qui nécessite un personnel bien formé [84].

4.1.3. Les aptamères

4.1.3.1. Structure

Les aptamères sont des séquences nucléotidiques monobrin en série ARN (acide ribonucléique) ou ADN (acide desoxyribonucléique) générés par un processus *in vitro* appelé SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) et qui sont capables de se lier à des cibles avec une grande affinité et spécificité [85] [86]. Les aptamères ont des schémas de pliage tridimensionnels spécifiques qui sont régis par leurs séquences principales, qui ont généralement une longueur de 20 à 80 nucléotides. Ce pliage tridimensionnel s'opère grâce aux appariements intra-caténaux entre les bases nucléiques complémentaires,

notamment entre la guanosine (G) et la cytosine (C) et entre l'adénine (A) et la thymine (T) pour la série ADN ou l'adénine (A) et l'uracile (U) pour la série ARN, pour former des structures secondaires et tertiaires.

Ce réarrangement structural fait apparaître trois principaux motifs structuraux :

- **La tige-boucle ou hairpin ou épingle à cheveux** : cette topologie particulière est composée de régions en hélice (tiges) et de régions non-appariées (boucles) (Figure 11) [87].

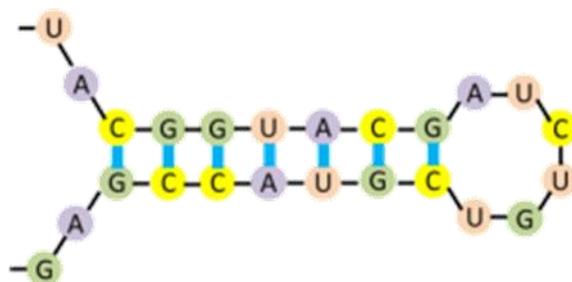


Figure 11: Représentation d'une structure tige boucle. Reproduit de [88].

- **Le pseudo-nœud** [88] : il contient au moins deux structures tige-boucle. La moitié de la tige d'une structure tige-boucle est insérée dans la structure tige de l'autre structure tige-boucle (Figure 12).

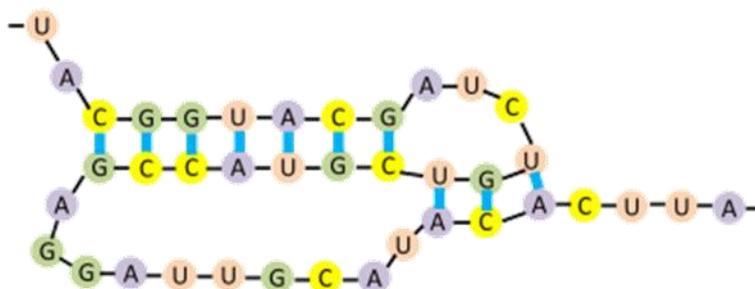


Figure 12: Représentation d'une structure en pseudo-nœud. Reproduit de [88].

- **Le G-quadruplex** : cette structure fait appel uniquement à des guanines appariées en quartets qui s'empilent en piégeant des cations monovalents (sodium ou potassium) qui stabilisent la conformation [89] (Figure 13).

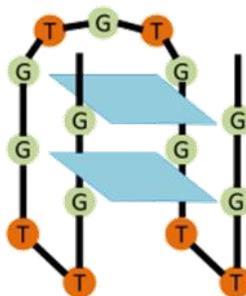


Figure 13: Représentation d'une structure G-quadruplex. Reproduit de [88].

4.1.3.2. Production par la méthode SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment)

La méthode SELEX implique la préparation d'une bibliothèque de nucléotides aléatoires avec des régions de séquences fixes et des régions de séquences aléatoires, qui sont ensuite exposées à la cible souhaitée.

Une bibliothèque d'oligonucléotides d'ADN aléatoire créée chimiquement et comportant entre 10^{13} et 10^{15} motifs de séquence distincts sert de point de départ à un processus SELEX conventionnel [90]. Cette bibliothèque peut être utilisée sans aucun prétraitement dans une technique SELEX destinée à sélectionner des aptamères d'ADN, mais doit d'abord être convertie en bibliothèque d'ARN avant d'entamer une procédure SELEX d'ARN. Les oligonucléotides restants, non ou faiblement liés à la cible, sont ensuite séparés des complexes de liaison. Cette séparation peut se faire par plusieurs techniques, notamment la centrifugation [91], la filtration sur membrane de nitrocellulose [92], l'électrophorèse capillaire [93], la chromatographie d'affinité [94] ou encore les techniques utilisant des billes magnétiques [95].

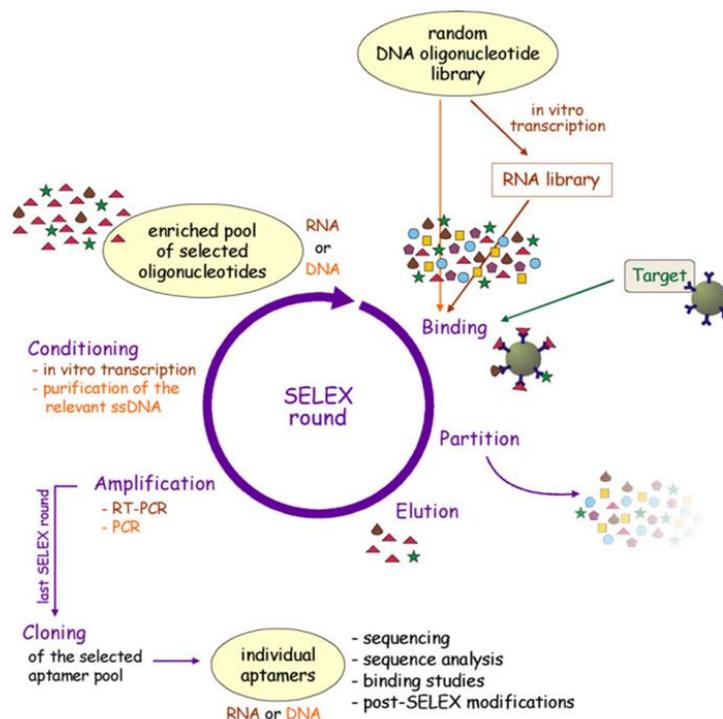


Figure 14: Schématisation de la méthode SELEX. Reproduit de [95].

Les nucléotides les plus affins sont sélectionnés et amplifiés par PCR (Polymerase chain reaction) pour créer une nouvelle bibliothèque enrichie en aptamères ayant une forte affinité pour la cible (Figure 14) [97]. Ce processus est répété plusieurs fois jusqu'à ce que les aptamères les plus affins soient isolés. Le nombre de cycles requis est déterminé par un certain nombre de facteurs, notamment les caractéristiques de la cible et sa concentration, le choix de la bibliothèque initiale d'oligonucléotides ADN aléatoires, le ratio entre les molécules cibles et les oligonucléotides, et l'efficacité de la technique de séparation [96]. La rigueur des conditions de sélection peut affecter la capacité des oligonucléotides à se lier à leur cible et celle-ci peut être progressivement augmentée au cours de la procédure en réduisant la concentration en cible lors des cycles ultérieurs ou en changeant les conditions de lavage [98].

Une fois les aptamères les plus affins et spécifiques obtenus, ils sont séquencés à haut débit pour obtenir leurs aptamères séquences [99]. Les aptamères choisis sont ensuite caractérisés par différentes techniques (anisotropie de fluorescence, ITC, HPLC etc...) afin d'en étudier l'affinité vis-à-vis de la cible [100]. Des modifications post-SELEX (l'inclusion de nucléotides modifiés, greffage de groupement chimique etc...) peuvent également être effectuées pour accroître la stabilité ou adapter l'utilisation à une application particulière.

4.1.3.3. Applications

Du fait de leurs propriétés fonctionnelles très proches de celles des anticorps, les aptamères ont au fil des années suscité une attention considérable pour de nombreuses applications telles que la thérapie ciblée [101], la bio-imagerie [102], le diagnostic clinique [103], l'administration de médicaments [104] et surtout la bio analyse [105], d'où le surnom d' « anticorps chimiques ». Il sera mis en avant ici uniquement leur utilisation dans la bio analyse.

Contrairement aux anticorps, les aptamères offrent une grande souplesse quant à leur utilisation dans la bio-détection, ils sont donc utilisés de plusieurs manières en fonction du besoin :

- **L'ELONA (Enzyme linked oligonucleotide assay) : c'est l'équivalent de l'ELISA pour les anticorps.**

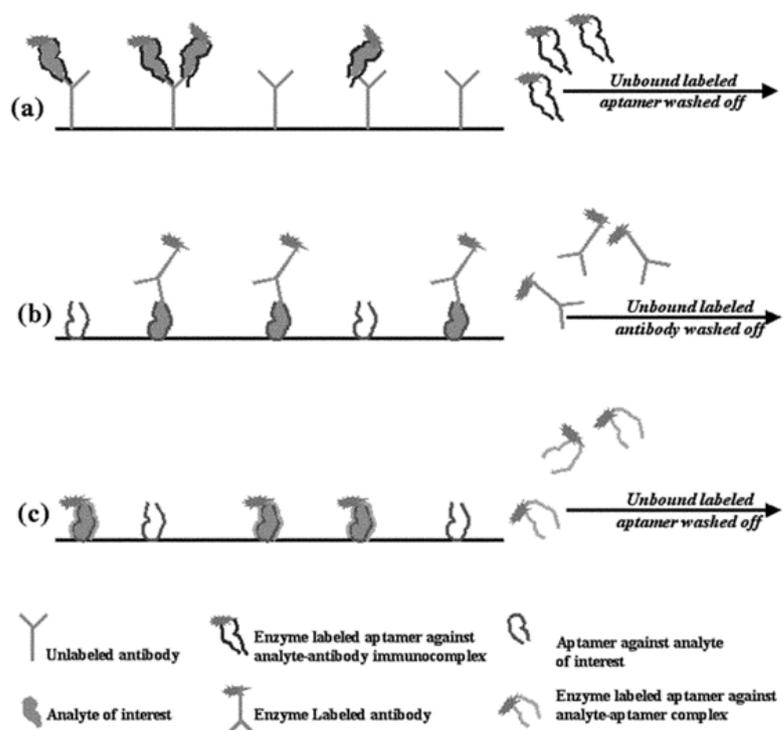


Figure 15: Schéma expliquant les différents types d'ELONA. Reproduit de [107].

Plusieurs configurations sont possibles, en utilisant des anticorps comme molécules de capture et des aptamères marqués à l'enzyme comme sondes moléculaires (Figure 15.a), des anticorps comme molécules rapporteuses et des aptamères marqués comme molécules de capture pour l'immunocomplexe anticorps-analyte. (Figure 15.b), des aptamères comme

molécules de capture et des aptamères marqués comme sondes dirigées contre le complexe aptamère-analyte (Figure 15.c) [106].

Une déclinaison particulière de cette dernière configuration a été mise au point par l'équipe NOVA du laboratoire DPM de l'Université Grenoble Alpes en collaboration avec l'équipe du Docteur Jean-Jacques Toulmé, du Laboratoire ARNA-Université de Bordeaux. Au lieu d'une reconnaissance de toute la séquence de l'aptamère de capture par l'aptamère rapporteur (Figure 15.c), cette nouvelle technique consiste à utiliser l'interaction boucle-boucle entre deux oligonucléotides afin de réaliser un « pseudo-sandwich » du nom de « complexe kissing » (Figure 16) [87] et offre plus de souplesse quant à l'élément rapporteur qui n'est plus forcément une enzyme. L'aptamère de capture est appelé aptaswitch et l'aptamère rapporteur aptakiss et, en théorie, l'aptaswitch en l'absence de la cible ne permet pas la formation du « complexe kissing » [107]. Bien que la conception de l'aptaswitch ne soit pas applicable qu'aux aptamères en conformation tige-boucle, la stratégie ainsi élaborée a inspiré de nombreuses applications [108]–[112] et est bien adaptée à la détection de molécules de faible poids moléculaire contrairement à l'ELISA de type sandwich.

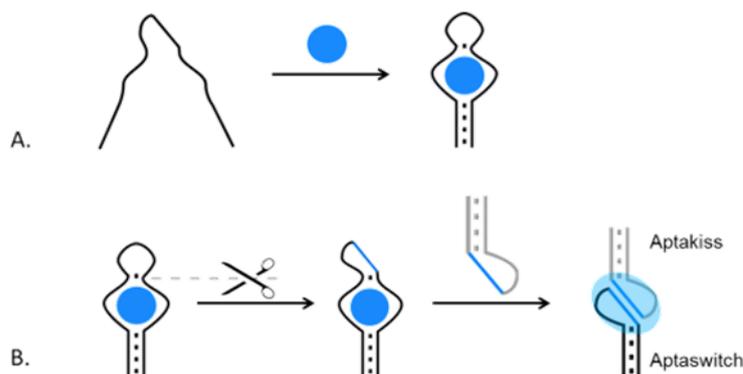


Figure 16: Schéma d'un complexe kissing .(A) Structures avec et sans la cible d'un aptamère pouvant être utilisé pour concevoir l'aptaswitch.(B) Conception de l'aptaswitch. Reproduit de [88].

- **Le balisage moléculaire :** contrairement aux immunocapteurs, les aptacapteurs sont bien adaptés à la transduction de la liaison de la cible basée sur les balises moléculaires. Le balisage moléculaire requiert une structure de type tige boucle, la boucle faisant office de sonde et la tige portant à chaque extrémité un fluorophore et un inhibiteur de fluorescence sont reliés de manière covalente (Figure 17) [111].

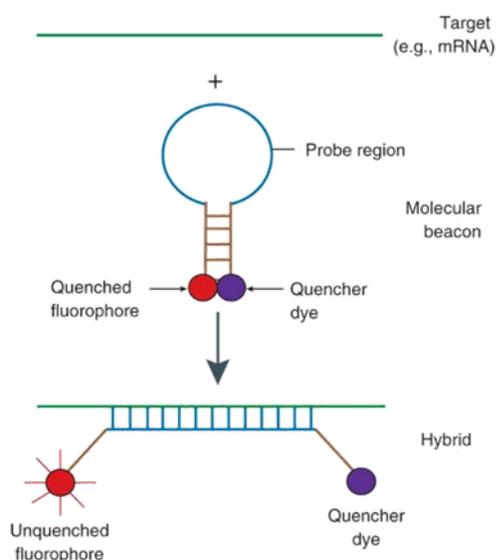


Figure 17: : Schéma du principe de balisage moléculaire. Reproduit de [112].

De manière générale, le fluorophore et le quencher sont en contact étroit grâce à la tige de la balise, et il n'y a donc pas de signal de fluorescence. Après interaction avec la cible et formation d'un complexe plus stable que la conformation tige-boucle, les bras de la tige sont écartés, ce qui permet à nouveau l'émission d'une fluorescence [113].

- **Le split-aptamer** : cette stratégie consiste à scinder l'aptamère en deux fragments qui peuvent spécifiquement former un assemblage ternaire en présence de la cible. Elle est surtout appliquée à la détection de cibles de faible poids moléculaire [114].

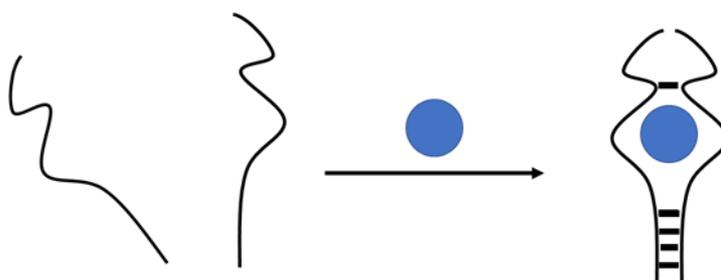


Figure 18: Stratégie du "split-aptamer". Formation du complexe ternaire en présence de la cible.

- **Les aptacapteurs simples** : ils consistent à immobiliser l'aptamère entier sur une surface couplée à une technique de transduction. Cette stratégie est la plus simple et permet la détection de tout type de molécules.

Les aptamères et les MIPs se présentent aujourd'hui comme des outils de reconnaissance de premier choix en alternative aux anticorps. Le Tableau 1 compare ces trois biorécepteurs sur

Chapitre I: Etat de l'art

plusieurs critères et met en exergue l'avantage considérable des aptamères dans la conception des biocapteurs, justifiant ainsi leur choix pour la réalisation des travaux de cette thèse.

Tableau 1: Tableau comparatif entre les anticorps, les MIPs et les aptamères [115].

Anticorps	MIPs	Aptamères
PRODUCTION		
Réponse immunitaire animale : <ul style="list-style-type: none"> • Grande variation d'un lot à un autre • Interactions entre les acides aminés • Marquage final possible • Faible rendement 	Impression moléculaire : <ul style="list-style-type: none"> • Variation modérée d'un lot à un autre • Grand nombre de monomères et d'interactions possibles • Grande adaptabilité • Pas de marquage spécifique • Rendement et coût dépendant du modèle 	SELEX : <ul style="list-style-type: none"> • Faible variation d'un lot à un autre • Interactions intra chaînes favorables à la stabilité • Marquage final possible • Rendement élevé • Faible coût
PROPRIETES		
<i>Affinité</i>		
<ul style="list-style-type: none"> • Faible pour les petites molécules • Elevée pour les grandes molécules et les cellules 	<ul style="list-style-type: none"> • Elevée pour les petites molécules • Elevée pour les grandes molécules et les cellules 	<ul style="list-style-type: none"> • Modérée pour les petites molécules • Elevée pour les grandes molécules et les cellules
<i>Spécificité</i>		
<ul style="list-style-type: none"> • Faible pour les petites molécules • Elevée pour les grandes molécules et les cellules 	<ul style="list-style-type: none"> • Elevée pour les petites molécules • Faible pour les grandes molécules et les cellules 	<ul style="list-style-type: none"> • Elevée pour les petites molécules • Elevée pour les grandes molécules et les cellules
<i>Stabilité</i>		
Quelques mois	Quelques années	Quelques années

4.1.4. Les autres outils de reconnaissance moléculaire

Il existe plusieurs autres outils de reconnaissance moléculaire :

- **Les enzymes** : elles ne sont pas à proprement dit des outils de reconnaissance moléculaires car elles ont deux fonctions. En plus de reconnaître le substrat, l'enzyme est un catalyseur qui transforme le substrat en produit. Elles ont été les premiers éléments utilisés dans la conception des biocapteurs et sont aujourd'hui toujours très étudiées. Elles sont le résultat de la grande spécificité des interactions enzyme substrat. Le premier biocapteur a été présenté par Clark et Lyons en 1962 , avec l'introduction de "l'électrode enzymatique" [116]. La concentration de glucose a pu

être déterminée en combinant l'enzyme glucose oxydase (GOx) avec l'électrode de Clark qui permet la détection ampérométrique du dioxygène (co-substrat de l'enzyme). Depuis lors, des électrodes enzymatiques pour une série d'autres composés ont été décrites en reliant les enzymes immobilisées à des électrodes. Il existe aussi de nombreux biocapteurs catalytiques où l'enzyme est associée à d'autres techniques de transduction. L'utilisation des biocapteurs enzymatiques reste restreinte aux seules molécules pouvant servir de substrat à ces enzymes, rendant très étroit le spectre d'application.

- **Les ADN** : il s'agit de séquences nucléotidiques monobrin qui permettent la détection de séquences complémentaires d'ADN (capteurs à ADN) [117] [118]. Ils diffèrent des aptamères par l'absence de liaisons intra caténaïres (absence de structure secondaire) en faveur d'une hybridation avec la séquence cible grâce à la complémentarité unique entre différentes bases.
- **Les acides nucléiques peptidiques** : ce sont des analogues synthétiques de l'ADN dont le squelette est un polyamide au lieu d'un squelette sucre-phosphate. Ils présentent des caractéristiques d'hybridation supérieures et une meilleure stabilité chimique et enzymatique que les acides nucléiques [119]. Ils sont capables de s'hybrider à des séquences d'ADNc ou d'ARN, et leur nature non chargée leur permet de s'hybrider à des molécules d'ADN dans des conditions de faible salinité. Ils peuvent alors être utilisés pour la détection d'organismes vivants tels que des cellules [120] ou des bactéries [121].

4.2. Les techniques d'immobilisation des éléments de biorecognition

L'immobilisation du biorécepteur lui-même et la préparation chimique globale de la surface du transducteur font partie de la conception de la surface du biocapteur. L'accessibilité et l'activité des molécules immobilisées affectent directement la sensibilité et la spécificité du dispositif. L'inertie de la surface, qui limite l'adsorption non spécifique, détermine le bruit de fond du capteur. La chimie de surface et la procédure de préparation de la biointerface ont donc un impact significatif sur les performances du biocapteur, en particulier sur le rapport signal/bruit. Enfin, une interface solide augmente la stabilité et la fiabilité des biocapteurs [68]. Il sera décrit ici les principales techniques d'immobilisation des biorécepteurs.

4.2.1. L'adsorption

La méthode la plus simple pour immobiliser des molécules bioréceptrices est l'adsorption [122]. Grâce aux interactions électrostatiques ou hydrophobes, le biorécepteur peut se lier à un support solide (électrode conductrice telle que l'or, le platine, le nickel etc...) ou à un support (matériaux nanostructurés) et s'y adsorber. Ce type d'immobilisation fait appel à des liaisons faibles telles que les interactions ioniques, les liaisons hydrogène et les interactions de Van der Waal. L'adsorption présente l'avantage d'être directe, simple, bon marché et de ne nécessiter aucun réactif. Il est néanmoins bien connu qu'il s'agit de liaisons peu stables, le biorécepteur pouvant se désorber aisément. C'est donc une technique d'immobilisation très peu utilisée.

4.2.2. Le piégeage

Dans ce type d'immobilisation, le biorécepteur est physiquement piégé dans une matrice poreuse (polymère) [122]. Les biorécepteurs peuvent être stabilisés dans la matrice par des liaisons covalentes ou non covalentes. Les pores de la matrice (gels de polyacrylamide, le triacétate de cellulose, l'agar, la gélatine et le carraghénane) peuvent être régulés de manière à empêcher la fuite des molécules piégées. Relativement facile et peu coûteux à concevoir, cette technique permet de préserver la conformation de molécules telles que les enzymes mais n'est pas totalement à l'abri d'une fuite, d'une limitation de la diffusion de la cible à travers les pores ou d'une contamination bactérienne.

Une autre variante de cette technique consiste à enfermer les biorécepteurs dans une capsule membranaire semi-perméable à base de nitrocellulose ou de nylon; on parle dans ce cas d'encapsulation.

4.2.3. Le greffage chimique covalent

Dans cette approche, les groupements fonctionnels des biorécepteurs (-NH₂ ou SH) et du support forment des liaisons covalentes. Pour créer ces connexions covalentes, une variété de groupements fonctionnels (amine, imine, hydroxyle, carboxyle, thiol, méthylthiol, guanidyle et imidazole) peuvent être produits sur un support [122]. La diversité des groupements fonctionnels qui offre plusieurs possibilités et la force de la liaison générée font de cette approche la plus utilisée pour l'immobilisation des molécules de biorecognition.

4.2.4. L'immobilisation par affinité biochimique

Cette approche repose sur l'utilisation de diverses affinités moléculaires pour garantir l'immobilisation du biorécepteur. La complexation métallique et la reconnaissance anticorps-antigène [123] sont quelques exemples de ces affinités. La plus utilisée reste cependant l'immobilisation de biomolécules biotinylées à l'aide de ponts d'avidine. Néanmoins, pour certaines méthodes de transduction, la taille du pont d'avidine (chaque chaîne d'avidine contient 128 acides aminés [124]) peut négativement affecter les performances du biocapteur. Des systèmes imitant l'interaction biologique avidine-biotine peuvent être utilisés comme alternative, en remplaçant le pont protéique par des ions métalliques (Ni^{2+} , Zn^{2+} ou Cu^{2+}) plus petits coordonnés à des groupes carboxylate ou imidazole de films de polypyrrole électrogénérés [125] [126].

Pour la réalisation des travaux de thèse, c'est cette dernière méthode et celle du greffage chimique covalent qui sont utilisées.

4.3. Les méthodes de transduction

Le rôle du transducteur est de convertir ces signaux physico-chimiques en un signal mesurable et qui peut être relié à une quantité de cible chimique ou biologique. Dans la définition du biocapteur, il est directement relié au support portant le biorécepteur. Le type de transduction est adapté au paramètre physicochimique généré par la reconnaissance entre le biorécepteur et sa cible [68] et il définit la classification des biocapteurs. Ainsi, un biocapteur peut être optique, gravimétrique, calorimétrique ou électrochimique.

4.3.1. La transduction optique

Les biocapteurs optiques utilisent un signal optique pour traduire la reconnaissance entre le biorécepteur et sa cible. Cette reconnaissance modifie les caractéristiques lumineuses du transducteur, telles que l'intensité, la phase ou la polarisation d'une lumière incidente. Le changement optique de cette lumière incidente est ensuite détecté par mesure de l'absorbance, la fluorescence, la luminescence ou l'indice de réfraction, entre autres [127].

4.3.2. La transduction gravimétrique

Les transducteurs gravimétriques mesurent le changement de masse induit par l'interaction entre la cible et la surface de biocapteur fonctionnalisée avec le biorécepteur. En général, ils utilisent de minces cristaux de quartz piézoélectriques qui vibrent à une fréquence spécifique

en fonction du courant appliqué et de la masse détectée [128]. Les trois types de capteurs les plus fréquemment utilisés pour la transduction gravimétrique sont la QCM (Quartz crystal microbalance), la SAV (Surface acoustic wave) et le MES (Magnetoelastic sensor).

4.3.3. La transduction calorimétrique

Les réactions chimiques étant en général exothermiques, les transducteurs thermiques mesurent le changement de température provoqué par la réaction entre l'élément de reconnaissance et la cible, à l'aide d'une thermistance [129].

4.3.4. La transduction électrochimique

Depuis la mise au point du premier biocapteur pour la détection de glucose sanguin par Clark [116], un engouement s'est créé autour de la transduction électrochimique. Tout au moins aussi sensibles que les autres types de biocapteurs, l'engouement autour des biocapteurs électrochimiques provient surtout de leur facilité d'utilisation et de miniaturisation aisée ainsi que de leur large gamme d'applications (médecine, environnement, agroalimentaire, pharmacie etc...).

L'électrode est le composant essentiel d'un biocapteur électrochimique. C'est un matériau conducteur d'électricité, généralement constitué de carbone vitreux (GCE), de platine (Pt) ou d'or (Au) et qui sert à la fois de support solide pour l'immobilisation des biomolécules (les enzymes, les anticorps et les acides nucléiques) et de conducteur électronique. En bioélectrochimie, la biorecognition étudiée produit généralement soit un courant mesurable (biocapteurs ampérométriques), soit un changement mesurable de potentiel (biocapteurs potentiométriques), soit un changement de la conductivité (ou de la résistance et de l'impédance) à la surface de l'électrode étudiée (biocapteurs conductométriques ou impédancemétriques) [130]. Une autre méthode de détection électrochimique est le transistor à effet de champ (Field effect transistor) qui utilise la technologie des transistors pour mesurer la variation de densité de charge au niveau de l'électrode modifiée par des biomolécules appelée « électrode de grille » [131]. Seuls les trois premiers types de biocapteurs électrochimiques seront décrits.

4.3.4.1. Les bases de l'électrochimie

L'électrochimie fait le lien entre le flux d'électrons dans le circuit électrique et les réactions d'oxydation et de réduction à l'interface entre une électrode et la solution. Puisque les réactions électrochimiques se déroulent à l'interface, elles sont donc hétérogènes.

Vu le caractère conducteur d'une électrode, une tension peut y être appliquée pour faire varier son niveau énergétique en utilisant une source d'énergie externe telle qu'un potentiostat [132]. C'est la différence de niveaux d'énergie entre l'électrode et la solution qui est à l'origine de la réaction de réduction ou d'oxydation, et du transfert d'électron thermodynamiquement favorable à l'interface. Une deuxième électrode est nécessaire pour compléter le circuit électrique. Sur cette seconde électrode se produit la réaction opposée, soit l'oxydation, soit la réduction. Les électrons circulent reliant le générateur de courant (ou de tension), aux deux électrodes jusqu'à l'interface électrode/électrolyte, et peuvent rejoindre l'électrode métallique (oxydation) ou être donnés à des espèces de la solution (réduction) au cours des processus de transfert de charge [133]. En électrochimie analytique, le montage est réalisé avec 3 électrodes afin de pouvoir connaître aussi le potentiel de l'électrode de travail :

- **L'électrode de référence (RE) :** son potentiel est clairement défini et constant. Elle sert de référence en potentiel pour mesurer le potentiel de l'électrode de travail. L'électrode au calomel saturée en KCl (SCE) et l'électrode Ag/AgCl KCl 3M ou saturée en KCl sont quelques exemples d'électrodes de référence fréquemment utilisées dans les milieux aqueux. La solution de référence interne est généralement séparée du milieu aqueux par un fritté poreux. Les électrodes de référence Ag/Ag⁺ sont utilisées dans les liquides non aqueux. Elles sont composées d'un fil d'argent dans une solution saline de Ag⁺, généralement AgNO₃. Dans ce cas, deux frittés poreux séparent ces électrodes de référence de la solution électrolytique organique pour ralentir la diffusion des ions Ag⁺ dans la solution. Entre les deux frittés, on place l'électrolyte support.
- **L'électrode de travail (WE) :** elle est le siège des réactions d'intérêt. Dans les biocapteurs, elle est constituée d'un matériau inerte dans la gamme de potentiel étudiée qui est modifié en surface par le matériau biologique. En mode ampérométrique, un potentiel lui est appliqué par rapport au potentiel de l'électrode de référence. Elle peut être une électrode de carbone vitreux (GCE), une électrode d'or (Au), de platine (Pt) ou d'oxyde d'indium dopé à l'étain (ITO).

- **La contre-électrode (CE) ou électrode auxiliaire** : elle complète le circuit électrique et permet le passage du courant. Il s'agit généralement d'une électrode en Pt inerte de grande surface.

La Figure 19 représente le schéma d'un montage à électrochimiques conventionnel à 3 électrodes.

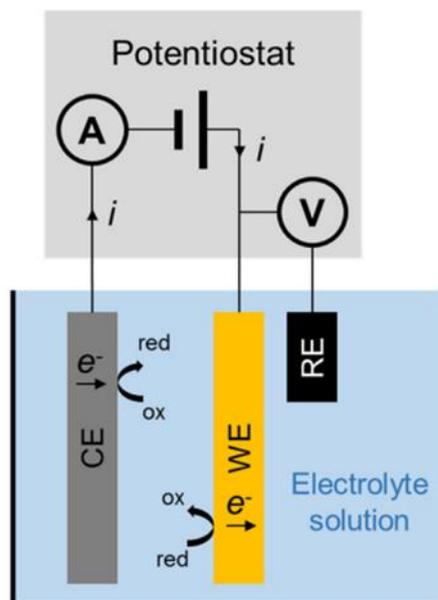


Figure 19: Schéma d'une cellule électrochimique avec montage à 3 électrodes. Reproduit de [131].

L'électrolyte support est un mélange du solvant et d'un conducteur ionique (sel) à une concentration assez élevée pour augmenter la conductivité de la solution et contenir le phénomène de migration. L'électrolyte (la solution) est composé des espèces électroactives susceptibles de pouvoir s'oxyder ou se réduire et de l'électrolyte support.

Les réactions électrochimiques, comme toute autre réaction rédox homogène, donnent lieu à des équilibres régis par la loi de Nernst [135] :

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln(\alpha_{ox}/\alpha_{red}) \quad \text{Equation I-1}$$

où E est le potentiel d'équilibre, E^0 est le potentiel standard de l'espèce, n le nombre d'électrons transférés par molécule, α_{ox} et α_{red} sont les activités relatives de l'analyte oxydé et réduit dans le système. F est la constante de Faraday (96485 C.mol⁻¹) et R est la constante des gaz parfaits (8,314 J.mol⁻¹.K⁻¹).

Les réactions ont lieu à la suite d'un transport de masse du réactif vers la surface de l'électrode de travail. Ce transport a lieu par trois modes : la diffusion dans un gradient de concentration, la migration d'ions dans un gradient de potentiel et la convection. En régime de diffusion limitante, lorsque la substance est oxydée ou réduite à la surface de l'électrode, un gradient de concentration se développe à l'interface électrode/électrolyte. Le profil de diffusion est une fonction du temps et dépend des coefficients de diffusion des ions (ou molécules) qui diffusent.

L'oxydation ou la réduction des espèces chimiques génère un courant dit faradique car régi par la loi de Faraday :

$$q = n.F.n_i \quad \text{Equation I-2}$$

où q est la charge électrique qui traverse l'électrode, n est le nombre d'électrons transférés par molécule, F est la constante de Faraday et n_i est le nombre de moles de l'espèce électroactive « i ».

D'autre part, à l'introduction de l'électrode (conducteur électronique) dans l'électrolyte, il apparaît à l'interface une répartition particulière des charges électriques permettant la continuité du potentiel entre les deux milieux (électrode et électrolyte) qui ont chacun un potentiel interne (potentiel de Fermi et potentiel de Galvani). Cette répartition des charges donne naissance à un condensateur lorsqu'il y a une accumulation de charge (Figure 20). Cette répartition des charges à l'interface est également connue sous le nom de double couche électrochimique (EDL) et se caractérise par une première couche plane suivie d'une couche diffuse. Une première rangée est généralement formée par des anions ou des cations (dépendamment de la polarisation de l'électrode) non solvatés dits spécifiquement adsorbés ou alors par des molécules de solvant dipolaires adsorbées et orientées (molécules d'eau). Ces ions ou ces molécules de solvant organisés de façon compacte forment le plan de Helmholtz interne (PHI). Une deuxième rangée constituée de cations ou d'anions solvatés, ne pouvant s'approcher de l'interface que jusqu'à une distance fixe minimale, forme le plan de Helmholtz externe (PHE). Le potentiel varie linéairement dans la couche compacte et jusqu'au PHE. Après le PHE, le potentiel varie de manière exponentielle dans la couche diffuse où les ions accumulés sont de moins en moins nombreux jusqu'à correspondre au milieu électrolytique. L'épaisseur de l'EDL (couche compacte + couche diffuse) dépend de la concentration des ions, de leur charge, et de la densité de charge du côté du métal (potentiel de l'électrode). L'accumulation de charges au niveau de l'EDL donne naissance au courant dit capacitif.

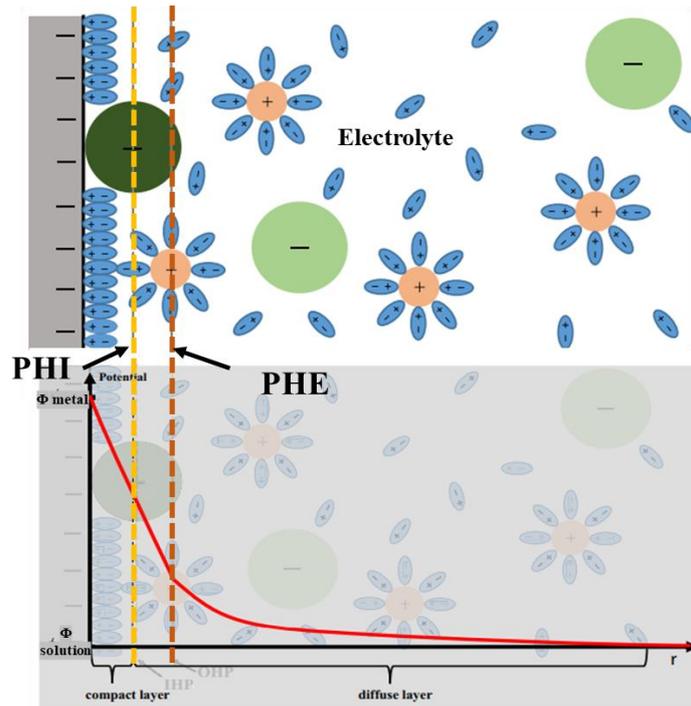


Figure 20: Schéma d'une double couche électrochimique (couche compacte : compact layer, couche diffuse : diffuse layer). PHI plan de Helmholtz intérieur, PHE plan de Helmholtz extérieur. Φ métal et Φ solution sont les potentiels internes du métal et de la solution, respectivement. En abscisse, la distance r de l'interface et en ordonnée le potentiel. Reproduit de [130].

Le courant total mesuré dans la cellule électrochimique est la somme du courant capacitif (I_c) et du courant faradique (I_f) :

$$I = I_c + I_f \quad \text{Equation I-3}$$

La force de l'électrochimie réside essentiellement dans l'aisance avec laquelle la vitesse d'une réaction peut être contrôlée et dans la facilité avec laquelle les paramètres thermodynamiques et cinétiques peuvent être mesurés [132].

4.3.4.2. Les biocapteurs ampérométriques

L'ampérométrie consiste à mesurer le courant produit lorsqu'une espèce électroactive est réduite ou oxydée par voie électrochimique. Dans le cas des biocapteurs ampérométriques, les biorécepteurs immobilisés à la surface de l'électrode de travail peuvent participer à la consommation ou à la production de cette espèce électroactive : c'est le cas des biocapteurs enzymatiques. Le courant qui en résulte est directement lié à la concentration globale de l'espèce électroactive ainsi qu'à la quantité produite ou consommée à la surface proche de l'électrode de travail.

Il est répertorié aujourd'hui trois générations de biocapteurs ampérométriques enzymatiques : ceux sans médiateur, ceux avec médiateur et ceux à transfert électronique direct (plus rares) (Figure 21) [136].

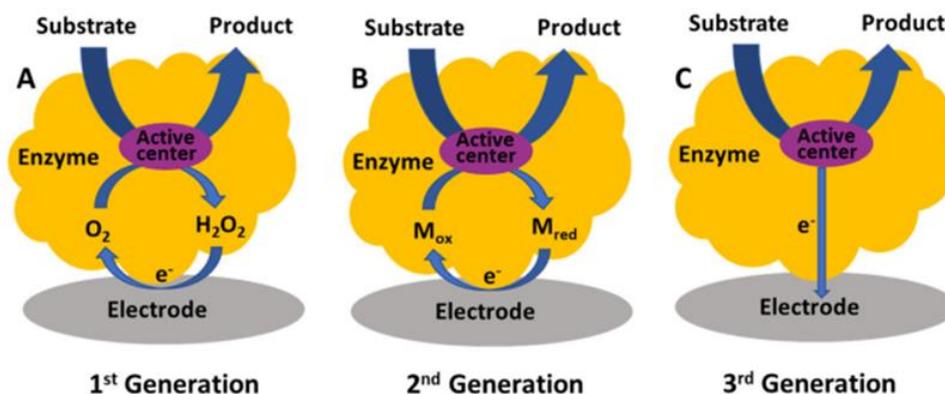


Figure 21: Principe de fonctionnement des différents biocapteurs ampérométriques : a) sans médiateur, (b) avec médiateur, c) à transfert électronique direct. Reproduit de [134].

En raison de la simplicité de sa méthode, de son excellente stabilité et de sa grande sensibilité, le biocapteur ampérométrique de première génération est l'étalon-or pour les biocapteurs enzymatiques. Néanmoins, la mesure s'effectuant généralement à potentiel élevé, ce qui peut impacter certains analytes, de nouveaux matériaux d'électrode sont développés pour réduire les potentiels d'oxydation [137] [138]. Les biocapteurs ampérométriques de deuxième génération font quant à eux recours à un médiateur dont le rôle est de réduire les interférences dues à l'utilisation de potentiels élevés et de permettre une utilisation en continue et sur du long terme. Cependant, leur faible stabilité et la dangerosité des médiateurs en font des biocapteurs peu utilisés *in vivo*. Parce qu'ils sont exempts de médiateurs et d'oxygène, les biocapteurs de troisième génération sont plus performants que les deux générations précédentes. Ils demandent pour cela une connexion directe de l'enzyme à l'électrode afin de maintenir le site catalytique de l'enzyme proche de la surface de l'électrode et de faciliter ainsi le transfert d'électrons et donc ne sont pas compatibles avec toutes les enzymes. Les nanomatériaux ont grandement et continuent de contribuer au développement de ces biocapteurs [139] [140].

Une autre manière de mesurer le courant est de le faire, non à potentiel fixe, mais sur toute une gamme de potentiels : on parle dans ce cas de biocapteurs voltampérométriques. Les techniques voltampérométriques comprennent la voltampérométrie linéaire (LSV), la voltampérométrie cyclique (CV), la voltampérométrie différentielle (DPV) et la voltampérométrie à ondes carrées (SWV) ; l'unicité de chacune d'entre elles repose sur des

différences subtiles dans la manière et le moment où le potentiel est appliqué et le courant mesuré. Seule la voltampérométrie cyclique sera décrite dans la suite.

La voltampérométrie cyclique consiste à mesurer la réponse en courant d'une solution redox active à la suite d'un balayage linéaire cyclique du potentiel entre deux valeurs prédéfinies. Selon le sens de balayage du potentiel, l'espèce redox (sonde redox) subit une oxydation (Figure 22) ou une réduction [141].

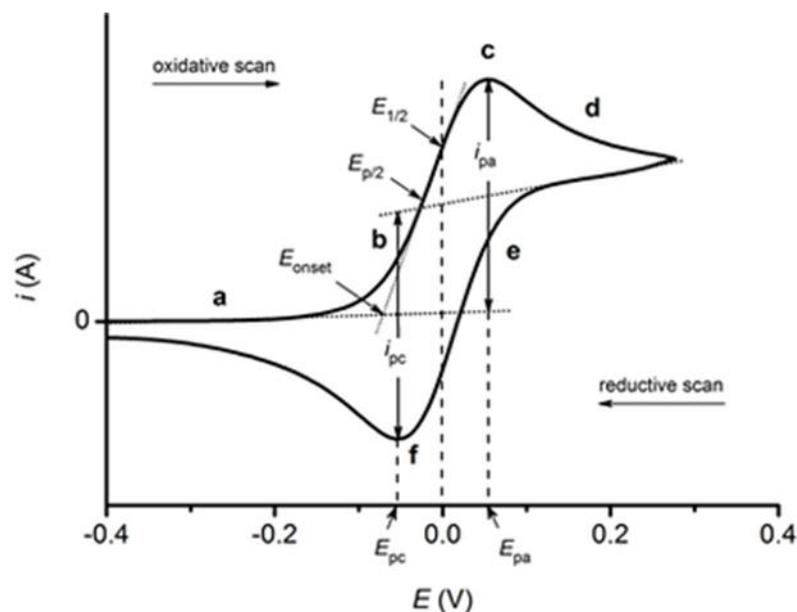


Figure 22: Voltampérogramme cyclique pour un processus d'oxydoréduction électrochimiquement réversible. Reproduit de [139].

Selon la convention IUPAC, dans le cas d'une oxydation de l'espèce rédox, le balayage commence aux bas potentiels et progresse vers des potentiels oxydatifs (surtension positive). Sur la partie (a) du graphique, le potentiel est insuffisant pour oxyder la sonde redox. Ensuite, lorsque ce potentiel devient suffisamment haut, l'espèce redox commence à s'oxyder à la surface de l'électrode de travail (b) et le courant croît de manière exponentielle. Au fur et à mesure que le balayage se poursuit, une plus grande quantité d'oxydant est progressivement épuisée à l'interface. Cela entraîne une modification du gradient de concentration qui est à l'origine du pic de courant (c) du voltampérogramme. Ce pic est dit pic anodique (i_{pa}) et correspond à un potentiel de pic anodique (E_{pa}).

À partir de ce point, lorsque le balayage se déplace vers des potentiels plus élevés, la vitesse de diffusion des espèces redox de la solution vers l'électrode de travail ralentit, ce qui entraîne une baisse du courant (d). Le mouvement de masse de la sonde rédox de la solution vers l'interface est limitant d'un point de vue électrochimique. Lors du balayage retour, lorsque la

tension appliquée atteint le point (e), l'analyte oxydé et accumulé à la surface de l'électrode peut être réduit. Le processus de réduction est similaire au processus d'oxydation. Le pic cathodique (i_{pc}) au potentiel de pic cathodique (E_{pc}) (f) et le sens de balayage opposé sont les seules différences. La vitesse à laquelle est réalisé le balayage joue un rôle important ; des vitesses de balayage plus élevées entraînent une diminution de la taille de la couche de diffusion ayant pour conséquence des courants plus élevés [142] [143].

Pour les processus réversibles en solution (Figure 23.a) [144], l'amplitude et le signe des courants de pic anodiques et cathodiques doivent être égaux. Dans cette configuration, la cinétique de transfert d'électrons doit être suffisamment rapide pour maintenir les concentrations en surface des espèces oxydées et réduites aux valeurs requises par l'équation de Nernst (Equation I-1). La différence de potentiel entre les pics anodique (E_{pa}) et cathodique (E_{pc}) dans ce cas vaut :

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = E_p - E_{p_{1/2}} = \frac{57}{n} \text{ mV } \text{ à } 25^\circ\text{C} \quad \text{Equation I-4 [143]}$$

où E_p est le potentiel de pic, $E_{p_{1/2}}$ (ou E^0) le potentiel de pic à mi-hauteur de courant et n le nombre d'électrons échangés. Le processus est qualifié d'électrochimiquement irréversible (Figure 23.c) lorsque le transfert d'électrons à la surface de l'électrode est lent par rapport au transport de masse. La cinétique lente nécessite des potentiels appliqués nettement plus élevés. La différence ΔE_p vaut dans ce cas :

$$\Delta E_p = E_p - E_{p_{1/2}} = \frac{47,7}{\alpha n} \text{ mV } \text{ à } 25^\circ\text{C} \quad \text{Equation I-5}$$

où α est le coefficient de transfert de charge.

Enfin, les processus quasi-réversibles (Figure 23.b) sont décrits comme étant intermédiaires entre le réversible et l'irréversible. Dans cette configuration, la cinétique de la réaction est contrôlée par le transfert de charge et par la diffusion et $\Delta E_p > \frac{59}{n} \text{ mV}$.

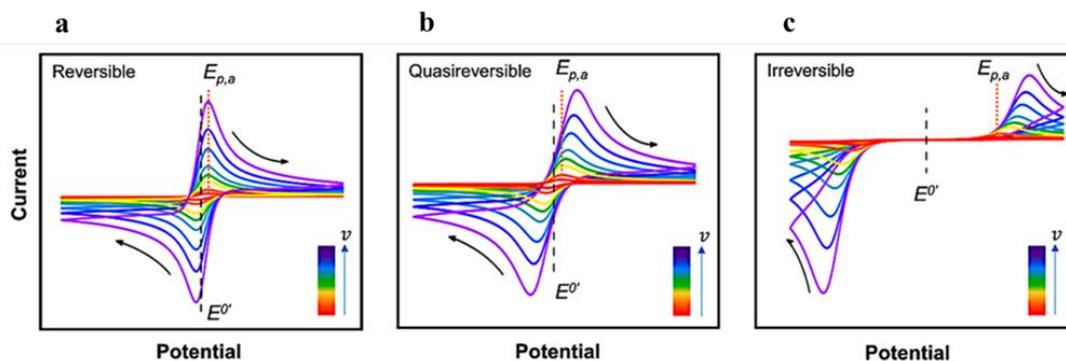


Figure 23: Comparaison des voltampérogrammes cycliques pour (a) un système réversible, (b) un système quasi-réversible et (c) un système irréversible. Reproduit de [142].

Le paramètre ΔE_p offre ainsi des informations importantes sur la réversibilité du système et il est étroitement lié au taux de transfert de charge.

Dans le cas de l'élaboration d'un biocapteur d'affinité (reconnaissance entre une cible en solution et la sonde biologique immobilisée sur l'électrode) lorsqu'il fonctionne grâce à une sonde rédox en solution, ce paramètre, ainsi que l'intensité du courant, fourniront des informations cruciales sur les perturbations à la surface de l'électrode et permettront de caractériser les différentes étapes du processus de biofonctionnalisation et permettront la détection de la molécule cible. C'est le cas, à titre d'exemple, de l'aptacapteur à méthamphétamine développé par M. Alijanianzadeh et son équipe [145]. Ces derniers ont étudié, par voltampérométrie cyclique, la variation (diminution) de l'intensité du courant résultant de l'oxydoréduction du couple ferri/ferrocyanure ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$) à la surface d'une électrode d'or où a été immobilisé un aptamère anti-métamphétamine et à laquelle étaient ajoutées des concentrations croissantes de métamphétamine. Avec ce principe, ils ont pu mettre au point un biocapteur capable de détecter la métamphétamine avec une limite de détection de $5\mu\text{mol.L}^{-1}$.

4.3.4.3. Les biocapteurs potentiométriques

La potentiométrie consiste à mesurer le potentiel, généralement à l'équilibre entre l'électrode de travail et l'électrode de référence ou entre deux électrodes de référence séparées par une membrane sélective (électrode sélective à ions, ISE). Cette technique présente l'avantage d'être simple et de consommer peu d'énergie [146]. De plus, en général, elle ne nécessite que deux électrodes. Il a été démontré que la potentiométrie est relativement insensible à la taille de l'électrode [147], ce qui indique qu'il est possible de miniaturiser le système de détection sans perte de sensibilité. Les ISE constituent l'un des types les plus

populaires de capteurs potentiométriques, où l'équilibre des d'ions au niveau de l'interface membrane sélective/solution entraîne une modification du potentiel mesuré. Si la plus connue de cette application est celle de la mesure du pH avec l'électrode de verre (Figure 24) [148], il existe des ISE pour plusieurs autres ions (F^- , I^- , CN^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , NH_4^+) ou gaz (CO_2 , NH_3) commercialement disponibles.

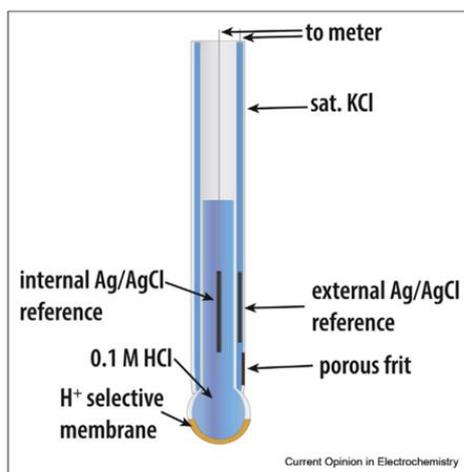


Figure 24: Schéma d'une ISE conventionnelle pour l'analyse du pH d'une solution. Reproduit de [146].

L'équation de Nernst-Donnan stipule que les différences de potentiel entre ces électrodes indicatrices et de référence sont proportionnelles au logarithme de l'activité (ou concentration) ionique ou de la fugacité (ou pression partielle) des gaz.

Si la potentiométrie demeure aujourd'hui la technique de prédilection pour le dosage des ions et gaz, elle est également utilisée pour la détection d'autres cibles telles que les protéines [149], les bactéries [150] [151] ou de petites molécules [152] [153] mais ces exemples éloignés de la thématique de cette thèse ne seront pas développés ici.

4.3.4.4. Les biocapteurs impédancemétriques

Les biocapteurs impédancemétriques sont basés sur la mesure de la variation de l'impédance à la surface de l'électrode de travail sous l'effet d'une perturbation alternative en courant ou en tension autour d'un point de fonctionnement. La technique utilisée porte le nom de spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) qui est un puissant outil non-destructif d'analyse d'interfaces électrochimiques ou de matériau conducteurs tels que les électrolytes solides et liquides, les sels fondus, les verres ou encore les polymères à conduction ionique [154] et est ainsi très utile pour l'étude des systèmes corrosifs, des batteries rechargeables et des piles à combustible.

a. Aspects théoriques

De manière générale, l'EIS peut être galvanostatique (GEIS) ou potentiostatique (PEIS). La GEIS consiste à appliquer une perturbation du courant et à suivre les changements du potentiel. Elle est largement utilisée pour l'étude des batteries et des piles à combustible. Ici il sera décrit uniquement la PEIS qui est celle généralement appliquée aux biocapteurs et qui consiste à appliquer une perturbation en potentiel.

Les biocapteurs impédancemétriques peuvent être utilisés de deux manières différentes [155]. La première méthode implique l'utilisation d'électrodes bloquantes, ce qui signifie que l'électrode est placée dans des conditions où il n'y a pas de transfert d'électron (pas de courant faradique). Les modifications diélectriques de l'interface sont les seuls phénomènes étudiés dans ces biocapteurs. Cependant, cette méthode est beaucoup moins utilisée par rapport à la seconde qui consiste à utiliser une sonde rédox. En effet, lorsque le phénomène de reconnaissance entre le biorécepteur et sa cible ne produit pas ou ne consomme pas d'espèce redox, on peut rajouter une sonde rédox afin de visualiser la reconnaissance. La sonde redox, lorsqu'elle est ajoutée en solution, diffuse jusqu'à la surface de l'électrode à travers l'architecture moléculaire et l'impédance liée à la réaction rédox à la surface de l'électrode peut alors être mesurée par EIS. Grâce au courant généré par la réaction d'oxydation ou de réduction, les capteurs faradiques peuvent atteindre une sensibilité plus élevée que les dispositifs non faradiques.

La PEIS consiste à créer une perturbation alternative sinusoïdale en potentiel (ΔE) de faible amplitude par rapport au potentiel de consigne (souvent le potentiel d'équilibre) appliqué au système rédox et d'en étudier la réponse sinusoïdale résultante au niveau du courant (ΔI). Le potentiel et l'intensité sont reliés par la loi d'Ohm :

$$R = \frac{\Delta E}{\Delta I} \quad \text{Equation I-6}$$

où R est la résistance. Il s'agit d'une relation linéaire qui impose la première règle pour la réalisation d'une mesure d'impédance potentiostatique : la linéarité du système étudié.

Cependant, comme vu précédemment avec la voltampérométrie cyclique, les systèmes rédox ne répondent de manière linéaire que sur d'étroites plages de potentiel (Figure 22). La perturbation sinusoïdale doit alors avoir lieu sur ces étroites plages de linéarité, ce qui requiert une amplitude de perturbation faible (5 à 10 mV) autour du potentiel de perturbation (E_c) (Figure 25.a). Cette amplitude ne doit néanmoins pas être trop faible, au risque de n'avoir

accès qu'à des réponses très faibles en intensité qui ne sont pas distinguables du bruit de fond généré par le montage électrique. Le potentiel appliqué et le courant résultant sont fonction du temps donnés par les relations suivantes :

$$E(t) = E_c + \Delta E(t) = E_c + \Delta E \sin(\omega t) \quad \text{Equation I-7}$$

$$I(t) = I_c + \Delta I(t) = I_c + \Delta I \sin(\omega t + \varphi) \quad \text{Equation I-8}$$

où ω est la pulsation du signal périodique (donnée par $\omega=2\pi f$, où f est la fréquence) et φ est le déphasage (Figure 25.b) [156].

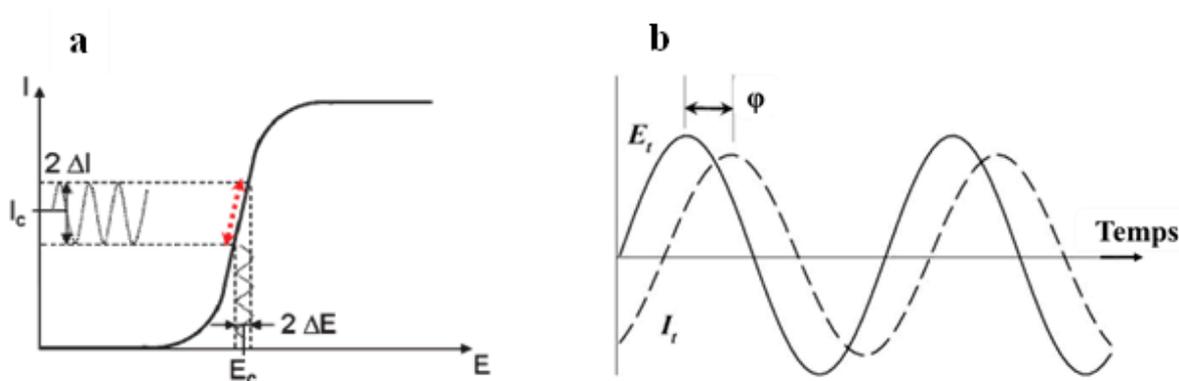


Figure 25: (a) Courbe courant-tension stationnaire d'un système rédox "rapide" avec réponse sinusoïdale en courant à la suite d'une perturbation sinusoïdale en potentiel (b) Déphasage entre le potentiel sinusoïdal et le courant sinusoïdal. Reproduit de [154].

Certains processus électrochimiques sont difficilement voire impossibles à analyser, quand le paramètre temps est utilisé comme indicateur. En effectuant une analyse d'un point de vue fréquentiel, sur une large gamme de fréquences, l'EIS simplifie un système électrochimique complexe du point de vue temporel en plusieurs processus individuels du point de vue fréquentiel. Les processus lents peuvent être sondés à basses fréquences, tandis que les processus rapides peuvent être sondés à hautes fréquences [157]. Le passage du domaine temporel au domaine fréquentiel s'effectue par les transformées de Fourier. Celles-ci permettent d'accéder à l'impédance $Z(\omega)$ en utilisant la loi d'Ohm :

$$Z(\omega) = \frac{E(\omega)}{I(\omega)} \quad \text{Equation I-9}$$

L'impédance $Z(\omega)$ est un nombre complexe caractérisé par un module et un argument qui dépendent de la fréquence. En coordonnées polaires, l'impédance peut également s'écrire :

$$Z(\omega) = |Z|e^{j\varphi} \quad \text{Equation I-10}$$

où $|Z|$ est le module de l'impédance, $j=\sqrt{-1}$ et φ l'argument (ou de déphasage).

Il est également possible d'écrire $Z(\omega)$ en coordonnées cartésiennes :

$$Z(\omega) = \text{Re}[Z(\omega)] + j\text{Im}[Z(\omega)] \quad \text{Equation I-11}$$

où $\text{Re}[Z(\omega)]$ est la partie réelle et $\text{Im}[Z(\omega)]$ la partie imaginaire de l'impédance.

b. Exploitation des résultats

Les données résultant de l'EIS peuvent être représentées de deux manières principales : la représentation de Bode et la représentation de Nyquist. La première consiste à représenter le logarithme du module de l'impédance et le déphasage en fonction logarithme de la fréquence ou de la pulsation de la perturbation ($\log|Z| = f(\log \omega)$ et $\varphi = f(\log \omega)$). Si celle-ci permet d'avoir un accès direct aux valeurs de $|Z|$, elle ne permet pas de visualiser directement les informations sur les différents processus électrochimiques se déroulant à la surface de l'électrode.

La représentation de Nyquist des électrochimistes, la plus utilisée, consiste quant à elle au tracé des valeurs de l'inverse de la partie imaginaire de l'impédance en fonction de la partie réelle ($-\text{Im}(z) = f(\text{Re}(Z))$) à chaque fréquence d'excitation (Figure 26.a).

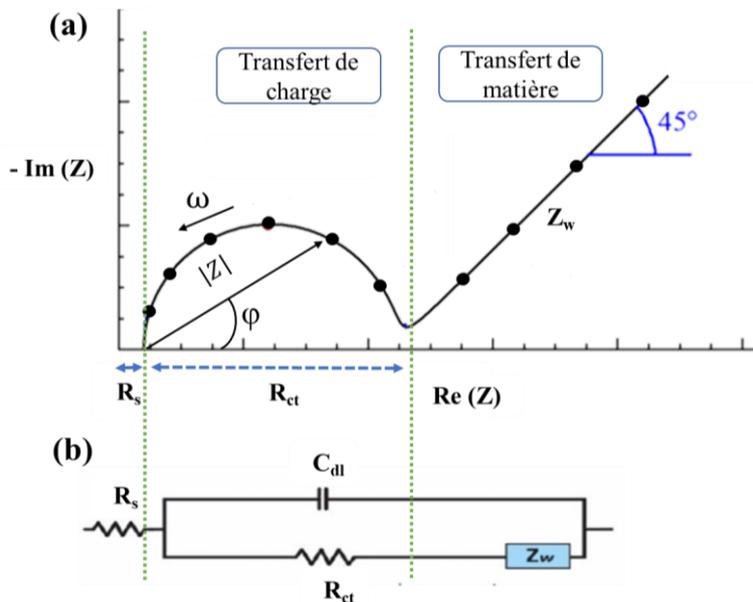


Figure 26: Exemple de représentation de Nyquist d'impédance d'une électrode en contact avec une solution (a) et son circuit de Randles équivalent (b).

Cette représentation, bien que ne montrant pas des données explicites sur les valeurs de $|Z|$ et de la fréquence f , offre la possibilité d'effectuer une analyse qualitative sur les phénomènes électrochimiques ayant lieu à l'interface électrode/solution. Le diagramme de Nyquist doit être réalisé dans un repère orthonormé au risque de le déformer et d'en tirer des informations erronées notamment sur les angles.

Les différents phénomènes ayant lieu en présence de la sonde rédox peuvent être représentés par des composants électriques (résistance, capacitance ou inductance) ; à chaque diagramme de Nyquist il est donc possible de faire correspondre au moins un circuit électrique équivalent. Le plus employé pour décrire les biocapteurs porte le nom de circuit de Randles (Figure 26.b). C'est aussi celui utilisé pour des espèces rédox en solution étudiés sur électrode nue. Le passage des données expérimentales obtenues (diagramme de Nyquist) au circuit de Randles correspondant et des valeurs de ses composants se fait par un traitement de données du nom de « fitting » (ajustement). Il nécessite généralement une estimation manuelle des valeurs initiales avant l'utilisation des algorithmes de régression tels que les moindres carrés non linéaires complexes [158].

Les composants électriques sont généralement :

- **La résistance de la solution (R_s)** : elle résulte de la mise en contact de l'électrode avec la solution électrolytique et de la distance entre l'électrode de travail et l'électrode de référence en potentiel. Sa valeur dépend essentiellement du type l'électrolyte utilisé, de la force ionique, de la température et de la surface géométrique de l'électrode de travail.

Elle est déterminée à haute fréquence et vaut :

$$Z_{R_s}(\omega) = R_s \quad \text{Equation I-12}$$

- **La capacité de la double couche C_{dl}** : elle représente la charge globale stockée à l'interface électrode/solution (figure 27) [159]. Elle provient de l'accumulation des ions créant ainsi un condensateur à la surface de l'électrode. Son impédance est donnée par :

$$Z_{C_{dl}}(\omega) = \frac{1}{j\omega C} \quad \text{Equation I-13}$$

Expérimentalement, il n'existe pas de condensateur idéal. Un élément à phase constante (CPE) est inclus pour simuler ou reproduire ce comportement de capacité

non idéal. Ce phénomène peut être expliqué par plusieurs paramètres tels que la porosité, la non-homogénéité et la rugosité de la surface des matériaux étudiés [160]. L'impédance d'un CPE est donnée par :

$$Z_{CPE}(\omega) = \frac{1}{Q(j\omega)^n} \quad \text{Equation I-14}$$

où Q est l'admittance à $\omega = 1 \text{ rad s}^{-1}$, et n est un nombre réel compris entre 0 et 1. On pourra noter que pour $n = 0$, l'impédance correspond à celle d'une résistance, tandis que pour $n = 1$, on retrouve celle d'une capacité idéale où $Q = C$.

- **La résistance au transfert de charge R_{ct}** : elle est liée à l'opposition au flux d'électrons provenant de l'oxydation de la sonde rédox à la surface de l'électrode. Pour un biocapteur, c'est en général le principal paramètre d'intérêt en termes de signal. Son impédance vaut :

$$Z_{R_{ct}}(\omega) = R_{ct} \quad \text{Equation I-15}$$

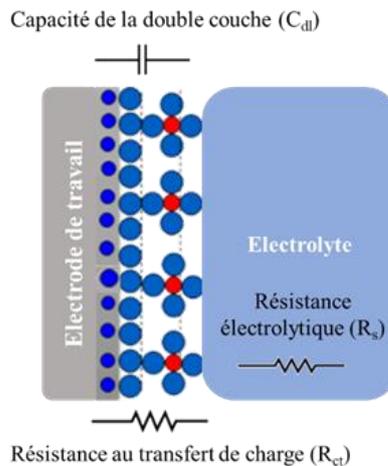


Figure 27: Schéma décrivant les différents composants électriques du circuit de Randles à l'interface électrode/solution. Inspiré de [157].

Les deux éléments, R_{ct} et C_{dl} sont en parallèle dans le circuit électrique et décrivent ce qui se passe à l'interface (figure 27).

Le processus de diffusion produit l'impédance de Warburg. Il existe trois types d'impédance de Warburg : le Warburg semi-infini Z_w (diffusion sur une distance semi-infini), le Warburg limité Z_{W_δ} (diffusion dans une couche limitée, δ , c'est le cas des électrodes à disque tournant) et le Warburg restreint $Z_{W_{rest}}$ (diffusion dans une couche mince restreinte

d'épaisseur définie et qui n'est pas approvisionnée en espèce électroactive par le reste de la solution).

Dans nos travaux seule le Warburg semi-infini Z_w sera évoqué car il correspond aux conditions opérationnelles. Sur le diagramme de Nyquist, ce terme est traduit par une pente de 45° (figure 27.a).

Comme décrit plus haut avec la voltampérométrie cyclique, le courant total traversant la surface active est la somme des contributions des processus faradique (I_f) et capacitif (I_c). Ainsi, dans le circuit de Randles, les résistances de transfert de charge et de Warburg (R_{ct} et Z_w) sont représentées en série et sont connectées en parallèle avec la capacité de la double couche C_{dl} . La résistance de la solution électrolytique devant être traversée par tous les courants, R_s est finalement connectée en série avec le circuit précédent (Figure 26.b) [161].

III. Les aptamères comme éléments de reconnaissance moléculaire pour la détection de l'arginine vasopressine: état de l'art

Dans le défi de développer des techniques assez sensibles et innovatrices pour la détection de petites molécules telles que l'arginine vasopressine, plusieurs équipes de différentes spécialités se mobilisent. Ainsi, il est retrouvé dans la littérature plusieurs méthodes décrites à ce sujet. Dans cette partie nous présentons une liste non exhaustive des différentes approches élaborées utilisant les aptamères pour la détection de l'arginine vasopressine. Ces tableaux présentent les principes d'immobilisation, la technique de transduction du signal, la gamme de linéarité et limite de détection pour les différentes techniques. Ces techniques sont regroupées ici en deux groupes : les techniques optiques (Tableau 2) et les techniques électrochimiques (Tableau 3).

Chapitre I: Etat de l'art

Tableau 2: Comparaison des techniques de détection optiques utilisant les aptamères pour la détection de l'AVP.

	Stratégie d'immobilisation	Technique de transduction	Gamme de linéarité	Limite de détection (LOD)	Référence
Aptamère non immobilisé	-	Colorimétrie	125-225 nmol.L ⁻¹	-	[162]
	-	Colorimétrie	-	16 µmol.L ⁻¹	[163]
	-	Fluorescence	100 nmol.L ⁻¹ 10 µmol.L ⁻¹	100 nmol.L ⁻¹	[164]
	-	Fluorescence	-	2 nmol.L ⁻¹	[165]
	-	Anisotropie de fluorescence	-	0,2 µmol.L ⁻¹	[166]
	-	Anisotropie de fluorescence	2.3 – 150 nmol.L ⁻¹	7,9 nmol.L ⁻¹	[167]
Aptamère immobilisé	Streptavidine/Biotine-aptamère	Chemiluminescence	0.1 nmol.L ⁻¹ – 1 µmol.L ⁻¹	79 pmol.L ⁻¹	[168]
	Nanopilliers d'or/Aptamère thiolé	Spectroscopie Raman (SERS)	-	1 pmol.L ⁻¹	[169]
	Réseau de nano-tubes d'or/Aptamère thiolé	Spectroscopie Raman (SERS)	-	11.28 pmol.L ⁻¹	[170]

Chapitre I: Etat de l'art

Tableau 3: Comparaison des techniques de détection électrochimiques utilisant les aptamères pour la détection de l'AVP.

	Stratégie d'immobilisation	Technique de transduction	Gamme de linéarité	Limite de détection (LOD)	Référence
Aptamère immobilisé	Au/CNTs/EDC/NHS-aptamère	Ampérométrie	-	43 pmol.L ⁻¹	[171]
	ITO/PDDA-MB/PSS-G/Aptamère/BSA	DPV	0.92-244 nmol.L ⁻¹	0.92 nmol.L ⁻¹	[172]
	Graphène-silice mésoporeuse-nanoparticules d'or hybrides (GSGHs)/Aptamère thiolé	DPV	4.61 nmol.L ⁻¹ -52.1 μmol.L ⁻¹	287 pmol.L ⁻¹	[173]
	Graphène/APTES/GA/Aptamère	Field effect transistor (FET)	0.92 amol.L ⁻¹ -0.92 pmol.L ⁻¹	3.27 amol.L ⁻¹	[174]
	-	Field effect transistor (FET)	-	-	[175]

IV. Objectifs de la thèse

L'état de l'art sur les techniques utilisant les aptamères pour la détection de l'AVP a permis de mettre en exergue l'efficacité des biocapteurs électrochimiques par rapport à d'autres types de biocapteurs (meilleure sensibilité et simplicité des techniques de transduction). Néanmoins, pour la plupart des travaux décrits, l'assemblage des capteurs paraît relativement complexe, notamment l'étape d'immobilisation de l'aptamère. De plus, peu de ces travaux se sont intéressés à la spécificité de détection des outils mis au point.

Ce projet de thèse vise donc à développer un aptacapteur électrochimique capable de détecter l'arginine vasopressine de manière sensible (échelle picomolaire) et spécifique dans des milieux simples et complexes telles que les urines). L'étape critique pour la conception de ce type de biocapteur étant l'immobilisation de l'élément de biorecognition (l'aptamère) à la surface de l'électrode, l'essentiel du projet a été consacré à déterminer les conditions optimales d'immobilisation permettant d'obtenir les meilleures performances en termes de sensibilité et de spécificité.

Comme décrit précédemment, la souplesse des aptamères vis-à-vis des modifications chimiques et la diversité des techniques d'immobilisation offrent une pluralité de possibilités en termes de stratégie d'immobilisation à la surface des électrodes. Si certaines d'entre elles sont reconnues classiques et ancrées dans le milieu depuis plusieurs décennies (greffage chimique covalent à l'aide de groupements $-NH_2$ ou $-SH$ de l'aptamère, affinité biochimique avidine-biotine), d'autres sont assez récentes et continuent de susciter de l'intérêt (immobilisation à partir de polymères électrogénérés [125]). Ces différentes techniques ont été explorées pour l'immobilisation de l'aptamère arginine vasopressine tout en optimisant d'autres paramètres pouvant affecter les performances du biocapteur dans son ensemble.

Les résultats obtenus pour les techniques à base de polymères électrogénérés sont décrits et discutés en détail dans le chapitre II et ceux pour les techniques de greffage chimique covalent dans le chapitre III. D'autres aptamères dédiés à d'autres cibles de petite taille telles que l'adénosine et la tyrosinamide ont également été testés et les résultats obtenus sont présentés au chapitre II. Indépendamment de la technique d'immobilisation et pour répondre à des spécifications précises en termes de sensibilité, la spectroscopie d'impédance électrochimique a été retenue comme technique principale de transduction.

Chapitre II : Biocapteurs
impédancemétriques à base de
polymères électrogénérés.

Chapitre II : Biocapteurs impédancemétriques à base de polymères électrogénérés

Comme mentionné dans le précédent chapitre, il existe de nombreuses techniques d'immobilisation des éléments de biorecognition sur une surface. Pour les biocapteurs électrochimiques, celle basée sur les polymères électrogénérés est une spécialité de l'équipe BioCEN du Département de Chimie Moléculaire de l'Université Grenoble Alpes. Il s'agit d'une technique simple permettant de maintenir, d'un point de vue moléculaire, le biorécepteur assez proche de la surface de l'électrode et d'obtenir ainsi des biocapteurs de haute performance. Elle a ainsi été utilisée avec succès dans l'élaboration de biocapteurs enzymatiques [176], [177], d'immunocapteurs [178], de capteurs à ADN [179] ou encore d'aptacapteurs [180]–[182].

Dans ce chapitre, il est décrit l'élaboration et la caractérisation d'aptacapteurs électrochimiques à base de polymères électrogénérés pour la détection de l'arginine vasopressine, la tyrosinamide et l'adénosine.

I. Les polymères conducteurs en électrochimie : exemple du polypyrrole

La plupart des polymères organiques ont été longtemps considérés comme isolants et utilisés comme tels (emballage, isolation électrique etc...). La découverte dans les années 70 de polymères organiques conducteurs tels que la polyaniline, le polyacéthylène ou encore le polypyrrole a permis d'élargir le champ d'applications de ces matériaux (technologies LED et OLED, stockage électrochimique de l'énergie, biocapteurs etc...) [183]–[185].

Nous nous sommes intéressés pour nos travaux au polypyrrole et à son utilisation dans le développement de biocapteurs.

Du fait de la facilité et du faible coût de sa préparation et de sa biocompatibilité le polypyrrole est un polymère très utilisé dans l'élaboration de biocapteurs. Il peut être synthétisé soit par voie chimique (en général, par oxydation de monomères de pyrrole par un agent oxydant tel que le chlorure de fer III (FeCl_3) ou le persulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) [186], soit par voie électrochimique (dépôt du film de polypyrrole directement sur la surface d'une électrode) en mode potentiostatique, galvanostatique ou potentiodynamique [187]. Nos travaux sont basés uniquement sur la synthèse par voie

électrochimique (électropolymérisation) qui permet aisément de former un film fin sur une électrode puisque la réaction se produit seulement à l'interface électrode/solution alors que la polymérisation chimique se produit dans tout le volume de la solution. La Figure 28 représente le schéma de polymérisation d'un motif pyrrole.

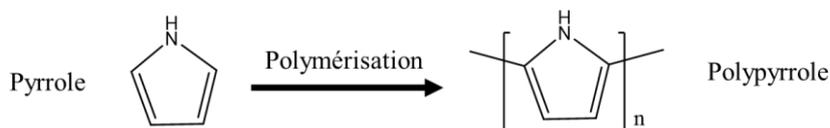


Figure 28: Schéma de polymérisation d'un motif pyrrole

Il s'agit d'une polymérisation anodique de motifs pyrrole à la surface de matériaux conducteurs ou de métal noble tels que l'or ou encore le platine. Elle présente des avantages tels qu'une facilité et une rapidité de mise en œuvre, un bon contrôle de l'épaisseur, de la structure et donc de la reproductibilité du film.

Initialement plusieurs modèles de mécanisme d'électropolymérisation avaient été proposés [188] mais celui de Diaz [189] est celui officiellement retenu aujourd'hui. Résumé avec les équations de la Figure 29, ce dernier décrit une combinaison de plusieurs réactions successives (formation puis couplage de cations radicalaires et déprotonation) [187].

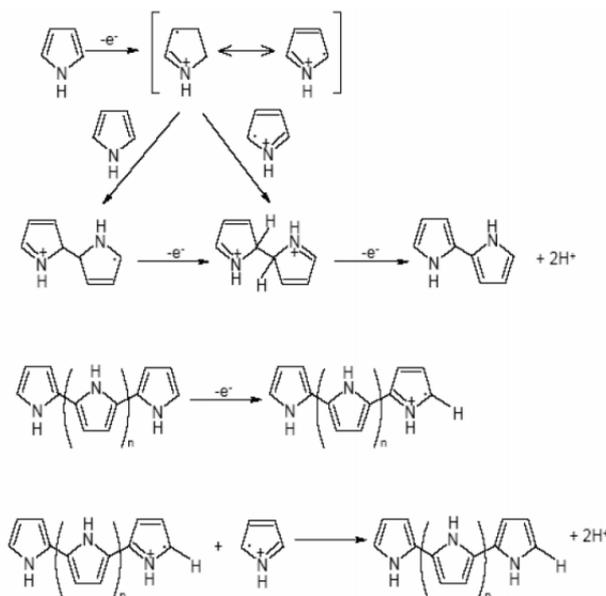


Figure 29: Représentation du mécanisme de polymérisation du pyrrole selon Diaz et al. Reproduit de [187].

L'hydrogène porté par l'azote peut être substitué par une chaîne alkyle. Dans le cas des biocapteurs, cette chaîne porte à son bout un groupement chimique fonctionnel qui pourra être utilisé pour la fixation du biorécepteur. Dans nos travaux, nous avons testé trois types de

polypyrrole : le polypyrrole nitrilotriacétique (polypyrrole NTA), le polypyrrole N-hydroxysuccinimide (polypyrrole NHS) et le polypyrrole adamantane (Figure 30).

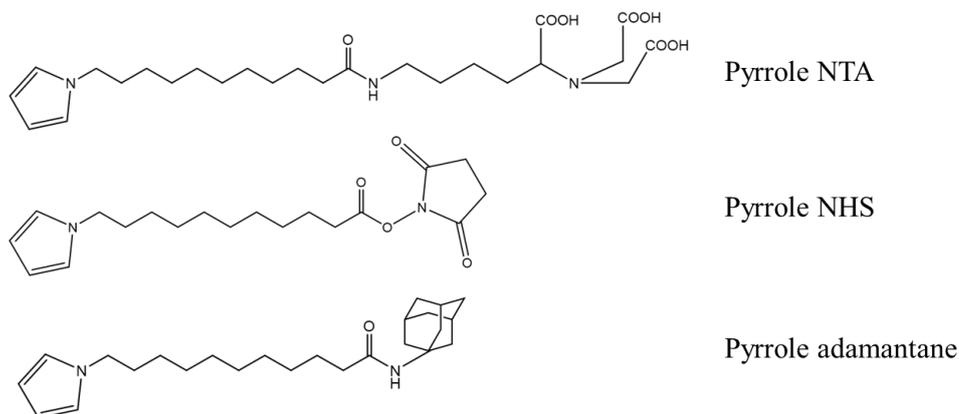


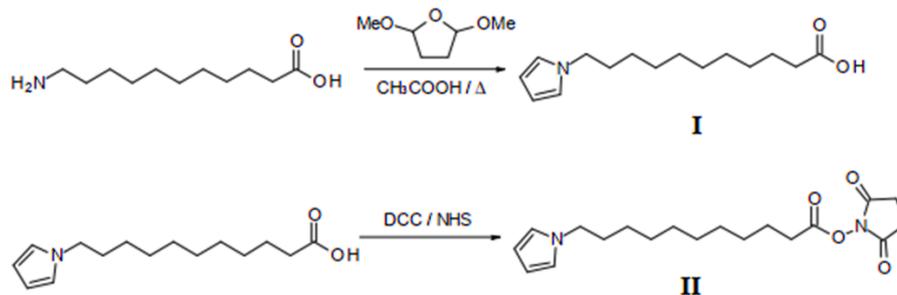
Figure 30: Les différents types de pyrrole utilisés.

Il est à préciser que ces trois monomères de pyrrole utilisés pour nos travaux ont tous été synthétisés par le Plateau de Synthèse Organique du Département de Chimie Moléculaire de l'Université Grenoble Alpes.

II. Elaboration d'un biocapteur à base de polypyrrole NHS pour la détection de l'AVP

La réaction entre le groupement NHS et les amines primaires est un standard très utilisé pour l'immobilisation des biomolécules. Elle permet la formation d'une liaison de type amide qui est une liaison covalente et par conséquent assez solide pour éviter un éventuel détachement de la biomolécule fixée à la surface de l'électrode.

Le pyrrole NHS provient d'une estérification de l'acide 1-(11-undécanoïque) pyrrole par le NHS en présence de N, N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (Figure 31) [190].



I Acide 1-(11-undécanoïque) pyrrole

II Ester activé de I

Figure 31: Schéma de synthèse du pyrrole NHS. Reproduit de [190].

En plus d'être neutre (ce qui en fait un bon substrat d'immobilisation pour le développement de biocapteurs pour la détection de protéines telles que l'AVP), le polypyrrole NHS présente l'avantage de permettre une immobilisation en une seule étape des biomolécules portant une fonction amine primaire à leur extrémité. Il pourrait donc permettre d'obtenir un biocapteur à la fois sensible et sélectif ; tous ces avantages justifient son choix en première intention.

1. Préparation des électrodes

1.1. Choix de la technique d'électropolymérisation

Comme décrit précédemment, l'électropolymérisation peut se faire par plusieurs techniques. Néanmoins, quelle que soit la technique utilisée, il convient de s'assurer qu'elle permet de former une couche de polymère avec un certain nombre de propriétés (faible épaisseur, homogénéité) adaptées aux performances du biocapteur.

1.1.1. Caractérisation du monomère

La caractérisation du monomère de pyrrole NHS a été réalisée en milieu organique qui est également le milieu de synthèse du polymère en utilisant une électrode de travail en platine, de diamètre $\Phi = 3$ mm et préalablement nettoyée. Une solution à 2 mmol.L^{-1} du monomère a été préparée en dissolvant du pyrrole NHS dans une solution de $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$. Un pic anodique irréversible du pyrrole est observé à $0,93 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$ (dans une solution de $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de AgNO_3 dans la solution électrolytique) sur le voltampérogramme cyclique obtenu (Figure 32). Ce pic correspond à l'oxydation irréversible du motif pyrrole du monomère en radical cation, première étape de l'électropolymérisation.

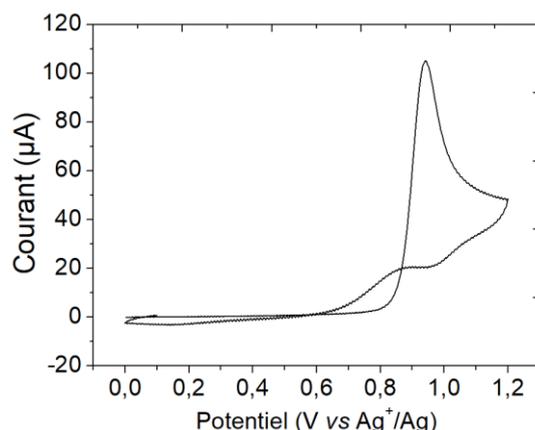


Figure 32: Voltampérogramme cyclique d'une solution de monomère de pyrrole $2.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ sur électrode de platine ($\Phi = 3 \text{ mm}$) à une vitesse de balayage de $0,1 \text{ V.s}^{-1}$.

1.1.2. Electropolymérisation par voltampérométrie cyclique

L'une des techniques de formation du polymère est la voltampérométrie cyclique. 10 balayages successifs entre 0 et 0,8 V vs Ag^+/Ag (dans une solution de $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de AgNO_3 dans la solution électrolytique) ont été réalisés. Le choix du potentiel d'oxydation (0,8 V) est dicté par deux contraintes principales. La première est que le potentiel choisi doit être assez bas (moins de 1,2 V) pour éviter la dégradation oxydative du film de polymère qui conduit à la perte de ses propriétés de conduction électrique (phénomène de suroxydation) [191] [192]. La seconde contrainte est qu'il faut atteindre un potentiel suffisant pour amorcer l'oxydation du monomère (au pied du pic irréversible du monomère). Un signal rédox réversible électroactif typique d'un poly(pyrrole-N-alkyl) apparaît autour de 0,27 V vs Ag^+/Ag (Figure 33A). La formation d'un film de polypyrrole à la surface de l'électrode est caractérisée par l'augmentation de l'intensité du signal au fur à mesure des cycles, avec 1 électron échangé pour 3 motifs pyrrole polymérisés.

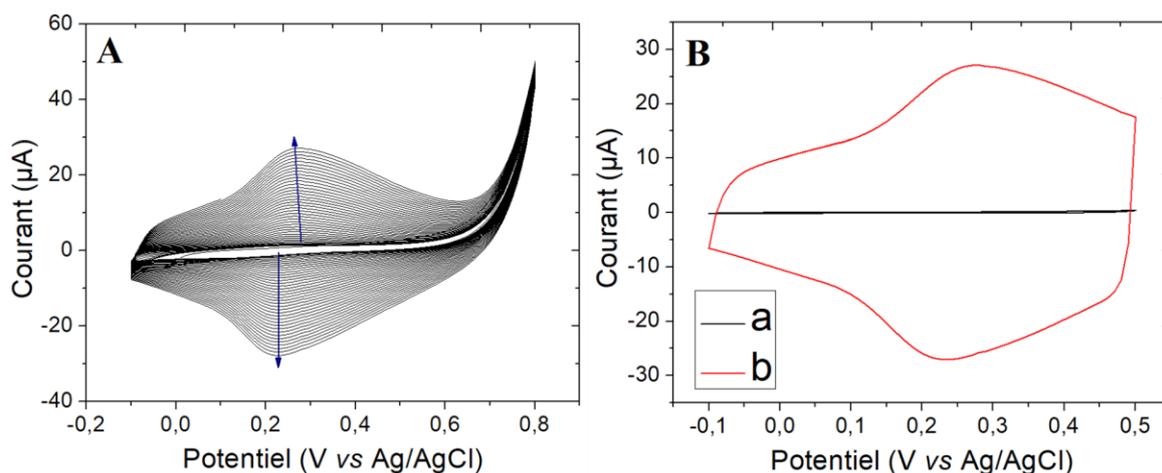


Figure 33: A) Electropolymérisation par voltampérométrie cyclique du pyrrole NHS ($2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) dans $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ sur électrode de platine ($\Phi = 3 \text{ mm}$) à une vitesse de balayage de $0,1 \text{ V.s}^{-1}$. B) Voltampérogrammes cycliques de l'électrode nue (a) et recouverte de polypyrrole NHS (b) transférées dans une solution de $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ exempte de monomère à une vitesse de balayage de $0,1 \text{ V.s}^{-1}$.

Pour confirmer la formation et l'adhérence du film de polypyrrole à la surface de l'électrode, une nouvelle caractérisation est effectuée en transférant l'électrode dans une solution électrolytique ($\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$) exempte de monomère. Le voltampérogramme cyclique obtenu (Figure 33B) montre la persistance du signal rédox réversible avec un pic de courant anodique d'intensité $I_{\text{pa}} = 25 \pm 1 \mu\text{A}$ (Figure 33B.b). Cette technique de polymérisation bien qu'efficace ne permet pas de contrôler l'épaisseur de la couche de polymère déposée.

1.1.3. Electropolymérisation par chronoampérométrie

L'électropolymérisation par chronoampérométrie (mode potentiostatique) permet de contrôler l'épaisseur de la couche de polymère déposée par le contrôle de la charge électrique consommée pendant l'électropolymérisation. Nous basant sur de précédents travaux d'optimisation de la densité de charge [182] [190], il a été retenu pour nos travaux, une densité de charge optimale de $2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$, soit une charge $Q = 0,18 \text{ mC}$ pour une électrode de diamètre $\Phi = 3 \text{ mm}$.

Les contraintes liées aux choix du potentiel décrites précédemment ont permis de fixer le potentiel d'oxydation à $E = 0,82 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$ dans une solution de $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de AgNO_3 dans la solution électrolytique (potentiel au pied du pic d'oxydation irréversible du monomère).

Une fois le dépôt effectué, le film de polymère est caractérisé dans une solution électrolytique exempte de monomère par voltampérométrie cyclique (Figure 34). La persistance du signal rédox du polymère (Figure 34.b) témoigne de son adhérence à la surface de l'électrode cependant on remarquera que l'électroactivité du film polymère est de moins bonne qualité que celle obtenue par voltampérométrie cyclique. En effet, on ne voit pas de pic anodique et cathodique comme pouvait le montrer la voltampérométrie cyclique. On soupçonne seulement une légère bosse anodique et cathodique autour de 0,2-0,3 V.

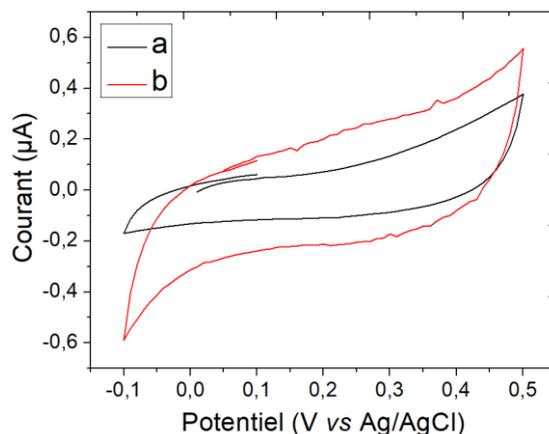


Figure 34: Voltampérogrammes cycliques d'une électrode de platine ($\Phi = 3 \text{ mm}$) modifiée avec le polypyrrole-NHS polymérisé par électrolyse à potentiel constant $E = 0,82 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$ ($Q = 0,18 \text{ mC}$) et transférée dans $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ exempt de monomère avec une vitesse de balayage de $0,1 \text{ V.s}^{-1}$: a) électrode nue ; b) électrode avec polypyrrole NHS.

Avant de poursuivre les différentes étapes conduisant au greffage de l'aptamère, nous nous sommes intéressés au rendement de l'électropolymérisation. Ce rendement est calculé à partir des concentrations surfaciques théorique et réel en polypyrrole NHS à la surface de l'électrode : $\eta = \Gamma_{\text{réelle}} / \Gamma_{\text{théorique}}$.

La concentration surfacique peut être calculée en intégrant la charge du signal rédox du polymère (Figure 34) grâce à la formule :

$$\Gamma \text{ (mole.cm}^{-2}\text{)} = Q/nFA \quad \text{Equation II-1}$$

avec Q la charge intégrée sous les pics anodique ou cathodique, n le nombre d'électrons échangés, F la constante de Faraday et A la surface géométrique de l'électrode. Cette concentration surfacique reflète la concentration en sites électroactifs (ici motif pyrrole électroactifs du polypyrrole) par unité de surface et est dit «réel» ($\Gamma_{\text{réel}}$). Il est calculé en considérant $n = 0,33$, qui est le nombre d'électrons produit par motif pyrrole du polypyrrole. D'autre part, la charge limite imposée lors de l'électropolymérisation ($Q = 0,18 \text{ mC}$) permet

de calculer la concentration surfacique théorique ($\Gamma_{\text{théorique}}$) en considérant que 2,33 électrons sont produits (2 électrons pour l'électropolymérisation d'un motif pyrrole libre et 0,33 électron pour l'oxydation d'un motif pyrrole du polypyrrole, les deux phénomènes se produisant simultanément). Grâce au calcul de $\Gamma_{\text{réelle}}$ et $\Gamma_{\text{théorique}}$, le rendement de d'électropolymérisation du pyrrole NHS a été évalué à $\eta = 3 \%$ ($\Gamma_{\text{réelle}} = 3,65 \cdot 10^{-10} \text{ mole.cm}^{-2}$ et $\Gamma_{\text{théorique}} = 1,13 \cdot 10^{-8} \text{ mole.cm}^{-2}$). Ce faible rendement montre que le pyrrole NHS, malgré sa bonne solubilité dans la solution électrolytique, ne polymérise pas de manière efficace. Le polymère créé semble avoir une très faible électroactivité. Cette valeur très faible pourrait signifier que la polymérisation réalisée par chronoampérométrie, bien qu'effective, produit des courtes chaînes de polymères qui ne sont pas suffisamment connectées entre elles. Certaines chaînes polymères pourraient se retrouver isolées et dans ce cas, la voltampérométrie cyclique ne permettrait pas de rendre compte de la totalité du polymère formé. Malgré tout, c'est cette technique qui a été retenue pour fabriquer l'assemblage moléculaire du biocapteur car cette technique permet d'obtenir des films fins et reproductibles contrairement à la voltampérométrie cyclique.

1.2. Greffage de l'aptamère anti-AVP

L'aptamère anti-vasopressine utilisé pour nos travaux est l'énantiomère D en série ADN isolé par Williams et al. [193] et qui a été plusieurs fois utilisé dans le développement de biocapteurs et d'essais pour la détection de l'arginine vasopressine (voir review en annexe). Il s'agit d'un aptamère en tige-boucle de 55 bases (Figure 35).

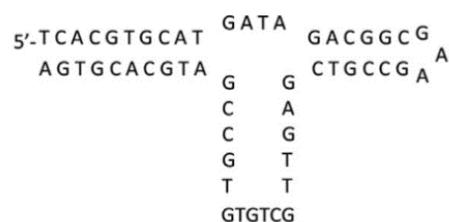


Figure 35: Structure secondaire de l'aptamère anti-arginine vasopressine. Reproduit de [193].

Alors qu'à terme, la molécule d'intérêt est la L-AVP (énantiomère naturel), pour des raisons de coût (l'énantiomère D de l'aptamère est environ 10 fois moins coûteux que l'énantiomère L), le développement du biocapteur est réalisé entièrement en configuration D (fonctionnalisation des électrodes avec le D-aptamère pour la détection de la D-AVP). La L-AVP est utilisée pour effectuer le contrôle de sélectivité du biocapteur.

L'immobilisation par l'usage du polypyrrole NHS présente l'avantage de se faire en une seule étape qui est basée sur la capacité de l'ester activé NHS à former un amide avec une amine primaire (Figure 36) [194].

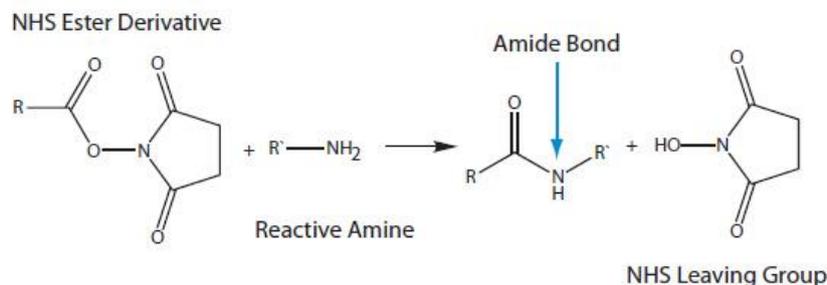


Figure 36: Schéma réactionnel du groupement NHS avec une amine primaire. Inspiré de [19].

L'aptamère a, à cet effet, été modifié par une fonction amine terminale à son extrémité 5' suivi d'un espaceur alkyl (séquence : 5' NH₂-(CH₂)₁₂- TCA-CGT-GCA-TGA-TAG-ACG-GCG-AAG-CCG-TCG-AGT-TGC-TGT-GTG-CCG-ATG-CAC-GTG-A 3'). Une solution de 1 μmol.L⁻¹ de cet aptamère a été préparée dans du tampon phosphate à 0,1 mol.L⁻¹ salin (10 mmol.L⁻¹ de NaCl, 5 mmol.L⁻¹ de KCl, 1 mmol.L⁻¹ de MgCl₂), pH = 7,4. Il est à noter que la composition de cette solution tampon phosphate restera la même pour toutes les autres expériences réalisées au cours de nos travaux.

L'aptamère a ensuite été dénaturé à 80°C avant d'être placé dans de la glace pendant 30 minutes pour figer sa structure ; 15 μL de la solution de l'aptamère ont ensuite été déposés à la surface des électrodes fonctionnalisées par le polypyrrole NHS pour une incubation d'une nuit. La Figure 37 présente le schéma d'immobilisation d'un aptamère modifié par une amine sur des électrodes fonctionnalisées par le polypyrrole NHS.

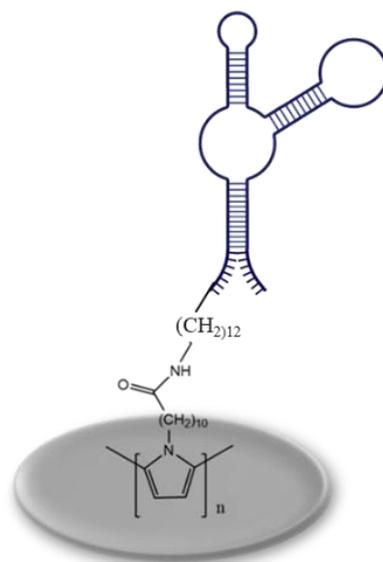


Figure 37: Schéma du principe d'immobilisation d'un aptamère à l'aide du polypyrrole NHS.

1.3. Caractérisation des différentes étapes de fonctionnalisation

La voltampérométrie cyclique et la spectroscopie d'impédance électrochimique ont été retenues comme méthodes de caractérisation électrochimiques. Ayant opté pour le développement d'une technique de détection sans marquage, l'utilisation d'une sonde électrochimique en solution s'est avérée nécessaire. Pour le développement de biocapteurs, plusieurs sondes électrochimiques utilisées en solution sont répertoriées dans la littérature : le couple ferri/ferrocyanure $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, le couple $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$, le bleu de méthylène (MB) [195] ou encore l'hydroquinone (QH_2) [196]. Le $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ et le MB peut se lier à l'aptamère, ce qui n'en fait pas des sondes électrochimiques adéquates à utiliser en solution pour les aptacapteurs [197] [198]. Bien que le QH_2 présente l'avantage d'être neutre par rapport au $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (et donc adapté aux surfaces éventuellement chargées) il est photosensible et peut donc poser des problèmes de stabilité du signal électrochimique si certaines conditions expérimentales ne sont pas respectées (préparation extemporanée, protection de la solution contre la lumière).

La neutralité du polypyrrole NHS a permis l'utilisation de la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ comme sonde électrochimique pour les différentes caractérisations (Figure 38). Ces caractérisations ont été effectuées par voltampérométrie cyclique à une vitesse de balayage de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ et par spectroscopie d'impédance électrochimique. Concernant ce dernier, les mesures ont été effectuées à un potentiel de consigne de $0,23 \text{ V vs Ag/AgCl}$ dans une solution saturée en KCl avec une amplitude de perturbation $10 \text{ mV}_{\text{rms}}$ entre 50 kHz et $0,1 \text{ Hz}$ avec une acquisition de

13 points par décade en fréquence. Ces paramètres de mesure seront les mêmes pour toutes les expériences effectuées avec la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. Le balayage en potentiel par voltampérométrie cyclique est réalisé entre -0,1 et 0,6 V. La Figure 38 Aa, montre, pour l'électrode de platine nue, le signal rédox réversible de la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ avec des pics de courant anodique $I_{pa} = 40 \pm 1 \mu\text{A}$ et cathodique $I_{pc} = -39 \pm 1 \mu\text{A}$ à des potentiels de 0,29 et 0,17 V respectivement ($\Delta E_p = 0,12 \pm 0,01 \text{ V}$).

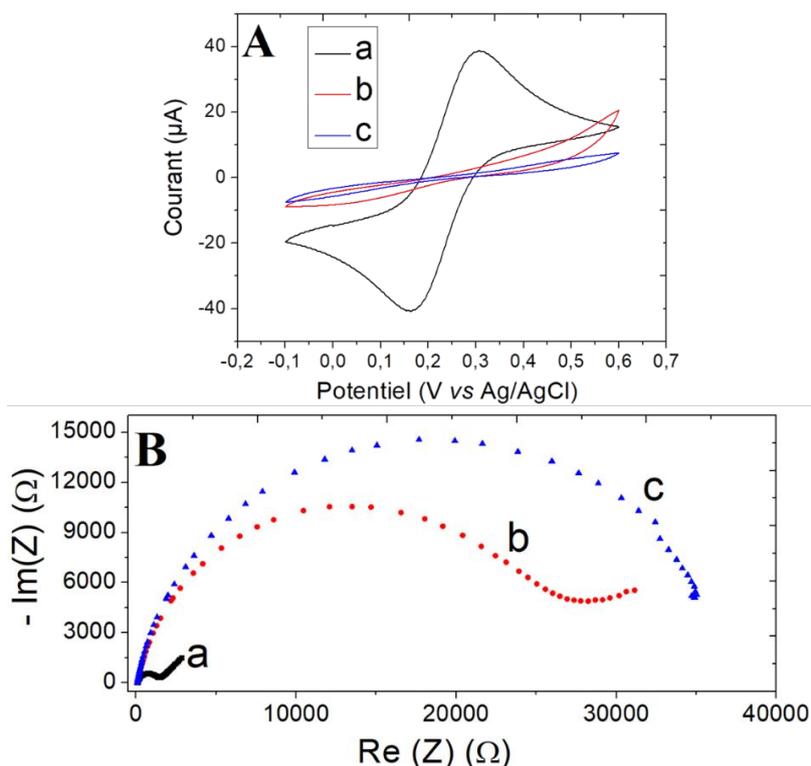


Figure 38: Caractérisation électrochimique d'une électrode de platine ($\Phi = 3 \text{ mm}$) (a) avant ; (b) après dépôt d'un film de polypyrrole NHS ; (c) après greffage de l'aptamère anti-AVP comme indiqué sur chaque figure : (A) voltampérogrammes cycliques enregistrés à une vitesse de balayage de 100 mV/s, et (B) diagramme de Nyquist des spectres d'impédance obtenus à l'OCP, avec un potentiel alternatif d'amplitude de 10 mV_{RMS} et un balayage de fréquence de 50 000 Hz à 0,1 Hz. Toutes les mesures ont été effectuées en utilisant $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ comme sonde redox dans un tampon phosphate $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ salin (pH 7,4).

L'électrode étant nue, le transfert d'électron vers sa surface se fait assez aisément. Après greffage du polypyrrole NHS (Figure 38A.b) et puis après le greffage de l'aptamère au polypyrrole (Figure 38A.c) sur l'électrode, ce transfert d'électron est plus difficile, d'où la diminution des intensités des pics anodique et cathodique de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, jusqu'à leur quasi-disparition avec des courants anodiques à $I_{pa} = 10 \pm 1 \mu\text{A}$ et $I_{pa} = 5 \pm 1 \mu\text{A}$ respectivement pour l'électrode recouverte de polypyrrole NHS et de polypyrrole NHS/aptamère (cf. Tableau

4). Ainsi, l'encombrement de la surface par le polypyrrole NHS puis par l'aptamère greffé au polymère ralentit le transfert d'électron des ions $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, qui doivent traverser ces deux couches avant de pouvoir s'oxyder ou se réduire à l'interface. On voit que le polypyrrole, malgré sa conductivité, ne sert pas de relais d'électron entre les $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ et l'électrode, il reste une barrière au transfert d'électron.

Tableau 4: Valeurs de I_{pa} , ΔE_p et du module de l'impédance Z obtenues après les différentes étapes de fonctionnalisation de l'électrode en utilisant la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$.

Etape	I_{pa} (μA)	ΔE_p (V)	Z (Ω)
Pt	40 ± 1	$0,12 \pm 0,01$	500 ± 10
Pt/Polypyrrole NHS	10 ± 1	$0,4 \pm 0,01$	23700 ± 500
Pt/Polypyrrole NHS/aptamère	5 ± 1	$0,42 \pm 0,01$	30380 ± 600

Concernant le diagramme de Nyquist des spectres d'impédance (Figure 38B), il montre de manière générale, à hautes fréquences, une boucle correspondant au phénomène de transfert de charge associé à la double couche électrochimique et à basses fréquences une demi-droite de pente proche de 45° correspondant au phénomène de diffusion des espèces $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (chapitre I-II-4.3.4). Pour le spectre correspondant à l'électrode fonctionnalisée par l'aptamère greffé au polypyrrole, la boucle est tellement importante que la demi-droite n'est plus visible dans le domaine des fréquences de mesure (Figure 38B.c).

En première approximation, on peut dire que la taille de la boucle correspond à la résistance au transfert de charge qui, au départ, est relativement peu importante pour l'électrode de platine nue (transfert plutôt facile, Figure 38B.a, $Z_{28\text{ Hz}} = 500 \pm 10 \Omega$), augmente après le dépôt de la couche de polypyrrole NHS (transfert contraint, Figure 38B.b, $Z_{2\text{ Hz}} = 23700 \pm 500 \Omega$), puis augmente encore après le greffage de l'aptamère (transfert très contraint, Figure 38B.c, $30400 \pm 600 \Omega$). Ceci s'explique, comme pour les mesures de voltampérométrie cyclique, par l'encombrement à l'interface électrode/solution lié à la présence du polypyrrole NHS puis de l'aptamère greffé au polypyrrole.

2. Caractérisation de la reconnaissance aptamère-vasopressine par titrage calorimétrique isotherme (ITC)

Afin de nous assurer de la reconnaissance spécifique de l'aptamère avec sa cible en milieu homogène, nous avons réalisé des mesures par titrage calorimétrique indirecte (ITC) dans le tampon phosphate décrit plus haut.

L'ITC est une technique sans marquage qui permet d'établir le profil thermodynamique (constante de dissociation, stœchiométrie, enthalpie et entropie) de l'interaction entre des biomolécules. La chaleur résultant de l'interaction entre les différentes biomolécules dans une cellule dite d'échantillon, est mesurée par rapport à une cellule de référence contenant de l'eau. Pour ce faire, la cible (AVP dans ce cas) est progressivement injectée, à volume fixe, dans la cellule contenant le ligand (aptamère). A chaque injection, quand il y a interaction, la variation de chaleur (sous forme d'enthalpie) est détectée puis compensée par le calorimètre de sorte que les températures soient égales dans les deux cellules et la puissance appliquée (DP : Differential Power) à la cellule échantillon pour rétablir cet équilibre est mesurée. Le rapport molaire entre la cible et l'aptamère augmente progressivement au fur à mesure des injections jusqu'à ce que la cellule échantillon contienne un excès d'aptamère par rapport à la cible, ce qui se traduit par une saturation du signal.

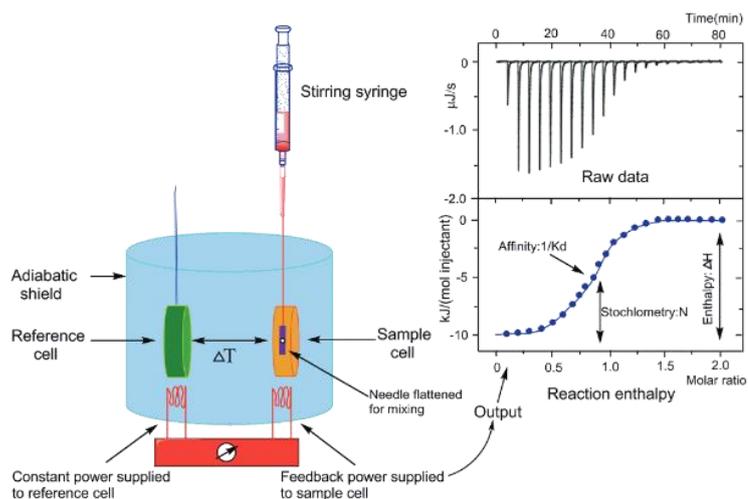


Figure 39: Schéma du principe de l'ITC. Reproduit de [199].

Le D-aptamère anti-AVP a été testé avec cette technique vis-à-vis de sa cible, la D-AVP et de l'énantiomère L-AVP. La Figure 40 montre les variations de la puissance appliquée (DP) à la cellule échantillon pour chaque injection (courbes i) et de l'énergie (enthalpie) calculée en fonction du ratio molaire (courbes ii) AVP/D-aptamère pour la D-AVP (A) et la L-AVP (B).

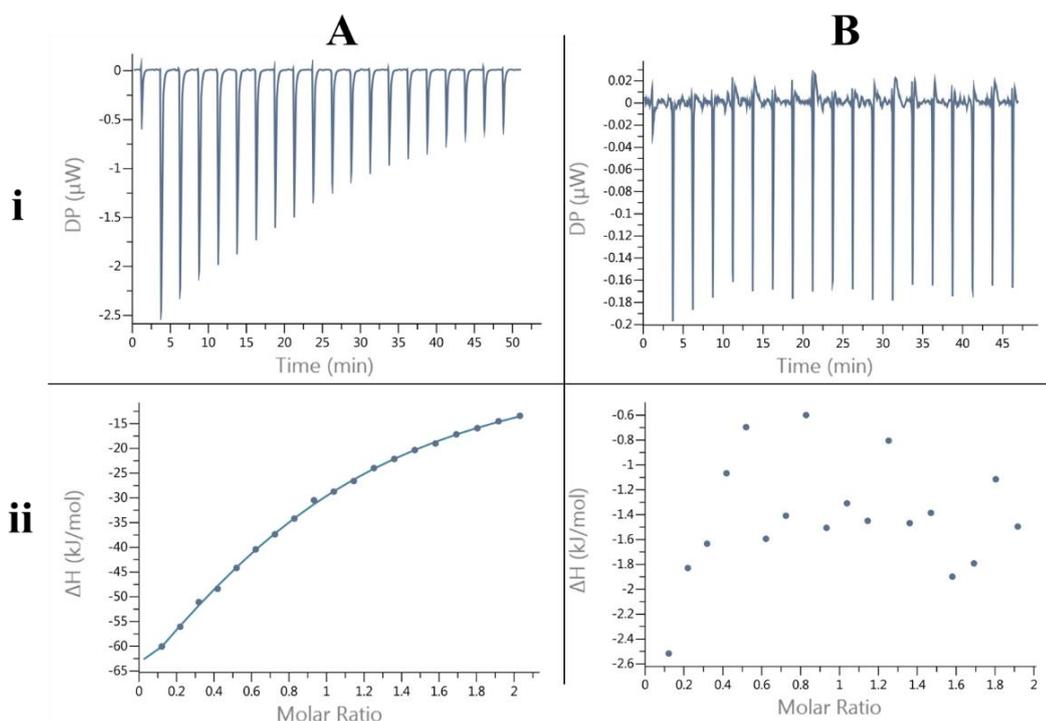


Figure 40: Courbes de variation de la puissance appliquée DP en fonction du temps (i) et de l'enthalpie mesurée en fonction du ratio molaire (ii) obtenues par ITC isotherme entre l'aptamère anti-AVP en configuration D et les énantiomères D-AVP (A) et L-AVP (B).

Pour la D-AVP, il peut être observé une diminution progressive de la puissance appliquée DP à chaque injection (Figure 40A-i), qui s'explique par la saturation progressive des molécules d'aptamère présentes dans le mélange par la D-AVP. La quantité de chaleur quant à elle augmente progressivement en fonction du ratio molaire D-AVP/aptamère (Figure 40A-ii). Ces observations permettent de confirmer que l'aptamère en configuration D reconnaît bien la D vasopressine. Pour l'énantiomère L-AVP, la DP et la chaleur restent relativement faibles et stables tout au long de l'injection (Figure 40B-i et ii), il peut être alors conclu que l'aptamère est énantiospécifique en solution.

L'analyse des données obtenues a permis d'établir pour cette interaction entre le D-aptamère et la D-AVP une stœchiométrie de 1:1 (une molécule d'aptamère reconnaît une molécule de D-AVP). La constante de dissociation K_d de cette interaction a été évaluée à $22 \pm 4 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Cette valeur est plus importante que celle reportée dans la littérature qui est de $0,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$ [193]. Cette différence pourrait s'expliquer par la différence des techniques utilisées (dialyse à équilibre dans le cas de littérature) mais aussi par la nature et la composition du tampon utilisé qui est un tampon sodium 2-[bis(2- hydroxyéthyl)amino]éthane sulfonate (BES) salin.

Bien qu'un meilleur K_d soit obtenu avec ce tampon BES, le tampon phosphate sera maintenu pour nos travaux de développement du biocapteur car les propriétés de ce dernier sont plus proches de celles des liquides physiologiques.

3. Performances analytiques

La Figure 41 présente les variations de signal obtenues pour la voltampérométrie cyclique et pour la spectroscopie d'impédance après ajout de concentrations croissantes d'AVP D ou L.

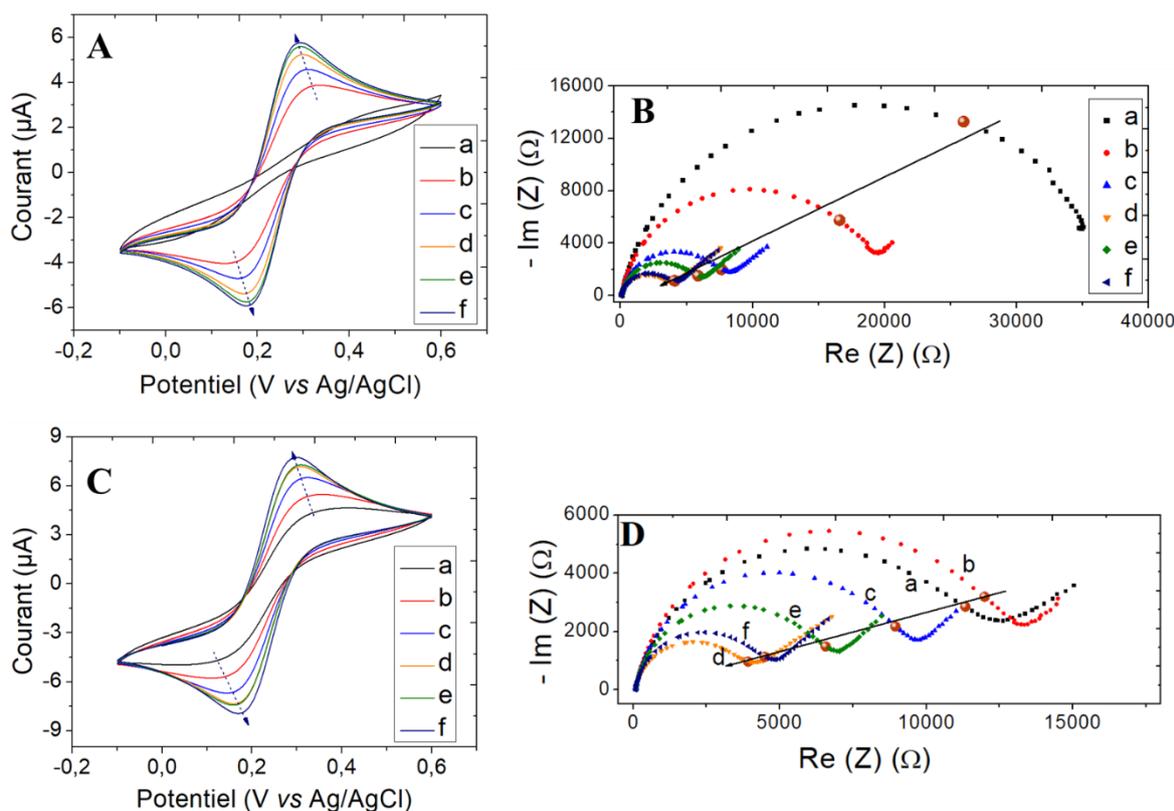


Figure 41: Voltampérogrammes cycliques du biocapteur à base de polypyrrole NHS/aptamère dans une solution de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ ($2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) à une vitesse de balayage de 10 mV.s^{-1} obtenus à différentes concentrations de D-AVP (A) et de L-AVP (C) : a) 0 mol.L^{-1} ; b) $3,2 \cdot 10^{-14} \text{ mol.L}^{-1}$; c) $3,2 \cdot 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$; d) $3,2 \cdot 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$; e) $3,2 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$; f) $3,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Diagramme de Nyquist des spectres d'impédance obtenus après ajout de D-AVP (B) et de L-AVP (D) sur les électrodes ; les points d'isofréquence sont représentés par une sphère marron.

Contrairement à ce qui est communément observé dans la littérature avec les aptacapteurs, les voltampérogrammes cycliques réalisés à une vitesse de balayage de 10 mV.s^{-1} révèlent que l'ajout de concentrations croissantes de D-AVP aux électrodes fonctionnalisées à l'aptamère anti-AVP provoque une augmentation progressive des intensités des pics de courant faradique. Le courant anodique passe d'une intensité $I_{pa} = 2,6 \mu\text{A}$ sans D-AVP à $I_{pa} = 5,7 \mu\text{A}$

pour une concentration de $3,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ (Figure 41A). Le même phénomène est observé pour l'ajout de la L-AVP avec une intensité du courant anodique qui augmente de $I_{pa} = 4,5 \mu\text{A}$ sans L-AVP à $I_{pa} = 7,7 \mu\text{A}$ pour une concentration de $3,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ (Figure 41C).

L'analyse du diagramme de Nyquist des spectres d'impédance corrobore les mesures de la voltampérométrie cyclique. En effet, pour l'ajout de concentrations croissantes de D-AVP, l'impédance Z à la fréquence de 2 Hz (fréquence choisie dans la partie du spectre correspondant à la résistance au transfert de charge) passe de $30400 \pm 600 \Omega$ sans D-AVP à une valeur plus faible de $4600 \pm 100 \Omega$ pour une concentration de $3,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ (Figure 41B). On a donc une diminution de l'impédance avec l'ajout de la cible alors que l'on attendait une augmentation de l'impédance comme souvent dans les biocapteurs d'affinité. Cette même tendance de variation est observée après ajout de la L-AVP mais de manière moins importante (Figure 41D).

Ce phénomène pourrait s'expliquer par les interactions électrostatiques entre les différents groupements chargés (l'aptamère, l'AVP et la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$). En effet, la surface de l'électrode peut être considérée comme chargée négativement grâce aux groupements phosphate du squelette de l'aptamère (le polymère étant neutre) ; l'AVP quant à elle porte une charge positive ($pI = 10,9$) au $pH = 7,4$ qui est celui du tampon phosphate [200]. La reconnaissance entre l'aptamère et l'AVP entraîne une diminution de la charge négative de la surface, facilitant ainsi le passage de la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ vers la surface des électrodes pour y subir une oxydation ou une réduction, d'où un meilleur transfert d'électron qui se traduit par une augmentation progressive du courant et une diminution de l'impédance. Ce phénomène a déjà été reporté dans la littérature pour d'autres protéines chargées positivement [201]–[203] même si dans la majorité des aptacapteurs on a une croissance de l'impédance due à une augmentation de l'encombrement.

Une comparaison quantitative de la réponse du biocapteur aux deux énantiomères a été effectuée à l'aide de courbes d'étalonnage. Ces dernières ont été réalisées à partir des valeurs de l'impédance Z à la fréquence de 2 Hz (fréquence située dans la zone correspondant au phénomène transfert de charge) du diagramme de Nyquist des spectres d'impédance des Figure 41B et D. Afin de ne tenir compte que des variations de signal résultant de l'ajout d'AVP, le paramètre ΔZ est utilisé. Il vaut $\Delta Z = Z_{AVP} - Z_{\text{aptamère}}$ où Z_{AVP} est l'impédance obtenue après ajout d'une certaine concentration d'AVP et $Z_{\text{aptamère}}$ celle des électrodes après fonctionnalisation à l'aptamère. C'est ce paramètre qui sera pris en compte pour la réalisation des courbes d'étalonnage tout au long de nos travaux.

Le Tableau 5 présente les valeurs du paramètre ΔZ à une fréquence de 2 Hz en fonction des concentrations de D-AVP et de L-AVP. Les incertitudes sur ces valeurs sont les incertitudes de mesure de ce paramètre. Elles résultent de la somme de l'incertitude de mesure sur le paramètre Z_{AVP} (2%) et de celle sur le paramètre $Z_{\text{aptamère}}$ (2%).

Tableau 5: Valeurs de ΔZ obtenues après ajout de la D-AVP ou de la L-AVP aux électrodes fonctionnalisées avec l'aptamère anti-AVP greffé polypyrrole NHS en utilisant la sonde $Fe(CN)_6^{3-/4-}$.

Concentration (mol.L ⁻¹)	$\Delta Z_{2\text{Hz}} (\Omega)$	
	D-AVP	L-AVP
$3,2 \cdot 10^{-14}$	-12000 ± 1000	700 ± 500
$3,2 \cdot 10^{-12}$	-22200 ± 800	-2500 ± 500
$3,2 \cdot 10^{-10}$	-25900 ± 700	-7500 ± 400
$3,2 \cdot 10^{-8}$	-24000 ± 800	-5000 ± 400
$3,2 \cdot 10^{-6}$	-25800 ± 700	-7000 ± 400

En termes de performances, une concentration de $3,2 \cdot 10^{-14}$ mol.L⁻¹ (qui peut être considérée comme la LOD) d'AVP a suffi à obtenir un signal énantiospécifique, ce qui est très intéressant par rapport aux valeurs reportées dans la littérature pour les biocapteurs à AVP. Cette réponse reste spécifique sur toute la gamme de concentration étudiée comme le montrent les courbes d'étalonnage qui ont été obtenues à partir du paramètre $\Delta Z_{2\text{ Hz}}$ (Figure 42).

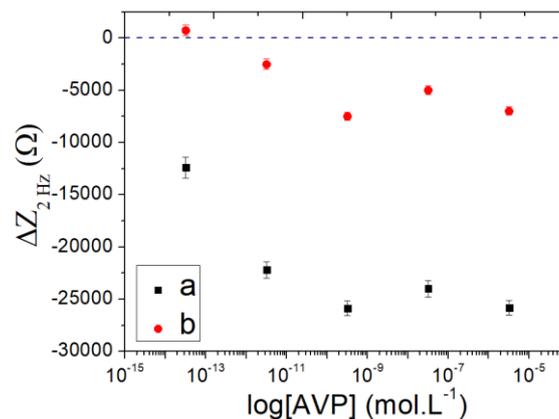


Figure 42: Courbes d'étalonnage montrant la variation du paramètre $\Delta Z_{2\text{ Hz}}$ en fonction de la concentration en D-AVP (a) et L-AVP (b) pour le biocapteur à polypyrrole NHS avec la sonde $(CN)_6^{3-/4-}$ dans le tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹, pH = 7,4. n = 1.

Cependant, bien que les variations soient plus importantes pour la D-AVP que pour la L-AVP ($\Delta Z_{2\text{ Hz}} = -12000 \pm 1000\Omega$ pour la D-AVP contre $\Delta Z_{2\text{ Hz}} = 700 \pm 500 \Omega$ pour une concentration de $3,2 \cdot 10^{-14}$ mol.L⁻¹), l'aptacapteur est très vite saturé à partir d'une

concentration de $3,2 \cdot 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$, ce qui rend la gamme de concentration d'analyse très étroite (entre $3,2 \cdot 10^{-14}$ et $3,2 \cdot 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$). Cette saturation rapide pourrait s'expliquer par une faible concentration surfacique en aptamère. Un tel aptacapteur ne correspond pas aux spécifications attendues en termes de performances malgré sa spécificité et son faible seuil de détection.

III. Elaboration d'un biocapteur à base de polypyrrole adamantane pour la détection de l'AVP

Les expériences menées avec le polypyrrole NHS pour greffer l'aptamère anti AVP ont été reprises avec un autre polymère, le polypyrrole adamantane, qui présente l'avantage d'être aussi un polymère neutre. Il constitue une alternative intéressante au polypyrrole NHS et offre des options innovantes de greffage de biomolécules en matière de conception de biocapteurs. En effet, impliqué le plus souvent dans des liaisons non covalentes, il permet une réversibilité des réactions de couplage avec d'autres molécules et peut ainsi permettre de régénérer la surface sur laquelle il est greffé. Cette propriété est sollicitée dans le développement d'aptacapteurs réutilisables.

Le polypyrrole adamantane résulte de la polymérisation du pyrrole adamantane. La synthèse de ce dernier est réalisée *via* un couplage amide classique entre le groupement acide carboxylique de l'acide 1-(11-undécanoïque) pyrrole et la fonction amine de l'adamantanamine en présence de DCC (Figure 43).

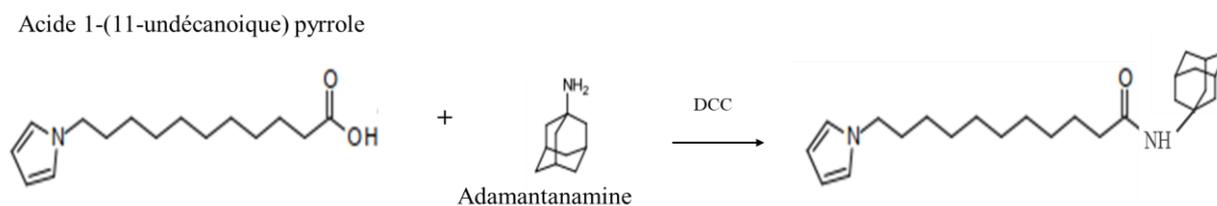


Figure 43: Schéma de synthèse du pyrrole adamantane.

1. Préparation des électrodes

1.1. Caractérisation du monomère

La caractérisation du monomère pyrrole adamantane a été réalisée en milieu organique sur une électrode platine de diamètre $\Phi = 3 \text{ mm}$ propre. Une solution de pyrrole adamantane à

2 mmol.L^{-1} a été préparée dans une solution de $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$. Un pic anodique irréversible du pyrrole est observé à $0,86 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$ (dans une solution de $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de AgNO_3 dans la solution électrolytique) sur le voltampérogramme cyclique obtenu (Figure 44). Ce pic correspond à l'oxydation irréversible du motif pyrrole du monomère.

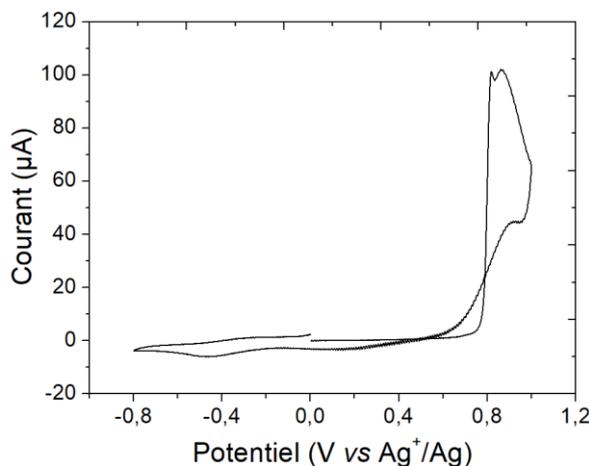


Figure 44: Voltampérogramme cyclique d'une solution de monomère de pyrrole adamantane $2.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ sur électrode de platine ($\Phi = 3 \text{ mm}$) à une vitesse de balayage de $0,1 \text{ V.s}^{-1}$.

1.2. Polymérisation par voltampérométrie cyclique

L'électropolymérisation par voltampérométrie cyclique a été réalisée avec 20 balayages successifs entre 0 et $0,8 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$ (dans une solution de $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de AgNO_3 dans la solution électrolytique). Un signal rédox réversible électroactif (Figure 45A) typique d'un poly(pyrrole-N-alkyl) apparaît autour de $0,27 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$ (dans une solution de $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de AgNO_3 dans la solution électrolytique).

Une nouvelle caractérisation est effectuée en transférant l'électrode dans une solution électrolytique ($\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) exempte de monomère. Elle montre la persistance du signal rédox réversible (Figure 45.b) du polypyrrole, absent sur l'électrode nue (Figure 45B.a), ce qui confirme l'adhérence du film de polymère. L'intensité du pic de courant anodique induit par le polymère est de $I_{\text{pa}} = 35 + 1 \mu\text{A}$ témoignant de la bonne polymérisation du pyrrole adamantane. En tenant compte du nombre de cycles effectués pour le dépôt du polymère, en termes d'ordre de grandeur, cette intensité de pic est voisine de celle obtenue pour le pyrrole NHS. Le pyrrole adamantane polymérise au moins aussi bien que le pyrrole NHS.

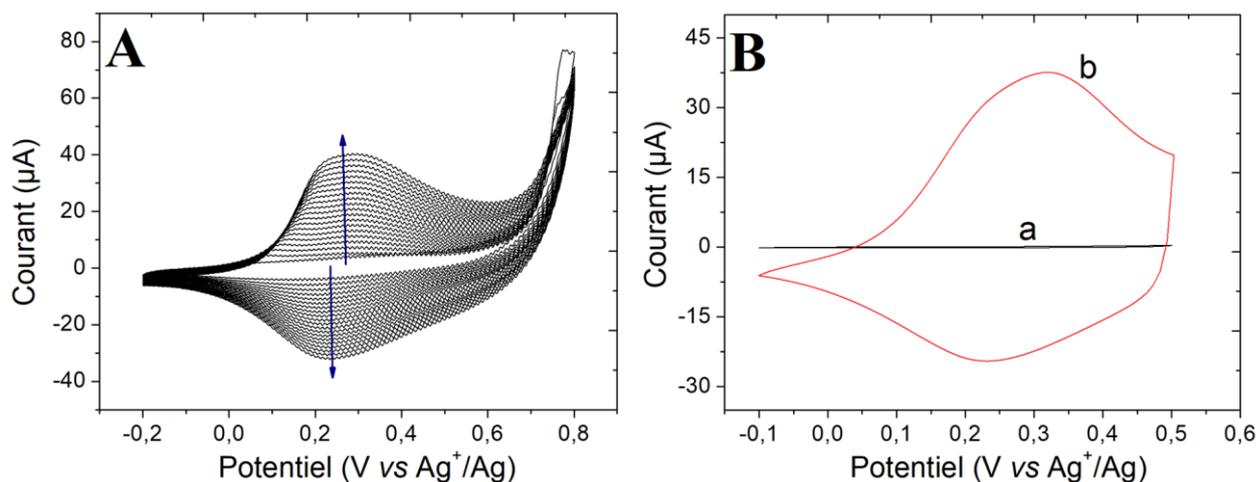


Figure 45: A) Electropolymérisation par voltampérométrie cyclique du pyrrole adamantane ($2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) dans $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ sur électrode de platine ($\Phi = 3 \text{ mm}$) à vitesse de balayage de $0,1 \text{ V.s}^{-1}$. B) Voltampérogrammes cycliques de l'électrode nue (a) et recouverte de polypyrrole adamantane (b) transférées dans une solution de $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ exempte de monomère à une vitesse de balayage de $0,1 \text{ V.s}^{-1}$.

1.3. Polymérisation par chronoampérométrie

Toujours dans le but d'obtenir une épaisseur de polymère contrôlée pour la conception du biocapteur, l'électropolymérisation du pyrrole adamantane a été réalisée par chronoampérométrie avec une densité de charge surfacique de $2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$ avec un potentiel fixé à $0,9 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$ dans une solution de $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de AgNO_3 dans la solution électrolytique.

La caractérisation en milieu électrolytique exempt de monomère (Figure 46) montre l'adhérence du film de polypyrrole adamantane formé à la surface de l'électrode. Comparativement au polypyrrole NHS (Figure 34.b), l'intensité de courant obtenue pour le polypyrrole adamantane en milieu exempt de monomère (Figure 46.b) est beaucoup plus importante. Le signal redox du polypyrrole à $0,2\text{-}0,3 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$ est bien visible.

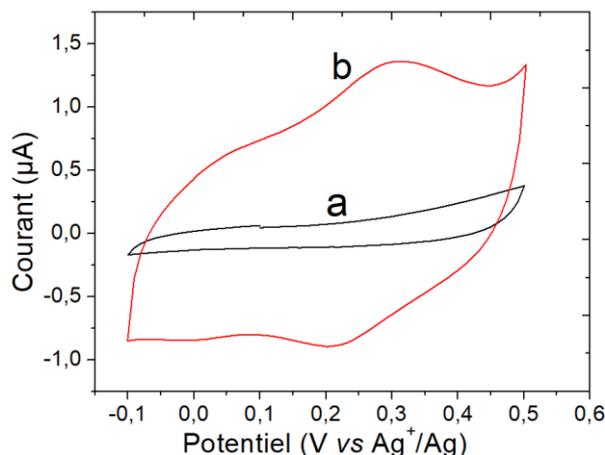


Figure 46: Electrode de platine ($\Phi = 3 \text{ mm}$) modifiée avec le polypyrrole-adamantane polymérisé par électrolyse à potentiel constant $E = 0,85 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$ ($Q = 0,18 \text{ mC}$) et transférée dans $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ exempt de monomère avec $v = 0,1 \text{ V.s}^{-1}$: a) électrode nue b) électrode avec polypyrrole adamantane.

La concentration surfacique en polypyrrole adamantane a été évaluée à $\Gamma_{\text{réelle}} = 8,86 \cdot 10^{-9} \text{ mole.cm}^{-2}$, soit un rendement d'électropolymérisation $\eta = 78 \%$. Si l'électropolymérisation par voltampérométrie cyclique montrait une qualité d'électropolymérisation voisine pour les deux monomères (NHS et adamantane), le calcul du rendement d'électropolymérisation par chronoampérométrie montre que le pyrrole adamantane polymérisé à potentiel imposé est beaucoup plus électroactif que le pyrrole NHS polymérisé dans les mêmes conditions. De meilleures performances pourraient être espérées pour l'aptacapteur qui en résulte.

1.4. Greffage de l'aptamère

L'immobilisation de l'aptamère a été effectuée en se basant sur deux systèmes d'affinité très connus : adamantane / β -cyclodextrine et β -cyclodextrine/biotine. Le premier système (adamantane/ β - cyclodextrine) a été décrit dans la littérature par l'équipe BioCEN du DCM pour l'immobilisation de la glucose oxydase marquée avec des β -cyclodextrines sur un film de poly(pyrrole-adamantane) dans le cadre d'un développement d'un biocapteur à glucose [204]. Cette association s'établit grâce à l'interaction hydrophobe entre la cavité intérieure de la β -cyclodextrine et l'adamantane [205] [206].

Le système β -cyclodextrine/biotine a également été développé par l'équipe BioCEN du DCM [207] comme alternative au système conventionnellement connu de la biotine/avidine qui est moins performant comme système d'immobilisation des biomolécules dans le cas des biocapteurs électrochimiques. En effet, quand bien même la constante d'affinité de l'interaction avidine/biotine ($K_a \approx 10^{15} \text{ L.mol}^{-1}$) [208] est très supérieure à celle de

l'interaction β -cyclodextrine/biotine ($K_a \approx 300 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$) [207], cette dernière est suffisante pour une immobilisation stable des macromolécules. D'autre part, l'avidine par sa taille crée une couche supplémentaire à la surface de l'électrode limitant ainsi l'efficacité de la transduction. Le système β -cyclodextrine/biotine semble être une bonne alternative pour notre étude. D'autre part, disposant déjà d'un aptamère modifié à la biotine, le recours à ce système nous a paru en tous points plus judicieux.

Un intermédiaire de liaison portant des fonctions β -cyclodextrines était nécessaire pour l'immobilisation de l'aptamère sur la surface du polypyrrole adamantane. Nous avons opté pour l'utilisation de nanoparticules d'or modifiées avec une β -cyclodextrine (AuNPs- β -CD, Figure 47) fournies par le Département de Chimie Analytique de la Faculté de Chimie de la Complutense University of Madrid en Espagne. Une solution d'AuNPs- β -CD à $0,5 \text{ mg/mL}$ a été préparée dans un tampon phosphate à $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ salin ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl, $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de KCl, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de MgCl_2 , $\text{pH} = 7,4$) et $15 \mu\text{L}$ de cette dernière ont été déposés sur les électrodes fonctionnalisées par le polypyrrole adamantane pendant 1 heure d'incubation.

Pour adapter son utilisation à la méthode d'immobilisation choisie, il a été greffé à l'extrémité 5' de l'aptamère une molécule de biotine avec du triéthylène glycol (TEG) comme bras espaceur (5' biotine-TEG-aptamère). Avant son dépôt sur les électrodes, une solution d'aptamère à $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ préparée dans le tampon phosphate a été dénaturée à 80°C pendant 5 minutes puis laissée dans de la glace pendant 30 minutes pour figer sa structure. Après rinçage des électrodes fonctionnalisées aux AuNPs-CD, $15 \mu\text{L}$ de cette solution ont été déposés sur les électrodes pour une incubation d'une nuit.

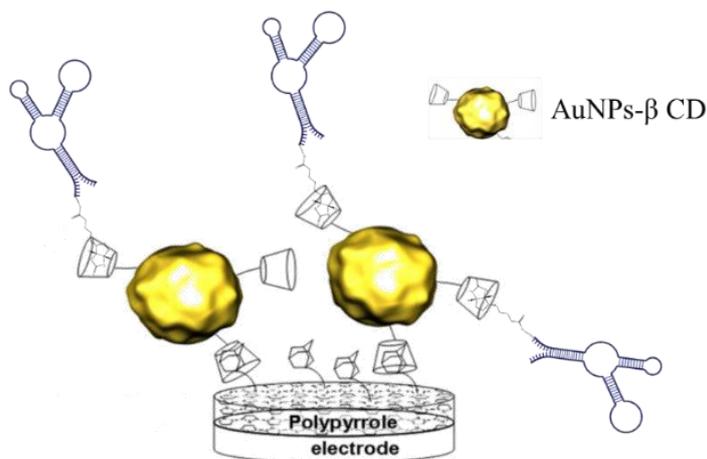


Figure 47: Schéma du principe d'immobilisation d'un aptamère basé sur le complexe polypyrrole adamantane/ AuNPs- β -CD/biotine.

1.5. Caractérisation des différentes étapes de fonctionnalisation

Comme ce fut le cas précédemment avec l'immobilisation via le polypyrrole NHS, la neutralité du polypyrrole adamantane a conduit au choix de la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ comme sonde électrochimique. Une solution à 2 mmol.L^{-1} de cette sonde a été préparée dans le tampon phosphate ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$) et a servi dans un premier temps pour la caractérisation des différentes étapes de fonctionnalisation de l'électrode (Figure 48).

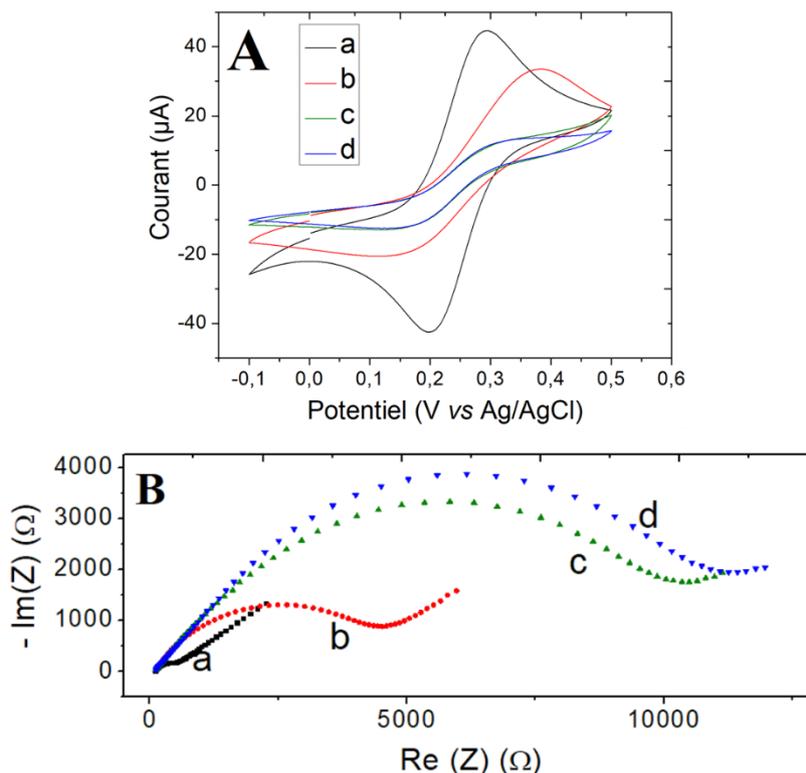


Figure 48: Caractérisation électrochimique d'une électrode de platine ($\Phi = 3 \text{ mm}$) (a) avant ; (b) après dépôt d'un film de polypyrrole adamantane ; (c) après greffage de nanoparticules d'or modifiées à la β -cyclodextrine (Pt/polypyrrole adamantane/AuNPs-CD) ; (d) après greffage de l'aptamère anti-AVP comme indiqué sur chaque figure : (A) Voltampérogrammes cycliques enregistrés à une vitesse de balayage de 100 mV.s^{-1} et (B) Diagramme de Nyquist des spectres d'impédance obtenus à l'OCP, avec un potentiel alternatif d'amplitude de $10 \text{ mV}_{\text{rms}}$ et un balayage de fréquence de $50\,000 \text{ Hz}$ à $0,1 \text{ Hz}$. Toutes les mesures ont été effectuées en utilisant $2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ comme sonde redox dans un tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ salin ($\text{pH} 7,4$).

Le balayage par voltampérométrie cyclique entre $-0,1$ et $0,5 \text{ V}$ de l'électrode de platine nue (Figure 48A.a) montre le signal rédox réversible rapide typique de la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ avec des pics de courant anodique $I_{\text{pa}} = 44 \pm 1 \mu\text{A}$ et cathodique $I_{\text{pc}} = -42 \pm 1 \mu\text{A}$ à des potentiels de $0,29$ et $0,19 \text{ V}$ respectivement ($\Delta E_p = 0,1 \pm 0,01 \text{ V}$). L'électrode étant nue, le transfert d'électrons vers sa surface se fait assez aisément. Après greffage du polypyrrole adamantane, ce transfert d'électron est plus difficile, d'où la diminution des courants des pics anodique

($I_{pa} = 33 \pm 1 \mu A$) et cathodique ($I_{pa} = 20 \pm 1 \mu A$) et l'augmentation de $\Delta E_p = 0,27 \pm 0,01 V$. Ce phénomène est d'autant plus accentué après ajout des AuNPs-CD (Figure 48A.b) et de l'aptamère (Figure 48A.c), ce qui a conduit à des intensités $I_{pa} = 14 \pm 1 \mu A$ et $I_{pa} = 13 \pm 1 \mu A$ respectivement.

Le Tableau 6 regroupe les valeurs des paramètres I_{pa} , ΔE_p et de l'impédance Z correspondant aux différentes étapes de fonctionnalisation des électrodes avec les incertitudes sur leur mesure.

Tableau 6: Valeurs de I_{pa} , ΔE_p et du module de l'impédance Z obtenues après les différentes étapes de fonctionnalisation de l'électrode en utilisant la sonde $Fe(CN)_6^{3-/4-}$.

Etape	$I_{pa} (\mu A)$	$\Delta E_p (V)$	$Z (\Omega)$
Pt	44 ± 1	$0,1 \pm 0,01$	500 ± 10
Pt/Polypyrrole adamantane	33 ± 1	$0,27 \pm 0,01$	4100 ± 100
Pt/Polypyrrole adamantane/AuNPs-CD	14 ± 1	$0,24 \pm 0,01$	8700 ± 200
Pt/Polypyrrole adamantane/AuNPs-CD/aptamère	13 ± 1	$0,24 \pm 0,01$	9200 ± 200

De manière générale, les spectres d'impédance du diagramme de Nyquist obtenus montrent à hautes fréquences une boucle relative au transfert de charge. Cette boucle s'apparente à un demi-cercle pour l'électrode nue (Figure 48.a) tandis qu'elle est légèrement aplatie dès que l'électrode est modifiée par le polypyrrole adamantane (Figure 48.b et Figure 48.c). Ceci semble indiquer une forte hétérogénéité du transfert de charge à l'interface avec une dispersion de la fréquence caractéristique associée. De plus, pour toutes les étapes, à basses fréquences, il est observé une demi-droite correspondant à la diffusion des molécules de $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ vers la surface de l'électrode. L'augmentation de la résistance au transfert de charge (avec des impédances de $Z_{28 \text{ Hz}} = 500 \pm 10 \Omega$ pour l'électrode nue, $Z_{1,43 \text{ Hz}} = 4100 \pm 100 \Omega$ pour l'électrode recouverte de polypyrrole adamantane, $Z_{1,43 \text{ Hz}} = 8700 \pm 200 \Omega$ pour l'électrode avec polypyrrole adamantane/AuNPs-CD et $Z_{1,43 \text{ Hz}} = 9200 \pm 200 \Omega$ pour l'électrode avec polypyrrole adamantane/AuNPs-CD/aptamère) permet de confirmer l'effet de blocage du transfert d'électrons résultant de la modification de la surface de l'électrode par les couches successives qui la recouvrent.

L'apparition de ce type d'aplatissement de la boucle haute fréquence du spectre d'impédance résulte généralement de la rugosité, des inhomogénéités ou de la porosité de la

surface de l'électrode de travail [209]. Dans notre cas il peut être rajouté à la forte rugosité du polymère, l'hypothèse selon laquelle l'hydrophobie du polypyrrole adamantane est à l'origine de la déformation des spectres d'impédance.

2. Performances analytiques du biocapteur

Les mesures de voltampérométrie cyclique réalisées dans une solution de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ à 2 mmol.L^{-1} dans le tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ à une vitesse de balayage de 10 mV.s^{-1} entre $-0,1$ et $0,5 \text{ V}$ ont permis d'évaluer la réponse du biocapteur (Figure 49 A et C).

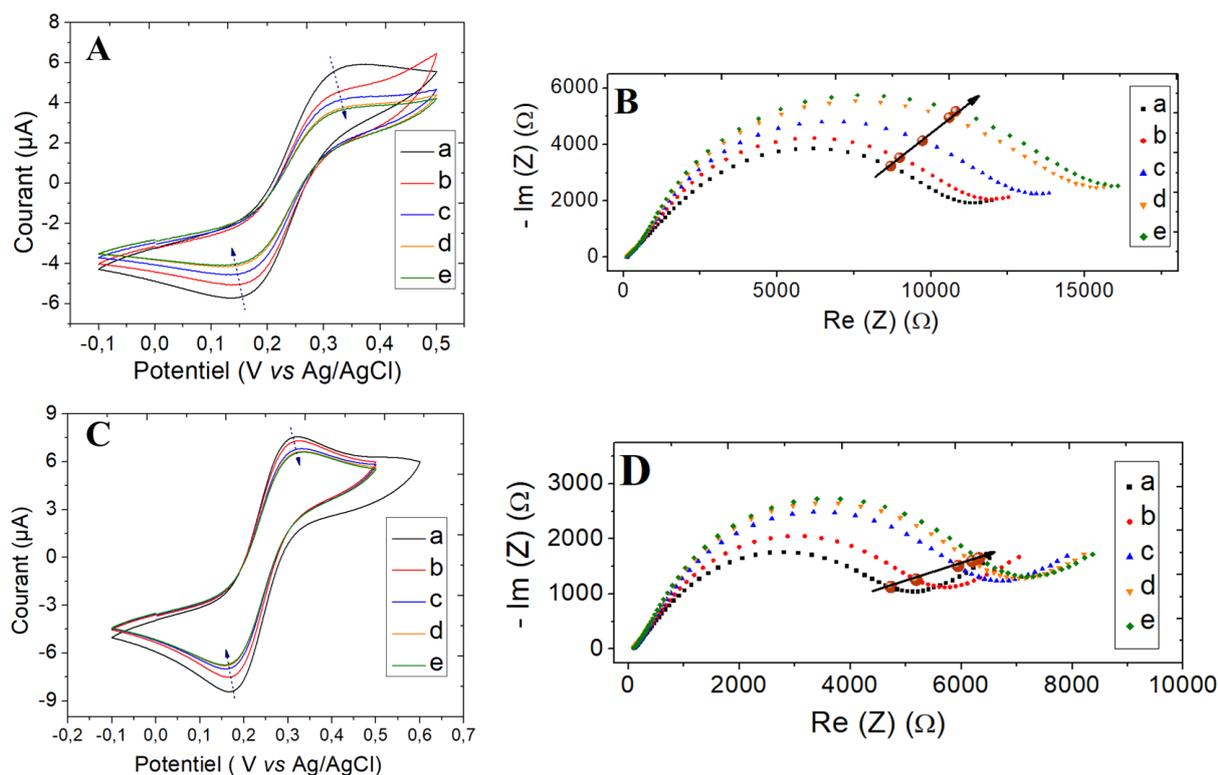


Figure 49: Voltampérogrammes cycliques enregistrés à une vitesse de balayage de 10 mV/s pour le biocapteur à base de polypyrrole adamantane/ AuNPs- β -CD après incubation de différentes concentrations d'AVP : a) 0 mol.L^{-1} ; b) $3,2 \cdot 10^{-14} \text{ mol.L}^{-1}$; c) $3,2 \cdot 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$; d) $3,2 \cdot 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$; e) $3,2 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ de D-AVP (A) et de L-AVP (C). Diagramme de Nyquist des spectres obtenus pour le même biocapteur aux mêmes concentrations en D-AVP (B) et L-AVP (D). Mesures effectuées dans une solution de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ($2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) dans un tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$; les points d'isofréquence sont représentés par une sphère marron.

Les voltampérogrammes montrent que l'ajout de concentrations croissantes de D-AVP aux électrodes fonctionnalisées à l'aptamère anti-AVP provoque une diminution progressive des intensités des pics de courant. Le courant anodique passe d'une intensité $I_{\text{pa}} = 5,9 \mu\text{A}$ sans D-AVP à $I_{\text{pa}} = 3,75 \mu\text{A}$ pour une concentration de $3,2 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$. On remarquera que les voltampérogrammes des plus fortes concentrations en D-AVP ont une allure proche de celle

d'une courbe courant-tension stationnaire avec des pics peu visibles. La diminution des courant de pic pourrait être expliquée par le phénomène d'accumulation de masse de D-AVP à la surface de l'électrode, qui provoquerait une diminution du transfert d'électron de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ à l'interface. Cela indiquerait que contrairement au cas précédent (pyrrole NHS), ici l'annulation des charges de l'aptamère après reconnaissance de la cible n'aurait aucun effet pour faciliter le passage de la sonde rédox jusqu'à l'interface. De plus, on peut voir que pour la L-AVP, les voltampérogrammes montrent eux aussi une baisse des courants de pics avec la concentration (Figure 49 C). L'électrode modifiée n'est pas sélective.

Le tracé du diagramme de Nyquist des spectres d'impédance pour l'ajout de D-AVP ou de la L-AVP (Figure 49 B et 22D) permet de confirmer cette hypothèse. Pour les 2 énantiomères, on observe une augmentation progressive de la boucle associée à la résistance au transfert de charge. Le Tableau 7 présente les valeurs du paramètre ΔZ à une fréquence de 1,92 Hz en fonction des concentrations de D-AVP et de L-AVP. Les incertitudes présentées dans ce tableau représentent les incertitudes sur les moyennes de ΔZ calculées sur 2 électrodes pour chaque concentration. La non-spécificité de l'électrode ne fait aucun doute.

Tableau 7 : Valeurs de ΔZ obtenues après ajout de la D-AVP ou de la L-AVP aux électrodes fonctionnalisées à l'aptamère anti-AVP grâce au polypyrrole adamantane/AuNPs- β -CD en utilisant la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$.

Concentration (mol.L ⁻¹)	$\Delta Z_{1,92 \text{ Hz}} (\Omega)$	
	D-AVP	L-AVP
$3,2 \cdot 10^{-14}$	460 ± 30	350 ± 40
$3,2 \cdot 10^{-12}$	1200 ± 200	900 ± 500
$3,2 \cdot 10^{-10}$	1500 ± 60	1500 ± 1200
$3,2 \cdot 10^{-8}$	1600 ± 100	1900 ± 1200

Les courbes d'étalonnage dressées grâce aux données du tableau 4 montrent que le biocapteur répond à de faibles concentrations d'AVP (à partir de $3,2 \cdot 10^{-14}$ mol.L⁻¹), ce qui répond dans un premier temps aux attentes en matière de limite de détection (Figure 50). Néanmoins, puisque sur la gamme de concentration étudiée (de $3,2 \cdot 10^{-14}$ à $3,2 \cdot 10^{-8}$ mol.L⁻¹), aucune différence n'a pu être observée entre les signaux résultant de l'ajout des différents énantiomères, ce capteur ne remplit pas les critères voulus. On remarquera cependant que, si les dispersions obtenues pour la réponse après ajout de la D-AVP sont relativement faibles (coefficient de variation maximum de 17% pour une concentration de $3,2 \cdot 10^{-12}$ mol.L⁻¹), elles

sont très importantes pour l'énantiomère L (coefficient de variation atteignant les 80% pour une concentration de $3,2 \cdot 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$).

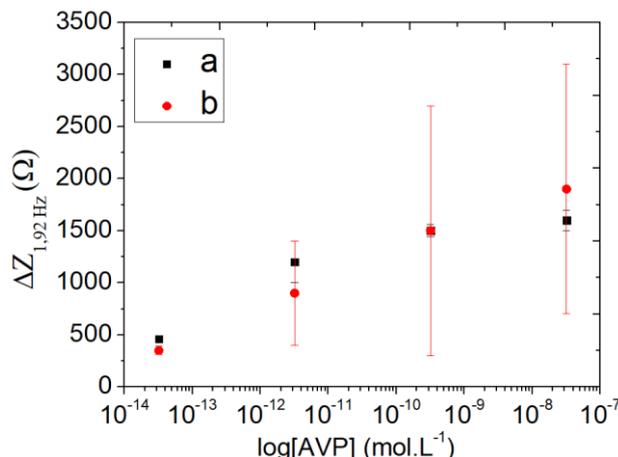


Figure 50: Courbes d'étalonnage montrant la variation du paramètre $\Delta Z_{1,92 \text{ Hz}}$ en fonction de la concentration en D-AVP (a) et L-AVP (b) pour le biocapteur à polypyrrole adamantane/AuNps-CD avec la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ dans le tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$. $n = 2$.

Au vu de ces résultats, il peut être conclu que le biocapteur ne répond pas de manière spécifique. Cette non-spécificité pourrait être due aux interactions entre les molécules d'AVP et les cavités de β -cyclodextrine libres. En effet, si du fait du diamètre des cavités de β -cyclodextrine (0,6 à 0,65 nm) [210], celles-ci ne peuvent inclure en entier des protéines de la taille de l'AVP en leur sein, il a été démontré que ces cavités pouvaient interagir avec des acides aminés [211]. Il ne peut donc pas être exclu que ce phénomène soit à l'origine des réponses obtenues, l'emportant sur le phénomène de reconnaissance spécifique entre l'aptamère en configuration D et sa cible correspondante, la D-AVP. Des essais par co-dépôt biotine/biotine-aptamère afin de « boucher » les β -cyclodextrine libres à l'aide de molécules de biotine libres ont été menés mais n'ont pas été concluants (réponses aléatoires du biocapteur). Malgré la bonne électropolymérisation du pyrrole adamantane, la technique d'immobilisation de l'aptamère anti-AVP basée sur le complexe polypyrrole adamantane/AuNPs-CD n'est pas l'approche adéquate pour l'obtention d'un aptacapteur fiable pour la détection spécifique de la D-AVP.

IV. Elaboration de biocapteurs à base de polypyrrole NTA

Développée par Haddour et al. [212] en 2005 et optimisée par Baur et al. [190] en 2010, la synthèse du pyrrole NTA passe par le couplage de l'ester de succinimide de l'acide 1-(11-undécanoïque) pyrrole avec le $N\alpha, N\alpha'$ -bis(carboxyméthyl)-L-lysine (Figure 51).

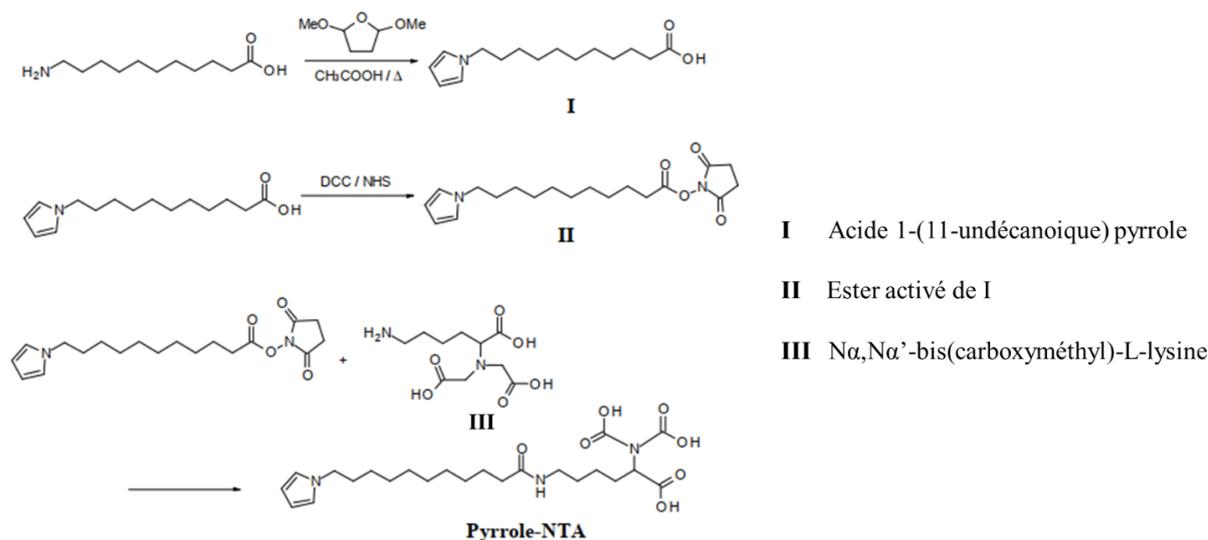


Figure 51: Schéma de la synthèse du pyrrole NTA. Reproduit de [190].

Les trois fonctions acétiques en bout de chaîne permettent une complexation avec des cations métalliques bivalents (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}), le pyrrole NTA se comportant comme un chélateur. En se servant particulièrement de la capacité de coordination du Cu^{2+} avec l'histidine et la biotine, des systèmes d'immobilisation ont pu être mis au point pour des molécules marquées à ces derniers [176] [179] [182] [212]. C'est sur ces mêmes propriétés qu'est basée l'élaboration de nos différents biocapteurs. Bien qu'il ne soit pas neutre dans la zone de pH d'utilisation (et donc susceptible d'induire de nombreuses interactions non spécifiques) il nous a paru intéressant de tester son utilisation dans le cadre de l'élaboration du biocapteur à AVP, les deux polymères précédents n'ayant pas entièrement répondu aux attentes.

1. Préparation des électrodes

1.1. Etude du monomère en solution

La caractérisation électrochimique du monomère a été réalisée en milieu organique qui est également le milieu de synthèse du polymère. Une solution de monomère (pyrrole NTA) a été préparée dans une solution de $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$. Quelques gouttes d'acide

perchlorique (HClO_4) ont été ajoutées à la solution pour permettre la solubilisation du monomère. Un pic anodique irréversible est observé à 1 V vs Ag^+/Ag (dans une solution de $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de AgNO_3 dans la solution électrolytique) sur le voltampérogramme cyclique obtenu (Figure 52). Ce pic correspond à l'oxydation du motif pyrrole du pyrrole NTA et est en bon accord avec les potentiels décrits dans la littérature [190] [213].

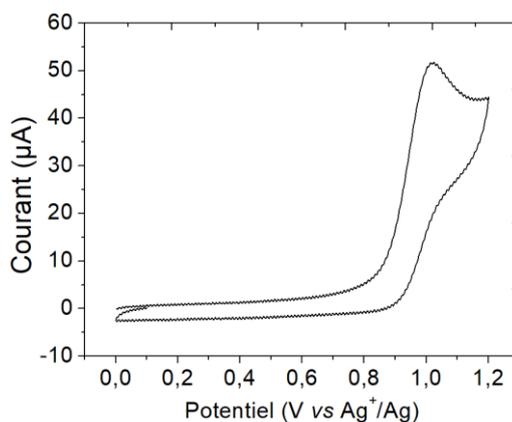


Figure 52: Voltampérogramme cyclique d'une solution de monomère de pyrrole NTA $2.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ sur électrode de platine ($\Phi = 3 \text{ mm}$) à une vitesse de balayage de $0,1 \text{ V.s}^{-1}$.

1.1.1. Polymérisation par voltampérométrie cyclique

Comme ce fut le cas pour les autres polymères, une première polymérisation par voltampérométrie cyclique (Figure 53A) a été réalisée avec 20 cycles de balayage. Le voltampérogramme cyclique obtenu en transférant l'électrode dans une solution électrolytique ($\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de LiClO_4) exempte de monomère montre la persistance du signal rédox réversible (avec $I_{\text{pa}} = 3 \mu\text{A}$) du polypyrrole (Figure 53B.b) confirmant ainsi l'adhérence du film de polypyrrole. Ce signal est plus important que celui obtenu pour le polypyrrole NHS (Figure 33B.b) mais plus faible que celui du polypyrrole adamantane (Figure 45B.b).

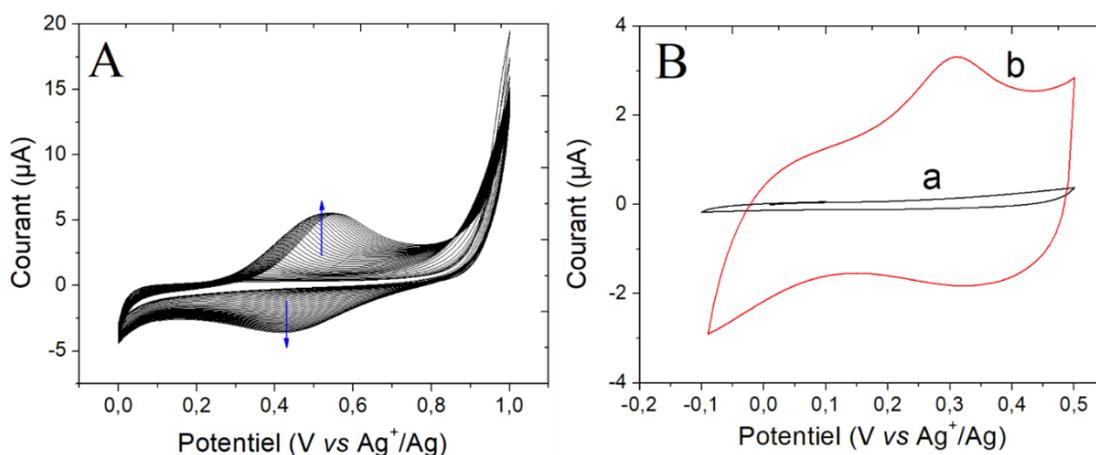


Figure 53: A) Electropolymérisation par voltampérométrie cyclique du pyrrole NTA ($2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) dans $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ sur électrode de platine ($\Phi = 3 \text{ mm}$) à une vitesse de balayage de $0,1 \text{ V.s}^{-1}$. B) Voltampérogrammes cycliques de l'électrode nue (a) et recouverte d'un film de polypyrrole NTA (b) transférées dans une solution de $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ exempte de monomère, à une vitesse de balayage de $0,1 \text{ V.s}^{-1}$.

1.1.2. Polymérisation à par chronoampérométrie

Pour la conception du biocapteur et comme ce fut le cas pour les deux polymères précédents (polypyrrole adamantane et NHS), le polypyrrole NTA a été formé par chronoampérométrie avec une densité de charge de $2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$ ($Q = 0,18 \text{ mC}$ pour une surface d'électrode $\Phi = 3 \text{ mm}$).

Une fois le dépôt effectué, le film de polymère est caractérisé dans une solution électrolytique exempt de monomère par voltampérométrie cyclique (Figure 54). Le voltampérogramme de l'électrode modifiée (Figure 54b) montre la persistance du signal rédox du polymère, qui est absent sur l'électrode de platine nue (Figure 54a) confirmant la présence du polypyrrole NTA à la surface de l'électrode.

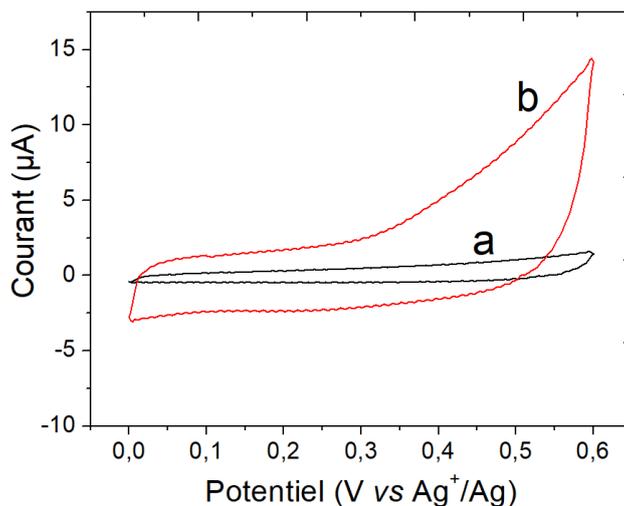


Figure 54: Voltampérogrammes cycliques dans une solution de $\text{CH}_3\text{CN} + 0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ de l'électrode de platine ($\Phi = 3 \text{ mm}$) nue (a) et modifiée (b) avec le polypyrrole NTA polymérisé par électrolyse à potentiel constant $E = 0,85 \text{ V vs Ag}^+/\text{Ag}$ ($Q = 0,18 \text{ mC}$) ; Vitesse de balayage de $0,1 \text{ V.s}^{-1}$.

Le rendement d'électropolymérisation a été évalué à $\eta = 67 \%$ ($\Gamma_{\text{réelle}} = 7,59 \cdot 10^{-9} \text{ mole.cm}^{-2}$) dans le cas du dépôt de notre polymère. Il est beaucoup plus important que celui obtenu pour le polypyrrole NHS et très légèrement inférieur à celui obtenu pour le polypyrrole adamantane. D'autre part, il est supérieur à celui obtenu dans la littérature [190], ce qui témoigne d'un bon processus d'électropolymérisation.

1.2. Greffage de l'aptamère basé sur l'interaction NTA/ Cu^{2+} /biotine

1.2.1. Le complexe NTA- Cu^{2+}

L'acide nitrilotriacétique (NTA) est un chélateur dit quadridentate, c'est-à-dire qu'il forme quatre liaisons avec les ions métalliques séquestrés ; il complexe donc fortement les ions Cu^{2+} et Ni^{2+} , qui sont de valence six. Les deux sites vacants de ces ions une fois complexés peuvent alors être occupés soit par des molécules d'eau (Figure 55) soit par d'autres ligands.

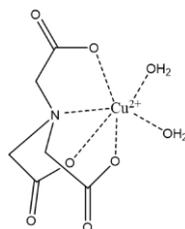


Figure 55: Représentation schématique du complexe NTA/ Cu^{2+} lié à deux molécules d'eau.

Afin de réaliser cette complexation du cuivre par les groupements NTA du film de polypyrrole déposé sur l'électrode, cette dernière modifiée par le polypyrrole NTA a été incubée dans une solution tampon acétate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ $\text{pH} = 4,8$ contenant du CuCl_2 ($10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$), sous agitation pendant 15 minutes. L'électrode est ensuite rincée dans une solution de NaCl $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ puis dans un tampon phosphate à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ salin, $\text{pH} = 7,4$.

Pour caractériser la complexation des ions Cu^{2+} par les groupements NTA présents à la surface de l'électrode, une électrolyse à $-0,9 \text{ V}$ vs Ag/AgCl dans une solution saturée en KCl pendant 40 secondes a été réalisée sur l'électrode modifiée. Cette électrolyse permet de réduire les cations Cu^{2+} complexés par le film en Cu^0 . Ensuite, un balayage de potentiel par voltampérométrie cyclique entre $-0,9$ et $0,5 \text{ V}$ dans une solution de NaCl $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ dans de l'eau distillée permet de visualiser les pics d'oxydation du cuivre au degré zéro en Cu(I) puis en Cu(II) (Figure 56) [214].

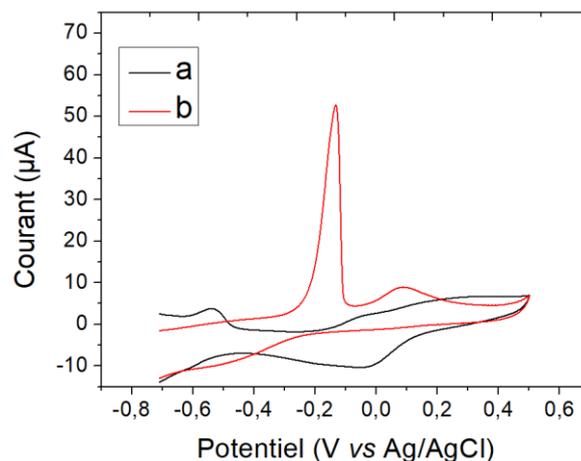


Figure 56: Voltampérogrammes d'une électrode de platine ($\Phi = 3 \text{ mm}$) modifiée par un film de polypyrrole NTA ($\Gamma_{\text{réel}} = 2,12 \cdot 10^{-9} \text{ mole.cm}^{-2}$ dans $\text{H}_2\text{O} + 0,5 \text{ mol.L}^{-1} \text{ NaCl}$ après électrolyse de 40 secondes à $-0,9 \text{ V}$ avant (a) et après (b) incubation dans une solution de CuCl_2 ($10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) dans un tampon acétate ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,8$).

Les courbes de Figure 56 représentent les voltampérogrammes obtenus pour les électrodes recouvertes de polypyrrole NTA avant (Figure 56.a) et après (Figure 56.b) incubation dans la solution de CuCl_2 . Cette dernière (Figure 56.b) montre l'apparition de deux pics à $-0,17 \text{ V}$ et à $0,1 \text{ V}$, pics qui correspondent respectivement à l'oxydation du Cu^0 en Cu^+ et du Cu^+ en Cu^{2+} . La présence de ces pics corrobore la complexation du Cu^{2+} par le film de polypyrrole NTA.

La concentration surfacique en ions Cu^{2+} peut être déterminée grâce à l'intégration de la charge sous les deux pics anodiques en utilisant l'équation II-1. En considérant un nombre d'électrons échangé $n = 2$, cette concentration surfacique a été évaluée à $\Gamma_{\text{Cu}^{2+}} = 3,66 \cdot 10^{-9}$

mole.cm⁻². Le taux de recouvrement en ions Cu²⁺ a pu être calculé en faisant le rapport de cette concentration surfacique par celle du polypyrrole NTA ($T_{Cu^{2+}} = \Gamma_{Cu^{2+}} / \Gamma_{NTA-réelle}$). Il a été évalué à 48% et est resté du même ordre de grandeur pour plusieurs temps d'électrolyse testés (20, 40, 60 et 80 secondes). Il est donc optimal dans les conditions opératoires de nos travaux et est supérieur à celui obtenu lors des travaux de Haddour et al. [213]. Cependant, il est important de préciser que la concentration surfacique en ions Cu²⁺ calculée prend en compte les ions Cu²⁺ localisés en surface et au sein du polymère et que seuls les ions Cu²⁺ de surface sont impliqués dans le greffage des biomolécules.

1.2.2. Le système NTA/Cu²⁺/biotine

La biotine est une vitamine hydrosoluble (vitamine B₈ ou H) qui agit comme coenzyme dans le métabolisme des acides gras et des acides aminés. Elle est composée d'un noyau de 2-imidazolidinone fusionné avec un noyau tétrahydrothiophène substitué d'un acide pentanoïque (Figure 57).

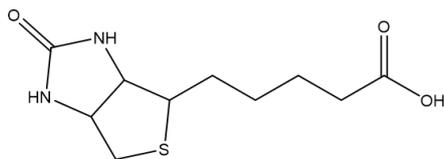


Figure 57: Structure de la biotine.

Pour l'immobilisation de biomolécules, elle est très connue pour son interaction très forte avec l'avidine ou d'autres molécules ayant la même activité (streptavidine, neutravidine...) [215]. Il a été aussi démontré que la biotine est capable d'établir une liaison de coordination avec les ions métalliques tels que Mn²⁺, Zn²⁺ et Cu²⁺, une interaction qui impliquerait l'atome de soufre de la biotine [216]. L'aisance de greffage de la biotine à des biomolécules telles que les aptamères a permis de se servir du système NTA/Cu²⁺/biotine pour l'immobilisation de ces derniers. La Figure 58 présente le schéma d'immobilisation d'un aptamère modifié à la biotine sur des électrodes fonctionnalisées au polypyrrole NTA.

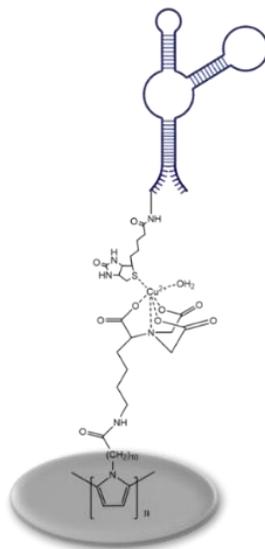


Figure 58: Schéma de l'immobilisation de l'aptamère avec un complexe polypyrrole NTA/Cu²⁺/biotine.

1.2.3. Optimisation du taux de recouvrement en aptamère

La quantité d'aptamère déposée à la surface de l'électrode impacte indubitablement les performances du biocapteur. Dans cette optique, nous avons mené des essais pour déterminer le taux de recouvrement surfacique en aptamère en fonction de la concentration en aptamère déposée à la surface d'électrodes fonctionnalisées au complexe polypyrrole NTA/Cu²⁺.

Pour ce faire, nous nous sommes appuyés sur la capacité du ruthénium III hexamine [Ru(NH₃)₆³⁺] à complexer l'ADN grâce à des interactions électrostatiques avec les charges négatives des groupements phosphate de ce dernier (Figure 59A) [217].

Dans un premier temps, l'électrode recouverte du complexe polypyrrole NTA/Cu²⁺ a été rincée, incubée dans une solution de Ru(NH₃)₆³⁺ à 10⁻² mol.L⁻¹ dans le tampon phosphate (0,1 mol.L⁻¹, pH = 7,4), avant d'être caractérisée par voltampérométrie cyclique (balayage entre 0 et -0,5 V) (Figure 59B). Le balayage est effectué d'abord dans le sens de la réduction afin de réduire dans un premier temps tous les ions Ru^{III} en Ru^{II}. Le signal rédox résultant (courbe a) est un signal réversible caractérisé par un pic de réduction du Ru^{III} en Ru^{II} à -0,38 V suivi d'un pic d'oxydation à -0,28 V. Etant en absence d'aptamère à la surface de l'électrode, l'obtention d'un signal rédox du ruthénium pourrait être expliquée par sa complexation avec les fonctions NTA (qui portent des charges négatives) libres du polypyrrole (le taux de complexation en ions Cu²⁺ étant inférieur à 100%).

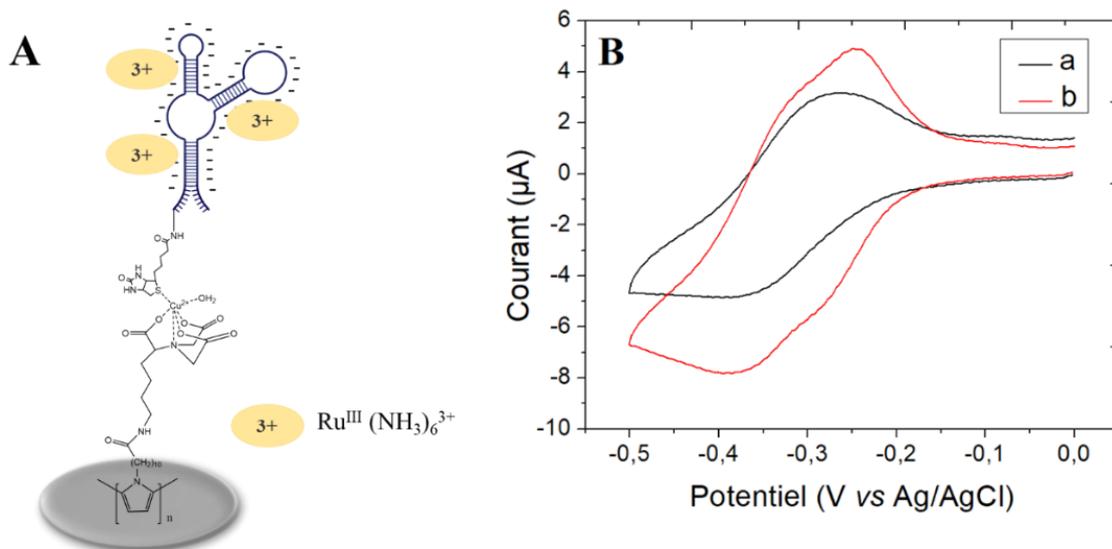


Figure 59: A) Représentation schématique de complexation entre l'aptamère immobilisé à la surface de l'électrode et le $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ pour la détermination du taux de recouvrement. B) Voltampérogramme cyclique de l'électrode modifiée par l'aptamère avant (a) et après incubation (b) de l'électrode dans une solution de tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contenant $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ à $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ et après rinçage de l'électrode sous agitation, à une vitesse de balayage de 50 mV.s^{-1} .

D'autre part, différentes électrodes ont été fonctionnalisées avec différentes concentrations d'aptamère. Pour ce faire, avant d'être déposé sur la surface de l'électrode, l'aptamère a été dénaturé à 80°C pendant 5 minutes puis laissé dans de la glace pendant 30 minutes pour figer sa structure. $15 \mu\text{L}$ de la solution d'aptamère ainsi préparée ont été déposés sur les électrodes recouvertes du complexe polypyrrole NTA/ Cu^{2+} pour une incubation de 45 minutes.

Les électrodes fonctionnalisées à l'aptamère ont été ensuite rincées avant d'être à leur tour incubées dans la solution de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ préparée. La Figure 59B.b représente le voltampérogramme cyclique (balayage entre 0 et $-0,5 \text{ V}$) d'une électrode fonctionnalisée avec $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ d'aptamère. Celui-ci révèle la présence cette fois-ci d'un signal rédox réversible avec des pics de réduction et d'oxydation du Ru^{III} plus importants que dans le cas de l'électrode recouverte de polypyrrole NTA/ Cu^{2+} uniquement. Ces pics plus importants sont le résultat de la présence à la surface de l'électrode d'une quantité de Ru^{III} complexé plus importante, grâce aux aptamères.

L'intensité des pics anodique et cathodique obtenus est proportionnelle à la vitesse de balayage (Figure 59A), ce qui témoigne que le signal observé n'est pas lié à une éventuelle diffusion du $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ mais bien à son immobilisation à la surface de l'électrode grâce aux interactions électrostatiques avec l'aptamère négativement chargé.

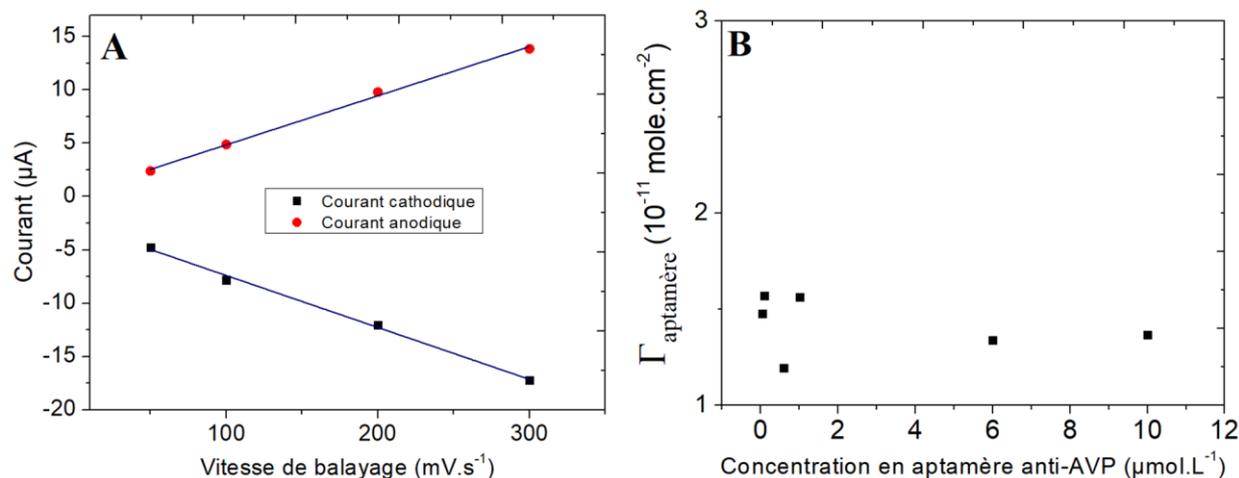


Figure 60: Courbes montrant la variation du courant en fonction de la vitesse de balayage pour des électrodes recouvertes d'aptamères complexés au $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$; B) Concentration surfacique en aptamère des électrodes en fonction de la concentration en aptamère déposée.

A l'aide de l'intégration de la charge sous les pics anodiques et cathodiques résultant de l'électroactivité du couple rédox $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$, il a été possible de déterminer la concentration surfacique en ions ruthénium associés aux aptamères de l'électrode, grâce à l'équation II-1. Pour ce calcul, c'est la différence de charge $\Delta Q = Q_b - Q_a$ (avec Q_b et Q_a les charges obtenues après intégration des pics respectivement après et avant greffage des aptamères) qui a été utilisée. En partant de l'hypothèse qu'une molécule de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ du fait de sa charge [+3] peut se lier à trois groupements phosphate (donc 3 bases) de charge [-1] de l'aptamère et que l'aptamère comporte 55 bases, la concentration surfacique en aptamère a pu être déduite de celle en $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ ($\Gamma_{\text{aptamère}} = 3 \times \Gamma_{\text{Ru}}/55$).

Ainsi, pour différentes concentrations en aptamère incubées à la surface de l'électrode, il a été possible de calculer la concentration surfacique correspondante. La Figure 60 B montre la variation de cette concentration surfacique $\Gamma_{\text{aptamère}}$ en fonction des concentrations en aptamère déposées (entre 0,1 et 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). La concentration surfacique reste relativement constante sur toute la gamme de concentration testée (entre $1,19 \cdot 10^{-11}$ mole.cm⁻² pour une concentration de 6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et $1,56 \cdot 10^{-11}$ mole.cm⁻² pour une concentration de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'aptamère).

La concentration de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'aptamère a été retenue la concentration comme optimale pour la suite de nos travaux, elle permet d'obtenir une bonne concentration surfacique en utilisant une quantité relativement faible en aptamère, ce qui pourrait être pertinent dans le cadre du développement de l'aptacapteur à L-AVP.

Le taux de recouvrement en aptamère par rapport au cuivre ($T_{\text{aptamère}/\text{Cu}^{2+}} = \Gamma_{\text{aptamère}} / \Gamma_{\text{Cu}^{2+}}$) a été évalué à 0,4%. Ce taux est très faible et pourrait être expliqué par deux raisons principales.

La première raison est liée au calcul effectué ; en effet la concentration surfacique $\Gamma_{\text{Cu}^{2+}}$ utilisée pour ce calcul comprend les ions Cu^{2+} de surface et ceux au sein du polymère. L'aptamère se greffant uniquement aux ions Cu^{2+} de surface, le taux de recouvrement en aptamère devrait être calculé en tenant uniquement compte de la concentration surfacique des ions Cu^{2+} de surface. Le calcul du taux de recouvrement comme effectué dans notre cas sous-estime sa valeur réelle. La deuxième raison est liée à la concentration surfacique en aptamère. A titre comparatif, pour une concentration en aptamère de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et dans les mêmes conditions opératoires, Kazane et al. [182] ont obtenu une concentration surfacique de $\Gamma_{\text{aptamère}} = 1,84.10^{-10} \text{ mole.cm}^{-2}$ pour un aptamère de taille plus importante, soit une concentration surfacique environ 10 fois plus importante que celle obtenue dans nos travaux. Cette faible concentration surfacique ($1,56.10^{-11} \text{ mole.cm}^{-2}$) explique aussi le faible taux de recouvrement en aptamère et pourrait éventuellement avoir un impact sur les performances de notre aptacapteur, notamment en termes de spécificité.

2. Performances du biocapteur

2.1. Utilisation de la sonde QH_2

A $\text{pH} = 7,4$ qui est celui du tampon phosphate utilisé, les fonctions carboxyliques de l'acide NTA sont entièrement déprotonées ($\text{pK}_a = 3$), ce qui confère au polypyrrole NTA (et donc à la surface de l'électrode qui en est fonctionnalisée) une charge globale négative [218]. Malgré les contraintes précédemment citées liées à son usage, le choix du QH_2 comme sonde électrochimique a été la première option envisagée du fait de sa neutralité, afin de limiter l'effet des répulsions électrostatiques avec les groupements carboxylates du polymère [123]. Ce choix est également privilégié dans la littérature pour le développement d'aptacapteurs à base d'un film de polypyrrole NTA [180] [182].

L'hydroquinone est une sonde électrochimique neutre dont l'oxydation aboutit à la formation de quinone (Figure 61). Elle est adaptée aux systèmes analytiques faisant appel à des entités de charge non-neutre. Cette molécule étant photosensible, afin de nous assurer que les variations de signal observées ne résultent pas d'une éventuelle photo-dégradation, la cellule électrochimique a été entièrement isolée de la lumière.

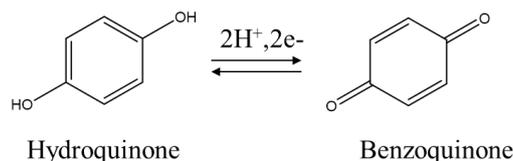


Figure 61 : Formules du couple benzoquinone (Q)/hydroquinone (QH₂).

Contrairement au couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ pour lequel il est généralement préparé un mélange équimolaire, seul le QH₂ est préparé dans le tampon phosphate à une concentration de 2 mmol.L⁻¹. Cette solution est nouvellement préparée à chaque utilisation. Pour les mesures d'impédance, le potentiel de consigne a été déterminé par voltampérométrie à balayage linéaire et a été fixé à $E_c = 0,14 \text{ V vs Ag/AgCl}$. L'amplitude de perturbation a été maintenue à 10 mV_{rms} sur une gamme de fréquence allant de 50000 à 0,1 Hz avec un nombre de fréquences par décade de 13.

2.1.1.1. Performances du biocapteur à AVP

Les expériences menées avec le $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ ont permis de confirmer la présence du polymère et de l'aptamère à la surface de l'électrode, les caractérisations des étapes de fonctionnalisation par voltampérométrie cyclique et par spectroscopie d'impédance comme ce fut le cas pour les polymères précédents ne sont pas présentées.

De nouvelles électrodes fonctionnalisées au polypyrrole NTA/Cu²⁺/aptamère avec 1 μmol.L⁻¹ d'aptamère incubé pour la dernière étape de fonctionnalisation ont été utilisées pour évaluer les performances du biocapteur.

Les voltampérogrammes cycliques réalisés entre -0,5 et 0,5 V vs Ag/AgCl à une vitesse de balayage de 10 mV.s⁻¹ ont permis de caractériser ces performances après ajout des énantiomères D et L de l'AVP (Figure 62A et C). Ces voltampérogrammes montrent de manière générale un système rédox réversible lent (limité par le transfert d'électrons de l'hydroquinone vers la surface de l'électrode) caractéristique du QH₂.

Les intensités des pics anodique et cathodique (à 0,29 V et -0,03 V vs Ag/AgCl respectivement) sont restées stables ($I_{pa} = 14 \text{ μA}$ et $I_{pc} = -17 \text{ μA}$) malgré l'ajout de concentrations croissantes de D-AVP (Figure 62A). Le diagramme de Nyquist des spectres d'impédance correspondant montre quant à lui une légère augmentation de la résistance au transfert de charge suggérant qu'il y a bien une réponse du biocapteur (Figure 62B).

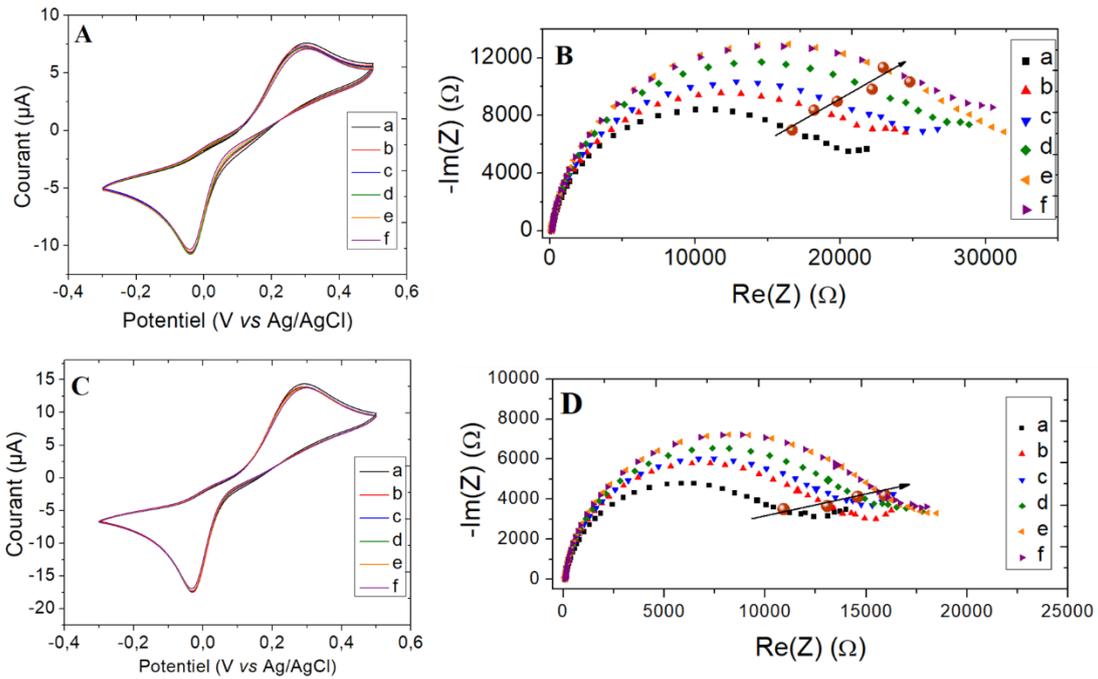


Figure 62: Voltampérommes cycliques enregistrés à une vitesse de balayage de 10 mV/s pour le biocapteur à base de polypyrrole NTA/Cu²⁺/biotine après incubation de différentes concentrations d'AVP : a) 0 mol.L⁻¹ ; b) 3,2.10⁻¹⁴ mol.L⁻¹ ; c) 3,2.10⁻¹³ mol.L⁻¹ ; d) 3,2.10⁻¹² mol.L⁻¹ ; e) 3,2.10⁻¹¹ mol.L⁻¹ , f) 3,2.10⁻¹⁰ mol.L⁻¹ de D-AVP (A) et de L-AVP (C). Diagramme de Nyquist des spectres obtenus pour le même biocapteur aux mêmes concentrations en D-AVP (B) et L-AVP (D). Mesures effectuées dans une solution de QH₂ (2.10⁻³ mol.L⁻¹) dans un tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹ , pH =7,4; les points d'isofréquence sont représentés par une sphère marron.

Les mêmes tendances de variation ont été observées pour les voltampérommes cycliques et le diagramme de Nyquist des spectres après ajout de L-AVP mais avec des variations moins importantes (Figure 62C et D).

Le Tableau 8 regroupe les valeurs de ΔZ en fonction de concentrations croissantes de D-AVP et de L-AVP à une fréquence de 0,39 Hz. Les incertitudes présentées sont les incertitudes sur la valeur moyenne de ΔZ pour 2 électrodes différentes pour chaque concentration. Ce tableau montre des valeurs de $\Delta Z_{0,39 \text{ Hz}}$ relativement plus importantes pour la D-AVP que pour la L-AVP sur toute la gamme de concentration étudiée.

Tableau 8: Valeurs de ΔZ obtenues après ajout de la D-AVP ou de la L-AVP en utilisant la sonde QH_2 à une fréquence de 0,39 Hz.

Concentration (mol.L ⁻¹)	$\Delta Z_{0,39 \text{ Hz}} (\Omega)$	
	D-AVP	L-AVP
$3,2 \cdot 10^{-14}$	3600 ± 2300	1600 ± 700
$3,2 \cdot 10^{-13}$	4400 ± 1100	900 ± 2100
$3,2 \cdot 10^{-12}$	5200 ± 1400	2700 ± 1000
$3,2 \cdot 10^{-11}$	7600 ± 1700	3300 ± 2100
$3,2 \cdot 10^{-10}$	7500 ± 200	4300 ± 400

Les courbes d'étalonnage dressées grâce aux valeurs du tableau 5 sont présentées sur la figure 36. Elles montrent pour la D-AVP (Figure 63.a) une réponse peu linéaire ($R^2 = 0,919$ entre $3,2 \cdot 10^{-14}$ et $3,2 \cdot 10^{-10}$ mol.L⁻¹) avec des dispersions de réponse relativement importantes (coefficient de variation allant jusqu'à 64% pour une concentration de $3,2 \cdot 10^{-14}$ mol.L⁻¹ entre deux électrodes). Ces coefficients de variation sont également très importants pour la L-AVP (jusqu'à 230% pour une concentration de $3,2 \cdot 10^{-13}$ mol.L⁻¹) (Figure 63.b).

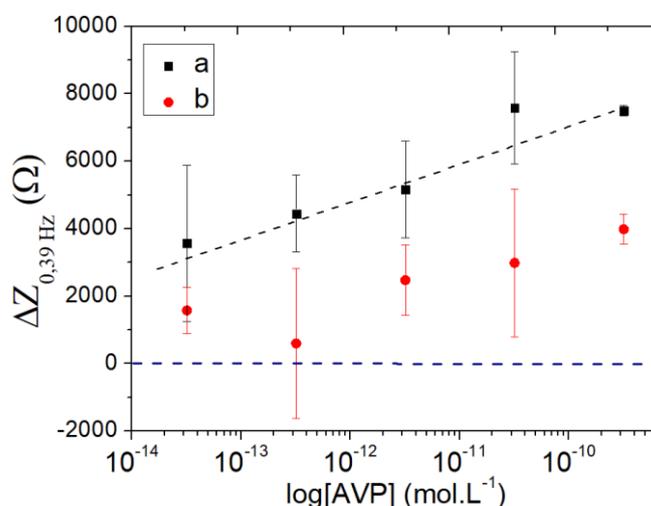


Figure 63: Courbes d'étalonnage montrant la variation du paramètre $\Delta Z_{0,39 \text{ Hz}}$ en fonction de la concentration en D-AVP (a) et L-AVP (b) pour le biocapteur à polypyrrole NTA avec la sonde QH_2 , dans le tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹, pH = 7,4 ; n = 2.

Ces performances obtenues bien qu'intéressantes, ne permettent pas de conclure sur l'efficacité du système basé sur l'utilisation du polypyrrole NTA/Cu²⁺ avec la sonde QH_2 comme sonde électrochimique pour la détection de l'AVP, au vu de l'application envisagée pour ce biocapteur.

2.1.1.2. Performances du biocapteur à L-tyrosinamide (L-Tym)

Etendre son usage à de petites cibles autres que l'AVP pourrait aider à mieux comprendre les différents phénomènes mis en jeu. A cet effet, nous avons mis au point de nouveaux biocapteurs à L-tyrosinamide et à adénosine notamment.

L'amide de la L-tyrosine a un effet sur l'attention, la motivation et la régulation de l'humeur [219] alors que la L-tyrosinamide, quant à elle n'a pas d'intérêt médical particulier, mais elle est très utilisée pour l'étude de nouvelles techniques de détection à base d'aptamères pour les petites molécules car son aptamère montre un grand changement conformationnel lors de la fixation à sa cible [220]–[223].

Comme réalisé précédemment pour l'AVP, un aptacapteur impédancemétrique pour la L-tyrosinamide (L-Tym, Figure 64) a été conçu en utilisant le complexe polypyrrole NTA/Cu²⁺/biotine pour l'immobilisation de l'aptamère anti L-Tym. La L-AVP a été utilisée pour tester la spécificité du biocapteur.

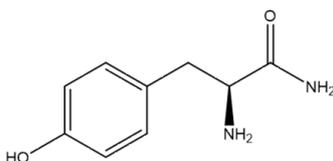


Figure 64: Structure de la L-tyrosinamide.

L'aptamère anti-tyrosinamide utilisé est un 23 mer en série ADN dont la séquence est 5'Biotine-TEG-TGT GGT GTG TGA GTG CGG TGC CC. Le QH₂ a été reconduit comme sonde électrochimique.

De manière générale, les voltampérogrammes cycliques à 10 mV.s⁻¹ montrent une faible diminution de l'intensité du courant anodique (Figure 65A) en fonction de concentrations croissantes de L-Tym et une augmentation plus importante de la résistance au transfert de charge (Figure 65B). Pour la L-AVP les signaux obtenus ne suivent aucun sens de variation précis (Figure 65C et D).

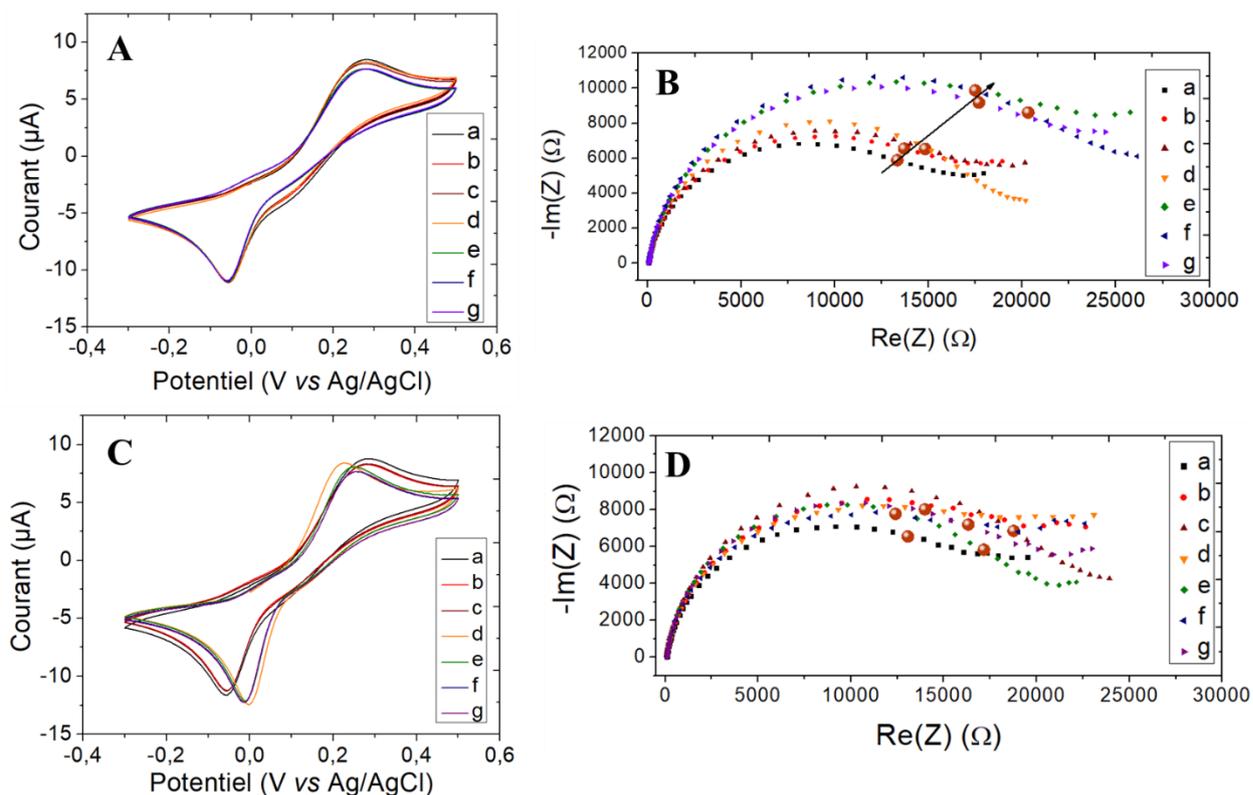


Figure 65: Voltampérogrammes cycliques enregistrés à une vitesse de balayage de 10 mV/s pour le biocapteur à base de polypyrrole NTA/Cu²⁺/biotine après incubation de différentes concentrations d'AVP : a) 0 mol.L⁻¹ ; b) 10⁻¹² mol.L⁻¹ ; c) 10⁻¹¹ mol.L⁻¹ ; d) 10⁻¹⁰ mol.L⁻¹ ; e) 10⁻⁹ mol.L⁻¹ , f) 10⁻⁸ mol.L⁻¹ , g) 10⁻⁷ mol.L⁻¹ de L-Tym (A) et de L-AVP (C). Diagramme de Nyquist des spectres obtenus pour le même biocapteur aux mêmes concentrations en L-Tym (B) et L-AVP (D). Mesures effectuées dans une solution de QH₂ (2 × 10⁻³ mol.L⁻¹) dans un tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹ , pH =7,4; les points d'isofréquence sont représentés par une sphère marron.

Le Tableau 9 regroupe les valeurs de ΔZ en fonction de concentrations croissantes de L-Tym et de L-AVP à une fréquence de 0,41 Hz. Les incertitudes présentées sont les incertitudes sur la valeur moyenne de ΔZ pour 2 électrodes différentes pour chaque concentration de L-Tym ou de L-AVP.

Tableau 9 : Valeurs de ΔZ obtenues après ajout de la L-Tym ou de la L-AVP sur les électrodes fonctionnalisées à l'aptamère anti-Tym utilisant la sonde QH_2 .

Concentration (mol.L ⁻¹)	$\Delta Z_{0,41 \text{ Hz}} (\Omega)$	
	L-Tym	L-AVP
10 ⁻¹²	80 ± 970	2200 ± 700
10 ⁻¹¹	1200 ± 600	5200 ± 700
10 ⁻¹⁰	4100 ± 1200	1700 ± 700
10 ⁻⁹	6800 ± 1700	3400 ± 700
10 ⁻⁸	6700 ± 1100	1800 ± 700

L'analyse quantitative des signaux de ces spectres d'impédance a permis de dresser les courbes d'étalonnage de la Figure 66. Il peut être noté une augmentation de l'impédance après ajout de concentrations croissantes de la L-Tym (jusqu'à $\Delta Z_{0,41 \text{ Hz}} = 6800 \pm 1700 \Omega$ pour une concentration de 10⁻⁹ mol.L⁻¹) avec une gamme de linéarité ($R^2 = 0,975$) de 3 ordres de grandeur (10⁻¹² à 10⁻⁹ mol.L⁻¹). Un plateau de signal est atteint à une concentration 10⁻⁹ mol.L⁻¹.

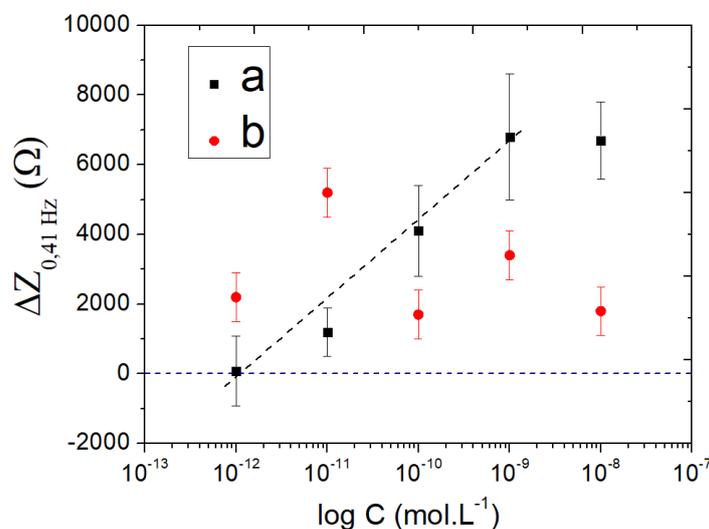


Figure 66: Courbes d'étalonnage montrant la variation du paramètre $\Delta Z_{0,41 \text{ Hz}}$ en fonction de la concentration en L-Tym (a) et L-AVP (b) pour le biocapteur à polypyrrole NTA avec la sonde QH_2 , dans le tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹, pH = 7,4 ; n = 2.

On peut supposer que ce plateau entre 10⁻⁹ et 10⁻⁸ mol.L⁻¹ de L-Tym correspond à une saturation des aptamères (état d'équilibre). La L-Tym étant neutre à pH = 7,4, il peut être conclu que l'augmentation de cette impédance résulte de la reconnaissance entre l'aptamère et

la cible et que la réponse produite par le biocapteur résulte de l'accumulation de L-Tym à la surface de l'électrode.

Les observations faites après ajout de la L-AVP n'ont quant à elles pas été concluantes. La réponse du biocapteur bien que relativement importante pour certaines concentrations (jusqu'à $\Delta Z_{0,41 \text{ Hz}} = 5200 \pm 700 \Omega$ pour une concentration de $10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$), est aléatoire et peut être considérée comme non spécifique. Cette variation aléatoire résulte certainement de phénomènes d'adsorption et de désorption non spécifiques de la L-AVP sur la surface des électrodes.

2.1.1.3. Performances du biocapteur à adénosine

L'adénosine est un nucléoside endogène pouvant provenir de l'hydrolyse de l'adénosine-monophosphate (AMP). Grâce à ses récepteurs situés au niveau du cœur, des bronches, du système nerveux central (récepteurs A_1 et A_2) [224], des vaisseaux sanguins (récepteurs A_2), l'adénosine a des effets cardiovasculaire (bradycardie et vasodilatation) [225], bronchoconstricteur [226], sédatif et anticonvulsivant [227].

Toujours dans le but d'évaluer l'utilisation du complexe polypyrrole NTA/ Cu^{2+} pour l'immobilisation des aptamères dans l'élaboration d'aptacapteurs électrochimiques, nous avons élaboré un aptacapteur impédancemétrique pour la détection de l'adénosine. Ce biocapteur a été mis au point sur le même principe que ceux développés pour la détection de la D-AVP et de la L-Tym.

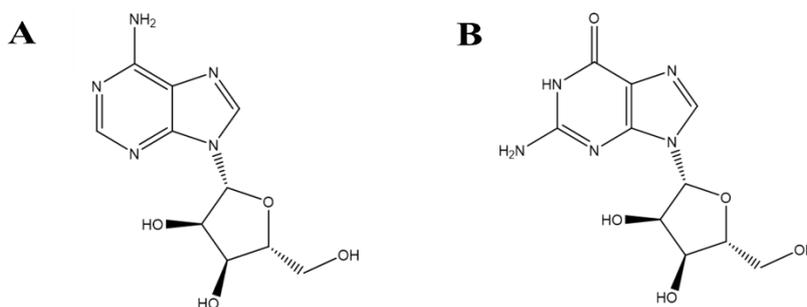


Figure 67: Structures de l'adénosine (A) et de la guanosine (B).

L'aptamère utilisé est un aptamère anti-adénosine en série ADN de 25 bases dont la séquence est : 5' CCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGG 3'.

Du fait de sa structure très proche de celle de l'adénosine, la guanosine (Figure 67) a été utilisée pour évaluer la spécificité de l'aptacapteur à adénosine. La sonde neutre QH_2 a été

utilisée comme sonde électrochimique en solution pour suivre les variations de signaux électrochimiques (Figure 68).

Pour l'adénosine, les voltampérogrammes cycliques montrent un sens de variation aléatoire de l'intensité du pic du courant anodique I_{pa} (Figure 68A) en fonction de concentrations croissantes. C'est la même chose pour l'impédance (Figure 68B). Les mêmes observations sont faites pour les voltampérogrammes cycliques (Figure 68C) et le diagramme de Nyquist des spectres d'impédance (Figure 68D) dans le cas de la guanosine.

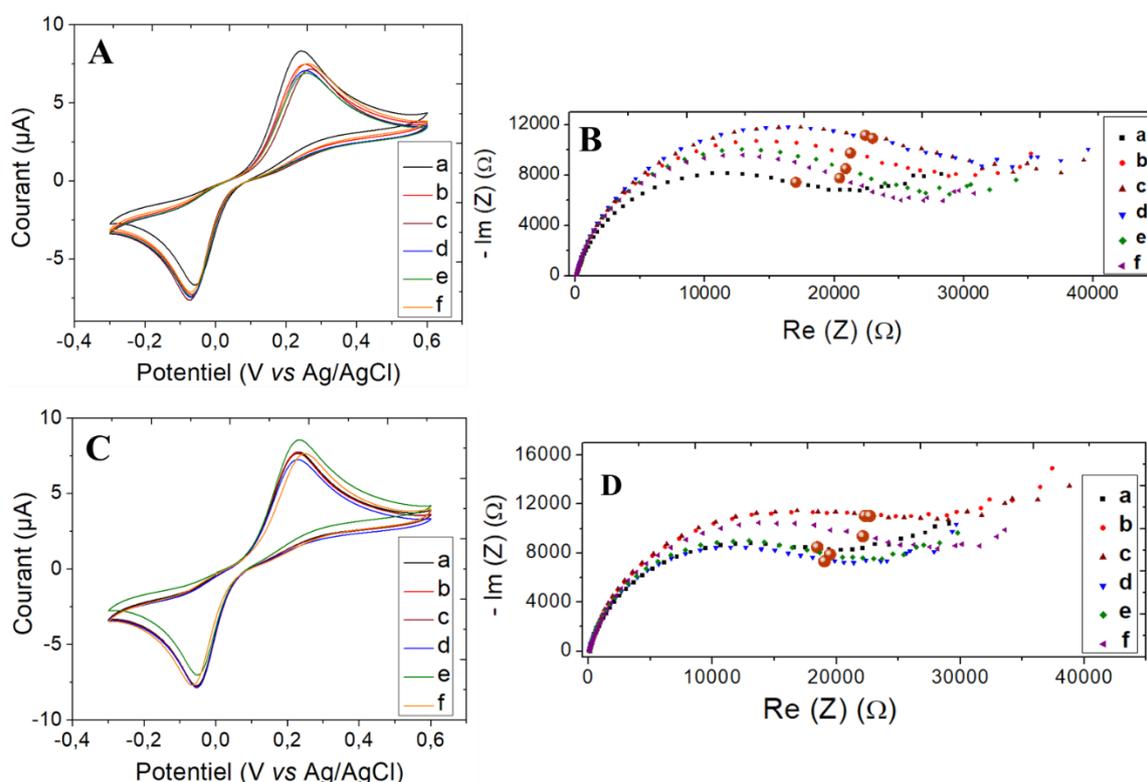


Figure 68: Voltampérogrammes cycliques enregistrés à une vitesse de balayage de 10 mV/s pour le biocapteur à base de polypyrrole NTA/Cu²⁺/biotine après incubation de différentes concentrations d'AVP : a) 0 mol.L⁻¹ ; b) 10⁻¹⁴ mol.L⁻¹ ; c) 10⁻¹² mol.L⁻¹ ; d) 10⁻¹⁰ mol.L⁻¹ ; e) 10⁻⁸ mol.L⁻¹ ; f) 10⁻⁶ mol.L⁻¹ de l'adénosine (A) et de la guanosine (C). Diagramme de Nyquist des spectres obtenus pour le même biocapteur aux mêmes concentrations en adénosine (B) et la guanosine (D). Mesures effectuées dans une solution de QH₂ (2 × 10⁻³ mol.L⁻¹) dans un tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹, pH =7,4; les points d'isofréquence sont représentés par une sphère marron.

Le Tableau 10 regroupe les valeurs de ΔZ en fonction de concentrations croissantes d'adénosine et de guanosine à une fréquence de 0,41 Hz. Les incertitudes présentées sont les incertitudes sur la valeur moyenne de ΔZ pour 2 électrodes différentes pour chaque concentration. L'analyse du tableau révèle des valeurs de $\Delta Z_{0,41 \text{ Hz}}$ assez voisines pour l'adénosine et la guanosine pour plusieurs concentrations sur toute la gamme étudiée.

Tableau 10: Valeurs de ΔZ obtenues après ajout de l'adénosine ou de la guanosine sur les électrodes fonctionnalisées avec l'aptamère anti-adénosine en utilisant la sonde QH_2 .

Concentration (mol.L ⁻¹)	$\Delta Z_{0,41 \text{ Hz}} (\Omega)$	
	Adénosine	Guanosine
10 ⁻¹⁴	2400 ± 3300	3300 ± 600
10 ⁻¹²	5600 ± 1100	3900 ± 700
10 ⁻¹⁰	6400 ± 700	2000 ± 2500
10 ⁻⁸	4700 ± 1100	2500 ± 2300
10 ⁻⁶	5300 ± 2900	5900 ± 3800

Comme en témoignent les courbes d'étalonnage de la Figure 69, les variations des valeurs de l'impédance ne sont ni linéaires ni spécifiques à l'adénosine. Elles sont également peu reproductibles comme peut en témoigner la grande dispersion observée (des coefficients de variation allant jusqu'à 136%).

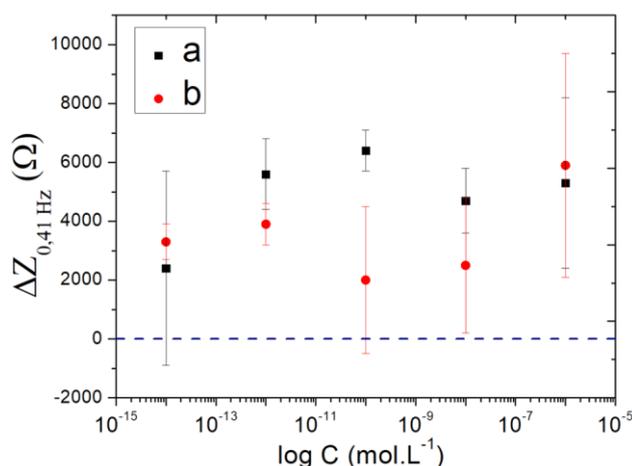


Figure 69: Courbes d'étalonnage montrant la variation du paramètre $\Delta Z_{0,41 \text{ Hz}}$ en fonction de la concentration en adénosine (a) et en guanosine (b) pour le biocapteur à base d'un film de polypyrrole NTA/Cu^{2+} avec la sonde QH_2 dans le tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹, pH = 7,4. n = 2.

Au vu des différents résultats obtenus avec trois cibles différentes mais avec un même système d'accroche de l'aptamère sur l'électrode et la même sonde rédox, on peut dire qu'il ne suffit pas de changer l'aptamère pour avoir un nouveau capteur. On voit clairement, que quelques mesures ne permettent pas de mettre au point un capteur. Les interactions aptamères/cibles sont spécifiques à chaque couple et nécessitent un travail de mise au point important avant de pouvoir réaliser un capteur performant. On peut dire que pour un même

polymère et une même sonde électrochimique, les résultats obtenus en électrochimie ne peuvent pas être prévus car ils dépendent très fortement de la nature du couple aptamère/cible.

2.1.2. Utilisation de la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$

De tous les biocapteurs à AVP conçus, celui à base de polypyrrole NHS et de la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ a montré les performances les plus prometteuses. Quand bien même la sonde QH_2 paraissait la plus adaptée en termes de neutralité pour les biocapteurs à base de polypyrrole NTA, des expériences ont été réalisées avec la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ afin d'en étudier les performances. A cet effet, nous avons mis au point un nouvel aptacapteur à AVP.

Une solution équimolaire (2 mmol.L^{-1}) de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ a été préparée dans le tampon phosphate ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$). Elle a permis dans un premier temps de caractériser les étapes de fonctionnalisation des électrodes (Figure 70).

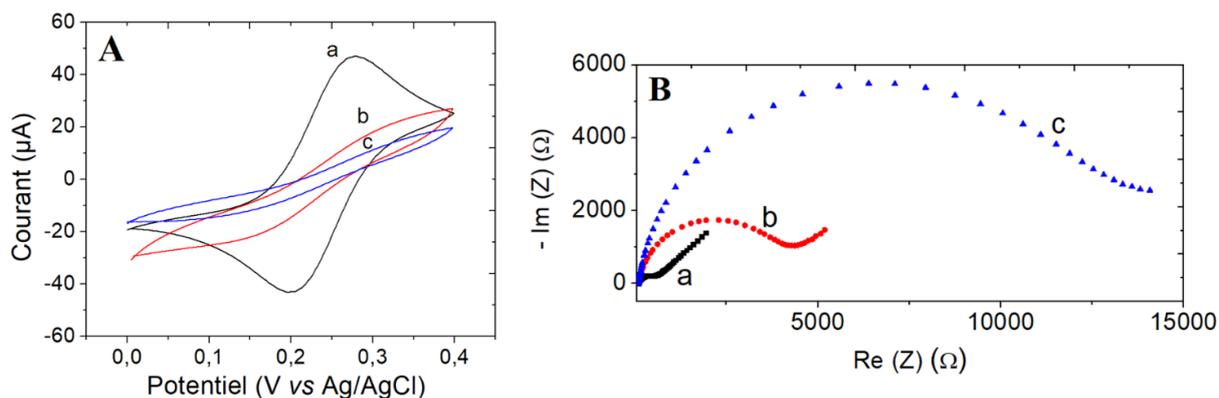


Figure 70: Caractérisation électrochimique d'une électrode de platine ($\Phi = 3 \text{ mm}$) avant (a) et après (b) dépôt d'un film de polypyrrole NTA ; (c) après greffage de l'aptamère anti-AVP comme indiqué sur chaque figure : (A) voltampérogrammes cycliques enregistrés à une vitesse de balayage de 100 mV/s , et (B) Diagramme de Nyquist des spectres d'impédance obtenus à l'OCP, avec un potentiel alternatif d'amplitude de $10 \text{ mV}_{\text{rms}}$ et un balayage de fréquence de 50000 Hz à $0,1 \text{ Hz}$. Toutes les mesures ont été effectuées en utilisant $2.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1} \text{ Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ comme sonde redox dans un tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ salin ($\text{pH} 7,4$).

Comme ce fut précédemment décrit pour les deux autres polymères, le balayage par voltampérométrie cyclique entre 0 et $0,4 \text{ V}$ (Figure 70A) montre une diminution progressive du transfert d'électrons (et donc de l'intensité des pics de courant avec un courant I_{pa} dont la valeur diminue de 46 ± 1 à $13 \pm 1 \mu\text{A}$) avec le greffage du polypyrrole NTA et de l'aptamère.

Tableau 11 : Valeurs de I_{pa} , ΔE_p et du module de l'impédance Z obtenues après les différentes étapes de fonctionnalisation de l'électrode en utilisant la sonde $Fe(CN)_6^{3-/4-}$.

	I_{pa} (μA)	ΔE_p (V)	Z (Ω)
Pt	44 ± 1	$0,07 \pm 0,01$	500 ± 10
Pt/Polypyrrole NTA	18 ± 1	$0,15 \pm 0,01$	4100 ± 100
Pt/Polypyrrole NTA/Aptamère	13 ± 1	$0,19 \pm 0,01$	10700 ± 200

Par l'analyse des spectres d'impédance du diagramme de Nyquist, on observe que l'électrode nue présente une impédance $Z_{28\text{ Hz}} = 500 \pm 10 \Omega$ qui augmente à $Z_{1\text{ Hz}} = 4100 \pm 100 \Omega$ après dépôt du polymère puis à $Z_{1\text{ Hz}} = 10700 \pm 200 \Omega$ après fixation de l'aptamère. Cette augmentation progressive de l'impédance traduit une diminution du transfert de charge à l'interface électrode/solution en raison la présence du polymère et de l'aptamère (cf. Tableau 11).

2.1.2.1. Performances analytiques du biocapteur à AVP

Dans un premier temps, les électrodes préparées ont été testées en y déposant la cible après greffage de l'aptamère. La Figure 71 montre le diagramme de Nyquist des spectres d'impédance obtenus avec différentes concentrations croissantes en AVP.

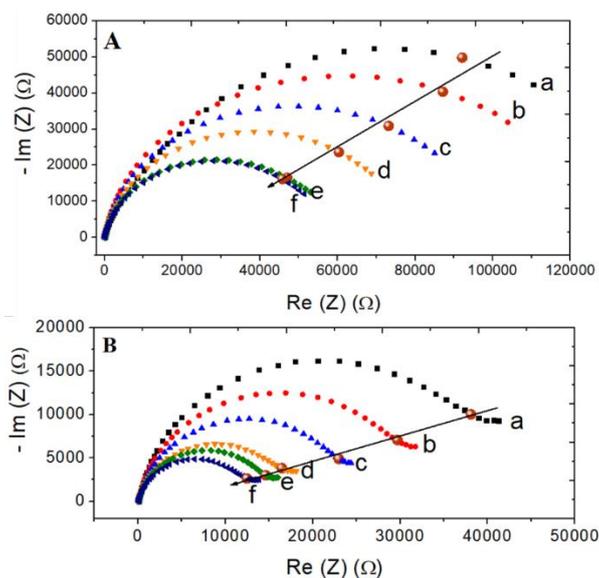


Figure 71: Diagrammes de Nyquist des spectres obtenus pour le biocapteur à base de polypyrrole NTA aux concentrations de : a) 0 mol.L^{-1} ; b) $3,2.10^{-14} \text{ mol.L}^{-1}$; c) $3,2.10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$; d) $3,2.10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$; e) $3,2.10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$; f) $3,2.10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ en D-AVP (A) et L-AVP (B). Mesures effectuées à l'OCP dans une solution de $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ ($2.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) dans un tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$; les points d'isofréquence sont représentés par une sphère marron.

Ce tracé montre une diminution de la résistance au transfert de charge en fonction de concentrations croissantes d'AVP (D comme L) comme ce fut le cas pour le biocapteur conçu avec le polypyrrole NHS et testé avec la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. Les interactions électrostatiques pourraient à nouveau expliquer ces observations avec une diminution de la charge négative globale (résultant cette fois-ci à la fois des fonctions carboxylate libres du polypyrrole NTA et du squelette phosphate de l'aptamère) avec l'ajout de l'AVP qui elle est chargée positivement. La sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ migre ainsi plus aisément vers la surface des électrodes, d'où la diminution de la résistance au transfert de charge.

Le Tableau 12 regroupe les valeurs de ΔZ en fonction de concentrations croissantes d'adénosine et de guanosine à une fréquence de 0,2 Hz. Les incertitudes présentées sont les incertitudes sur la valeur moyenne de ΔZ pour 2 électrodes différentes pour chaque concentration.

Tableau 12: Valeurs de ΔZ obtenues après ajout de la D-AVP ou de la L-AVP en utilisant la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$.

Concentration (mol.L ⁻¹)	$\Delta Z_{0,2 \text{ Hz}} (\Omega)$	
	D-AVP	L-AVP
$3,2 \cdot 10^{-14}$	-3000 ± 3900	-8900 ± 1400
$3,2 \cdot 10^{-12}$	-19600 ± 3600	-15900 ± 1300
$3,2 \cdot 10^{-10}$	-34200 ± 3300	-22200 ± 1200
$3,2 \cdot 10^{-8}$	-49200 ± 3000	-24000 ± 1100
$3,2 \cdot 10^{-6}$	-50400 ± 3000	-26200 ± 1100

Il révèle un seuil de détection de $3,2 \cdot 10^{-14}$ mol.L⁻¹ mais qui est non spécifique ($\Delta Z_{0,2 \text{ Hz}} = -3000 \pm 3900 \Omega$ pour la D-AVP contre $-8900 \pm 1400 \Omega$ pour la L-AVP). Une légère différence est observée pour une concentration en AVP de $3,2 \cdot 10^{-12}$ mol.L⁻¹, une nette différence est observée ($\Delta Z_{0,2 \text{ Hz}} = -19600 \pm 3600 \Omega$ pour la D-AVP contre $\Delta Z_{0,2 \text{ Hz}} = -15900 \pm 1300 \Omega$ pour la L-AVP) et l'aptacapteur ne peut être considéré comme spécifique qu'à partir de cette concentration comme en témoignent les courbes d'étalonnage de la Figure 72 **Error! Reference source not found.** établies à partir du Tableau 12.

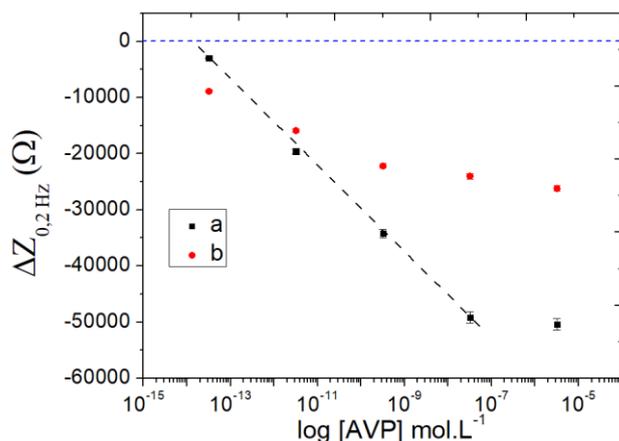


Figure 72: Courbes d'étalonnage montrant la variation du paramètre $\Delta Z_{0,2 \text{ Hz}}$ en fonction de la concentration en D-AVP (a) et L-AVP (b) pour le biocapteur à polypyrrole NTA avec la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ dans le tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$, $n = 1$.

D'autre part, à titre comparatif au système avec le polypyrrole NHS, les variations d'impédance obtenues avec le système au polypyrrole NTA sont beaucoup plus importantes ($\Delta Z = -25900 \pm 700 \Omega$ pour le système au polypyrrole NHS contre $\Delta Z = -34200 \pm 3300 \Omega$ pour le polypyrrole NTA pour une concentration en D-AVP de $3,2 \cdot 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$). Ces variations de signal ont été « amplifiées » pour le système au polypyrrole NTA, avec une meilleure linéarité de 6 ordres de grandeur pour la D-AVP (entre 10^{-14} à $10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$, $R^2 = 0,999$).

2.1.2.2. Analyse des contrôles de la réponse du biocapteur

Afin de valider les résultats, des expériences supplémentaires ont été menées en éliminant à chaque fois l'un des acteurs de l'assemblage du biocapteur à base de pyrrole-NTA, sauf la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ qui permet d'obtenir le signal électrochimique impédancemétrique.

a. Etude des interactions entre l'AVP et le polypyrrole NTA (contrôle sans l'aptamère)

Ce premier contrôle a consisté à étudier le comportement du complexe $\text{NTA}/\text{Cu}^{2+}$ vis-à-vis des cibles (D-AVP et L-AVP) en absence d'aptamère anti-AVP et en présence de la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. $20 \mu\text{L}$ de ces différentes cibles préparées à différentes concentrations dans du tampon phosphate ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$) ont été déposés sur des électrodes fonctionnalisées au complexe polypyrrole $\text{NTA}/\text{Cu}^{2+}$ sans l'aptamère. Pour chaque concentration en AVP, le spectre d'impédance a été enregistré après rinçage des électrodes après une période d'incubation de 30 minutes ce qui correspond aux conditions d'utilisation du biocapteur.

La gamme de concentration en AVP testée est celle d'intérêt (entre $3,2 \cdot 10^{-14}$ et $3,2 \cdot 10^{-12}$ mol.L⁻¹) pour les applications du biocapteur.

De légères augmentations de la résistance au transfert de charge ont pu être notées grâce au diagramme de Nyquist des spectres d'impédance pour les deux énantiomères d'AVP malgré l'absence d'aptamère à la surface des électrodes (Figure 73).

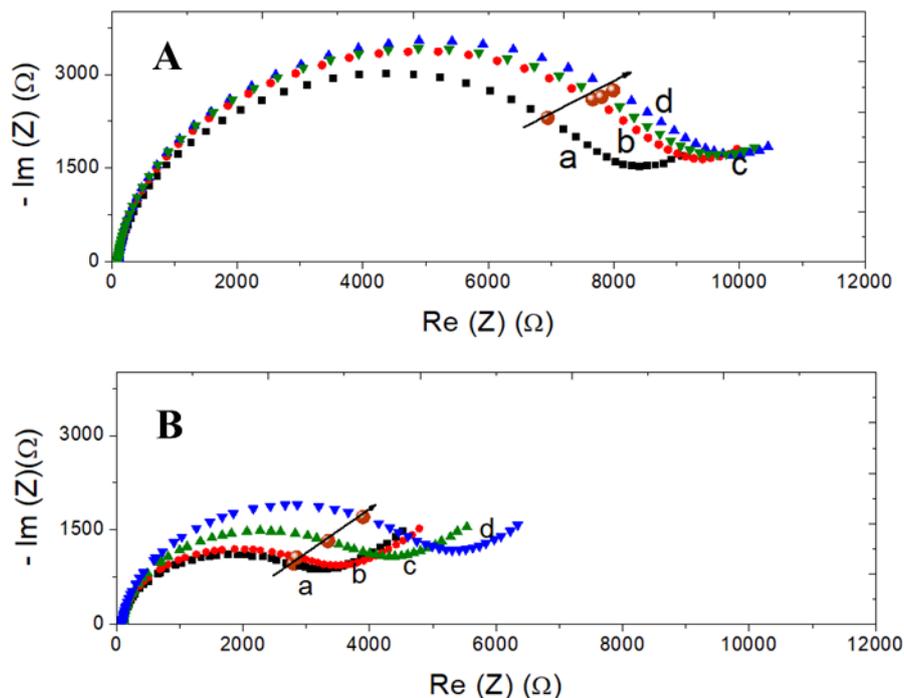


Figure 73: Diagramme de Nyquist des spectres d'impédance dans une solution de $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ ($2 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹) obtenus après ajout de D-AVP (A) et de L-AVP (B) sur des électrodes fonctionnalisées au polypyrrole NTA/ Cu^{2+} à différentes concentrations : a) 0 mol.L⁻¹ ; b) $3,2 \cdot 10^{-14}$ mol.L⁻¹ ; c) $3,2 \cdot 10^{-12}$ mol.L⁻¹ ; d) $3,2 \cdot 10^{-10}$ mol.L⁻¹. Les points d'isofréquence sont représentés par une sphère marron.

Au vu de ces réponses à l'ajout d'AVP (le sens de variation du signal d'impédance ainsi que l'intensité de ces variations), qui peuvent être considérées comme non spécifiques en raison de l'absence de l'aptamère anti-AVP, il est possible de conclure que les interactions entre le polymère et les molécules d'AVP ne contribuent pas aux réponses obtenues pour le biocapteur à base de polypyrrole NTA précédemment conçu.

b. Etude de stabilité des interactions entre l'aptamère et le polypyrrole NTA (contrôle sans la cible)

Un autre contrôle a consisté à étudier la stabilité du signal d'impédance dans le temps des électrodes fonctionnalisées avec l'aptamère (Figure 74).

En plus du diagramme de Nyquist des spectres d'impédance (Figure 74A), un graphique permettant d'évaluer les variations du signal d'impédance dans le temps a été réalisé (Figure 74 47B). Ce dernier montre le paramètre $\Delta Z = Z_t - Z_{t0}$ avec Z_t l'impédance à la l'instant t à une fréquence comprise dans zone à basse fréquence (0,49 Hz) de la boucle correspondant à la résistance au transfert de charge et Z_{t0} l'impédance, à la même fréquence, juste après le dépôt de l'aptamère à la surface de l'électrode.

L'impédance n'est pas constante et varie de manière significative dans le temps. Elle augmente d'abord dans les premières heures suivant le dépôt de l'aptamère pour ensuite diminuer au-delà de 16h. Une première hypothèse émise pour expliquer ce phénomène est celle d'importantes répulsions électrostatiques entre l'aptamère négativement chargé, les fonctions carboxylates libres (non complexées avec le Cu^{2+}) du polypyrrole NTA et la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. Une seconde hypothèse pourrait être que la restructuration de l'aptamère après sa dénaturation entraîne des changements de l'organisation de la surface des électrodes, provoquant ainsi de variations de l'impédance. Il n'est pas exclu que les résultats observés soient la combinaison de ces deux phénomènes.

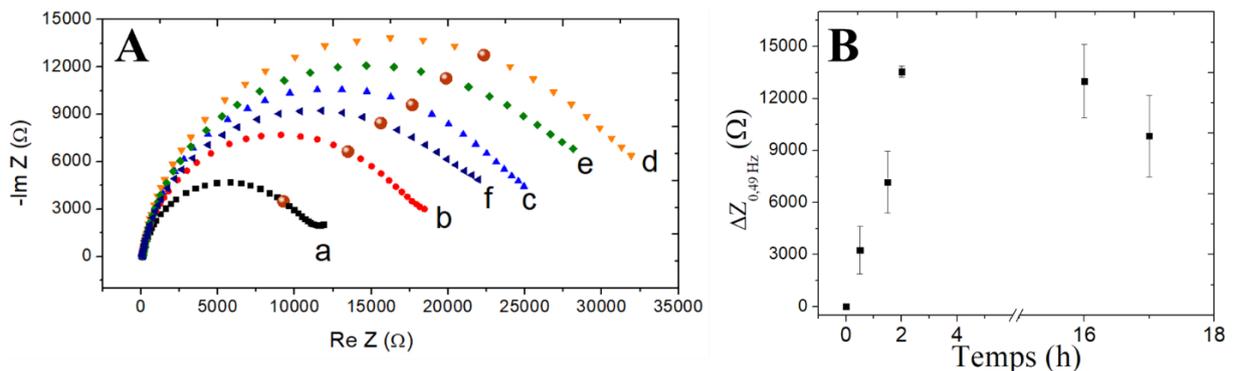


Figure 74: (A) Diagramme de Nyquist des spectres d'impédance à $t = a) 0 h ; b) 0,5 h ; c) 2 h ; d) 2,5 h ; e) 1-h ; f) 17h$ d'une électrode fonctionnalisée au polypyrrole NTA/ Cu^{2+} /aptamère anti-AVP dans une solution de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ($2.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$). (B) Graphique de variation en fonction du temps de ΔZ à 0,49 Hz.

Cette instabilité du signal pourrait d'une part expliquer la différence entre les valeurs initiales des impédances obtenues juste après fonctionnalisation des électrodes par l'aptamère

(figure 44). Cependant, bien que relativement importantes, ces variations ne pourraient pas expliquer les performances obtenues après ajout d'AVP (sens de variation du signal, bonne linéarité et spécificité vis-à-vis D-AVP). Les performances obtenues semblent donc résulter de la reconnaissance entre l'aptamère et sa cible et non pas d'un problème de stabilité de l'impédance avec le temps.

c. Etude des interactions entre l'aptamère et la cible après blocage des fonctions carboxylates libres du polypyrrole NTA

Les agents bloquants sont généralement utilisés pour réduire le plus possible la réponse non spécifique des biocapteurs due à l'adsorption non spécifique de molécules autres que la cible d'intérêt à la surface de l'électrode [228] [229]. Dans le cas présent, le recours à l'utilisation d'agents bloquants a pour but d'empêcher les interactions non spécifiques entre la surface du biocapteur et l'AVP d'une part qui pourraient être à l'origine de réponses sans reconnaissance par l'aptamère et d'empêcher des interactions trop fortes entre le polypyrrole NTA et l'aptamère d'autre part qui pourraient être en partie responsable de d'instabilité du signal observé dans le temps. Ainsi seules les interactions entre l'aptamère et sa cible (D-AVP) devraient être détectées par l'électroactivité de la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$.

➤ Utilisation de la BSA

Parmi les agents bloquants les plus utilisés, on retrouve la BSA [230]. Cette protéine de 65 kDa provenant de la vache présente l'avantage d'être assez facile d'accès et peu coûteuse.

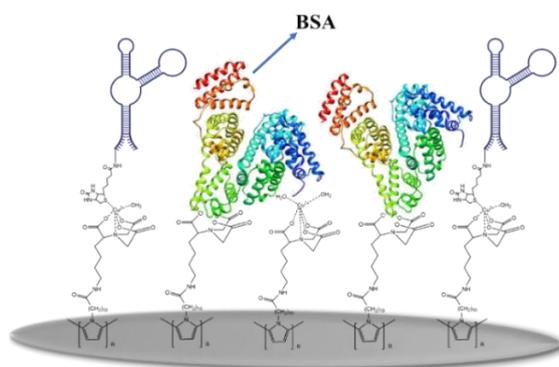


Figure 75: Schéma du principe de blocage des sites non spécifiques avec la BSA.

15 μL d'une solution de BSA à 0,5 % préparée dans le tampon phosphate (0,1 mol.L⁻¹, pH = 7,4) sont déposés à la surface des électrodes fonctionnalisées avec l'aptamère pour une incubation de 20 minutes. Les électrodes sont ensuite vigoureusement rincées dans le tampon

phosphate avant l'ajout de l'AVP. Comme en témoigne le diagramme de Nyquist des spectres d'impédance de la Figure 76, l'utilisation de la BSA a entraîné une perte totale de la variation de l'impédance lors de l'ajout de la cible pour les deux énantiomères ; l'aptacapteur ne répond plus.

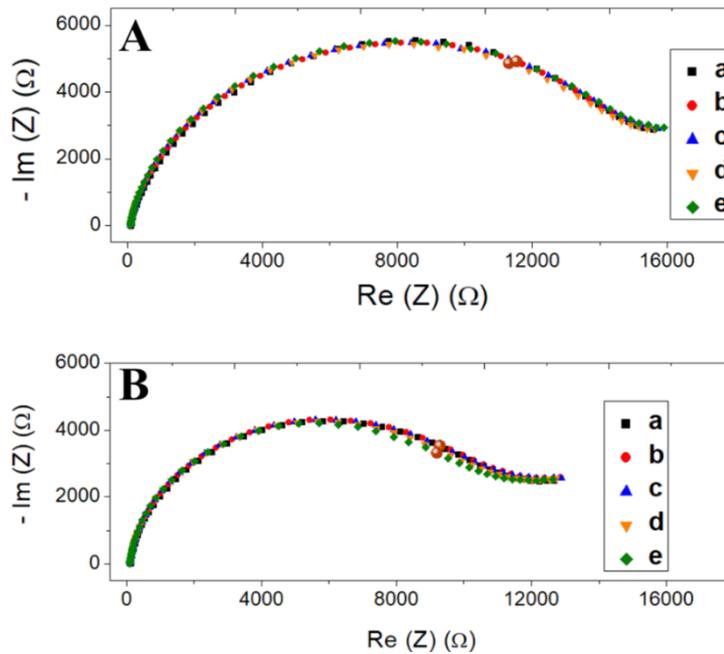


Figure 76: Diagramme de Nyquist des spectres obtenus pour le biocapteur à base de polypyrrole NTA/Cu²⁺/aptamère/BSA après incubation de différentes concentrations a) 0 mol.L⁻¹; b) 3,2.10⁻¹⁴ mol.L⁻¹; c) 3,2.10⁻¹² mol.L⁻¹; d) 3,2.10⁻¹⁰ mol.L⁻¹; e) 3,2.10⁻⁸ mol.L⁻¹ de D-AVP (A) et L-AVP (B).

Mesures effectuées à l'OCP dans une solution de Fe(CN)₆^{3-/4-} (2.10⁻³ mol.L⁻¹) dans un tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹, pH = 7,4; les points d'isofréquence sont représentés par une sphère marron.

Le Tableau 13 présente les valeurs moyennes du paramètre ΔZ à une fréquence de 1 Hz en fonction de concentrations croissantes de D-AVP et de L-AVP ainsi que les incertitudes sur ces moyennes pour 2 électrodes. Sur toute la gamme de concentration testée, ces valeurs sont très faibles par rapport à celles obtenues sans la BSA.

Tableau 13: Valeurs de ΔZ obtenues après ajout de la D-AVP ou de la L-AVP aux électrodes fonctionnalisées au polypyrrole NTA/Cu²⁺/aptamère/BSA en utilisant la sonde Fe(CN)₆^{3/4-}.

Concentration (mol.L ⁻¹)	$\Delta Z_{1 \text{ Hz}} (\Omega)$	
	D-AVP	L-AVP
3,2.10 ⁻¹⁴	-300 ± 600	-50 ± 300
3,2.10 ⁻¹²	-200 ± 500	10 ± 500
3,2.10 ⁻¹⁰	-300 ± 600	500 ± 300
3,2.10 ⁻⁸	-500 ± 700	700 ± 200

Cette perte quasi-totale de variation du signal d'impédance indique un blocage total et stable de la surface de l'électrode. L'hypothèse émise est que la BSA, du fait de sa taille importante, en plus de bloquer les fonctions carboxylates du polymère empêcherait également l'aptamère d'avoir une configuration adaptée pour reconnaître sa cible. L'usage de la BSA non seulement ne permet pas de favoriser les interactions spécifiques entre l'aptamère et la cible, mais en plus ne pourrait pas être envisagé pour limiter d'éventuelles adsorptions non spécifiques.

➤ Utilisation du polyéthylène glycol (PEG)

Le polyéthylène glycol (PEG) est un polymère hydrophile non ionique très utilisé comme agent anti-adsorbant (Figure 77). Son efficacité dépend d'un certain nombre de facteurs. Parmi ceux-ci, la longueur des chaînes PEG, les fonctions chimiques accessibles aux extrémités et la densité de greffage du PEG sur la surface de travail sont d'une grande importance [231].

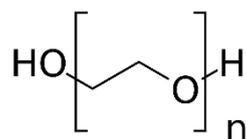


Figure 77: Formule du polyéthylène glycol.

Pour nos travaux nous avons choisi le polyéthylène glycol 400 (PEG-400) car sa masse molaire de 400 g/mol) reste assez faible par rapport à la BSA, ceci dans l'optique d'avoir un effet bloquant tout en limitant le plus possible l'encombrement vis-à-vis de l'aptamère qui doit pouvoir changer de conformation lors de la reconnaissance de sa cible. Une solution à 50 mmol.L⁻¹ de PEG-400 est préparée dans le même tampon phosphate et 20 µL de cette solution ont été déposés sur les électrodes fonctionnalisées avec l'aptamère. Après rinçage, les électrodes ont été incubées avec des concentrations croissantes de D et L-AVP.

La Figure 78 montre le diagramme de Nyquist des spectres d'impédance obtenus après ajout de concentrations croissantes de D-AVP (Figure 78A) et de L-AVP (Figure 78B). On peut noter une légère augmentation de la résistance au transfert de charge pour la D-AVP tandis que l'ajout de la L-AVP entraîne une faible et stable diminution de la résistance au transfert de charge. L'augmentation de la résistance au transfert de charge après ajout de D-AVP peut s'expliquer par l'augmentation de la masse de D-AVP à la surface de l'électrode après reconnaissance avec l'aptamère.

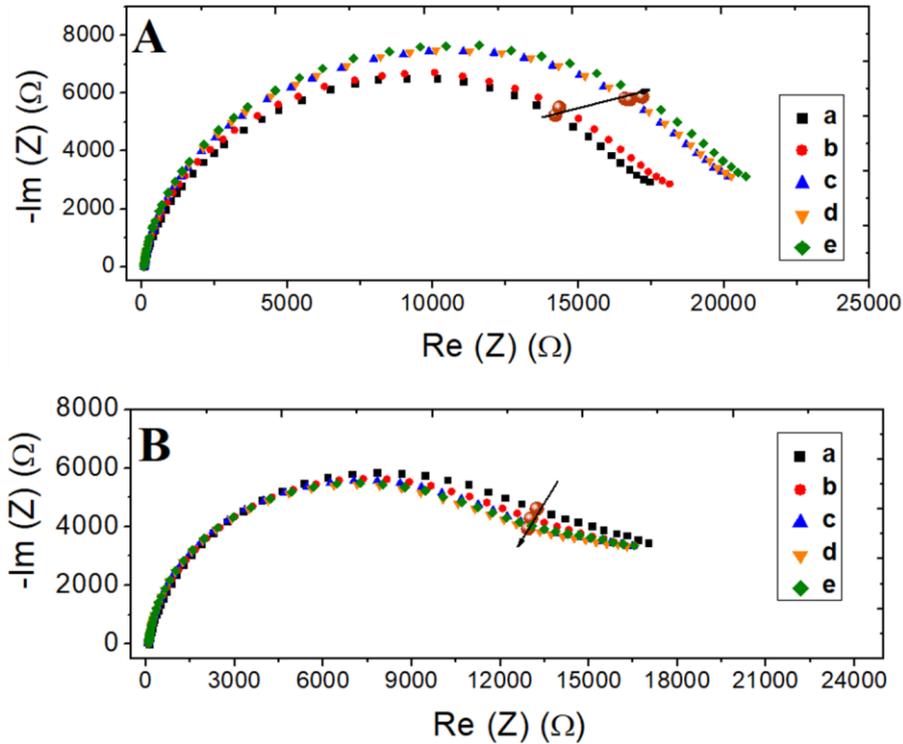


Figure 78: Diagramme de Nyquist des spectres obtenus pour le biocapteur à base de polypyrrole NTA/Cu²⁺/aptamère/PEG-400 après incubation de différentes concentrations a) 0 mol.L⁻¹ ; b) 3,2.10⁻¹⁴ mol.L⁻¹ ; c) 3,2.10⁻¹² mol.L⁻¹ ; d) 3,2.10⁻¹⁰ mol.L⁻¹ ; e) 3,2.10⁻⁸ mol.L⁻¹ de D-AVP (A) et L-AVP (B). Mesures effectuées à l'OCP dans une solution de Fe(CN)₆^{3-/4-} (2.10⁻³ mol.L⁻¹) dans un tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹, pH = 7,4; les points d'isofréquence sont représentés par une sphère marron.

Le Tableau 14 regroupe les valeurs de ΔZ en fonction de concentrations croissantes de D-AVP et de L-AVP à une fréquence de 0,49 Hz, pour l'aptacapteur à base d'un film de polypyrrole NTA/Cu²⁺/aptamère/PEG-400. Les incertitudes présentées sont les incertitudes des mesures sur ces valeurs. Ce tableau montre que les variations obtenues pour la D-AVP sont plus importantes que celles obtenues pour la L-AVP sur toute la gamme de concentration étudiée.

Tableau 14: Valeurs de ΔZ obtenues après ajout de la D-AVP ou de la L-AVP en présence de PEG-400.

Concentration (mol.L ⁻¹)	$\Delta Z_{0,49 \text{ Hz}} (\Omega)$	
	D-AVP	L-AVP
3,2.10 ⁻¹⁴	700 ± 600	-300 ± 600
3,2.10 ⁻¹²	2400 ± 700	-300 ± 600
3,2.10 ⁻¹⁰	2600 ± 700	-500 ± 600
3,2.10 ⁻⁸	3000 ± 700	-300 ± 600

Néanmoins, pour la D-AVP, après une augmentation rapide entre des concentrations de $3,2 \cdot 10^{-14}$ et $3,2 \cdot 10^{-12}$ mol.L⁻¹ (de $700 \pm 600 \Omega$ à $2400 \pm 700 \Omega$), les valeurs de $\Delta Z_{0,49}$ Hz deviennent assez vite constantes sur tout le reste de la gamme de concentration testée (de $2400 \pm 700 \Omega$ à $3000 \pm 700 \Omega$). Il n'y a donc pas de croissance du signal. D'autre part, pour la D-AVP, bien que les variations de signal soient plus importantes que celles obtenues avec la BSA, elles restent moins importantes que celles obtenues sans l'utilisation d'agents bloquants. Pour la L-AVP, l'ordre de grandeur des variations reste le même que pour l'usage de la BSA mais moins importantes que celles obtenues sans usage d'agents bloquants.

L'utilisation du PEG-400 a permis la détection spécifique de la D-AVP mais avec un sens de variation du signal qui est opposé à celui obtenu sans l'utilisation d'agents bloquants. Les variations d'impédances sont toutefois extrêmement faibles. La sonde rédox subit très fortement l'encombrement lié à la présence du PEG-400 sur son passage. On ne peut pas envisager un capteur aussi peu sensible.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté différentes stratégies d'immobilisation à base de polymères électrogénérés pour l'élaboration de différents biocapteurs impédancemétriques. En tout trois polymères ont été testés : le polypyrrole NHS, le polypyrrole adamantane et le polypyrrole NTA.

Pour leur dépôt à la surface de l'électrode, bien que la méthode par voltampérométrie cyclique permette d'obtenir une importante couche de polymère à la surface de l'électrode, c'est l'électropolymérisation par potentiel contrôlé qui a été utilisée pour la conception des biocapteurs car celle-ci permet un meilleur contrôle de l'épaisseur de la couche de polymère déposée. Les étapes de fonctionnalisation des électrodes (électropolymérisation et greffage de l'aptamère), bien qu'elles soient spécifiques pour chaque polymère, ont pu être caractérisées par voltampérométrie cyclique et par spectroscopie d'impédance électrochimique à l'aide d'une sonde électrochimique en solution. Ces caractérisations montrent pour tous les polymères une diminution des intensités des courants de pics anodiques et une augmentation de la résistance au transfert de charge à chaque étape de fonctionnalisation. La présence à la surface de l'électrode du polymère et de l'aptamère ralentit le transfert d'électron à l'interface électrode/solution. C'est sur ce principe de modification du phénomène de transfert d'électrons à la surface de l'électrode qu'est basée le principe de fonctionnement des différents biocapteurs élaborés.

L'utilisation d'un film de polypyrrole NHS pour l'élaboration d'un capteur à AVP a conduit à l'obtention d'un aptacapteur dont le signal impédancemétrique diminuait en fonction de concentrations croissantes de cible, en raison des interactions électrostatiques entre la sonde électrochimique et le couple aptamère/AVP qui accélèrent le transfert d'électrons. Cet aptacapteur est spécifique sur toute la gamme de concentration testée (entre $3,2 \cdot 10^{-14}$ mol.L⁻¹ et $3,2 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹), mais sature rapidement (à partir d'une concentration de $3,2 \cdot 10^{-12}$ mol.L⁻¹). Ceci pourrait s'expliquer par une faible concentration surfacique en aptamère greffé. En effet, si le nombre d'aptamère est faible, la surface est très vite saturée par la cible.

Le film de polypyrrole adamantane/AuNPs-CD a quant à lui abouti à un aptacapteur dont le signal d'impédance augmente avec les concentrations en AVP mais qui non spécifique et dont il n'est pas possible de conclure sur les performances en termes de sensibilité. Cette non-spécificité est probablement liée aux interactions non spécifiques entre les acides aminés de

l'AVP et les cavités de β -cyclodextrine libres. Il faudrait alors pour ce système d'immobilisation trouver le moyen de bloquer de manière stable ces cavités de β -cyclodextrine libres afin d'améliorer la spécificité.

Le dernier polymère testé, le polypyrrole NTA, utilisé dans un premier temps avec l'hydroquinone comme sonde électrochimique, a conduit à l'obtention d'un aptacapteur avec un seuil de détection de $3,2 \cdot 10^{-14}$ mol.L⁻¹, une faible linéarité ($R^2 = 0,919$ entre $3,2 \cdot 10^{-14}$ mol.L⁻¹ et $3,2 \cdot 10^{-10}$ mol.L⁻¹), une sensibilité de $975 \pm 1000 \Omega$ par unité logarithmique et est spécifique sur la gamme de concentration testée. Néanmoins, ce capteur est peu sensible et la réponse liée à l'adsorption non spécifique de L-AVP est relativement important ; il est donc peu fiable. Le capteur à L-Tym développé dans les mêmes conditions a une meilleure linéarité ($R^2 = 0,975$ entre 10^{-12} et 10^{-9} mol.L⁻¹), une meilleure sensibilité ($1700 \pm 700 \Omega$ par ordre de grand par unité logarithmique) et est spécifique en effectuant un contrôle avec la L-AVP. Cette spécificité pourrait néanmoins être vérifiée à nouveau en testant l'énantiomère D-Tym. Les essais menés pour le capteur à adénosine se sont quant à eux révélés non concluants. Dans ces conditions opératoires, les performances des aptacapteurs semblent fortement dépendre du couple aptamère/cible. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour la mise au point de chaque aptacapteur.

Enfin de tous les systèmes testés, le polypyrrole NTA en combinaison avec la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ s'est montré le plus performant. Avec un signal résultant des interactions électrostatiques entre le couple aptamère/cible et la sonde, cet aptacapteur a un seuil de détection de $3,2 \cdot 10^{-14}$ mol.L⁻¹, une bonne linéarité de signal ($R^2 = 0,999$, entre $3,2 \cdot 10^{-14}$ et $3,2 \cdot 10^{-8}$ mol.L⁻¹) et une spécificité vis-à-vis de l'énantiomère D de l'AVP dans une gamme de concentration entre $3,2 \cdot 10^{-12}$ et $3,2 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹. Néanmoins, au vu de l'application envisagée (détection dans la gamme du picomolaire dans les fluides physiologiques), à ce stade, le biocapteur à base de polypyrrole NTA ne constitue pas l'outil de détection fiable que nous espérons. En effet, le signal provenant de l'adsorption non spécifique de la L-AVP reste relativement important. L'utilisation d'agents bloquants, au-delà de limiter ces interactions non spécifiques, diminue fortement la sensibilité du capteur. D'autre part, les premiers contrôles effectués sans l'aptamère ont permis d'écarter les interactions entre la cible et le polypyrrole NTA mais des contrôles supplémentaires devraient être effectués afin de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu. L'étape d'encrage de l'aptamère sur l'électrode devrait également être optimisée (quantité d'aptamère incubé, ajout d'espaceur biotinylé) afin d'améliorer la concentration surfacique en aptamère.

Les polymères électrogénérés ont déjà fait leurs preuves dans la conception d'immunocapteurs [3] [58], de biocapteurs enzymatiques [233] [234] et d'aptacapteurs [4] [5] [7] impédancemétriques et nos résultats pour l'aptacapteur à AVP, bien que nécessitant une optimisation, montrent encore une fois qu'ils constituent un outil d'intérêt pour l'immobilisation de biomolécules.

Pour remplir les objectifs de nos travaux sur le développement d'un aptacapteur à AVP, d'autres techniques d'immobilisation plus simples et pouvant permettre une meilleure fiabilité du signal électrochimique doivent être explorées.

**Chapitre III : Biocapteurs
impédancemétriques à base d'une
monocouche autoassemblée sur
électrodes d'or.**



Chapitre III : Biocapteurs impédancemétriques à base d'une monocouche autoassemblée sur électrodes d'or.

Parmi les différentes méthodes d'immobilisation des aptamères sur des surfaces, celles permettant de former des liaisons covalentes sont fortement prisées du fait qu'elles permettent de s'assurer de la non-désorption du biorécepteur. Dans cette optique, une multitude d'options se présentent parmi lesquelles on trouve les monocouches auto-assemblées (SAMs : self assembled monolayer) qui permettent une fixation verticale d'une molécule par un point d'ancrage fixé à l'une de ses extrémités. Ce point d'encrage est très souvent la fonction thiol. L'avantage des SAMs est qu'elles permettent de disposer d'une dimension mono-moléculaire perpendiculaire à la surface de l'électrode pour l'accroche du biorécepteur. Les composés organosoufrés se fixent spontanément sur de nombreuses surfaces métalliques et notamment sur l'or. La liaison thiol-Au est très largement choisie pour sa force et du fait que l'or est un métal relativement inerte.

En raison des performances insatisfaisantes obtenues pour les biocapteurs à base de polymères électrogénérés qui ont été décrites dans le chapitre II, nous avons essayé de trouver une alternative sans couche de polymère et nous avons opté pour l'utilisation de la technique d'immobilisation basée sur la construction de SAMs avec la liaison thiol-Au.

Dans ce chapitre, il sera décrit les différents résultats obtenus pour le développement de deux biocapteurs différents : un premier pour la détection de l'adénosine et un second pour la détection de la D-AVP qui est notre cible d'intérêt.

I. Principe de l'immobilisation de l'aptamère

Comme indiqué précédemment, les thiols (R-SH), mais aussi les disulfides (R-S-S-R) et les sulfides (R-S-R) ont une forte réactivité avec les surfaces métalliques telles que l'or, l'argent, le platine ou encore le cuivre. A partir d'une solution diluée de ces molécules, les groupes sulfurés s'adsorbent spontanément sur la surface du métal, formant une couche mono-moléculaire ordonnée et orientée, appelée monocouche auto-assemblée (SAM). L'or est un substrat de premier choix du fait qu'il est relativement inerte et que les molécules adsorbées forment à sa surface des structures cristallines bien définies [217], ce qui justifie son choix comme support d'élaboration de notre biocapteur.

La formation de la monocouche se réalise en trois étapes qui sont la physisorption contrôlée par diffusion, la chimisorption des molécules et enfin la cristallisation de l'autoassemblage. L'état de physisorption sur Au (111) est un système extrêmement désordonné et dans lequel seules les interactions de Van der Waals sont responsables de l'adsorption. Lors de la chimisorption, le groupement SH perd l'atome d'hydrogène mercaptan (qui générerait du H₂) et forme une forte connexion covalente avec trois atomes d'or (environ 50 kcal/mol) [235]. Le soufre étant hybridé sp³, les chaînes thiol prennent une inclinaison de 20 à 40° par rapport au niveau de la surface [236]. Au cours du processus de cristallisation qui s'en suit, les molécules s'alignent sur la surface de manière parallèle, par le biais d'interactions de Van der Waals (répulsives, stériques et électrostatiques) entre les queues ce qui donne lieu à des couches mono-moléculaires hautement ordonnées et orientées [237], comme le montre la Figure 79.

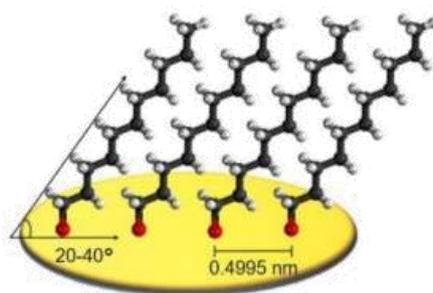


Figure 79: Monocouche auto-assemblée d'alkanethiols. Reproduit de [217].

Concernant l'immobilisation de l'aptamère, elle peut se faire soit en modifiant directement l'aptamère modifié avec une fonction thiol [238]–[241] (Figure 80A), soit à l'aide de fonctions intermédiaires qui sont greffées sur la surface de l'électrode via la chimie Au-S, et auxquels les aptamères sont ensuite liés. A titre d'exemple, l'immobilisation indirecte fait appel à des couplages tels que :

- acide mercaptopropionique/1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide/N-hydroxysuccinimide/amine-aptamère(MPA/EDC/NHS/NH₂-aptamère) [242] (Figure 80B)
- dithiobis (succinimidyl propionate)/amine aptamère (DSP/NH₂-aptamère)[243] (Figure 80C)
- ou encore cysteamine/glutaraldehyde/NH₂ aptamère [244] (Figure 80D).

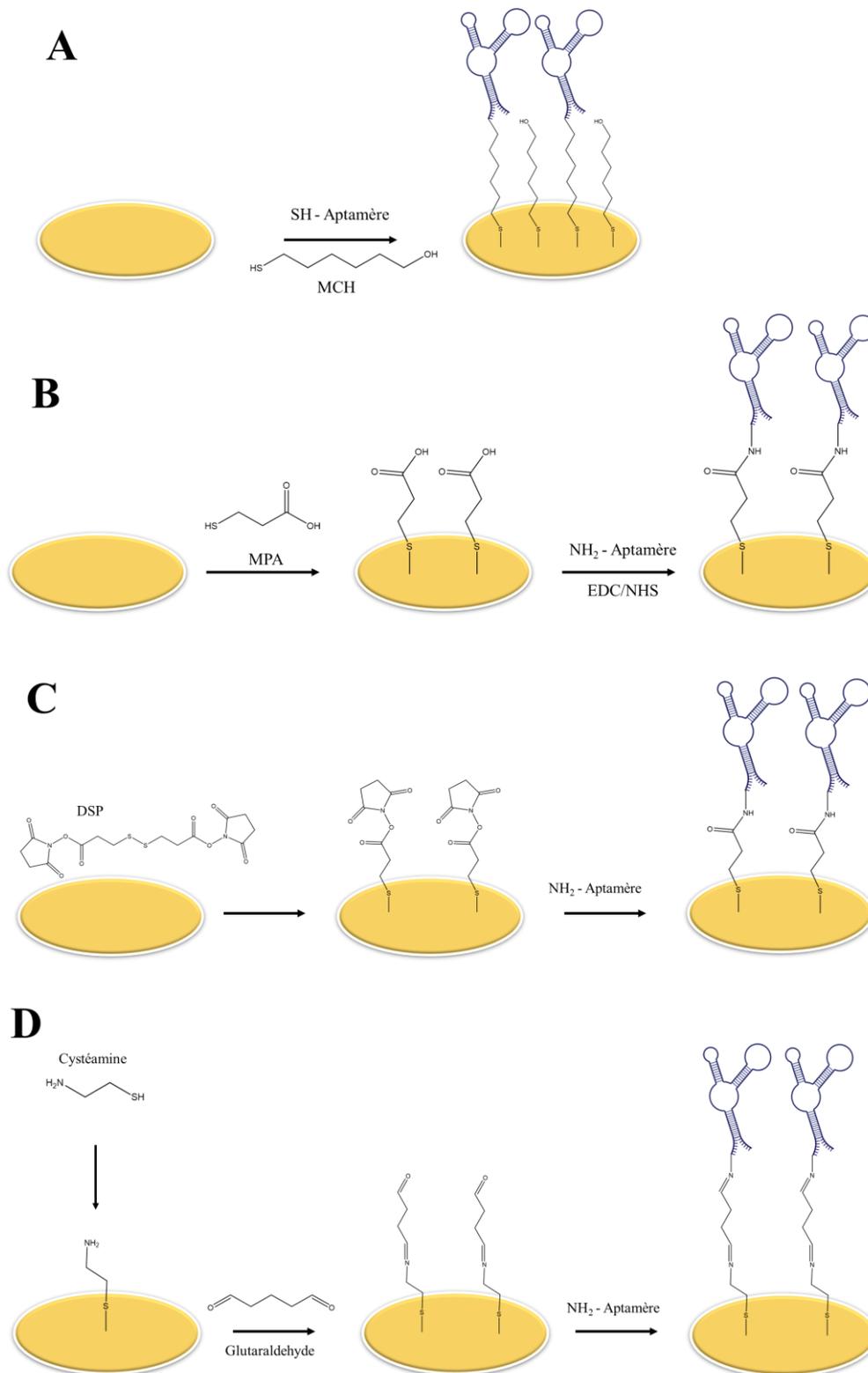


Figure 80: Schémas des différentes techniques d'immobilisation d'aptamères thiolés à la surface d'électrodes d'or. Inspiré de [217].

Du fait de sa simplicité, l'immobilisation directe reposant sur l'utilisation d'aptamères thiolés est la plus utilisée. Il a néanmoins été démontré qu'avec cette technique, les aptamères

thiolés (ou ADN en général) ne se fixaient pas à la surface de l'or uniquement grâce à l'interaction Au-S mais s'adsorbent également grâce aux atomes d'hydrogène [245] ou aux groupements phosphates [246]. Cette adsorption inadéquate ne permet pas une conformation optimale de l'aptamère pour la reconnaissance de sa cible, ce qui pourrait affecter de manière générale les performances d'un biocapteur.

Pour éviter ce problème d'adsorption de l'aptamère par d'autres fonctions que le thiol, une stratégie très répandue a été mise au point. Elle consiste en l'immobilisation, en plus de l'aptamère, de chaînes d'alcanethiols qui peuvent être de différentes longueurs. Cette stratégie prend néanmoins en compte un certain nombre de facteurs (la longueur de la chaîne d'alcanethiol, la longueur du bras espaceur ou linker entre l'aptamère et la fonction thiol rattachée, le rapport de concentration thiol-aptamère/alcanethiol à la surface de l'électrode).

La longueur du linker doit être choisie de sorte à permettre une conformation optimale de l'aptamère. La longueur de l'alcanethiol a, quant à elle, un impact sur la cinétique du transfert de charge, ainsi que sur la prévention de l'adsorption non spécifique d'interférents. En règle générale, plus la chaîne alkyle est longue, meilleures sont les propriétés anti-adsorbantes, mais aussi plus la couche d'alcanethiol est isolante. A cet effet, le mercapto-1-hexanol (MCH) est à ce jour l'alcanethiol le plus utilisé pour l'élaboration des SAMs à la surface d'électrodes d'or car la longueur de sa chaîne alkyle (6 atomes de carbone) est optimale pour cette application ; c'est également l'alcanethiol qui sera utilisé pour nos travaux (Figure 81). Enfin, le rapport de concentration SH-aptamère/alcanethiol doit être choisi de sorte à obtenir un taux de recouvrement permettant une bonne sensibilité tout en limitant le phénomène d'encombrement stérique [217].

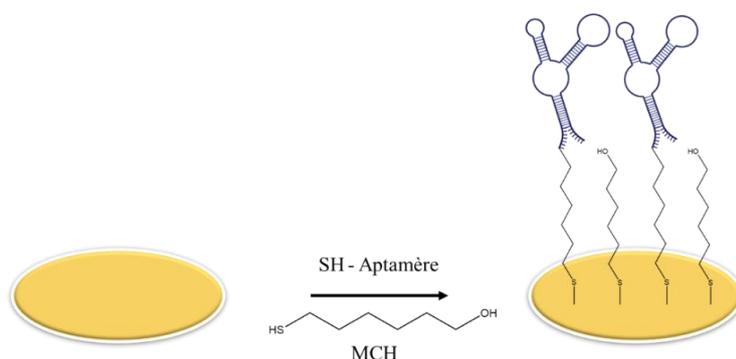


Figure 81: Schéma de fonctionnalisation de la surface d'une électrode d'or avec une monocouche aptamère/MCH.

Concernant le linker entre l'aptamère et la fonction SH rattachée, il a été choisi une chaîne alkyle de même longueur que le MCH (SH-(CH₂)₆-aptamère).

II. Biocapteur à base d'électrodes d'or pour la détection de l'adénosine

Comme ce fut le cas dans le chapitre précédent pour certaines réalisations, nous avons dans un premier temps mis au point un biocapteur à adénosine avec un aptamère anti-adénosine en série ADN de 25 bases, donc plus court que celui de la D-AVP (55 bases).

1. Préparation des électrodes

1.1. Nettoyage des électrodes d'or

Pour obtenir des aptacapteurs performants, la qualité de la surface de l'électrode nue est très importante car elle conditionne l'arrangement des molécules de surfaces pendant la construction du biocapteur, donc l'homogénéité du film accroché à l'interface et donc la sensibilité de la mesure électrochimique. De plus, les contaminations de la surface peuvent affecter la cinétique de formation de la liaison des thiols-Au [247].

Plusieurs méthodes de nettoyage des surfaces d'or sont reportées dans la littérature, dont le nettoyage à l'ozone ultraviolet, le nettoyage par le mélange KOH + H₂O₂, le nettoyage par solution piranha (mélange H₂SO₄ + H₂O₂) ou encore le nettoyage par voltampérométrie cyclique dans une solution de H₂SO₄ diluée [248].

Nous avons opté dans un premier temps pour le nettoyage à l'acide sulfurique qui est la technique la plus communément utilisée dans la littérature [249]. Des électrodes d'or polycristallin de diamètre $\Phi = 2$ mm (figure 4) ont été polies avec une suspension d'alumine 0,3 μm , avant d'être rincées à l'acétone puis soumises aux ultrasons successivement dans de l'éthanol et dans de l'eau milli-Q. Elles sont ensuite soumises au nettoyage électrochimique par voltampérométrie cyclique dans une solution de H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹ dans de l'eau milli Q (10 cycles entre -1,2 et -0,2 V à 50 mV/s). Les électrodes sont de nouveau rincées à l'eau milli-Q puis séchées sous N₂.

1.2. Dépôt de l'aptamère

Le même aptamère anti-adénosine utilisé précédemment pour le développement de l'aptacapteur à base de polypyrrole NTA (chapitre II-IV-1.3.1.2) a été modifié cette fois-ci à son extrémité 5' avec une fonction thiol et un linker alkyle de 6 atomes de carbone (séquence : 5' SH-(CH₂)₆-CCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGG 3').

Un mélange aptamère/MCH a été préparé à un rapport de concentration de 1:1000 ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}/1 \text{ mmol.L}^{-1}$) dans le tampon phosphate ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$) et est dénaturé à 80°C , pendant 5 minutes avant d'être refroidi dans de la glace pendant 30 minutes. $10 \mu\text{L}$ du mélange sont ensuite déposés à la surface des électrodes pour une incubation d'une nuit à 4°C : il s'agit de la technique dite de co-immobilisation.

Au vu des performances obtenues à l'aide de la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ pour les aptacapteurs précédemment développés et le caractère pratique de son utilisation par rapport à la sonde QH_2 (moins bonne stabilité), elle a été de nouveau utilisée comme sonde électrochimique pour le nouvel aptacapteur mis au point. De plus, c'est la sonde électrochimique communément utilisée dans la littérature pour les biocapteurs à base d'électrode d'or [250] [251]. La solution de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ($2.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans le tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$) a été utilisée dans un premier temps pour la caractérisation de l'étape de fonctionnalisation des électrodes par voltampérométrie cyclique et par spectroscopie d'impédance électrochimique (Figure 82).

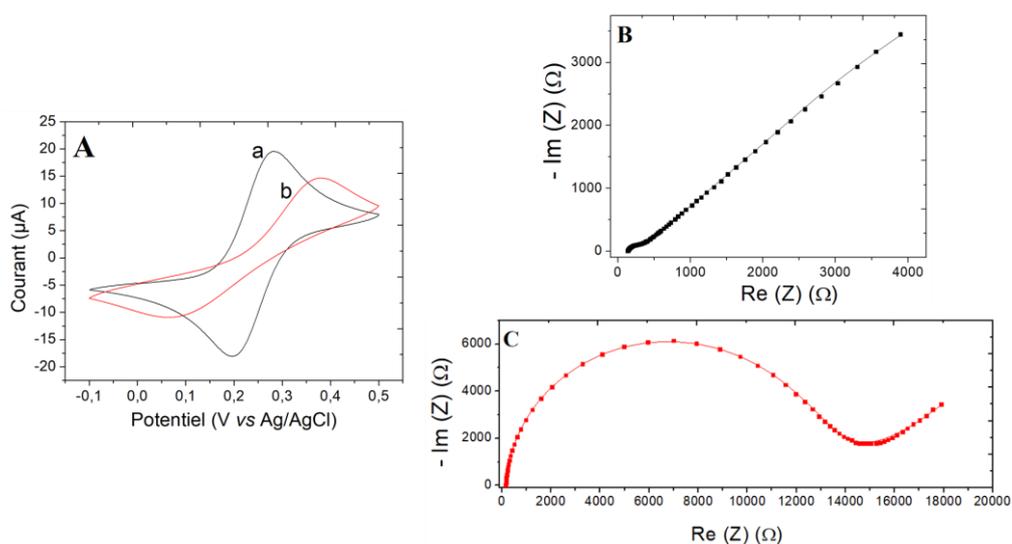


Figure 82: Caractérisation électrochimique d'une électrode d'or polycristalline ($\Phi = 2 \text{ mm}$) : (A) voltampérogrammes cycliques enregistrés à une vitesse de balayage de 100 mV/s (a) avant et (b) après dépôt d'une monocouche aptamère/MCH obtenue par co-immobilisation d'un mélange $1:1000 \mu\text{mol.L}^{-1}$; Diagramme de Nyquist des spectres d'impédance avant (B) et après dépôt (C) d'une monocouche aptamère/MCH. Les données expérimentales sont représentées par des points et les données ajustées par une ligne. Mesures effectuées à l'OCP, avec un potentiel alternatif d'amplitude de $10 \text{ mV}_{\text{RMS}}$ et un balayage de fréquence de 50000 Hz à $0,1 \text{ Hz}$. Des données expérimentales (points) et ajustées (lignes) sont présentées. Toutes les mesures ont été effectuées en utilisant $2.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1} \text{ Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ comme sonde redox dans un tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ salin ($\text{pH} 7,4$).

Le voltampérogramme cyclique à une vitesse de balayage de 100 mV.s^{-1} de l'électrode nue (Figure 82A.a) montre un signal d'oxydoréduction réversible typique de la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, avec des intensités de pics de courant anodique et cathodique de $I_{pa} = 19 \pm 1 \text{ } \mu\text{A}$ et $I_{pc} = -17 \pm 1 \text{ } \mu\text{A}$ et un $\Delta E_p = 0,90 \pm 0,01 \text{ V}$. Cette faible valeur de ΔE_p traduit un transfert d'électron rapide à l'interface entre la solution électrolytique et la surface de l'électrode d'or. Après incubation, du mélange de molécules thiolées, la diminution du courant I_{pa} (de 19 ± 1 à $15 \pm 1 \text{ } \mu\text{A}$), l'augmentation de ΔE_p (de $0,90$ à $0,34 \pm 0,01 \text{ V}$) témoignent d'une diminution du transfert d'électrons dû à la présence à la surface de l'électrode de la couche aptamère/MCH.

Quant aux diagrammes de Nyquist (Figure 82), ils montrent des spectres d'impédance qui ont une allure générale identique à celle décrite pour les aptacapteurs à base de polymère, avec, à hautes fréquences, une boucle correspondant au phénomène de transfert de charge associé à la double couche capacitive et à basses fréquences une demi-droite à 45° correspondant au phénomène de diffusion de la sonde électrochimique $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. La boucle correspondant au transfert de charge est de très petite taille pour l'électrode nue avant d'augmenter fortement pour l'électrode portant à sa surface la couche d'aptamère/MCH.

Dans ce chapitre, nous avons choisi de déconvoluer les spectres d'impédance en éléments d'un circuit électrique, afin d'étudier l'évolution des paramètres caractéristiques des phénomènes électriques et diélectriques de l'impédance. Le modèle électrique qui correspond aux spectres d'impédance de la Figure 82 est le modèle de Randles dont le circuit équivalent est donné sur la Figure 83. Le circuit de Randles est composé de 4 éléments. On a une résistance de l'électrolyte, R_{el} , en série avec la combinaison parallèle de la capacité double couche, C_{dc} , et d'une branche faradique composée d'une résistance de transfert de charge, R_{tc} , et d'une impédance de Warburg, Z_w . L'impédance de Warburg choisie est celle qui permet de modéliser la diffusion semi-infinie de l'espèce rédox. Pour l'ajustement des points avec le modèle électrique, nous avons remplacé la capacité de double couche par un élément à phase constante (CPE) afin de prendre en compte l'inhomogénéité communément associée aux électrodes modifiées [209]. L'impédance complexe d'un élément à phase constante (CPE) est donnée par :

$$Z_{CPE} = \frac{1}{Q(j\omega)^n} \quad (1)$$

où Q est l'admittance du CPE, ω est la pulsation en rad.s^{-1} , avec $\omega = 2\pi f$ (f la fréquence en s^{-1}), et n l'exposant adimensionnel qui traduit l'inhomogénéité de l'impédance. Lorsque $n=1$, l'impédance devient celle de la capacité, C , où $Q = C$.

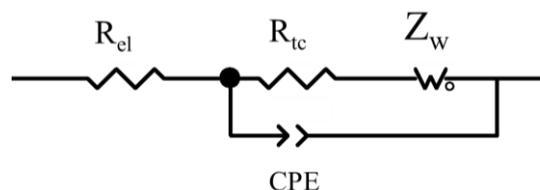


Figure 83: Circuit de Randles équivalent aux spectres d'impédances obtenus pour une électrode d'or polycristalline nue ou recouverte d'une monocouche aptamère anti-AVP/MCH, dans les conditions expérimentales de la Figure 82.

Le logiciel ZView (Scribner, LLC) a été utilisé pour adapter les paramètres du circuit électrique équivalent aux données expérimentales d'impédance. Une bonne correspondance entre les points expérimentaux et la courbe d'ajustement peut être observée sur la Figure 82, où la ligne passant par les points de données représente la courbe d'ajustement utilisant ce circuit équivalent. Les paramètres R_{tc} , C_{dc} et n sont reportés dans le Tableau 15 pour l'électrode nue et l'électrode recouverte de la couche d'aptamère/MCH. La fréquence caractéristique, f° , au sommet de la boucle haute fréquence a aussi été calculée ($R_{ct} \times C_{dc} \times 2 \times \pi \times f^\circ = 1$) et ajoutée au tableau. Les paramètres du Warburg ne seront pas donnés car ils ne fournissent pas d'information sur l'interface électrochimique donc sur les étapes de construction du biocapteur et ensuite sur sa réponse après l'ajout de la cible biologique.

Tableau 15 : Valeurs de I_{pa} , ΔE_p , de R_{tc} , C_{dc} , f° et n obtenues après les différentes étapes de fonctionnalisation de l'électrode en utilisant la sonde $Fe(CN)_6^{3-/4-}$. Les conditions expérimentales sont identiques à celles de la Figure 82.

Etape	I_{pa} (μA)	ΔE_p (V)	R_{ct} (Ω)	C_{dc} (μF)	f° (Hz)	n
Au	19 ± 1	$0,09 \pm 0,01$	178 ± 4	$0,89 \pm 0,02$	1000	0,86
Au/Aptamère/MCH	15 ± 1	$0,34 \pm 0,01$	11000 ± 200	$0,220 \pm 0,005$	65	0,97

Dans le Tableau 15, on peut voir que la résistance de transfert de charge est 62 fois plus grande pour l'électrode modifiée par le SAM Aptamère/MCH que pour l'électrode nue, ce qui est en accord avec la baisse de courant observée en voltampérométrie cyclique qui elle aussi montrait un ralentissement du transfert d'électron. La fréquence caractéristique associée diminue d'un facteur 15, montrant elle aussi ce ralentissement. En même temps, la capacité de double couche a diminué d'un facteur 4 et le facteur n a augmenté et se rapproche fortement

de 1. On voit ainsi clairement, que l'interface SAM/solution est très ordonnée avec une surface spécifique moins grande que celle de l'électrode nue et une rugosité très faible. On peut dire que la rugosité initiale de l'interface a été « effacée » par une SAM très ordonnée.

2. Performances analytiques

Des concentrations croissantes d'adénosine et de guanosine ont été ajoutées à la surface des électrodes préparées avec l'aptamère anti-adénosine pour une durée d'incubation de 30 minutes. Les électrodes ont ensuite été rincées dans le tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ avant d'être caractérisées par voltampérométrie cyclique à une vitesse de balayage de 10 mV.s^{-1} et par spectroscopie d'impédance électrochimique (Figure 84).

Les voltampérogrammes cycliques montrent la persistance des pics d'oxydation et de réduction typique de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ sur toute la gamme de concentration d'adénosine avec une diminution progressive mais modérée des intensités des pics de courant anodique en fonction de concentrations croissantes d'adénosine (Figure 84A).

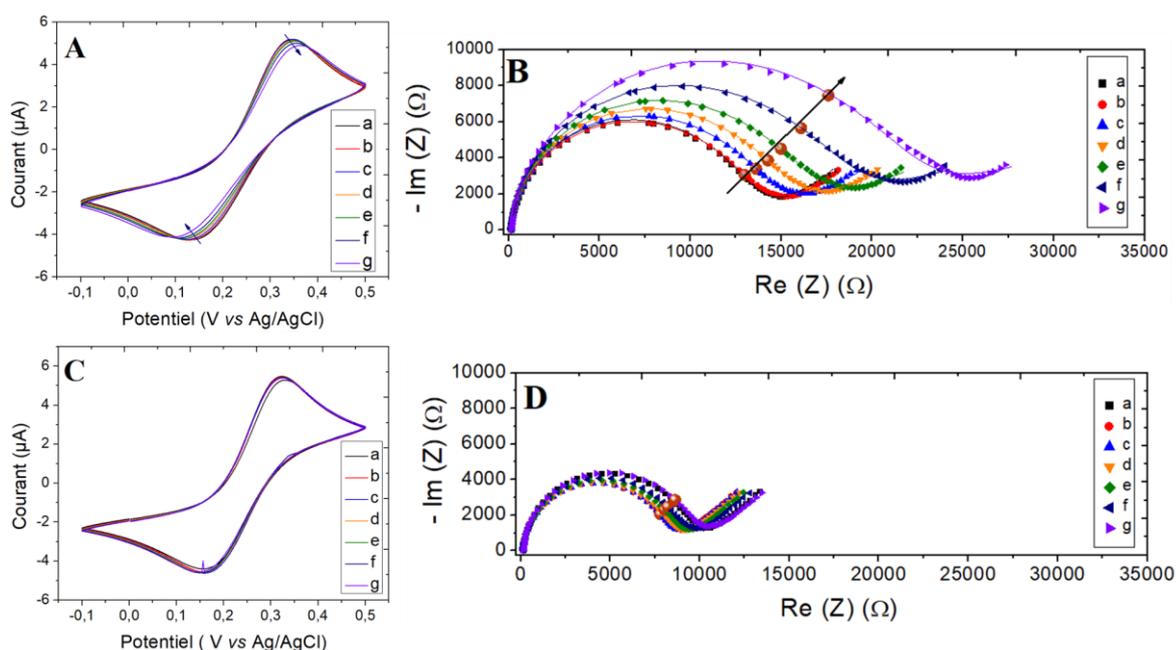


Figure 84: Voltampérogrammes cycliques du biocapteur aptamère anti-adénosine/MCH obtenue par co-immobilisation $1:1000 \mu\text{mol.L}^{-1}$ sur électrodes d'or polycristallin dans une solution de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ($2.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) à une vitesse de balayage de 10 mV.s^{-1} obtenus à différentes concentrations d'adénosine (A) et de guanosine (C) : a) 0 mol.L^{-1} ; b) $10^{-14} \text{ mol.L}^{-1}$; c) $10^{-13} \text{ mol.L}^{-1}$; d) $10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$; e) $10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$; f) $10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$; g) $10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$. Les données expérimentales sont représentées par des points et les données ajustées par des lignes. Diagrammes de Nyquist obtenus après ajout d'adénosine (B) et de guanosine (D) sur les électrodes ; les points d'isofréquence sont représentés par une sphère marron.

Cette diminution des intensités des pics peut s'expliquer par la réduction du transfert d'électron induite par l'accumulation de masse de l'adénosine à la surface de l'électrode provenant de sa reconnaissance par l'aptamère anti-adénosine. Cette tendance de réponse est validée par les mesures d'impédance dont le diagramme de Nyquist met en évidence une augmentation progressive de l'impédance (Figure 84B).

Concernant la guanosine, aucune variation significative n'a été observée que ce soit par voltampérométrie cyclique ou par spectroscopie d'impédance (Figure 84). Cette différence montre que la reconnaissance avec l'adénosine est effective et que si l'on ajoute un interférent, ici la guanosine, l'aptacapteur ne répond pas.

L'ajustement des spectres d'impédance de la Figure 84C a été réalisé avec le modèle de Randles. Les lignes sur les spectres correspondent à la courbe d'ajustement et on peut voir une forte similitude entre les valeurs expérimentales et les valeurs ajustées. Les paramètres R_{ct} , C_{dc} , f° et n du circuit électrique sont regroupés dans le

Tableau 16.

Tableau 16: Valeurs de I_{pa} , ΔE_p , de R_{ct} , C_{dc} , f° , et n obtenues après ajout d'adénosine sur une électrode fonctionnalisée par une monocouche aptamère anti-adénosine/MCH (ratio 1 :1000). Les conditions expérimentales sont identiques à celles de la Figure 82.

[Adenosine] (mol.L ⁻¹)	I_{pa} (μA)	ΔE_p (V)	R_{ct} (Ω)	C_{dc} (μF)	f° (Hz)	n
0	5,21 ± 0,10	0,21 ± 0,01	11000 ± 200	0,223 ± 0,005	65	0.970
10 ⁻¹⁴	5,20 ± 0,10	0,22 ± 0,01	11100 ± 200	0,215 ± 0,005	67	0.956
10 ⁻¹³	5,20 ± 0,10	0,22 ± 0,01	11400 ± 200	0,218 ± 0,005	64	0.955
10 ⁻¹²	5,13 ± 0,10	0,23 ± 0,01	11800 ± 200	0,215 ± 0,005	63	0.953
10 ⁻¹¹	5,10 ± 0,10	0,24 ± 0,01	12600 ± 200	0,243 ± 0,005	52	0.947
10 ⁻⁹	5,00 ± 0,10	0,25 ± 0,01	14000 ± 200	0,267 ± 0,005	42	0.941
10 ⁻⁷	4,89 ± 0,10	0,27 ± 0,01	17200 ± 200	0,326 ± 0,005	28	0.926

La représentation graphique des quatre paramètres R_{ct} , C_{dc} , f° et n de l'impédance en fonction du logarithme de la concentration en adénosine permet d'apprécier l'évolution de chaque paramètre (Figure 85). Ainsi, on remarque que les trois premières concentrations donnent des valeurs assez proches. Ensuite, lorsque la concentration en adénosine atteint puis dépasse 10⁻¹² mol.L⁻¹, les variations sont bien plus importantes.

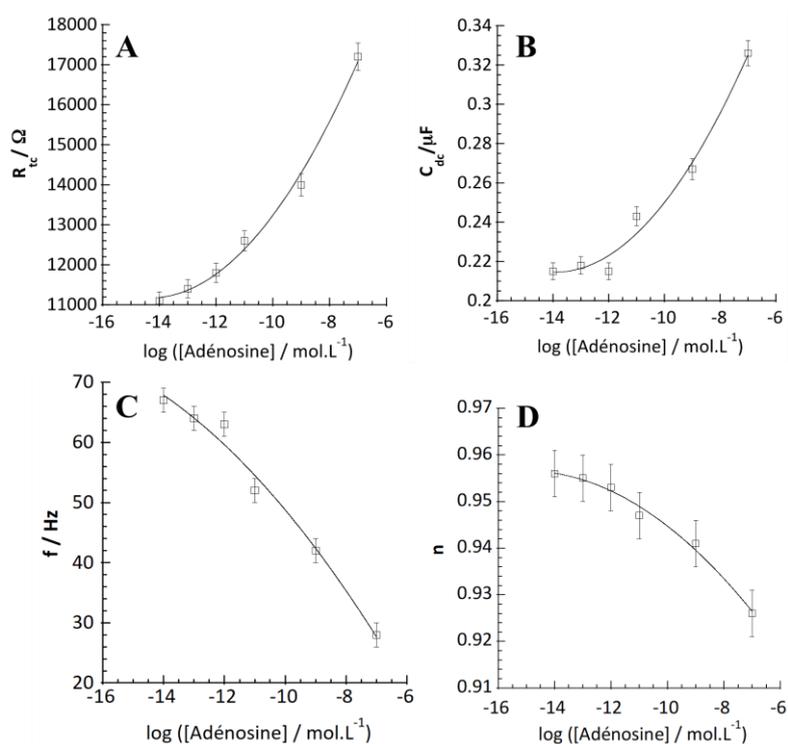


Figure 85: Courbes montrant les variations de R_{tc} (A), C_{dc} (B), f^o (C) et n (D) en fonction de la concentration d'adénosine, obtenues après ajustement des diagrammes de Nyquist de la Figure 84B.

La résistance de transfert de charge augmente alors que la fréquence caractéristique diminue, ce qui indique que le transfert d'électron de la sonde rédox ralentit avec l'augmentation de la concentration en adénosine. Ceci traduit, l'encombrement de la surface de la SAM par l'adénosine piégée dans l'aptamère. La capacité de double couche augmente légèrement alors que la valeur de n diminue lorsque l'on augmente la concentration en adénosine. La présence de l'adénosine piégée dans l'aptamère à la surface de la SAM rend la surface moins homogène avec un mélange d'aptamères libres et d'autres associés à l'adénosine, ce qui modifie la double couche électrochimique située à l'interface SAM / solution.

Une analyse quantitative des réponses obtenues avec 3 électrodes a été effectuée en comparant le paramètre ΔZ à une fréquence de 8,33 Hz (Tableau 17) après ajout de différentes concentrations d'adénosine ou de guanosine comprises entre 10^{-14} et 10^{-7} mol.L⁻¹. Les incertitudes présentées sont celles calculées sur les valeurs moyennes de ΔZ pour ces 3 électrodes. Sur toute la gamme de concentration étudiée, on peut noter des valeurs de $\Delta Z_{8,33 \text{ Hz}}$ pour l'adénosine (entre $700 \pm 600 \text{ } \Omega$ et $8100 \pm 2700 \text{ } \Omega$) nettement supérieures à celles de la guanosine (entre $-400 \pm 700 \text{ } \Omega$ et $400 \pm 400 \text{ } \Omega$).

Tableau 17: Valeurs de ΔZ obtenues à une fréquence de 8,33 Hz après ajout de l'adénosine ou de la guanosine aux électrodes fonctionnalisées par la monocouche aptamère anti-adénosine/MCH (ratio 1 :1000). Les conditions expérimentales sont identiques à celles de la Figure 84B. $n = 3$.

Concentration (mol.L ⁻¹)	$\Delta Z_{8,33 \text{ Hz}} (\Omega)$	
	Adénosine	Guanosine
10 ⁻¹⁴	700 ± 600	- 400 ± 700
10 ⁻¹³	1700 ± 900	-500 ± 600
10 ⁻¹²	2800 ± 1200	-400 ± 500
10 ⁻¹¹	4400 ± 2100	-200 ± 500
10 ⁻⁹	6000 ± 2000	50 ± 500
10 ⁻⁷	8100 ± 2700	400 ± 400

Les courbes d'étalonnage (Figure 86) pour ce nouvel aptacapteur ont été dressées à partir du paramètre des données du Tableau 17.

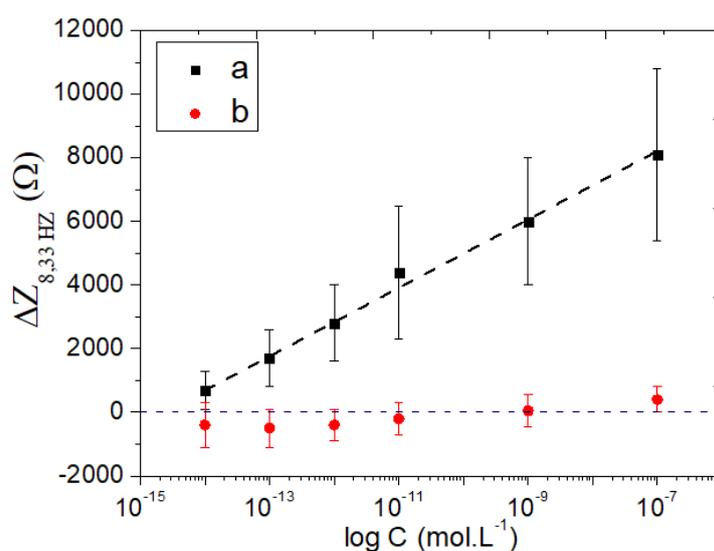


Figure 86: Courbes d'étalonnage montrant la variation du paramètre ΔZ en fonction de la concentration en adénosine (a) et en guanosine (b) pour des électrodes fonctionnalisées par une monocouche aptamère anti-adénosine/MCH obtenue par co-immobilisation 1:1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ sur électrode d'or avec la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ dans le tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹, pH =7,4. $n = 3$.

Contrairement au biocapteur à base de film de polypyrrole NTA qui n'avait pas donné de résultat probant (cf. chapitre II), celui avec une électrode d'or et un assemblage type SAMs (Figure 86) montre une large gamme de linéarité ($R^2 = 0,982$) de 7 ordres de grandeur (10^{-14} à 10^{-7} mol.L⁻¹) avec un seuil de détection à 10^{-13} mol.L⁻¹ pour l'adénosine puisque pour la concentration 10^{-14} mol.L⁻¹, on ne peut pas discriminer l'adénosine de la guanosine (domaine

d'incertitude communs). La Figure 86, montre aussi que l'ajout de guanosine n'entraîne pas de réponse des trois aptacapteurs basés sur une monocouche aptamère anti-adénosine/MCH quelle que soit la concentration. L'aptacapteur réalisé est donc très spécifique. Malgré ces performances très intéressantes, les importantes dispersions observées pour la réponse après l'ajout de l'adénosine (coefficient de variation atteignant les 85%) montrent que le système nécessite encore une certaine optimisation que nous n'avons pas eu l'occasion de réaliser.

III. Biocapteur à base d'électrodes d'or pour la détection de l'AVP

Au vu des bonnes performances de l'aptacapteur à adénosine, les paramètres utilisés pour la mise au point de ce dernier ont été reconduits pour le développement de l'aptacapteur pour la détection d'AVP.

1. Biocapteur à base d'électrodes d'or polycristallin

1.1.Fonctionnalisation des électrodes par co-immobilisation aptamère-MCH

1.1.1. Préparation des électrodes

Les électrodes précédemment utilisées pour le développement de l'aptacapteur pour la détection de l'adénosine ont été nettoyées et réutilisées pour la mise au point du capteur à AVP.

Dans un premier temps, les électrodes ont été nettoyées électrochimiquement dans une solution de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, après polissage à l'alumine (technique de nettoyage précédemment utilisée pour la réalisation des aptacapteurs à adénosine). Après dénaturation et refroidissement, $10 \mu\text{L}$ d'un mélange de D-aptamère anti AVP et de MCH (ratio $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ d'aptamère : $1000 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MCH) préparé dans une solution de tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,4$) ont été déposés à la surface des électrodes. L'aptacapteur pour la détection de l'AVP ainsi conçu s'est montré non fonctionnel (résultats non présentés). Ces résultats pourraient s'expliquer par le greffage d'une trop faible quantité de thiols (aptamère et MCH) à la surface de l'électrode. En effet, le spectre d'impédance de l'électrode modifiée par l'aptamère (Figure 87.b) montre une augmentation très modérée de l'impédance par rapport à l'électrode nue (Figure 87.a) après greffage de la monocouche aptamère anti-D-AVP/MCH alors que des valeurs bien plus importantes avaient été obtenues pour l'aptacapteur à adénosine.

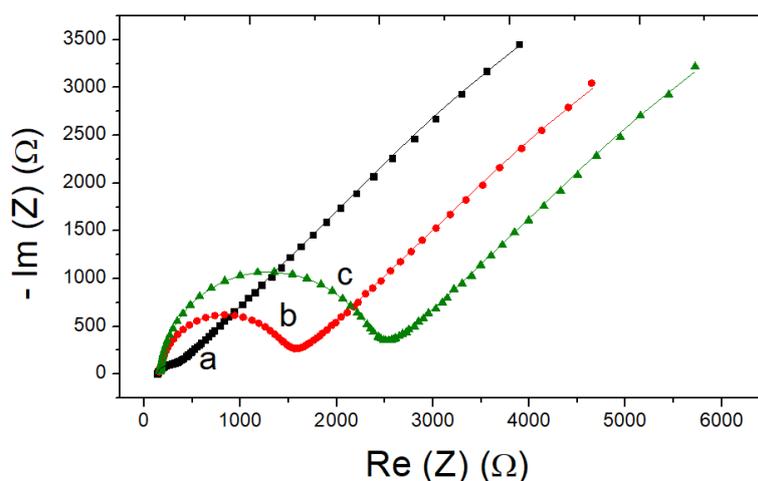


Figure 87: Diagrammes de Nyquist des spectres d'impédance d'une électrode d'or polycristalline ($\Phi = 2 \text{ mm}$) avant (a), après fonctionnalisation par une monocouche aptamère anti-AVP/MCH à la concentration $1:1000 \mu\text{mol.L}^{-1}$ obtenue par co-immobilisation après polissage à l'alumine et nettoyage électrochimique dans une solution de H_2SO_4 (b) et après polissage à la pâte de diamant et nettoyage chimique dans un mélange $\text{KOH } 50 \text{ mmol.L}^{-1} + \text{H}_2\text{O}_2$ à 25% (c). Les données expérimentales sont représentées par des points et les données ajustées par des lignes. Spectres obtenus à l'OCP, avec un potentiel alternatif d'amplitude de $10 \text{ mV}_{\text{RMS}}$ et un balayage de fréquence de 50000 Hz à $0,1 \text{ Hz}$. Toutes les mesures ont été effectuées en utilisant $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1} \text{ Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ comme sonde redox dans un tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ salin (pH 7,4).

Ce très faible greffage de thiols pourrait provenir d'une contamination de la surface de l'électrode qui malgré un polissage et un nettoyage très agressif n'est plus éliminée. En effet, il semblerait que le nettoyage était efficace au départ lorsque l'électrode était quasi-neuve mais ne l'est plus. La pâte diamantée est connue pour laisser beaucoup moins d'impuretés sur la surface de l'électrode par rapport à l'alumine qui peut encrasser la surface [252]. Dans ces conditions, nous avons opté pour un autre protocole de nettoyage. Celui-ci comprend un polissage de la surface des électrodes avec une suspension de particules de diamant de $0,1 \mu\text{m}$ de diamètre, suivi d'un nettoyage électrochimique dans un mélange $\text{KOH } 50 \text{ mmol.L}^{-1} + \text{H}_2\text{O}_2$ à 25% puis d'un nettoyage électrochimique par voltampérométrie cyclique dans une solution de $\text{KOH } 50 \text{ mmol.L}^{-1}$. Selon Fischer et al. , cette méthode de nettoyage serait plus efficace que le nettoyage électrochimique dans une solution de H_2SO_4 [248].

Les électrodes ainsi nettoyées ont été rincées à l'eau milli-Q et séchées au N_2 avant d'être fonctionnalisées par la monocouche aptamère anti-D-AVP/MCH (avec un mélange aptamère/MCH 1:1000). Le spectre d'impédance obtenu après greffage de la monocouche est représenté sur la Figure 87.c. Celui-ci montre une impédance plus importante que celle obtenue après le polissage à l'alumine et le nettoyage électrochimique à la solution de H_2SO_4

0,5 mol.L⁻¹ (Figure 87.b). Cette augmentation de l'impédance témoigne de la formation d'une monocouche aptamère/MCH plus compacte à la surface de l'électrode. Cette autre technique de nettoyage, qui paraît plus efficace, a donc été retenue.

Les paramètres des spectres d'impédance liés à l'effet des deux manières de nettoyer l'électrode sur la formation de la SAM aptamère anti-D-AVP/MCH sont regroupés dans le Tableau 18..

Tableau 18: Valeurs de R_{ct} , C_{dc} , f° et n obtenues après avant et après fonctionnalisation d'une électrode avec la monocouche aptamère/MCH après nettoyage électrochimique dans une solution de H_2SO_4 et dans une solution de $KOH + H_2O_2$ 25%. Les conditions expérimentales sont identiques à celles de la Figure 87.

Etape	R_{ct} (Ω)	C_{dc} (μF)	f° (Hz)	n
Au	170 ± 3	0.89 ± 0,02	1050	0.855
Au/Aptamère/MCH après polissage par la pâte d'alumine et nettoyage avec la solution de H_2SO_4	1280 ± 30	0.192 ± 0,003	650	0.958
Au/Aptamère/MCH après polissage par la pâte de diamant et nettoyage avec le mélange $KOH + H_2O_2$	2160 ± 40	0.157 ± 0,004	470	0.978

Les données du tableau montrent que le SAM obtenu après la nouvelle méthode de nettoyage a une plus grande résistance de transfert de charge, une plus grande valeur de n, une plus faible capacité de double couche et une plus faible fréquence caractéristique. Il est plus proche de ce que l'on attendait même si les valeurs n'atteignent pas ce que l'on avait eu avec le SAM à base d'aptamère anti-adénosine. Cette différence, peut être liée à la longueur de l'aptamère, ici 55 bases contre 25 bases pour l'anti-adénosine. En effet, l'aptamère anti-D-AVP peut perturber d'avantage le processus de construction du SAM à cause de sa longueur importante.

1.1.2. Performances analytiques

Des concentrations croissantes en AVP ont été ajoutées à la surface des électrodes préparées avec la nouvelle technique de nettoyage. La réponse de l'aptacapteur a été caractérisée par spectroscopie d'impédance électrochimique avec la sonde $Fe(CN)_6^{3-/4-}$. La Figure 88 montre le tracé des diagrammes de Nyquist des spectres d'impédance obtenus après ajout de différentes concentrations de D et de L-AVP à la surface des électrodes préparées.

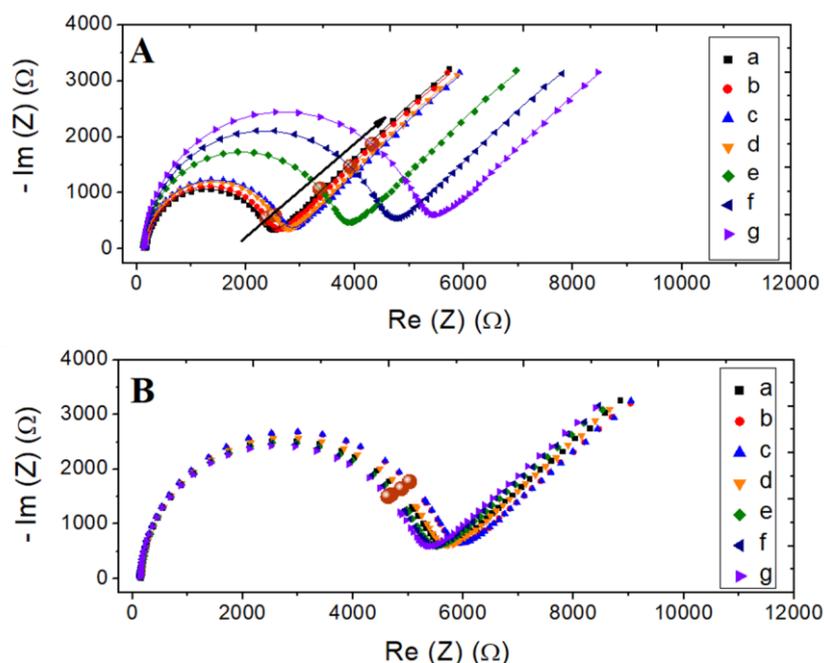


Figure 88: Diagrammes de Nyquist des spectres obtenus pour le biocapteur à base d'une monocouche aptamère/MCH à la concentration de $1 : 1000 \mu\text{mol.L}^{-1}$ déposée par co-immobilisation aux concentrations de : a) 0 mol.L^{-1} b) $3,2 \cdot 10^{-14} \text{ mol.L}^{-1}$; c) $3,2 \cdot 10^{-13} \text{ mol.L}^{-1}$; d) $3,2 \cdot 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$; e) $3,2 \cdot 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$; f) $3,2 \cdot 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ et g) $3,2 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ en D-AVP (A) et L-AVP (B). Les données expérimentales sont représentées par des points et les données ajustées par des lignes. Mesures effectuées à l'OCV dans une solution de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ($2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) dans un tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$; les points d'isofréquence sont représentés par une sphère marron.

Une augmentation de l'impédance en fonction des concentrations croissantes de cible est observée pour la D-AVP (Figure 88A) tandis qu'aucune variation significative n'est notée pour l'ajout de la L-AVP (Figure 88B). Cette augmentation, comme pour le cas précédent avec l'adénosine, résulte de l'accumulation de masse de la D-AVP à la surface de l'électrode par suite de sa reconnaissance par l'aptamère.

Les paramètres extraits des spectres d'impédance en fonction de la concentration en D-AVP incubée sur l'aptacapteur sont regroupés dans le Tableau 19. On remarque que la résistance de transfert de charge et la fréquence sont modifiées avec la concentration en D-AVP avec une augmentation pour la résistance et une diminution pour la fréquence. Les deux autres paramètres, la capacité de double couche et le facteur n , restent constants avec l'augmentation de la concentration.

Pour visualiser l'évolution de ces 4 paramètres, la Figure 89 est présentée. On voit que les variations de la résistance de transfert de charge et de la fréquence se découpent en deux zones, jusqu'à la concentration $3,2 \cdot 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$, la variation est assez faible voire nulle, et ensuite, pour les plus fortes concentrations, la variation est significative. Pour les deux autres

paramètres, f° et n , le graphe confirme que ces deux valeurs restent constantes quelle que soit la concentration.

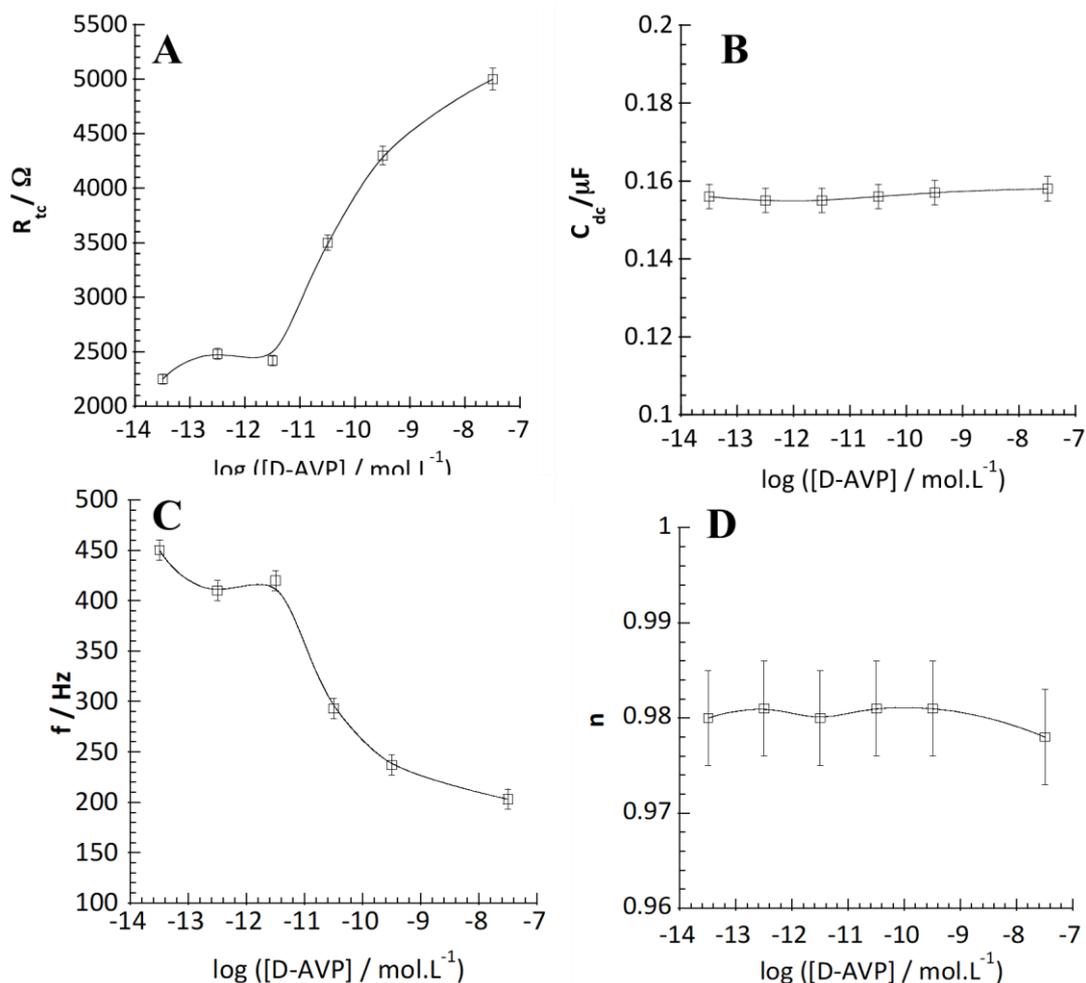


Figure 89: Courbes montrant les variations de R_{tc} (A), C_{dc} (B), f° (C) et n (D) en fonction de la concentration de D-AVP à la surface d'une électrode d'or polycristallin fonctionnalisée avec une monocouche aptamère/MCH (1 :1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), obtenues après ajustement des diagrammes de Nyquist de la Figure 88A.

Ces résultats semblent indiquer que la reconnaissance entre l'aptamère et la L-AVP n'a aucune influence sur la double couche et sur l'homogénéité de la couche de SAM. On peut supposer que le changement de conformation nécessaire à l'aptamère anti-D-AVP pour enchâsser sa cible est situé suffisamment loin de la surface du SAM pour ne pas perturber la double couche électrochimique. Ceci est cohérent avec le fait que l'aptamère anti-D-AVP est beaucoup plus long que celui de l'adénosine.

Tableau 19: Valeurs de R_{ct} , C_{dc} , f° , et n obtenues après ajout de D-AVP à la surface d'électrodes fonctionnalisées par une monocouche aptamère anti-D-AVP/MCH (ratio 1 :1000). Les conditions expérimentales sont identiques à celles de la Figure 88.

[D-AVP] (mol.L ⁻¹)	R_{ct} (Ω)	C_{dc} (μ F)	f° (Hz)	n
0	2150 \pm 40	0,157 \pm 0,003	470	0,980
3,2.10 ⁻¹⁴	2250 \pm 50	0,156 \pm 0,003	450	0,980
3,2.10 ⁻¹³	2480 \pm 50	0,155 \pm 0,003	410	0,981
3,2.10 ⁻¹²	2420 \pm 50	0,155 \pm 0,003	420	0,980
3,2.10 ⁻¹¹	3500 \pm 70	0,156 \pm 0,003	293	0,981
3,2.10 ⁻¹⁰	4300 \pm 90	0,157 \pm 0,003	237	0,981
3,2.10 ⁻⁸	5000 \pm 100	0,158 \pm 0,003	203	0,978

De plus, les variations d'impédance ont été quantitativement analysées à une fréquence de 120 Hz (Tableau 20). Les incertitudes présentées sont celles sur les moyennes de ΔZ sur 2 électrodes. Sur la gamme de concentration allant de 3,2.10⁻¹³ à 3,2.10⁻⁸ mol.L⁻¹, une différence est observée entre les valeurs de ΔZ pour la D-AVP et celles pour le L-AVP, ce qui n'était pas le cas pour l'aptacaptur à base d'un film de polypyrrole NTA avec la sonde Fe(CN)₆^{3-/4-}. On remarquera que la concentration 3,2.10⁻¹⁴ mol.L⁻¹, ne permet pas de différencier la D-AVP de la L-AVP et que les incertitudes élevées pour les concentrations 3,2.10⁻¹³ et 3,2.10⁻¹² mol.L⁻¹, sont suffisamment grande pour douter de la spécificité de l'aptacaptur dans cette gamme de concentration.

Tableau 20: Valeurs de ΔZ obtenues à une fréquence de 120 Hz après ajout de la D-AVP ou de la L-AVP aux électrodes fonctionnalisées à la monocouche aptamère anti-AVP/MCH (ratio 1:1000). Les conditions expérimentales sont identiques à celles de la Figure 88. $n = 2$.

Concentration (mol.L ⁻¹)	$\Delta Z_{120 \text{ Hz}} (\Omega)$	
	D-AVP	L-AVP
3,2.10 ⁻¹⁴	100 \pm 60	130 \pm 200
3,2.10 ⁻¹³	500 \pm 300	90 \pm 300
3,2.10 ⁻¹²	600 \pm 500	50 \pm 40
3,2.10 ⁻¹¹	1800 \pm 900	-40 \pm 80
3,2.10 ⁻¹⁰	1800 \pm 40	-110 \pm 60
3,2.10 ⁻⁸	2000 \pm 400	-170 \pm 80

Ainsi, les valeurs de ΔZ rejoignent les conclusions faites lors de l'étude des résistances de transfert présentées précédemment, c'est à dire qu'en dessous de $3,2 \cdot 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$, la réponse de l'aptacapteur n'est pas significative.

Enfin, les courbes d'étalonnage produites à partir des données du Tableau 20 (Figure 90) ne révèlent aucune croissance exploitable de la réponse induite par la D-AVP (Figure 90.a). En effet, un pseudo-plateau est visible entre $3,2 \cdot 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$ et $3,2 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ car l'incertitude sur les points de mesure est trop élevée à ce stade de notre étude.

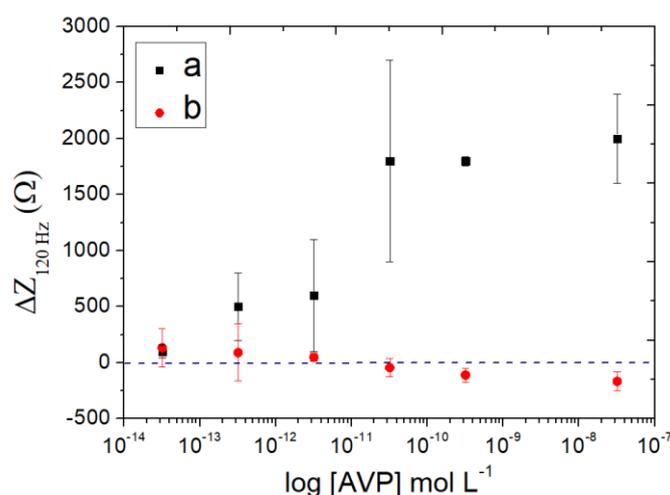


Figure 90: Courbes d'étalonnage montrant la variation du paramètre $\Delta Z_{120 \text{ Hz}}$ en fonction de la concentration en D-AVP (a) et de L-AVP (b) pour des électrodes fonctionnalisées par co-immobilisation aptamère/MCH avec la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ dans le tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$, $n = 2$.

Il est également pertinent de souligner que le signal provenant de la L-AVP reste faible sur toute la gamme de concentration testée avec des valeurs ΔZ comprises entre 130 et -170Ω ce qui n'était pas le cas pour les autres aptacapteurs développés avec les polymères électrogénérés. Ces faibles valeurs traduisent une faible adsorption non spécifique de la L-AVP à la surface de l'électrode d'or.

Ces performances nécessitent une optimisation en termes de sensibilité, de linéarité mais aussi de reproductibilité. En effet, les dispersions de la réponse restent très importantes (avec un coefficient de variation atteignant les 83%) pour la D-AVP comme peuvent en témoigner les incertitudes sur la Figure 90.a.

1.2.Fonctionnalisation des électrodes par « backfilling » avec le MCH

Une autre technique de préparation des électrodes consiste à réaliser des dépôts successifs d'aptamère et de MCH plutôt que de déposer un mélange des deux molécules thiolées : il

s'agit de la technique dite de « backfilling ». Elle présente l'avantage d'éviter une compétition entre les différents thiols composant le mélange de dépôt (l'aptamère et le MCH dans notre cas). Elle devrait permettre la fixation d'une quantité plus importante d'aptamère à la surface. Cette augmentation de la quantité d'aptamère greffé pourrait améliorer la sensibilité de l'aptacapteur.

D'autre part, cette technique pourrait permettre d'obtenir une meilleure orientation et une meilleure organisation de la monocouche auto-assemblée à la surface de l'électrode. Comme dit précédemment, l'aptamère peut s'adsorber de manière non spécifique à la surface de l'électrode grâce aux fonctions amines de son squelette. L'ajout de MCH dans un second temps permet de déplacer les parties de l'aptamère adsorbées pour leur donner une orientation verticale (Figure 91)[253]. Ce réarrangement se produit notamment grâce aux répulsions électrostatiques entre le dipôle négatif de l'extrémité alcoolique du MCH et le squelette de l'aptamère qui porte aussi des charges négatives (groupements phosphate) [217].

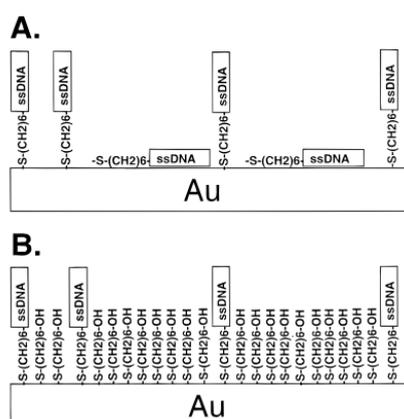


Figure 91: Schéma de l'adsorption de monobrins d'ADN (A) et d'ADN et de MCH (B) sur une surface d'or [253].

Cette technique a été appliquée pour la conception de l'aptacapteur à AVP sur ces électrodes d'or polycristallin.

1.2.1. Préparation des électrodes

Les électrodes propres ont été fonctionnalisées dans un premier temps avec 10 μL d'une solution d'aptamère dénaturé à 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ dans le tampon phosphate 0,1 mol.L^{-1} . Une fois ce dépôt effectué, les électrodes sont incubées à 4°C pour une nuit. Elles sont ensuite rincées avant le dépôt de 1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'une solution de MCH préparée également dans la solution de tampon phosphate pour une période d'incubation de 1 heure à 25°C. Après cette étape un nouveau rinçage est effectué avec la solution de tampon phosphate avant ajout de l'AVP. Ce

mode de préparation correspond à un rapport de concentration 1:1000 entre les concentrations (en micromolaire) de l'aptamère et de MCH

1.2.2. Performances analytiques

Le tracé des diagrammes de Nyquist obtenus après ajout de différentes concentrations de D-AVP est montré sur la Figure 92. Il fait apparaître, comme ce fut le cas pour la technique de « co-immobilisation » une augmentation progressive de l'impédance en fonction de concentrations croissantes de D-AVP.

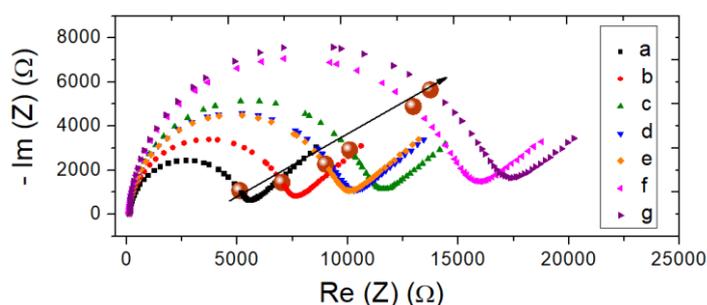


Figure 92: Diagrammes de Nyquist des spectres d'impédance obtenus pour le biocapteur à base d'une monocouche aptamère/MCH déposée avec un rapport de concentration 1:1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ par « backfilling » pour des concentrations de : a) 0 mol.L^{-1} b) $3,2.10^{-14} \text{ mol.L}^{-1}$; c) $3,2.10^{-13} \text{ mol.L}^{-1}$; d) $3,2.10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$; e) $3,2.10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$; f) $3,2.10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ et g) $3,2.10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ en D-AVP. Mesures effectuées à l'OCP dans une solution de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ($2.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) dans un tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$; les points d'isofréquence sont représentés par une sphère marron.

Le Tableau 21 compare les valeurs de ΔZ à une fréquence de 120 Hz obtenues après ajout de la D-AVP à la surface d'électrodes d'or fonctionnalisées par co-immobilisation aptamère-MCH et par « backfilling » avec le MCH. Les incertitudes présentées sont celles calculées sur les valeurs moyennes de ΔZ sur 2 électrodes.

Tableau 21: Valeurs de ΔZ obtenues à une fréquence de 120 Hz après ajout de D-AVP à la surface d'électrodes fonctionnalisées à la monocouche aptamère/MCH par techniques de co-immobilisation et de backfilling (ratio 1:1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Les conditions expérimentales sont identiques à celles de la Figure 92.

Concentration (mol.L^{-1})	$\Delta Z_{120 \text{ Hz}} (\Omega)$	
	D-AVP avec co-immobilisation	D-AVP avec backfilling
$3,2 \cdot 10^{-14}$	100 ± 60	800 ± 600
$3,2 \cdot 10^{-13}$	500 ± 300	1700 ± 1300
$3,2 \cdot 10^{-12}$	600 ± 500	2000 ± 400
$3,2 \cdot 10^{-11}$	1800 ± 900	2100 ± 300
$3,2 \cdot 10^{-10}$	1800 ± 40	2800 ± 1200
$3,2 \cdot 10^{-8}$	2000 ± 400	2800 ± 1500

Avec des variations ΔZ supérieures à celles précédemment obtenues, la technique de « backfilling » a semblé plus efficace que celle de la co-immobilisation comme le montrent les courbes d'étalonnage de la Figure 93 dressées à partir des valeurs du Tableau 20.

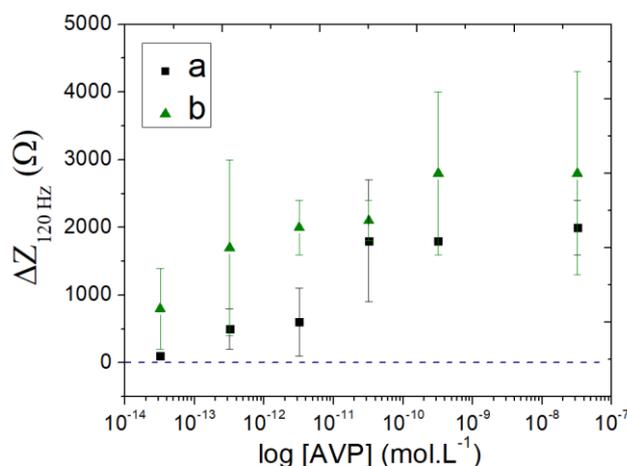


Figure 93: Courbes d'étalonnage montrant la variation du paramètre $\Delta Z_{120 \text{ Hz}}$ en fonction de la concentration en D-AVP pour des électrodes fonctionnalisées avec la monocouche aptamère/MCH par co-immobilisation (a) et par « backfilling » (b) avec un rapport de concentration de 1:1000 en utilisant la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ dans le tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$. $n = 2$.

Pour une concentration de $3,2 \cdot 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ en D-AVP, les variations $\Delta Z_{120 \text{ Hz}}$ sont de $600 \pm 500 \Omega$ et $\Delta Z_{120 \text{ Hz}} = 2000 \pm 400 \Omega$ respectivement pour avec la technique de co-immobilisation et la D-AVP avec la technique de « backfilling ». La linéarité a été quant à

elle légèrement améliorée (entre $3,2 \cdot 10^{-14}$ et $3,2 \cdot 10^{-10}$ mol.L⁻¹). Toutefois, les coefficients de variation restent importants (jusqu'à 76% pour une concentration de $3,2 \cdot 10^{-13}$ mol.L⁻¹).

La technique de « backfilling » semble avoir amélioré la réponse de l'aptacapteur mais n'a pas suffi à améliorer la reproductibilité sur les électrodes d'or polycristallin. Un autre moyen d'optimisation doit être envisagé pour améliorer cette reproductibilité mais aussi la linéarité et ce tout en préservant (ou en améliorant aussi) la sensibilité de l'aptacapteur.

2. Biocapteur à base de monocouches autoassemblées sur des électrodes d'or SPE (Screen Printed Electrodes)

On ne pourrait pas exclure que l'une des origines des importantes dispersions de réponse observées d'une électrode à une autre soit la réutilisation des électrodes. En effet, bien que le protocole de nettoyage à la pâte de diamant et au mélange KOH + H₂O₂ semble efficace, ce dernier ne garantit pas l'obtention de surfaces semblables d'une électrode à une autre puisque les mesures ne sont pas reproductibles. Afin de nous affranchir de ce facteur, nous nous sommes intéressés à des électrodes à usage unique commerciales.

Les électrodes SPE (Screen Printed Electrodes) sont des électrodes miniatures à usage unique fabriquées par impression de diverses encres (de carbone, d'or, de platine ou d'argent) sur différents types de substrats en plastique ou en céramique. Les motifs générés sont fonction de l'objectif de l'analyse. En plus de permettre d'éviter un nettoyage fastidieux comme celui des électrodes d'or réutilisables (par le polissage), les électrodes SPE présentent l'avantage de permettre la miniaturisation des systèmes de biodétection, sont peu coûteuses et plus simples à produire en masse, d'où leur grande accessibilité sur le marché [254].

Souvent, les dispositifs SPE sont constitués de 3 mini électrodes (électrode de travail, électrode auxiliaire et électrode de référence) portées par le même support (Figure 94).

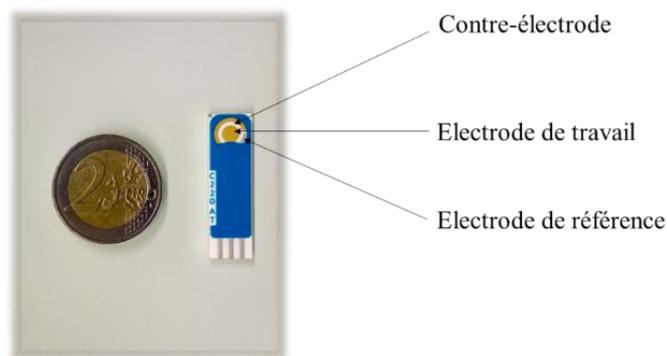


Figure 94: Image d'une électrode d'or SPE ($\Phi = 4$ mm) en comparaison avec une pièce de 2 €.

Pour la suite de nos travaux ce sont ces électrodes qui seront utilisées même si seule la partie imprimée correspondant à l'électrode de travail nous intéresse. Les autres électrodes (l'électrode auxiliaire et l'électrode de référence) étant elles aussi métalliques, ont été vernies afin d'éviter toute adsorption de l'aptamère ou de la cible.

2.1. Préparation des électrodes

2.1.1. Nettoyage des électrodes

Même si elles sont à usage unique, chaque électrode SPE est nettoyée avant son utilisation. Ceci permet de se débarrasser des éventuelles impuretés présentes à la surface de l'électrode. La technique de nettoyage utilisée pour ces électrodes est un nettoyage chimique dans une solution de KOH 50 mmol.L⁻¹ + H₂O₂ à 25% suivi d'un nettoyage électrochimique par voltampérométrie cyclique dans une solution de KOH 50 mmol.L⁻¹.

2.1.2. Reproductibilité à nue des électrodes

Des différences de caractéristiques importantes entre les électrodes pourraient être responsables d'importantes dispersions de la réponse des capteurs qui en résultent. Afin de nous assurer de l'homogénéité du lot d'électrodes utilisées, notamment en termes d'impédance, nous avons mesuré l'impédance de 10 électrodes nues avec la sonde Fe(CN)₆^{3-/4-} (2.10⁻³ mol.L⁻¹).

La Figure 95 représente les spectres d'impédance et un diagramme en bâton représentant les impédances à 120 Hz obtenues pour 10 électrodes.

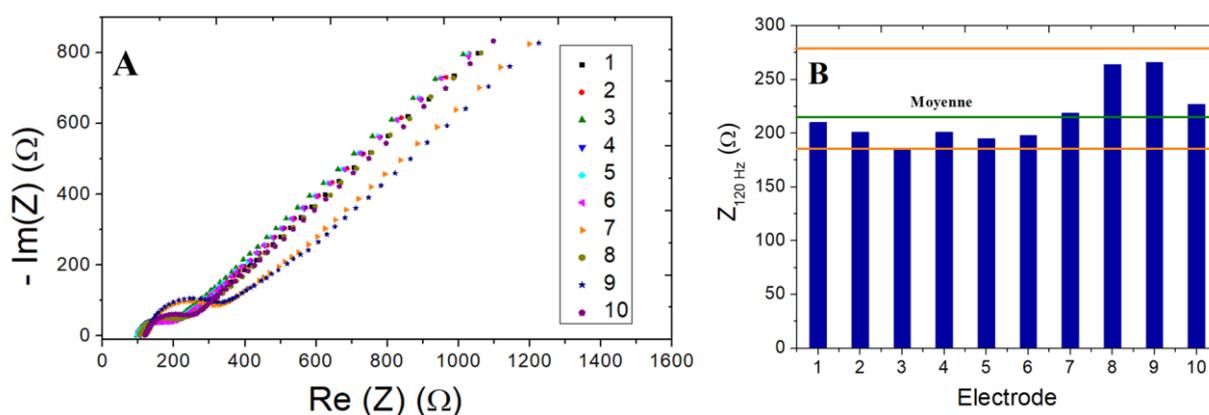


Figure 95: Diagrammes de Nyquist des spectres obtenus pour des électrodes d'or SPE après nettoyage dans un mélange KOH 50 mmol.L⁻¹ + H₂O₂ à 25% (A) et diagrammes en bâtons représentant les valeurs de l'impédance Z à une fréquence de 120 Hz pour chaque électrode (B). Mesures effectuées à l'OCP dans une solution de Fe(CN)₆^{3-/4-} (2.10⁻³ mol.L⁻¹) dans un tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹, pH = 7,4.

Comme attendu, le diagramme de Nyquist montre pour toutes les électrodes, à hautes fréquences, une boucle correspondant au phénomène de transfert de charge associé à la double couche électrochimique et à basses fréquences une demi-droite de pente très proche de 45° correspondant au phénomène de diffusion des espèces $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (Figure 95A).

Les valeurs d'impédance à 120 Hz obtenues oscillent autour d'une moyenne de $220 \pm 30 \Omega$ (Figure 95B). Cette faible valeur traduit un transfert d'électron plutôt facile. Au vu de la faible différence entre les valeurs de $Z_{120 \text{ Hz}}$ pour les 10 électrodes, on peut considérer que le process de fabrication ainsi que celui de nettoyage des électrodes permettent d'obtenir une certaine reproductibilité en termes d'impédance. D'éventuelles dispersions de la réponse du biocapteur proviendraient alors uniquement du process de fonctionnalisation des électrodes.

2.1.3. Fonctionnalisation des électrodes

Du fait des bonnes performances obtenues avec les électrodes d'or polycristallin en termes de sensibilité, la technique de « backfilling » avec le MCH a été reconduite pour la fonctionnalisation des électrodes SPE avec un rapport de concentration de 1:1000. Afin de confirmer l'action du MCH, l'impédance a été mesurée à chaque étape de fonctionnalisation des électrodes.

La Figure 96 montre les diagrammes de Nyquist des électrodes SPE nue (Figure 96.a), modifiées à l'aptamère anti-AVP (Figure 96.b) et ensuite au MCH (Figure 96.c).

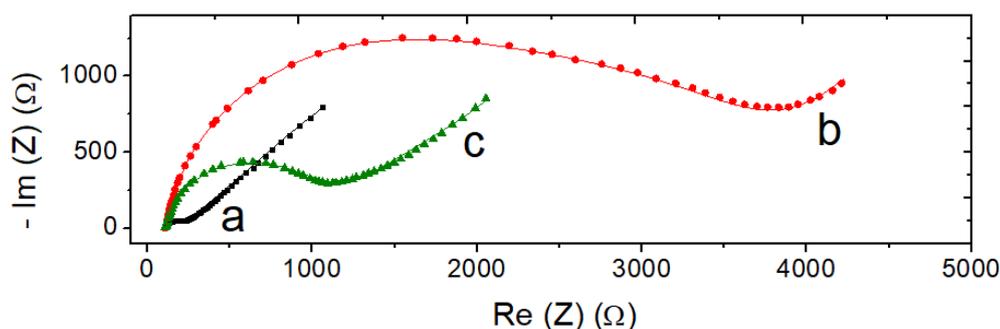


Figure 96: Diagrammes de Nyquist des spectres d'impédance d'une électrode d'or SPE ($\Phi = 4 \text{ mm}$) avant (a), après fonctionnalisation avec l'aptamère anti-AVP à une concentration de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (b) et après fonctionnalisation avec MCH à une concentration de $1000 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (c). Les données expérimentales sont représentées par des points et les données ajustées par des lignes. Spectres obtenus à l'OCP, avec un potentiel alternatif d'amplitude de $10 \text{ mV}_{\text{RMS}}$ et un balayage de fréquence de 50000 Hz à $0,1 \text{ Hz}$. Des données expérimentales (points) et ajustées (lignes) sont présentées. Toutes les mesures ont été effectuées en utilisant $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1} \text{ Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ comme sonde redox dans un tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ salin (pH 7,4).

On peut voir que pour la première étape de modification, l'impédance mesurée est la plus élevée (Figure 96.b). De plus, la partie haute fréquence est constituée de deux boucles qui se superposent. La première boucle ressemble à un demi-cercle alors que la seconde semble plus plate. Quand la construction de l'aptacapteur est complète, la forme habituelle est retrouvée avec une seule boucle à haute fréquence (Figure 96.c).

Le Tableau 22 montre les valeurs des paramètres de l'impédance à chaque étape de fonctionnalisation des électrodes SPE avec l'aptamère anti-AVP puis le MCH. Pour la première étape de fonctionnalisation (fixation de l'aptamère anti-AVP), le circuit équivalent a été adapté par ajout en série d'un circuit RC parallèle constitué d'une seconde résistance de transfert de charge et d'une seconde capacité de double couche pour tenir compte de la forme différente du spectre d'impédance. Nous n'avons pas essayé de voir si un ajout des paramètres en parallèle marcherait mieux, même si physiquement cela aurait plus de sens. En effet, cela permettrait de traduire la présence sur l'électrode d'une partie organisée et d'une partie désorganisée qui sont toutes les deux traversées par la sonde rédox mais cela aurait demandé l'ajout aussi d'une seconde impédance de Warburg. La simulation n'aurait pas été aisée.

Tableau 22: Valeurs de R_{ct} , C_{dc} , f° et n obtenues après les différentes étapes de fonctionnalisation de l'électrode. Les conditions expérimentales sont identiques à celles de la Figure 96.

Etape	R_{ct} (Ω)	C_{dc} (μF)	f° (Hz)	n
Au	108 ± 2	$2,10 \pm 0,04$	700	0,835
Au/Aptamère	1710 ± 30	$6,5 \pm 0,1$	14,3	0,962
	2050 ± 40	$32,4 \pm 0,7$	2,39	0,795
Au/Aptamère/MCH	860 ± 20	$3,80 \pm 0,08$	50	0,929

D'une valeur de $108 \pm 2 \Omega$ pour l'électrode nue, la résistance R_{ct} augmente à $1710 \pm 30 \Omega$ pour $R_{ct}(1)$ et $2050 \pm 40 \Omega$ pour $R_{ct}(2)$ pour l'électrode fonctionnalisée par l'aptamère, avant de diminuer à $860 \pm 20 \Omega$ pour l'électrode avec l'aptamère et le MCH. Pour les fréquences, les changements sont inverses, avec une baisse très importante après la fonctionnalisation par l'aptamère ($f^\circ(1) = 14,3$ et $f^\circ(2) = 2,9$ Hz alors qu'initialement $f^\circ = 700$ Hz) et une augmentation pour l'ajout de MCH ($f^\circ = 50$ Hz). Ces deux paramètres indiquent que le transfert de charge est fortement ralenti puis légèrement accéléré à chaque étape de la construction. Pour les deux autres paramètres, surtout la valeur de n , l'étape intermédiaire, où seul l'aptamère est sur l'électrode, évoque la présence d'une forme organisée de la couche de molécules sur l'électrode sur une sous partie de la surface ($n(1) = 0,962$) et d'une autre forme

désorganisée sur le reste de la surface ($n(2) = 0,795$). Lorsque l'aptacapteur est terminé, on revient à une valeur assez élevée pour n ($n = 0,929$) qui traduit une bonne organisation de la SAM réalisée sur l'électrode. Ces mesures confirment le mécanisme selon lequel le MCH permet de déplacer les molécules d'aptamère adsorbées à la surface de l'électrode par les groupements NH_2 et phosphate. Les molécules d'aptamère adsorbées couchées à la surface de l'électrode (Figure 91) empêchant ainsi la sonde électrochimique d'atteindre la surface de l'électrode, ralentissent ainsi le transfert d'électrons. Une fois que ces aptamères sont redressés par le MCH, la surface de l'électrode est plus accessible à la sonde rédox ; le transfert d'électrons est facilité et l'interface SAM/solution est bien organisée.

2.2. Performances analytiques dans le tampon phosphate

Un premier test de performances vis-à-vis de la D-AVP et de la L-AVP préparés dans le tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$ a été réalisé. Un autre type de spécificité a été étudié en immobilisant à la place de l'aptamère anti-D-AVP, un autre aptamère dit « scramble » qui est constitué des mêmes bases que l'aptamère anti-AVP mais dont la séquence est différente (les bases ont été mélangées) : (5' SH-(CH_2)₆-TGA-CAT-CTC-TAA-CGC-GAC-CAG-CGT-GGT-ATG-CTG-TGT-GCG-ACG-TGC-AGG-CGA-GTG-A 3'). Cet aptamère n'est censé reconnaître ni la D-AVP ni la L-AVP.

La Figure 97 montre le diagramme de Nyquist des spectres d'impédance obtenus pour les différentes configurations aptamère-analyte.

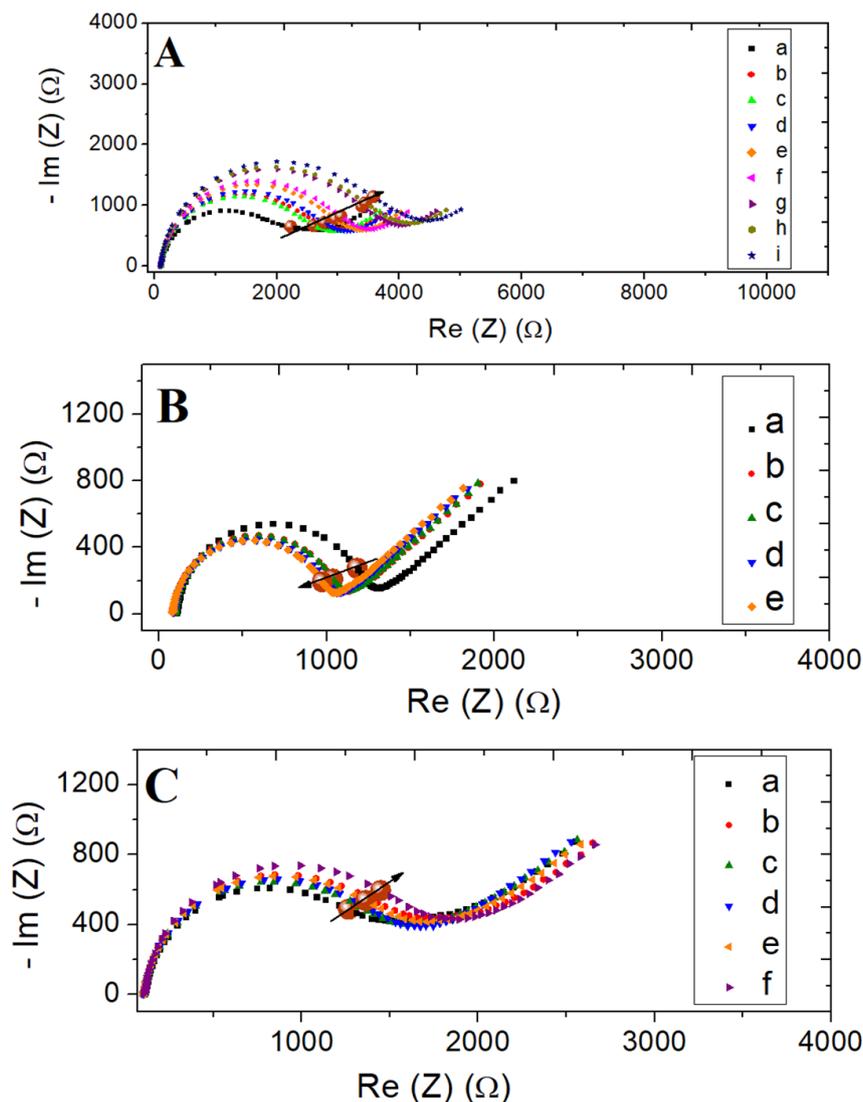


Figure 97: Diagrammes de Nyquist des spectres obtenus pour le biocapteur à base d'une monocouche aptamère/MCH ($1 : 1000 \mu\text{mol.L}^{-1}$) déposée par « backfilling » sur la surface d'une électrode d'or SPE ($\Phi = 4 \text{ mm}$) aux concentrations de : a) 0 mol.L^{-1} b) $3,2.10^{-14} \text{ mol.L}^{-1}$; c) $3,2.10^{-13} \text{ mol.L}^{-1}$; d) $1,28.10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$; e) $6,4.10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$; f) $3,2.10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$ et g) $3,2.10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ en D-AVP (A), L-AVP pour l'aptamère anti-AVP/MCH (B) et en D-AVP pour le « scramble »/MCH (C). Mesures effectuées à l'OCP dans une solution de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ($2.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) dans un tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$; les points d'isofréquence sont représentés par une sphère marron.

Comme il était espéré, l'ajout de la D-AVP à la surface des électrodes fonctionnalisées avec le aptamère anti-D-AVP entraîne une augmentation significative de l'impédance (Figure 97A). L'ajout de la L-AVP aux électrodes fonctionnalisées avec l'aptamère anti-D-AVP a quant à lui induit une légère diminution de l'impédance (Figure 97B), tandis qu'avec l'aptamère « scramble » on ne note pas de changement significatif à la suite de l'ajout de la D-AVP (Figure 97C).

Le Tableau 23 présente les valeurs des variations ΔZ à une fréquence de 8,33 Hz pour les différentes combinaisons aptamère/cible, avec deux électrodes testées pour chaque combinaison.

Tableau 23 : Valeurs de ΔZ obtenues à une fréquence de 8,33 Hz après ajout de D-AVP et de L-AVP à la surface d'électrodes fonctionnalisées à la monocouche aptamère/MCH et après ajout de D-AVP à la surface d'électrodes fonctionnalisées à la monocouche « scramble »/MCH par technique de « backfilling » (ratio 1:1000. Les conditions expérimentales sont identiques à celles de la Figure 97. $n = 2$.

D-AVP avec D-aptamère (mol.L⁻¹)	$\Delta Z_{8,33 \text{ Hz}}$ (Ω)	L-AVP avec D-aptamère (mol.L⁻¹)	$\Delta Z_{8,33 \text{ Hz}}$ (Ω)	D-AVP avec « scramble » (mol.L⁻¹)	$\Delta Z_{8,33 \text{ Hz}}$ (Ω)
3,2E-14	150 ± 30	3,2E-14	-160 ± 10	3,2E-14	90 ± 30
3,2E-13	300 ± 100	3,2E-13	-130 ± 30	3,2E-13	40 ± 10
1,28E-12	500 ± 300	3,2E-12	-190 ± 10	1,28E-12	20 ± 30
6,4E-12	600 ± 200	3,2E-11	-240 ± 30	6,4E-12	80 ± 30
3,2E-11	800 ± 300	-	-	3,2E-11	140 ± 40

Le paramètre $\Delta Z_{8,33 \text{ Hz}}$ augmente de 150 ± 30 Ω pour une concentration de 3,2.10⁻¹⁴ mol. L⁻¹ en D-AVP (contre -160 ± 10 Ω pour la L-AVP et 90 ± 30 Ω pour la D-AVP avec l'aptamère « scramble ») jusqu'à 800 ± 300 Ω pour une concentration de 3,2.10⁻¹¹ mol. L⁻¹ (contre -240 ± 30 Ω pour la L-AVP et 140 ± 40 Ω pour la D-AVP avec l'aptamère « scramble »).

Le nouveau biocapteur présente une zone de linéarité comprise entre 3,2.10⁻¹³ mol.L⁻¹ et 3,2.10⁻¹¹ mol.L⁻¹, avec $R^2 = 0,978$ (Figure 98.a). La reproductibilité reste faible mais ce nouvel aptacapteur permet de mesurer des concentrations 10 fois plus faibles que précédemment avec une bonne sélectivité.

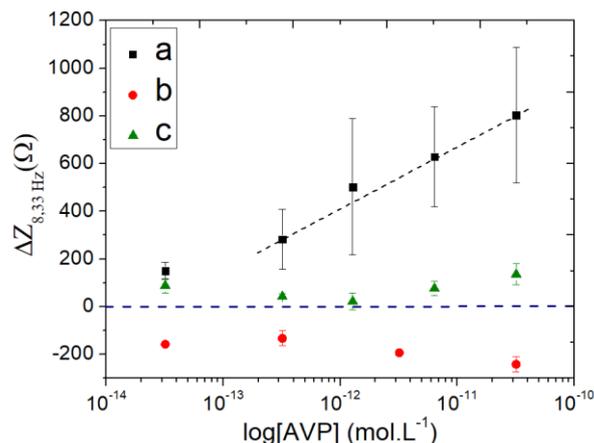


Figure 98: Courbes d'étalonnage montrant la variation du paramètre $\Delta Z_{8,33 \text{ Hz}}$ en fonction de la concentration en D-AVP (a), L-AVP (b) pour des électrodes fonctionnalisées avec la monocouche aptamère/MCH et en D-AVP pour des électrodes fonctionnalisées avec la monocouche « scramble » /MCH (c) avec la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ dans le tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹, pH = 7,4. n = 2.

Afin de pouvoir comparer ces performances à celles obtenues avec les électrodes d'or polycristallin, une normalisation du paramètre ΔZ est nécessaire.

En effet, pour tout matériau conducteur, la résistance est inversement proportionnelle à sa surface ; tel est le cas pour les électrodes. Ainsi, même dans des conditions identiques, l'impédance mesurée pour deux électrodes de surface différente n'est pas la même. Pour s'affranchir des différences liées à la surface, une normalisation de l'impédance par la surface s'impose et s'effectue en multipliant pour chaque électrode la valeur de l'impédance par sa surface correspondante. Dans le cas présent, les différents types d'électrodes utilisées n'ayant pas la même surface (12,56 mm² pour les électrodes SPE contre 3,14 mm² pour les électrodes d'or polycristallin), cette normalisation permet de comparer les performances entre ces deux types d'électrodes.

Le paramètre $\Delta Z' = \Delta Z * S$ (avec S la surface de l'électrode) est calculé et exprimé en $\Omega \cdot \text{mm}^2$. Le Tableau 24 regroupe les valeurs de la variation d'impédance normalisée $\Delta Z'$ en fonction de différentes concentrations de D-AVP ajouté à la surface des électrodes fonctionnalisées avec l'aptamère anti-AVP, pour les électrodes SPE et les électrodes polycristallin.

Tableau 24 : Valeurs de $\Delta Z'$ obtenues après ajout de D-AVP à la surface d'électrodes SPE et polycristallin fonctionnalisées à la monocouche aptamère/MCH (ratio 1:1000) en utilisant la sonde $Fe(CN)_6^{3-/4-}$.

Electrodes d'or SPE		Electrodes d'or polycristallin	
Concentration (mol.L ⁻¹)	$\Delta Z'_{8,33 \text{ Hz}}$ ($\Omega \cdot \text{mm}^2$)	Concentration (mol.L ⁻¹)	$\Delta Z'_{120 \text{ Hz}}$ ($\Omega \cdot \text{mm}^2$)
3,2E-14	1900 ± 400	3,2E-14	2900 ± 2300
3,2E-13	3500 ± 1600	3,2E-13	6900 ± 5800
1,28E-12	6300 ± 3600	3,2E-12	7900 ± 1900
6,4E-12	7900 ± 2700		
3,2E-11	10000 ± 3500	3,2E-11	7900 ± 1600

A faible concentration en D-AVP ($3,2 \cdot 10^{-14}$ mol. L⁻¹), l'aptacapteur élaboré à partir des électrodes SPE a une réponse plus faible ($1900 \pm 400 \Omega \cdot \text{mm}^2$) que celui de l'électrode d'or polycristallin ($2900 \pm 2300 \Omega \cdot \text{mm}^2$). Néanmoins, à forte concentration ($3,2 \cdot 10^{-11}$ mol.L⁻¹), le signal obtenu avec les électrodes SPE ($10000 \pm 3500 \Omega \cdot \text{mm}^2$) est légèrement supérieur à celui des électrodes d'or polycristallin ($7900 \pm 1600 \Omega \cdot \text{mm}^2$). On ne peut donc pas conclure sur une différence significative des performances entre les deux types d'électrodes. D'autre part la dispersion de la réponse avec les électrodes SPE reste assez importante avec un coefficient de variation allant jusqu'à 57%.

2.3. Performances analytiques dans les urines

Afin de tester les performances du biocapteur dans des conditions proches des conditions réelles, il a été choisi de reproduire des conditions d'analyse dans des échantillons matriciels.

Pour ce faire, des urines lyophilisées ont été reconstituées dans du tampon phosphate. Puis, des ajouts de D-AVP ont été réalisés dans l'urine reconstituée pour obtenir différentes concentrations de D-AVP en milieu complexe. Ces urines lyophilisées sont des standards fournis par le service de Biochimie du CHU de Grenoble. Avant utilisation, elles sont reconstituées dans de l'eau milli Q, centrifugées à 12000 rpm pendant 10 minutes puis filtrées à l'aide d'un filtre à cellulose 0,22 μm afin d'éliminer d'éventuelles grosses particules en suspension, en l'occurrence des cristaux.

Avant utilisation, les électrodes SPE ont été fonctionnalisées de la même manière que décrite précédemment (« backfilling » avec du MCH pour un rapport de concentration final de 1 :1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

Afin de nous assurer qu'aucun constituant des urines n'entraînerait une réponse impédancemétrique du biocapteur, nous avons dans un premier temps testé différentes dilutions d'urines préparées dans du tampon phosphate.

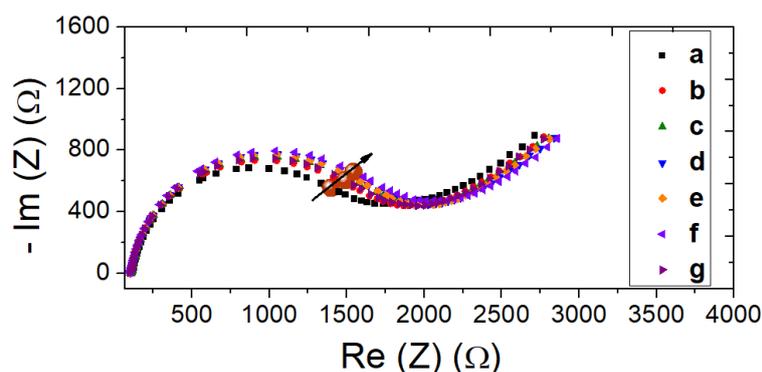


Figure 99 : Diagrammes de Nyquist des spectres obtenus pour le biocapteur à base d'une monocouche aptamère/MCH (1 :1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) déposée par « backfilling » aux concentrations de : a) 0 %, b) 5%; c) 10%; d) 25% ;e) 50% ; f) 75% et g) 100% en urines. Mesures effectuées à l'OCP dans une solution de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ($2.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) dans un tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$; les points d'isofréquence sont représentés par une sphère marron.

Comme en témoignent les diagrammes de Nyquist de la Figure 99, l'impédance ne varie que très peu après ajout de différentes dilutions d'urines. Le paramètre $\Delta Z_{8,33 \text{ Hz}}$ varie entre $200 \pm 100 \Omega$ pour 5% d'urines) et $350 \pm 80 \Omega$ pour 75% d'urines (cf. Tableau 25).

Tableau 25 : Valeurs de ΔZ obtenues à une fréquence de 8,33 Hz après ajout de différentes concentrations d'urines sans D-AVP à la surface d'électrodes fonctionnalisées à la monocouche aptamère/MCH par technique de « backfilling ». Les conditions expérimentales sont identiques à celles de la Figure 99.

Concentration en urines (%)	$\Delta Z_{8,33 \text{ Hz}} (\Omega)$
5	200 ± 100
10	200 ± 100
25	200 ± 100
50	300 ± 100
75	350 ± 80
100	290 ± 80

Ces variations, quoique non nulles, restent moins importantes que celles obtenues à l'ajout de la D-AVP dans le tampon phosphate.

Pour la suite de nos travaux, la teneur de 5% en urine dans le tampon phosphate a été retenue afin que la réponse du biocapteur soit affectée le moins possible par les constituants des urines responsables de la faible réponse non spécifique.

Le diagramme de Nyquist de la Figure 100, montre l'évolution des spectres d'impédance enregistrés en milieu complexe (5% d'urine) pour différentes concentrations de D-AVP allant de $3,2 \cdot 10^{-13} \text{ mol.L}^{-1}$ à $3,2 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$. On peut ainsi vérifier que l'aptacapteur répond à la présence de la D-AVP en milieu complexe.

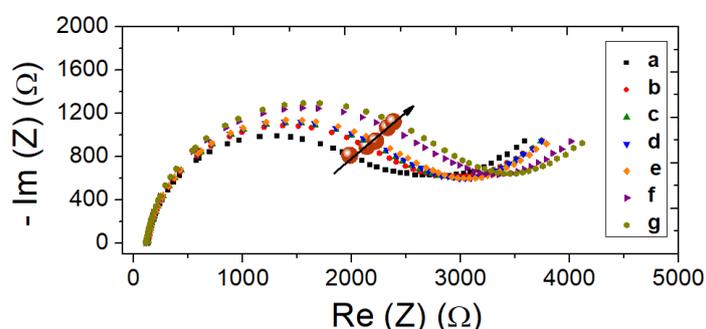


Figure 100: Diagrammes de Nyquist des spectres d'impédance obtenus pour le biocapteur à base d'une monocouche aptamère/MCH ($1 : 1000 \mu\text{mol.L}^{-1}$) déposée par « backfilling » aux concentrations de D-AVP de : a) 0 mol.L^{-1} ; b) 0 mol.L^{-1} ; c) $3,2 \cdot 10^{-13} \text{ mol.L}^{-1}$; d) $1,28 \cdot 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$; e) $6,4 \cdot 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$; f) $3,2 \cdot 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$ et g) $3,2 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ dans du tampon phosphate contenant 5% d'urine. Mesures effectuées à l'OCP dans une solution de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ($2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) dans un tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$; les points d'isofréquence sont représentés par une sphère marron.

Le Tableau 26 regroupe les valeurs moyennes de ΔZ à une fréquence de 8,33 Hz et les incertitudes sur ces valeurs pour 2 électrodes.

Tableau 26 : Valeurs de ΔZ obtenues à une fréquence de 8,33 Hz après ajout de D-AVP (préparée dans du phosphate d'urine) à la d'électrodes

Concentration en D-AVP (mol.L^{-1})	$\Delta Z_{8,33 \text{ Hz}}$ (Ω)
--	---

tampon contenant 5% surface

fonctionnalisées à la monocouche aptamère/MCH. Les conditions opératoires sont identiques à celles de la Figure 100.

0 (urine sans D-AVP)	200 ± 20
3,2E-14	230 ± 10
3,2E-13	270 ± 40
1,28E-12	330 ± 90
6,4E-12	530 ± 150
3,2E-11	600 ± 100

Pour pouvoir comparer les valeurs de ΔZ en milieu complexe et dans le tampon phosphate, les données de ces deux séries de mesures en fonction de la concentration ont été représentées sur le même graphe (cf. Figure 101). A concentrations égales de D-AVP, entre $3,2 \cdot 10^{-13} \text{ mol.L}^{-1}$ et $3,2 \cdot 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$, on voit que les valeurs sont du même ordre de grandeur, avec ou sans urine, avec des barres d'erreur qui se chevauchent. L'aptacapteur semble fonctionner en milieu complexe.

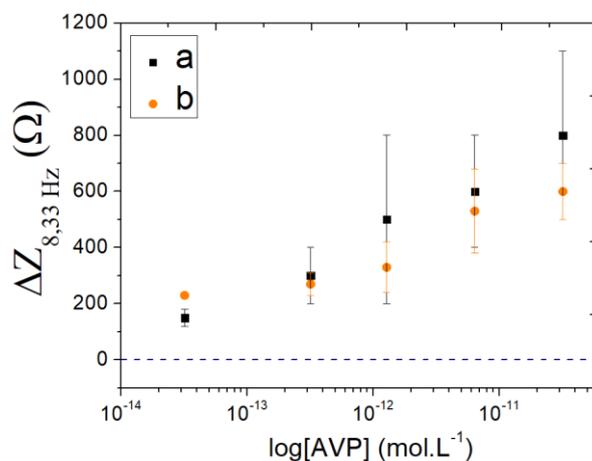


Figure 101: Courbes d'étalonnage montrant la variation du paramètre ΔZ après ajout de D-AVP (a) et L-AVP (b) à la surface d'électrodes fonctionnalisées à l'aptamère anti-AVP ; de D-AVP à la surface d'électrodes fonctionnalisées au « scramble » (c) (cibles préparées dans le tampon phosphate) et après ajout de D-AVP à la surface d'électrodes fonctionnalisées à l'aptamère anti-AVP /MCH (1 : 1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) (d) (cible préparée dans 5% d'urines). Mesures faites avec la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ dans le tampon phosphate 0,1 mol.L^{-1} , pH = 7,4. n = 2

De plus, la dispersion de la réponse entre les électrodes est relativement moins importante dans le cas du test dans les urines (un coefficient de variation maximal de 39%).

Malgré ces performances très intéressantes pour la gamme de concentration cible, cet aptacapteur pourrait être amélioré, notamment en termes de sensibilité et de reproductibilité, pour en faire un outil d'appoint pour la détection de l'AVP dans de vraies matrices biologiques plus complexes.

2.4. Optimisation de la réponse du biocapteur

Plusieurs études ont reporté l'influence du rapport de concentration aptamère/MCH sur les performances des aptacapteurs à base d'électrodes d'or [255]–[257]. Dans l'optique d'évaluer l'impact de ce paramètre sur les performances de notre biocapteur, plusieurs rapports de concentration aptamère/MCH ont été testés en modifiant les concentrations d'aptamère comme de MCH. Cette optimisation est faite en immobilisant l'aptamère anti-AVP et le MCH avec la technique de « backfilling ».

A cet effet, différentes concentrations de D-AVP ont été ajoutées à la surface d'électrodes fonctionnalisées avec différents rapports de concentration aptamère/MCH : 1:10, 1:2000, 1:4000, 0,5:1000, 0,5:2000, 2:2000, 2:4000 et 2:8000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et l'impédance a été mesurée.

La Figure 102 regroupe les huit diagrammes de Nyquist des spectres d'impédance obtenus pour ces différentes expériences.

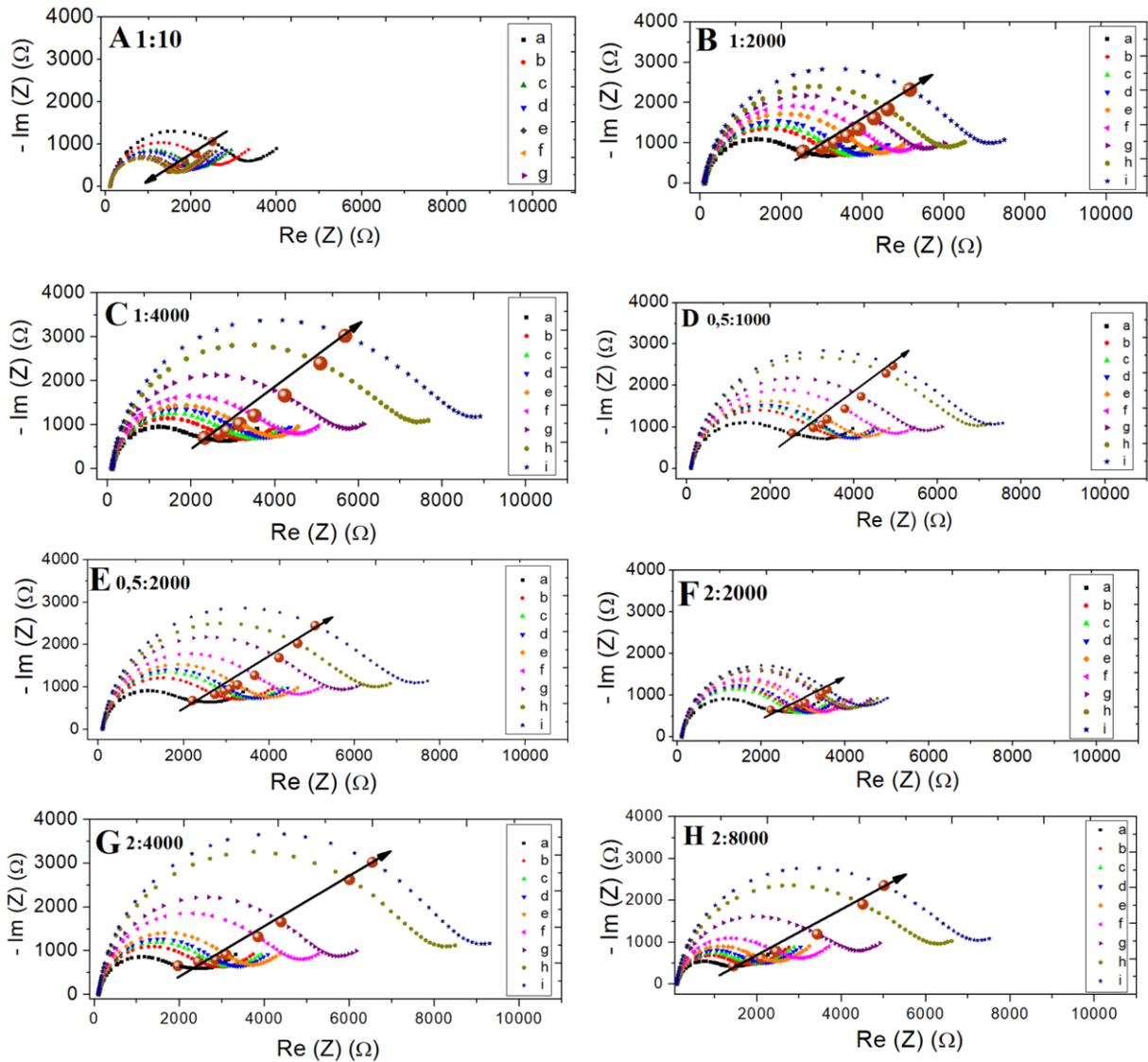


Figure 102 : Diagrammes de Nyquist des spectres obtenus pour le biocapteur à base d'une monocouche aptamère/MCH déposée par « backfilling » sur la surface d'une électrode d'or SPE ($\Phi = 4 \text{ mm}$) aux concentrations de : a) 0 mol.L^{-1} b) $3,2.10^{-14} \text{ mol.L}^{-1}$; c) $9,6.10^{-14} \text{ mol.L}^{-1}$; d) $3,2.10^{-13} \text{ mol.L}^{-1}$; e) $1,28.10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$; f) $3,2.10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$, g) $6,4.10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$, h) $3,2.10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$ et i) $3,2.10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ en D-AVP avec des rapports de concentration aptamère/MCH de 1:10 (A), 1:2000 (B), 1:4000 (C), 0,5:1000 (D), 0,5:2000 (E), 2:2000 (F), 2:4000 (G) et 2:8000 (H). Mesures effectuées à l'OCF dans une solution de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ($2.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) dans un tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$; les points d'isofréquence sont représentés par une sphère marron.

Dans un premier temps, la concentration en aptamère a été maintenue à $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et celle du MCH diminuée à $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, soit un rapport de concentration de 1:10. On peut voir que l'impédance initiale de l'aptacapteur est faible. De plus, contrairement au précédent rapport de concentration de 1:1000, un rapport de concentration de 1:10 a conduit à une diminution importante de l'impédance après ajout de concentrations croissantes en D-AVP, dû à un transfert d'électrons facilité par la présence de D-AVP (Figure 102A). Ces résultats semblent

confirmer les travaux de Herne et al. [253] sur la technique de « backfilling » avec le MCH. En effet, on peut supposer que la faible concentration en MCH n'est pas suffisante pour donner une bonne orientation aux molécules d'aptamère et favoriser la reconnaissance avec la cible. Ils pourraient s'expliquer par une réorganisation en présence de la D-AVP des aptamères qui au départ sont adsorbés à l'aide des fonctions NH_2 ; cette réorganisation conduit au redressement de l'aptamère, ce qui libèrerait la surface de l'électrode et favoriserait le transfert d'électrons à la surface de l'électrode. Un test de spécificité réalisé pour cet aptacateur a montré qu'il était non spécifique pour la détection de la D-AVP, l'ajout de l'énantiomère L aboutit aux mêmes résultats.

Les Figure 102 B et C correspondent aux diagrammes de Nyquist de réponse après ajout de la D-AVP à la surface des aptacateurs de rapport de concentration 1:2000 et 1:4000 respectivement. On peut remarquer que l'augmentation de la concentration en MCH à 2000 et 4000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ rétablit le sens de variation du signal d'impédance (augmentation) après l'ajout de D-AVP. En termes d'intensité du signal, une nette augmentation a été observée entre les nouveaux rapports de concentration et celui de 1:1000 (cf. Tableau 27). Pour une concentration en D-AVP de $3,2 \cdot 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$, le paramètre ΔZ vaut $3300 \pm 400 \Omega$ et $3600 \pm 800 \Omega$ pour respectivement les rapports de concentration de 1:2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et 1:4000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ contre $800 \pm 300 \Omega$ pour un rapport de concentration de 1:1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, soit une multiplication par 4 du signal. Il peut être noté également une nette amélioration des incertitudes de la réponse des différentes électrodes, avec des maxima de 24 et 25 % pour les rapports de concentration de 1:2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et 1:4000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivement (contre 57% pour un rapport de concentration de 1:1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). En termes d'intensité de signal, on n'observe pas de différence significative entre les rapports de concentration de 1:2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et 1:4000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Tableau 27: Valeurs de ΔZ obtenues à une fréquence de 2,38 Hz après ajout de différentes concentrations de D-AVP dans le tampon phosphate à la surface d'électrodes fonctionnalisées à la monocouche aptamère/MCH à différents rapports de concentration par technique de « backfilling ». n représente le nombre d'électrodes. Les conditions expérimentales sont identiques à celles de la figure 24.

Ratio	Concentration en D-AVP (mol.L ⁻¹)							
	3,2.10 ⁻¹⁴	9,6.10 ⁻¹⁴	3,2.10 ⁻¹³	1,28.10 ⁻¹²	3,2.10 ⁻¹²	6,4.10 ⁻¹²	3,2.10 ⁻¹¹	3,2.10 ⁻¹⁰
1:10 n = 2	80 ± 300	100 ± 100	-330 ± 10	-500 ± 200	-500 ± 100	-500 ± 300	-	-
1:2000 n = 2	430 ± 40	570 ± 80	740 ± 80	1000 ± 100	1530 ± 70	2300 ± 400	2800 ± 700	3300 ± 400
1:4000 n = 3	370 ± 10	550 ± 40	760 ± 10	1000 ± 200	1600 ± 400	2500 ± 400	3200 ± 200	3600 ± 800
0,5:1000 n = 2	400 ± 100	600 ± 200	600 ± 200	860 ± 60	1200 ± 200	1700 ± 200	2100 ± 700	2300 ± 800
0,5:2000 n = 2	530 ± 30	780 ± 10	880 ± 50	1000 ± 100	1600 ± 40	2400 ± 200	3000 ± 200	3280 ± 70
2:2000 n = 2	700 ± 400	800 ± 600	1100 ± 800	1400 ± 1000	1600 ± 1000	1600 ± 700	1700 ± 700	1700 ± 500
2:4000 n = 2	400 ± 100	600 ± 100	760 ± 20	1090 ± 80	1700 ± 300	2400 ± 300	3400 ± 1300	3800 ± 1600
2:8000 n = 2	200 ± 200	340 ± 60	470 ± 50	650 ± 80	1200 ± 200	2030 ± 60	3000 ± 500	3500 ± 700

Une autre approche dans ces étapes d'optimisation est la modification de la concentration en aptamère déposé à la surface des électrodes. Dans cette optique, la concentration en aptamère a été diminuée à 0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ avec des concentrations en MCH de 1 et 2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (soient des rapports de concentration de 0,5:1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et à 0,5:2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Les diagrammes de Nyquist correspondant à la réponse du capteur pour ces rapports de concentration sont représentés par les Figure 102 D et E pour les rapports de concentration de 0,5:1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et à 0,5:2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivement. Ils montrent une augmentation de l'impédance après ajout de D-AVP comme ce fut le cas pour les rapports de concentration 1:2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et 1:4000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Les performances sont néanmoins moins bonnes pour un rapport de concentration de aptamère/MCH de 0,5:1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (en termes d'intensité de signal et de dispersion) par rapport à un rapport de concentration de 0,5:2000 et par rapport à aux rapports de concentration de 1:2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et 1:4000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. D'autre part, aucune différence significative n'est notée entre ces deux derniers et le rapport de concentration de 0,5:2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

En termes de dispersion de la réponse entre les électrodes, l'aptacapteur assemblé avec un rapport de concentration de 0,5 :2000 est le plus performant, avec un coefficient de variation maximal de 8% (Tableau 27). On peut supposer à partir de ces observations qu'une légère

diminution de la concentration en aptamère ne semble pas impacter les performances de l'aptacapteur si on maintient une concentration relativement importante en MCH.

Une dernière approche d'optimisation des performances a été l'augmentation de la concentration en aptamère. A cet effet, les électrodes sont fonctionnalisées avec $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ d'aptamère anti-AVP. Différentes concentrations en MCH sont ensuite ajoutées après greffage de l'aptamère ; ces concentrations sont de 2, 4 et 8 mmol.L^{-1} , soient des rapports de concentration de 2:2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 2:4000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et 2:8000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivement. Les diagrammes de Nyquist obtenus montrent pour les aptacapteurs assemblés avec ces rapports de concentration (Figure 102 F, G et H pour 2 :2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 2:4000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et 2:8000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivement) également une augmentation de signal. Toutefois, ce signal pour les électrodes fonctionnalisées au rapport de concentration de 2:2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ est d'un ordre de grandeur proche de celui obtenu pour l'aptacapteur assemblé avec le rapport de concentration de 0,5 :1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, avec des dispersions plus importantes. Enfin, pour les électrodes préparées aux rapports de concentration de 2:4000 et 2:8000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, les variations de signal sont très proches de celles obtenues avec les électrodes préparées aux rapports de concentration de 0,5:2000, 1:2000 et 1:4000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

En somme, des huit aptacapteurs ainsi nouvellement assemblés, cinq ont produit des réponses très similaires en termes d'intensité de signal qui sont meilleures que celles de l'aptacapteur assemblé avec un rapport de concentration aptamère/MCH de 1:1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Les courbes d'étalonnage pour ces cinq aptacapteurs sont présentées sur la Figure 103. Il s'agit des aptacapteurs dont les électrodes ont été préparées avec des rapports de concentration aptamère/MCH de 0,5:2000 (Figure 103.b), 1:2000 (Figure 103.c), 1:4000 (Figure 103.d), 2:4000 (Figure 103.e) et 2:8000 (Figure 103.f). Ces courbes montrent un signal de réponse 4 fois plus important que celui généré par l'aptacapteur mis au point avec un rapport de concentration de 1:1000 (Figure 103.a).

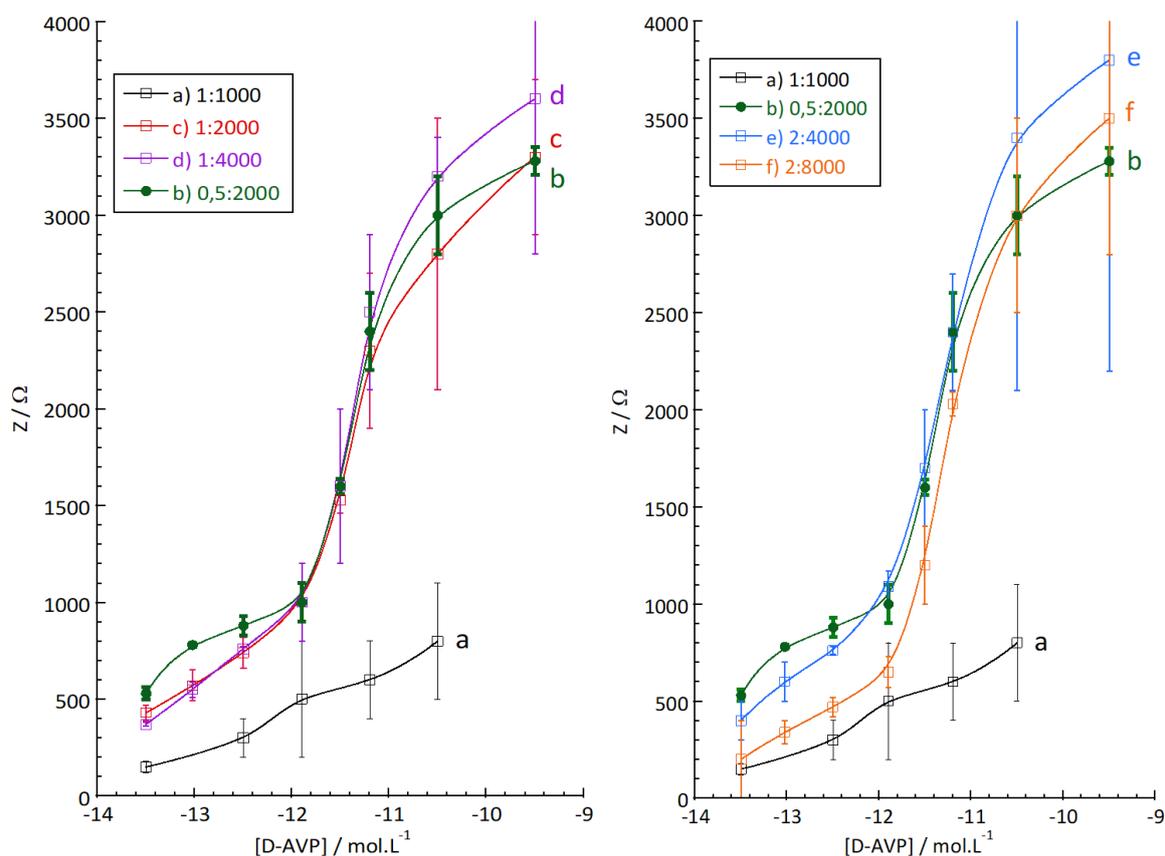


Figure 103: Courbes d'étalonnage montrant la variation du paramètre ΔZ en fonction du logarithme de la concentration en D-AVP pour des électrodes fonctionnalisées avec une monocouche aptamère/MCH par « backfilling » pour des rapports de concentration de 1:1000 (a) , 0,5:2000 (b) , 1:2000 (c), 1:4000 (d), 2:4000 (e) et 2:8000 (f) avec la sonde $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ dans le tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹, pH =7,4.

Ces résultats montrent une influence importante de la concentration en MCH sur les performances des aptacapteurs assemblés à partir d'électrode d'or et d'une monocouche aptamère/MCH. Ils viennent confirmer ceux de nombreux autres travaux sur le sujet [255] [256] [257]. Toutefois, un rapport de concentration aptamère/MCH particulier ne pourrait être généralisé comme optimal pour tous les aptacapteurs ; il conviendrait plutôt pour chaque couple aptamère/cible de trouver le rapport de concentration aptamère/MCH optimal.

De tous les capteurs que nous avons conçus, celui assemblé avec un rapport de concentration de 0,5:2000 aptamère/MCH peut être considéré, à ce stade, comme le plus performant. Il présente en effet une bonne sensibilité mais aussi la dispersion de réponse la moins importante entre les électrodes (coefficient de variation maximal de 8%, Figure 103).

Pour cet aptacapteur, nous avons mené des expériences supplémentaires afin d'en évaluer la spécificité. A cet effet, différentes électrodes ont été préparées avec des monocouches aptamère anti-AVP/MCH et « scramble »/MCH de sorte à obtenir un rapport de concentration

final de $0,5:2000 \mu\text{mol.L}^{-1}$. La L-AVP a ensuite été ajoutée à la surface des électrodes fonctionnalisées par l'aptamère anti-AVP et la D-AVP à celle des électrodes fonctionnalisées au « scramble ». La Figure 104 montre les trois diagrammes de Nyquist obtenus pour : la détection de la D-AVP à différentes concentrations sur l'aptacapteur à base d'aptamère anti-D-AVP/MCH (Figure 104A) ; l'interférence de la L-AVP à différentes concentrations sur l'aptacapteur à base d'aptamère anti-D-AVP/MCH (Figure 104B); l'interaction entre la D-AVP à différentes concentrations et l'aptacapteur à base du « scramble »/MCH (Figure 104C).

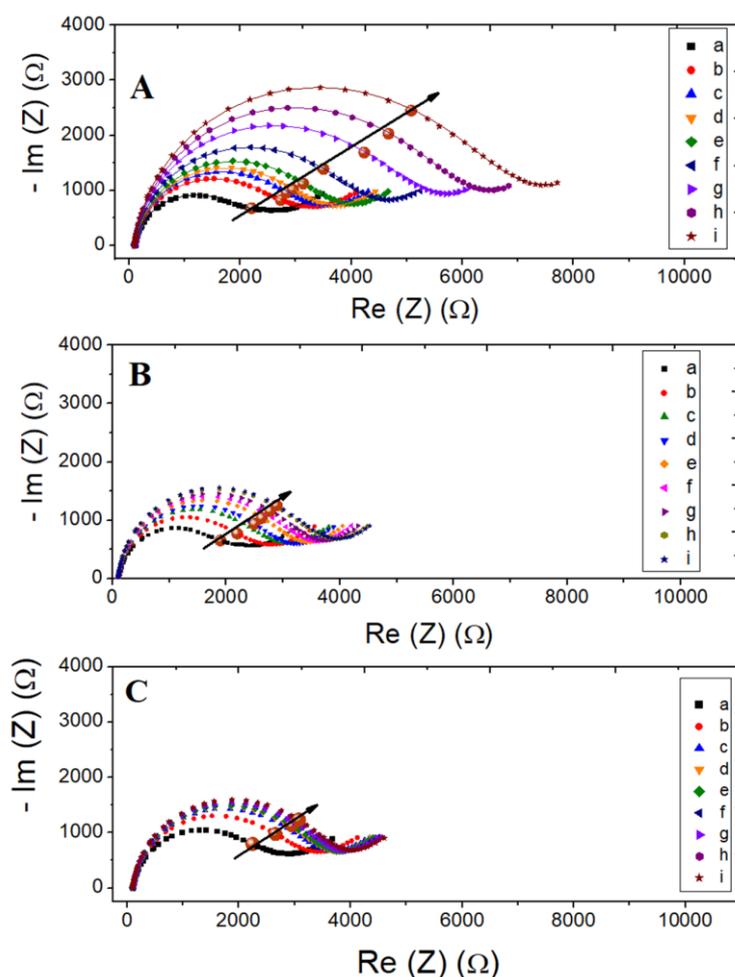


Figure 104: Diagrammes de Nyquist des spectres obtenus pour le biocapteur à base d'une monocouche aptamère/MCH ($0,5:2000 \mu\text{mol.L}^{-1}$) déposée par « backfilling » sur la surface d'une électrode d'or SPE ($\Phi = 4 \text{ mm}$) aux concentrations de : a) 0 mol.L^{-1} b) $3,2 \cdot 10^{-14} \text{ mol.L}^{-1}$; c) $9,6 \cdot 10^{-14} \text{ mol.L}^{-1}$; d) $3,2 \cdot 10^{-13} \text{ mol.L}^{-1}$; e) $1,28 \cdot 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$; f) $3,2 \cdot 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$, g) $6,4 \cdot 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$, h) $3,2 \cdot 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$ et i) $3,2 \cdot 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ en D-AVP (A), L-AVP pour l'aptamère anti-AVP/MCH (B) et en D-AVP pour le « scramble »/MCH (C) au rapport de concentration de $0,5:2000 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Les données expérimentales sont représentées par des points et les données ajustées par des lignes. Mesures effectuées à l'OCP dans une solution de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ($2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) dans un tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$; les points d'isofréquence sont représentés par une sphère marron.

On peut ainsi visualiser que la variation d'impédance en fonction de la concentration est la plus forte pour la détection de la D-AVP ; une plus faible augmentation de l'impédance est obtenue sur toute la gamme de concentration de L-AVP pour l'aptacapteur anti-D-AVP/MCH ; et enfin, une augmentation encore plus faible est obtenue pour la D-AVP avec l'aptacapteur « scramble »/MCH.

L'ajustement des spectres d'impédance de Figure 104A a été réalisé avec le circuit de Randles et les valeurs des paramètres obtenus ont été regroupées dans le Tableau 28. L'évolution de ces paramètres avec la concentration en D-AVP est aussi visible sur la Figure 105. Ainsi, on peut voir que le comportement, à première vue, est similaire à celui obtenu avec l'aptacapteur anti-D-AVP/MCH de rapport de concentration 1:1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figure 89) avec toutefois un meilleur résultat à basse concentration. En effet, même pour les concentrations inférieures à 10^{-12} mol.L^{-1} , on a une croissance de la résistance de transfert de charge et une diminution de la fréquence. Ceci indique que l'aptacapteur de rapport de concentration 0,5:2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ est plus sensible que le précédent aux faibles concentrations. Cependant, l'évolution n'est pas monotone. On distingue toujours deux domaines : un premier pour des concentrations inférieures à 10^{-12} mol.L^{-1} , un second pour des concentrations supérieures à 10^{-12} mol.L^{-1} . Pour la capacité de double couche, on n'a pas d'évolution ; la valeur reste constante comme pour le précédent aptacapteur. Et enfin, la valeur de n varie très légèrement alors qu'elle était restée constante dans le précédent capteur.

Tableau 28: Valeurs de R_{ct} , C_{dc} et n obtenues après ajout de D-AVP à la surface d'électrodes fonctionnalisées par une monocouche aptamère anti-D-AVP/MCH (ratio 0.5 :2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Les conditions expérimentales sont identiques à celles de la Figure 104.

[D-AVP] (mol.L-1) avec l'aptamère anti-AVP	R_{ct} (Ω)	C_{dc} (μF)	f° (Hz)	n
0	1180 \pm 20	3,84 \pm 0,08	35,3	0,973
$3,2 \cdot 10^{-14}$	1810 \pm 40	3,87 \pm 0,08	22,7	0,959
$9,6 \cdot 10^{-14}$	2150 \pm 40	3,87 \pm 0,08	19,2	0,951
$3,2 \cdot 10^{-13}$	2350 \pm 50	3,87 \pm 0,08	17,5	0,947
$1,28 \cdot 10^{-12}$	2600 \pm 50	3,87 \pm 0,08	15,8	0,945
$3,2 \cdot 10^{-12}$	3100 \pm 60	3,87 \pm 0,08	13,3	0,944
$6,4 \cdot 10^{-12}$	3880 \pm 80	3,87 \pm 0,08	10,6	0,941
$3,2 \cdot 10^{-11}$	4570 \pm 90	3,87 \pm 0,08	9,0	0,940
$3,2 \cdot 10^{-10}$	5300 \pm 100	3,87 \pm 0,08	7,8	0,941

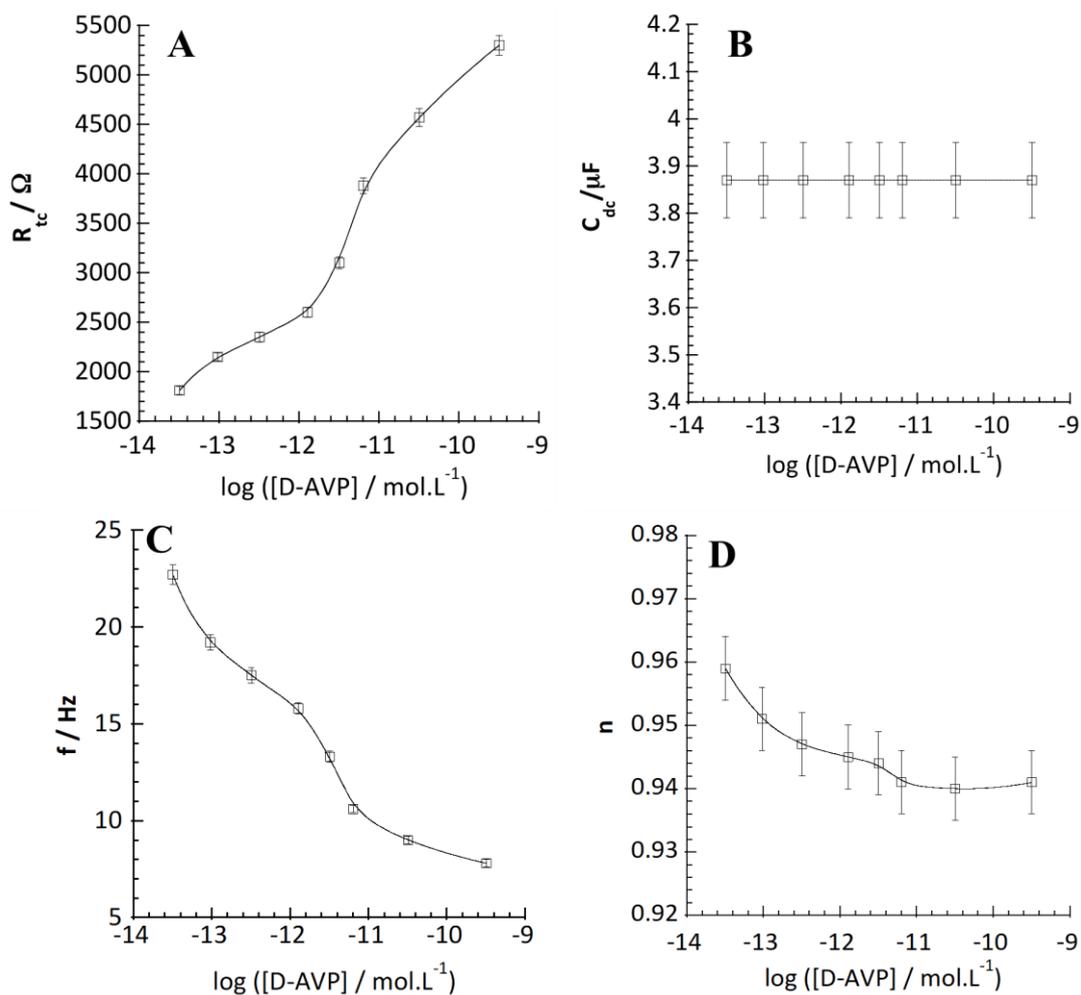


Figure 105 : Courbes montrant les variations de R_{tc} (A), C_{dc} (B), f^0 (C) et n (D) en fonction de la concentration de D-AVP à la surface d'une électrode d'or SPE fonctionnalisée avec une monocouche aptamère/MCH (0,5 :2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), obtenues après ajustement des diagrammes de Nyquist de la Figure 104.

Le Tableau 29 regroupe les valeurs de $\Delta Z_{2,38}$ Hz pour les différentes combinaisons aptamère/scramble/cible pour des aptacteurs assemblés avec une SAMs de rapport de concentration 0,5:2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Tableau 29: Valeurs de ΔZ obtenues à une fréquence de 2,38 Hz après ajout de différentes de D-AVP, L-AVP à la surface d'électrodes fonctionnalisées à la monocouche aptamère/MCH ou « scramble »/MCH avec un rapport de concentration de 0,5 :2000 par technique de « backfilling ». Les conditions expérimentales sont identiques à celles de la Figure 104.

Concentration en cible (mol.L ⁻¹)	$\Delta Z_{2,38 \text{ Hz}}$		
	D-AVP avec D- aptamère	L-AVP avec D- aptamère	D-AVP avec « scramble »
$3,2 \cdot 10^{-14}$	530 ± 30	420 ± 80	440 ± 60
$9,6 \cdot 10^{-14}$	780 ± 10	580 ± 60	740 ± 60
$3,2 \cdot 10^{-13}$	880 ± 50	690 ± 60	780 ± 40
$1,28 \cdot 10^{-12}$	1000 ± 100	860 ± 20	800 ± 100
$3,2 \cdot 10^{-12}$	1600 ± 40	960 ± 30	840 ± 60
$6,4 \cdot 10^{-12}$	2400 ± 200	1100 ± 100	880 ± 20
$3,2 \cdot 10^{-11}$	3000 ± 200	1300 ± 200	940 ± 30
$3,2 \cdot 10^{-10}$	3280 ± 70	1300 ± 200	1050 ± 60

Contrairement au rapport de concentration de 1 :1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, les signaux de réponse de la L-AVP avec l'aptamère anti-AVP et de la D-AVP avec le « scramble » (contrôles de spécificité) sont relativement importants. Ceci pourrait s'expliquer par une adsorption non spécifique plus importante de ces molécules à la surface de l'électrode. Ces expériences devraient être reprises avec les autres rapports de concentration aptamère/MCH afin d'étudier l'importance de cette adsorption en fonction de la composition de la SAM. Il serait également intéressant de déterminer la quantité d'aptamère réellement immobilisée à la surface (concentration surfacique) pour les différents rapports de concentration testés.

La Figure 106 montre des courbes d'étalonnage obtenues à partir du Tableau 29. L'aptacapteur présente une zone de linéarité relativement étroite comprise entre $1,28 \cdot 10^{-12}$ mol.L⁻¹ et $3,2 \cdot 10^{-11}$ mol.L⁻¹, avec $R^2 = 0,95$ (Figure 106.a). Un tel capteur nécessiterait une mise au point plus poussée. Cependant ces résultats sont très positifs notamment en termes de reproductibilité.

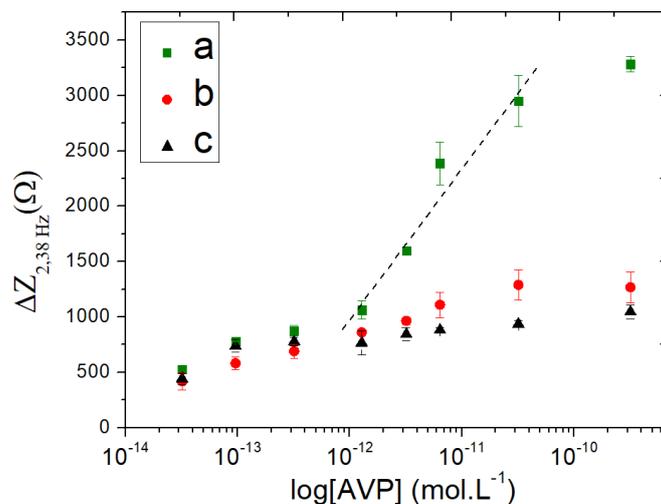


Figure 106: Courbes d'étalonnage montrant la variation du paramètre ΔZ en fonction de la concentration en D-AVP (a) ($n=2$), de L-AVP (b) ($n=3$) pour des électrodes fonctionnalisées par une monocouche aptamère/MCH et de D-AVP (c) ($n=3$) par pour des électrodes fonctionnalisées avec une monocouche « scramble »/MCH. Le rapport de concentration utilisé est 0,5:2000. Mesures faites avec la sonde $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ dans le tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹, pH =7,4.

Des expériences sur la détection de la D-AVP dans les urines n'ont malheureusement pas pu être menées, faute de matériel. En effet, n'ayant plus l'aptamère anti-AVP en stock, nous avons recommandé celui-ci. Les nouveaux lots d'aptamères anti-AVP (2 nouveaux échantillons) commandés auprès du même fournisseur n'ont pas pu être fonctionnalisés pour des raisons encore inconnues. Nous soupçonnons, un greffage inefficace des fonctions thiols sur les molécules d'aptamère pour ces nouveaux lots. L'obtention d'un lot d'aptamères anti-AVP à nouveau immobilisables sur la surface des électrodes d'or serait nécessaire pour approfondir nos travaux.

Conclusion

Ce chapitre a été consacré à la mise au point d'aptacapteurs à base de monocouches autoassemblées (SAMs) aptamère/MCH à la surface d'électrodes d'or. Une solution de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ à $2.10^{-3} \text{ mol/L}^{-1}$ dans le tampon phosphate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$ a été utilisée comme sondé électrochimique pour les mesures d'impédance. L'ajustement des données des spectres d'impédance à partir du circuit de Randles pour différents aptacapteurs a permis de mieux cerner les différents phénomènes mis en jeu à l'interface SAM/solution.

Dans un premier temps, nous avons élaboré un aptacapteur pour la détection de l'adénosine afin de pouvoir le comparer à celui élaboré à partir d'un film de polypyrrole NTA électrogénéré. Les résultats montrent pour l'aptacapteur assemblé à base d'une SAM aptamère/MCH ($1 : 1000 \mu\text{mol.L}^{-1}$) déposée par co-immobilisation sur une électrode d'or polycristallin de bien meilleures performances avec une bonne linéarité ($R^2 = 0,982$) comprise entre 10^{-14} et $10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ et une bonne spécificité, ce qui n'était pas le cas pour l'aptacapteur à base de polypyrrole NTA dont le signal de réponse n'était ni linéaire ni spécifique.

Ces résultats positifs ont permis de recourir à l'utilisation de cette technique d'immobilisation pour l'élaboration d'un aptacapteur à D-AVP. Une première difficulté, liée notamment au process de nettoyage des électrodes polycristallin ont été rencontrées. Les premiers aptacapteurs mis au point avec le nettoyage à l'alumine et à une solution de H_2SO_4 n'ont pas été fonctionnels. C'est la méthode de nettoyage par un polissage à la pâte de diamant suivi d'un nettoyage chimique dans un mélange $\text{KOH } 50 \text{ mmol.L}^{-1} + \text{H}_2\text{O}_2$ à 25% qui a permis d'obtenir de premiers résultats probants pour la détection de la D-AVP. Nous avons également montré que la technique de dépôt de la SAM aptamère/MCH par technique de « backfilling » offrait de meilleurs résultats que celle du dépôt par co-immobilisation. Néanmoins la dispersion de la réponse entre les différentes électrodes était toujours importante. Afin de réduire cette importante dispersion et de nous affranchir du process de nettoyage fastidieux des électrodes d'or polycristallin, ces dernières ont été remplacées par des électrodes d'or SPE qui sont à usage unique. Avec ces électrodes SPE, pour un même rapport de concentration aptamère/MCH de $1 : 1000 \mu\text{mol.L}^{-1}$, l'aptacapteur mis au point a montré des performances très intéressantes avec une bonne linéarité dans la gamme du picomolaire, une bonne spécificité et une meilleure reproductibilité. Le signal obtenu reste de même intensité que celui obtenu avec les électrodes d'or polycristallin. Utilisé pour le dosage de la D-AVP dans des urines à 5% dans le tampon phosphate, le capteur assemblé dans ces

conditions s'est montré également très performant en gardant la même intensité de signal que dans le tampon phosphate dépourvu d'urines, ce qui en fait un outil très intéressant pour le dosage de l'AVP dans les fluides biologiques. Une optimisation de ce capteur a cependant été effectuée en changeant la composition de la monocouche aptamère/MCH *via* un jeu de combinaisons de concentrations différentes d'aptamère et de MCH. Cette optimisation a permis de mettre en évidence plusieurs rapports de concentration aptamère/MCH dont les signaux de réponse obtenus sont quatre fois plus importants que celui de l'aptacapteur assemblé avec un rapport de concentration de 1 :1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Parmi les capteurs assemblés avec ces différents rapports, celui avec des concentrations aptamère/MCH de 0,5 :2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ a particulièrement retenu notre attention pour sa bonne sensibilité, sa bonne reproductibilité et également sa spécificité vis-à-vis de la D-AVP. N'ayant plus d'aptamère anti D-AVP en stock, nous n'avons malheureusement pas pu tester cet aptacapteur sur des échantillons d'urines ; ces expériences constitueront les prochaines étapes et permettront de compléter ces travaux.



Conclusion générale

Conclusion générale

La présente thèse a été une exploration approfondie de certaines techniques d'immobilisation de l'aptamère en vue de la conception d'un aptacapteur électrochimique destiné à la détection de l'arginine vasopressine. Ce travail de recherche a permis de mettre en lumière l'importance cruciale de la sélection de la méthode d'ancrage appropriée dans la performance globale du biocapteur. Au cours de cette étude, nous avons examiné diverses stratégies d'immobilisation, par la modification de surfaces avec des matériaux support et par la covalence. Chacune de ces approches a été évaluée en termes de sensibilité, de spécificité et de reproductibilité.

Avant la réalisation effective de ces travaux de recherche, une étude bibliographique a été menée et est présentée au premier chapitre. Cette étude relate les différentes techniques de dosage de l'arginine vasopressine, avec une mise en avant particulière des biocapteurs. Les différents éléments de reconnaissance moléculaire, leurs techniques d'immobilisation ainsi que les techniques de transduction du signal ont été détaillés dans ce chapitre. L'attention s'est ensuite portée particulièrement sur les performances des biocapteurs utilisant les aptamères afin de les comparer en fonction des techniques de transduction du signal. Il est ressorti de ce comparatif que, pour la détection de l'arginine vasopressine, les biocapteurs électrochimiques étaient les outils les plus efficaces car ils offraient la meilleure sensibilité tout en mobilisant très peu de ressources. Toutefois, peu parmi ces capteurs ont subi des contrôles de spécificité du signal.

Le deuxième chapitre a quant à lui porté sur l'élaboration de différents aptacapteurs impédancemétriques à partir d'une technique innovante qui est la modification de la surface des électrodes *via* des polymères organiques électrogénérés par chronoampérométrie.

Le premier polymère testé à cet effet est le polypyrrole NHS qui a permis l'immobilisation de l'aptamère anti-D-AVP grâce à un couplage amide entre la fonction NHS du polymère et la NH₂-terminale greffée à l'extrémité 5' de l'aptamère. Une diminution du signal a été observée après ajout de la D-AVP ; elle provient des interactions électrostatiques entre l'AVP, l'aptamère et la sonde Fe(CN)₆^{3-/4-} utilisée pour réaliser les mesures d'impédance. L'aptacapteur ainsi assemblé s'est montré très sensible avec un seuil de détection de 3,2.10⁻¹⁴ mol.L⁻¹ et également spécifique vis-à-vis de la D-AVP avec une nette différence entre le signal généré par la D-AVP et celui généré par son énantiomère L. Néanmoins, le manque de

linéarité de cet aptacapteur, probablement dû à une faible concentration surfacique d'aptamère, ne pouvait pas en faire un capteur fiable.

Le polypyrrole adamantane, offrant d'intéressantes propriétés en termes de régénération de la surface des électrodes, a été utilisé comme alternative au polypyrrole NHS. Grâce aux interactions entre les cavités de β -cyclodextrine avec l'adamantane et avec la biotine, des nanoparticules d'or modifiées à la β -cyclodextrine ont pu servir comme intermédiaire d'attachement pour les aptamères portant une fonction biotine à la surface des électrodes. Ce système d'immobilisation a conduit à un capteur non-spécifique envers la D-AVP, l'ajout de l'énantiomère L-AVP produisait des augmentations du signal impédancemétrique de même intensité. La capacité des cavités de β -cyclodextrine à inclure des acides aminés pourrait être à l'origine ce phénomène. Un tel aptacapteur nécessite des travaux supplémentaires pour trouver le moyen de bloquer ces interactions non spécifiques.

La dernière partie de ce chapitre a été consacrée à l'élaboration d'aptacapteur à partir d'un film de polypyrrole NTA. Les complexes polypyrrole NTA/ Cu^{2+} /biotine ou histidine ont été plusieurs fois utilisés avec succès au sein de l'équipe pour le développement d'aptacapteurs. Dans un premier temps, afin de limiter le plus possible les répulsions électrostatiques entre les charges négatives des carboxylates du polymère, celles de groupements phosphate de l'aptamère et celles de la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, la sonde QH_2 a été utilisée. Pour la détection de la D-AVP, cette méthode s'est montrée peu sensible mais spécifique. Pour la L-Tym, le capteur obtenu est sensible mais nécessite d'être également testé avec l'énantiomère D de la tyrosinamide afin de s'assurer de sa spécificité. Le capteur à adénosine, quant à lui, a produit des réponses totalement aléatoires. Il ressort de ces différentes expériences que la mise au point d'un aptacapteur pour chaque couple aptamère/cible nécessite une mise au point particulière.

D'autre part, comme l'on pouvait s'y attendre, l'utilisation de la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ avec le complexe polypyrrole NTA/ Cu^{2+} /aptamère anti-D-AVP a entraîné de fortes répulsions électrostatiques avec les charges négatives de la surface de l'électrode. Néanmoins, c'est avec cette combinaison que les meilleures performances ont été obtenues pour la détection de la D-AVP. En effet, ce capteur a un seuil de détection de $3,2 \cdot 10^{-14} \text{ mol.L}^{-1}$, une bonne linéarité ($R^2 = 0,999$ entre $3,2 \cdot 10^{-14}$ et $3,2 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$), une bonne sensibilité de $-7700 \pm 1150 \Omega$ par unité logarithmique et une bonne spécificité vis-à-vis de la D-AVP. Comme ce fut le cas avec le polypyrrole NHS, on peut supposer que la réponse du capteur résulte de répulsions électrostatiques auxquelles contribuent, dans le cas présent, le polypyrrole NTA, le couple

aptamère/AVP et la sonde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. Si un premier contrôle a permis d'exclure toute contribution d'interactions entre l'AVP et le polypyrrole NTA à cette réponse, les autres contrôles (utilisation d'agents bloquants, stabilité du signal sans la cible) n'ont pas suffi à apporter des éléments d'éclaircissements par rapport à ces phénomènes observés. L'expérience devrait être reconduite et de nouveaux contrôles devraient être effectués.

Enfin, le dernier chapitre a été consacré à l'élaboration d'aptacapteurs à base de monocouches autoassemblées (aptamère/MCH) à la surface d'électrodes d'or pour la détection de l'adénosine et de la D-AVP. Pour la détection de l'adénosine, l'aptacapteur mis au point s'est montré bien meilleur que celui élaboré à partir du film de polypyrrole NTA électrogénéré, avec une large gamme de linéarité ($R^2 = 0,982$) comprise entre 10^{-14} et 10^{-7} mol.L⁻¹ et une bonne spécificité. Quant à la détection de la D-AVP, un premier type d'aptacapteur assemblé avec un rapport de concentration aptamère/MCH de 1 :1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ par « backfilling » s'est montré performant sur les électrodes d'or polycristallin comme sur les électrodes d'or SPE. Néanmoins, les résultats obtenus avec les électrodes d'or SPE ont montré une meilleure reproductibilité et l'aptacapteur en résultant a pu être testé avec succès sur des urines à 5% sans perte significative du signal ; on pourrait donc envisager l'utilisation de cet aptacapteur pour la détection de l'AVP dans des fluides biologiques. Pour pousser les performances encore plus loin, l'aptacapteur a été optimisé en modifiant notamment le rapport de concentration aptamère/MCH. Au total, neuf rapports de concentration différents ont été étudiés. Avec un rapport de concentration aptamère/MCH de 0,5:2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ déposé par « backfilling », nous avons pu obtenir un aptacapteur avec un signal quatre fois plus important, une bonne spécificité vis-à-vis de la D-AVP et surtout une bonne reproductibilité. Un tel outil pourra être testé sur des matrices biologiques telles que les urines et le plasma.

En somme, les différentes approches utilisées au cours de ces travaux pour l'élaboration d'un biocapteur électrochimique pour la détection de l'AVP ont montré des performances très prometteuses. Bien que la technique de dépôt de l'aptamère *via* SAM sur des électrodes se soit montrée la plus performante, celle à base de films de polymère électrogénérés n'en est pas moins intéressante mais nécessite une mise au point plus poussée.

Enfin, en termes de performances, les aptacapteurs pour la détection de l'AVP élaborés lors de nos travaux ont montré des performances similaires et parfois meilleures que celles décrites dans la littérature, tant pour la sensibilité que pour la spécificité qui elle est rarement abordée.



Références bibliographiques



Références bibliographiques

- [1] G. Leng, *The Heart of the Brain: The Hypothalamus and Its Hormones*. MIT Press, 2018.
- [2] C. B. Saper *et al.* « The hypothalamus », *Current Biology*, vol. 24, n° 23, p. R1111-R1116, déc. 2014, doi: 10.1016/j.cub.2014.10.023.
- [3] « The Pituitary Gland and Hypothalamus | Anatomy and Physiology II ». Consulté le: 26 avril 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://courses.lumenlearning.com/suny-ap2/chapter/the-pituitary-gland-and-hypothalamus/>
- [4] *The Neurohypophysis: Structure, Function and Control*. Elsevier, 2011.
- [5] M. Glavaš *et al.* « Vasopressin and Its Analogues: From Natural Hormones to Multitasking Peptides », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, n° 6, Art. n° 6, janv. 2022, doi: 10.3390/ijms23063068.
- [6] M. O. Maybauer *et al.* « Physiology of the vasopressin receptors », *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, vol. 22, n° 2, p. 253-263, juin 2008, doi: 10.1016/j.bpa.2008.03.003.
- [7] « ADH - Hormone antidiurétique | Référentiel des examens », Eurofins Biomnis. Consulté le: 14 mai 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.eurofins-biomnis.com/en/english-news/>
- [8] J. Camps *et al.* « Radioimmunoassay for arginine-vasopressin in cold ethanol extracts of plasma. », *Clinical Chemistry*, vol. 29, n° 5, p. 882-884, mai 1983, doi: 10.1093/clinchem/29.5.882.
- [9] M. Umlauf *et al.* « Sleep disordered breathing and nocturnal polyuria: nocturia and enuresis », *Sleep Medicine Reviews*, vol. 7, n° 5, p. 403-411, oct. 2003, doi: 10.1053/smrv.2002.0273.
- [10] P. Bartsch *et al.* « Enhanced exercise-induced rise of aldosterone and vasopressin preceding mountain sickness », *Journal of Applied Physiology*, vol. 71, n° 1, p. 136-143, juill. 1991, doi: 10.1152/jappl.1991.71.1.136.
- [11] F. S. Greenspan *et al.* « Bioassay of hypophyseal growth hormone: the tibia test1 », *Endocrinology*, vol. 45, n° 5, p. 455-463, nov. 1949, doi: 10.1210/endo-45-5-455.
- [12] R. I. Dorfman, « Bioassay of Steroid Hormones », *Physiological Reviews*, janv. 1954, doi: 10.1152/physrev.1954.34.1.138.
- [13] T. Tanaka *et al.* « A New Sensitive and Specific Bioassay for Lactogenic Hormones: Measurement of Prolactin and Growth Hormone in Human Serum* », *The Journal of*

-
- Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 51, n° 5, p. 1058-1063, nov. 1980, doi: 10.1210/jcem-51-5-1058.
- [14] D. J. Chambers *et al.* « A Sensitive Bioassay of Parathyroid Hormone in Plasma », *Clinical Endocrinology*, vol. 9, n° 4, p. 375-379, 1978, doi: 10.1111/j.1365-2265.1978.tb02223.x.
- [15] J. Dekanski, « The quantitative assay of vasopressin », *Br J Pharmacol Chemother*, vol. 7, n° 4, p. 567-572, déc. 1952.
- [16] H. R. Dettelbach, « A method for assaying small amounts of antidiuretic substances with notes on some properties of vasopressin », *Am J Physiol*, vol. 192, n° 2, p. 379-386, févr. 1958, doi: 10.1152/ajplegacy.1958.192.2.379.
- [17] J. W. Czaczkes *et al.* « The Effect of Various States of Hydration and the Plasma Concentration on the Turnover of Antidiuretic Hormone in Mammals * », *J. Clin. Invest.*, vol. 43, n° 8, p. 1649-1658, août 1964, doi: 10.1172/JCI105040.
- [18] S. Yoshida *et al.* « Method for the assay of antidiuretic hormone in plasma with a note on the antidiuretic titer of human plasma », *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, vol. 62, n° 2, p. 279-285, août 1963, doi: 10.5555/uri:pii:0022214363900659.
- [19] W. E. Segar *et al.* « The regulation of antidiuretic hormone release in man: I. Effects of change in position and ambient temperature on blood ADH levels », *J Clin Invest*, vol. 47, n° 9, p. 2143-2151, sept. 1968, doi: 10.1172/JCI105900.
- [20] L. Share « Vasopressin, its bioassay and the physiological control of its release », *The American Journal of Medicine*, vol. 42, n° 5, p. 701-712, mai 1967, doi: 10.1016/0002-9343(67)90090-3.
- [21] D. S. Hage « Immunoassays », *Anal. Chem.*, vol. 67, n° 12, p. 455-462, juin 1995, doi: 10.1021/ac00108a030.
- [22] J. Wu *et al.* « Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 26, n° 7, p. 679-688, juill. 2007, doi: 10.1016/j.trac.2007.05.007.
- [23] D.-T. Huang *et al.* « Mimotope-Based Immunoassays for the Rapid Analysis of Mycotoxin: A Review », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 69, n° 40, p. 11743-11752, oct. 2021, doi: 10.1021/acs.jafc.1c04169.
- [24] E. P. Meulenberg *et al.* « Immunoassays for Pesticides », *Environ. Sci. Technol.*, vol. 29, n° 3, p. 553-561, mars 1995, doi: 10.1021/es00003a001.
-

-
- [25] S. S. Deshpande, « Immunoassay Classification and Commercial Technologies », in *Enzyme Immunoassays: From Concept to Product Development*, S. S. Deshpande, Éd., Boston, MA: Springer US, 1996, p. 231-274. doi: 10.1007/978-1-4613-1169-0_8.
- [26] T. Porstmann *et al.* « Enzyme immunoassay techniques an overview », *Journal of Immunological Methods*, vol. 150, n° 1-2, p. 5-21, juin 1992, doi: 10.1016/0022-1759(92)90061-W.
- [27] A. Jobst *et al.* « Oxytocin and vasopressin levels are decreased in the plasma of male schizophrenia patients », *Acta Neuropsychiatr.*, vol. 26, n° 6, p. 347-355, déc. 2014, doi: 10.1017/neu.2014.20.
- [28] J.-P. Gouin *et al.* « Changes in social functioning and circulating oxytocin and vasopressin following the migration to a new country », *Physiology & Behavior*, vol. 139, p. 67-72, févr. 2015, doi: 10.1016/j.physbeh.2014.11.021.
- [29] L. H. Rubin *et al.*, « Reduced Levels of Vasopressin and Reduced Behavioral Modulation of Oxytocin in Psychotic Disorders », *Schizophrenia Bulletin*, vol. 40, n° 6, p. 1374-1384, nov. 2014, doi: 10.1093/schbul/sbu027.
- [30] G. Robertson *et al.* « Immunoassay of plasma vasopressin in man », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 66, p. 1298-305, sept. 1970, doi: 10.1073/pnas.66.4.1298.
- [31] M. K. Husain *et al.* « Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma », 1973.
- [32] G. L. Robertson *et al.* « Development and Clinical Application of a New Method for the Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma », *J Clin Invest*, vol. 52, n° 9, p. 2340-2352, sept. 1973, doi: 10.1172/JCI107423.
- [33] A. Tausch *et al.* « Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Urine: Development and Application* », *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 57, n° 4, p. 777-781, oct. 1983, doi: 10.1210/jcem-57-4-777.
- [34] M. H. Kroll *et al.* « Interference with clinical laboratory analyses », *Clinical Chemistry*, vol. 40, n° 11, p. 1996-2005, nov. 1994, doi: 10.1093/clinchem/40.11.1996.
- [35] S. S. Levinson *et al.* « Towards a better understanding of heterophile (and the like) antibody interference with modern immunoassays », *Clinica Chimica Acta*, vol. 325, n° 1, p. 1-15, nov. 2002, doi: 10.1016/S0009-8981(02)00275-9.
- [36] L. J. Kricka, « Human Anti-Animal Antibody Interferences in Immunological Assays », *Clinical Chemistry*, vol. 45, n° 7, p. 942-956, juill. 1999, doi: 10.1093/clinchem/45.7.942.
-

-
- [37] A. W. Butch, « Falsely Increased Values for Rabbit Immunoglobulin-based Nephelometric Immunoassays Attributable to Human Anti-Rabbit Antibodies », *Clinical Chemistry*, vol. 46, n° 8, p. 1207-1208, août 2000, doi: 10.1093/clinchem/46.8.1207.
- [38] L. j. Wheat *et al.* « Elimination of false-positive Histoplasma antigenemia caused by human anti-rabbit antibodies in the second-generation Histoplasma antigen assay », *Transplant Infectious Disease*, vol. 8, n° 4, p. 219-221, 2006, doi: 10.1111/j.1399-3062.2006.00151.x.
- [39] L. Wang *et al.* « Human autoimmune diseases: a comprehensive update », *Journal of Internal Medicine*, vol. 278, n° 4, p. 369-395, 2015, doi: 10.1111/joim.12395.
- [40] J.-M. Anaya, « Common mechanisms of autoimmune diseases (the autoimmune tautology) », *Autoimmunity Reviews*, vol. 11, n° 11, p. 781-784, sept. 2012, doi: 10.1016/j.autrev.2012.02.002.
- [41] N. Després *et al.* « Antibody interference in thyroid assays: a potential for clinical misinformation », *Clinical Chemistry*, vol. 44, n° 3, p. 440-454, mars 1998, doi: 10.1093/clinchem/44.3.440.
- [42] A. Dasgupta *et al.* « False-Positive Troponin I in the MEIA Due to the Presence of Rheumatoid Factors in Serum: Elimination of This Interference by Using a Polyclonal Antisera Against Rheumatoid Factors », *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 112, n° 6, p. 753-756, déc. 1999, doi: 10.1093/ajcp/112.6.753.
- [43] J. F. Emerson *et al.* « Endogenous Antibody Interferences in Immunoassays », *Laboratory Medicine*, vol. 44, n° 1, p. 69-73, févr. 2013, doi: 10.1309/LMMURCFQHKSB5YEC.
- [44] A. Dasgupta *et al.*, *Accurate Results in the Clinical Laboratory: A Guide to Error Detection and Correction*. Elsevier, 2019.
- [45] G. Barbesino, « Misdiagnosis of Graves' Disease with Apparent Severe Hyperthyroidism in a Patient Taking Biotin Megadoses », *Thyroid*, vol. 26, n° 6, p. 860-863, juin 2016, doi: 10.1089/thy.2015.0664.
- [46] M. S. Elston *et al.* « Factitious Graves' Disease Due to Biotin Immunoassay Interference—A Case and Review of the Literature », *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 101, n° 9, p. 3251-3255, sept. 2016, doi: 10.1210/jc.2016-1971.

-
- [47] G. Ward *et al.* « The investigation of interferences in immunoassay », *Clinical Biochemistry*, vol. 50, n° 18, p. 1306-1311, déc. 2017, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2017.08.015.
- [48] K. Ghazal *et al.* « Hormone Immunoassay Interference: A 2021 Update », *Ann Lab Med*, vol. 42, n° 1, p. 3-23, janv. 2022, doi: 10.3343/alm.2022.42.1.3.
- [49] J. Schiettecatte *et al.* « Interferences in Immunoassays », *Advances in Immunoassay Technology*.
- [50] A. A. Ismail *et al.* « Wrong Biochemistry Results: Two Case Reports and Observational Study in 5310 Patients on Potentially Misleading Thyroid-stimulating Hormone and Gonadotropin Immunoassay Results », *Clinical Chemistry*, vol. 48, n° 11, p. 2023-2029, nov. 2002, doi: 10.1093/clinchem/48.11.2023.
- [51] G. Ellis, « Degradation of crystalline polyethylene glycol 6000 and its effect on assays for macroprolactin and other analytes », *Clinical Biochemistry*, vol. 39, n° 10, p. 1035-1040, oct. 2006, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2006.05.014.
- [52] E. P. Altova *et al.* « Mikhail S. Tsvet—pioneer of chromatography—150 years from his birth », *Struct Chem*, vol. 33, n° 1, p. 1-3, févr. 2022, doi: 10.1007/s11224-021-01804-z.
- [53] G. Burgot *et al.*, *Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques*. Lavoisier, 2011.
- [54] V. R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons, 2013.
- [55] S. N. Thomas *et al.* « Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for clinical diagnostics », *Nat Rev Methods Primers*, vol. 2, n° 1, Art. n° 1, déc. 2022, doi: 10.1038/s43586-022-00175-x.
- [56] P. J. Taylor *et al.* « Measurement of Aldosterone in Human Plasma by Semiautomated HPLC–Tandem Mass Spectrometry », *Clinical Chemistry*, vol. 55, n° 6, p. 1155-1162, juin 2009, doi: 10.1373/clinchem.2008.116004.
- [57] Y. Suhara *et al.* « Method for the Determination of Vitamin K Homologues in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry », *Anal. Chem.*, vol. 77, n° 3, p. 757-763, févr. 2005, doi: 10.1021/ac0489667.
- [58] B. R. Challa *et al.* « LC–ESI-MS/MS method for the quantification of entecavir in human plasma and its application to bioequivalence study », *Journal of*
-

-
- Chromatography B*, vol. 879, n° 11, p. 769-776, avr. 2011, doi: 10.1016/j.jchromb.2011.02.023.
- [59] P. Krumpochova *et al.*, « Amino acid analysis using chromatography–mass spectrometry: An inter platform comparison study », *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 114, p. 398-407, oct. 2015, doi: 10.1016/j.jpba.2015.06.001.
- [60] D. Zhang *et al.* « Development and validation of a highly sensitive LC–MS/MS assay for the quantification of arginine vasopressin in human plasma and urine: Application in preterm neonates and child », *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 99, p. 67-73, oct. 2014, doi: 10.1016/j.jpba.2014.07.001.
- [61] A. Thomas *et al.*, « Determination of Vasopressin and Desmopressin in urine by means of liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry for doping control purposes », *Analytica Chimica Acta*, vol. 707, n° 1, p. 107-113, nov. 2011, doi: 10.1016/j.aca.2011.09.027.
- [62] Y. Tsukazaki *et al.*, « Development of a High-Sensitivity Quantitation Method for Arginine Vasopressin by High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, and Comparison with Quantitative Values by Radioimmunoassay », *Anal Sci*, vol. 32, n° 2, p. 153-159, 2016, doi: 10.2116/analsci.32.153.
- [63] C. Seger, « Usage and limitations of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in clinical routine laboratories », *Wien Med Wochenschr*, vol. 162, n° 21-22, p. 499-504, nov. 2012, doi: 10.1007/s10354-012-0147-3.
- [64] K. Cammann, « Bio-Sensors based on ion-selective electrodes », *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, vol. 287, p. 1-9, mars 1977, doi: 10.1007/BF00539519.
- [65] A. Turner *et al.*, *Biosensors : Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, 1987. Consulté le: 16 mai 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:liu:diva-92007>
- [66] D. Thévenot *et al.* « Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 16, p. 121-131, janv. 2001, doi: 10.1081/AL-100103209.
- [67] P. Mehrotra, « Biosensors and their applications – A review », *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, vol. 6, n° 2, p. 153-159, mai 2016, doi: 10.1016/j.jobcr.2015.12.002.
- [68] M. Zourob, *Recognition Receptors in Biosensors*. 2010. doi: 10.1007/978-1-4419-0919-0.
-

-
- [69] N. Bhalla *et al.* « Introduction to biosensors », *Essays Biochem*, vol. 60, n° 1, p. 1-8, juin 2016, doi: 10.1042/EBC20150001.
- [70] K. Kaastrup *et al.* « Impact of Dissociation Constant on the Detection Sensitivity of Polymerization-Based Signal Amplification Reactions », *Anal. Chem.*, vol. 85, n° 17, p. 8055-8060, sept. 2013, doi: 10.1021/ac4018988.
- [71] B. B. Kim *et al.* « Evaluation of dissociation constants of antigen-antibody complexes by ELISA », *Journal of Immunological Methods*, vol. 131, n° 2, p. 213-222, août 1990, doi: 10.1016/0022-1759(90)90192-X.
- [72] C. Massart, « Glossaire », in *Glossaire*, EDP Sciences, 2009, p. 255-260. doi: 10.1051/978-2-7598-0902-8.c011.
- [73] W. C. Hanly *et al.* « Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry », *ILAR Journal*, vol. 37, n° 3, p. 93-118, janv. 1995, doi: 10.1093/ilar.37.3.93.
- [74] K. Kramer *et al.* « Antibodies for Biosensors », in *Ultrathin Electrochemical Chemo- and Biosensors: Technology and Performance*, V. M. Mirsky, Éd., in Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors. Berlin, Heidelberg: Springer, 2004, p. 3-22. doi: 10.1007/978-3-662-05204-4_1.
- [75] I. icherednychenko@rapidnovor.com, « Monoclonal vs Polyclonal Antibody Drugs », Rapid Novor. Consulté le: 22 mai 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.rapidnovor.com/monoclonal-vs-polyclonal-antibody-drugs/>
- [76] G. Köhler *et al.* « Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity », *Nature*, vol. 256, n° 5517, Art. n° 5517, août 1975, doi: 10.1038/256495a0.
- [77] A. Frenzel *et al.* « Expression of Recombinant Antibodies », *Frontiers in Immunology*, vol. 4, 2013, Consulté le: 23 mai 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2013.00217>
- [78] A. K. Trilling *et al.* « Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview », *Analyst*, vol. 138, n° 6, p. 1619-1627, 2013, doi: 10.1039/C2AN36787D.
- [79] B. Lu *et al.* « Tutorial review. Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors », *Analyst*, vol. 121, n° 3, p. 29R-32R, 1996, doi: 10.1039/AN996210029R.
- [80] Y. Saylan *et al.* « Molecularly Imprinted Polymer Based Sensors for Medical Applications », *Sensors*, vol. 19, n° 6, Art. n° 6, janv. 2019, doi: 10.3390/s19061279.

-
- [81] V. M. Mirsky, *Ultrathin Electrochemical Chemo- and Biosensors: Technology and Performance*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [82] Z. El-Schich *et al.*, « Molecularly imprinted polymers in biological applications », *Biotechniques*, vol. 69, n° 6, p. 406-419, déc. 2020, doi: 10.2144/btn-2020-0091.
- [83] J. W. Lowdon *et al.*, « MIPs for commercial application in low-cost sensors and assays – An overview of the current status quo », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 325, p. 128973, déc. 2020, doi: 10.1016/j.snb.2020.128973.
- [84] C. Baggiani *et al.* « MIP-based immunoassays: State of the Art, limitations and Perspectives », *Molecular Imprinting*, vol. 1, n° 2013, p. 41-54, août 2013, doi: 10.2478/molim-2013-0002.
- [85] B. Guan *et al.* « <p>Aptamers as Versatile Ligands for Biomedical and Pharmaceutical Applications</p> », *IJN*, vol. 15, p. 1059-1071, févr. 2020, doi: 10.2147/IJN.S237544.
- [86] K.-M. Song *et al.* « Aptamers and Their Biological Applications », *Sensors (Basel, Switzerland)*, vol. 12, p. 612-31, déc. 2012, doi: 10.3390/s120100612.
- [87] B. Chovelon, « Utilisation des aptamères pour le dosage de petites molécules d'intérêt biologique », 21 décembre 2018. [En ligne]. Disponible sur: <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01435343>
- [88] L. Chaloin *et al.* « Endogenous expression of a high-affinity pseudoknot RNA aptamer suppresses replication of HIV-1 », *Nucleic Acids Research*, vol. 30, n° 18, p. 4001-4008, sept. 2002, doi: 10.1093/nar/gkf522.
- [89] T. Simonsson, « G-Quadruplex DNA Structures Variations on a Theme », vol. 382, n° 4, p. 621-628, avr. 2001, doi: 10.1515/BC.2001.073.
- [90] W. James, « Aptamers in the virologists' toolkit », *Journal of General Virology*, vol. 88, n° 2, p. 351-364, 2007, doi: 10.1099/vir.0.82442-0.
- [91] K. Sefah *et al.* « Development of DNA aptamers using Cell-SELEX », *Nat Protoc*, vol. 5, n° 6, Art. n° 6, juin 2010, doi: 10.1038/nprot.2010.66.
- [92] K.-M. Song *et al.* « Aptamers and Their Biological Applications », *Sensors*, vol. 12, n° 1, Art. n° 1, janv. 2012, doi: 10.3390/s120100612.
- [93] S. D. Mendonsa *et al.* « In Vitro Selection of High-Affinity DNA Ligands for Human IgE Using Capillary Electrophoresis », *Anal. Chem.*, vol. 76, n° 18, p. 5387-5392, sept. 2004, doi: 10.1021/ac049857v.
- [94] E. Vianini *et al.* « In vitro selection of DNA aptamers that bind l-tyrosinamide », *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 9, n° 10, p. 2543-2548, oct. 2001, doi: 10.1016/S0968-0896(01)00054-2.
-

-
- [95] J. C. Cox *et al.* « Automated selection of anti-Protein aptamers », *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 9, n° 10, p. 2525-2531, oct. 2001, doi: 10.1016/S0968-0896(01)00028-1.
- [96] « SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands », *Biomolecular Engineering*, vol. 24, n° 4, p. 381-403, oct. 2007, doi: 10.1016/j.bioeng.2007.06.001.
- [97] F. Söylemez *et al.* « Aptamers and Possible Effects on Neurodegeneration », in *Neuroprotection - New Approaches and Prospects*, IntechOpen, 2019. doi: 10.5772/intechopen.89621.
- [98] K. A. Marshall *et al.* « [14] In vitro selection of RNA aptamers », in *Methods in Enzymology*, vol. 318, in RNA-Ligand Interactions Part B, vol. 318. , Academic Press, 2000, p. 193-214. doi: 10.1016/S0076-6879(00)18053-X.
- [99] M. Blind *et al.* « Aptamer Selection Technology and Recent Advances », *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, vol. 4, p. e223, 2015, doi: 10.1038/mtna.2014.74.
- [100] R. Thevendran *et al.* « Assays to Estimate the Binding Affinity of Aptamers », *Talanta*, vol. 238, p. 122971, févr. 2022, doi: 10.1016/j.talanta.2021.122971.
- [101] H. Sun *et al.* « Oligonucleotide Aptamers: New Tools for Targeted Cancer Therapy », *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, vol. 3, p. e182, janv. 2014, doi: 10.1038/mtna.2014.32.
- [102] C. A. Dougherty *et al.* « Applications of Aptamers in Targeted Imaging: State of the Art », *Curr Top Med Chem*, vol. 15, n° 12, p. 1138-1152, 2015.
- [103] S. Liu *et al.* « Translation of aptamers toward clinical diagnosis and commercialization », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 208, p. 114168, juill. 2022, doi: 10.1016/j.bios.2022.114168.
- [104] F. He *et al.*, « Aptamer-Based Targeted Drug Delivery Systems: Current Potential and Challenges », *Curr Med Chem*, vol. 27, n° 13, p. 2189-2219, 2020, doi: 10.2174/0929867325666181008142831.
- [105] Y. Ning *et al.* « Aptamers used for biosensors and targeted therapy », *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 132, p. 110902, déc. 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110902.
- [106] C. K. O'Sullivan « Aptasensors – the future of biosensing? », *Anal Bioanal Chem*, vol. 372, n° 1, p. 44-48, janv. 2002, doi: 10.1007/s00216-001-1189-3.
- [107] G. Durand *et al.* « Riboswitches Based on Kissing Complexes for the Detection of Small Ligands », *Angewandte Chemie*, vol. 126, n° 27, p. 7062-7065, 2014, doi: 10.1002/ange.201400402.
-

-
- [108] E. Goux *et al.*, « A colorimetric nanosensor based on a selective target-responsive aptamer kissing complex », *Nanoscale*, vol. 9, n° 12, p. 4048-4052, 2017, doi: 10.1039/C7NR00612H.
- [109] Y. Takeuchi *et al.*, « Single-molecule observations of RNA–RNA kissing interactions in a DNA nanostructure », *Biomaterials Science*, vol. 4, n° 1, p. 130-135, 2016, doi: 10.1039/C5BM00274E.
- [110] L. Azéma *et al.*, « Triggering nucleic acid nanostructure assembly by conditional kissing interactions », *Nucleic Acids Research*, vol. 46, n° 3, p. 1052-1058, févr. 2018, doi: 10.1093/nar/gkx1267.
- [111] M. M. Mhlanga *et al.* « Using tRNA-linked molecular beacons to image cytoplasmic mRNAs in live cells », *Nat Protoc*, vol. 1, n° 3, Art. n° 3, août 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.242.
- [112] G. Durand *et al.*, « A combinatorial approach to the repertoire of RNA kissing motifs; towards multiplex detection by switching hairpin aptamers », *Nucleic Acids Research*, vol. 44, n° 9, p. 4450-4459, mai 2016, doi: 10.1093/nar/gkw206.
- [113] R. Yamamoto *et al.* « Molecular beacon aptamer fluoresces in the presence of Tat protein of HIV-1 », *Genes to Cells*, vol. 5, n° 5, p. 389-396, 2000, doi: 10.1046/j.1365-2443.2000.00331.x.
- [114] A. Chen *et al.* « Split aptamers and their applications in sandwich aptasensors », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 80, p. 581-593, juin 2016, doi: 10.1016/j.trac.2016.04.006.
- [115] M. Naseri *et al.* « The Use of Aptamers and Molecularly Imprinted Polymers in Biosensors for Environmental Monitoring: A Tale of Two Receptors », *Chemosensors*, vol. 8, mai 2020, doi: 10.3390/chemosensors8020032.
- [116] L. C. Clark *et al.* « Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery », *Ann N Y Acad Sci*, vol. 102, p. 29-45, oct. 1962, doi: 10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.
- [117] J. Zhai *et al.* « DNA based biosensors », *Biotechnol Adv*, vol. 15, n° 1, p. 43-58, 1997, doi:
- [118] A. Kowalczyk, « Trends and perspectives in DNA biosensors as diagnostic devices », *Current Opinion in Electrochemistry*, vol. 23, p. 36-41, oct. 2020, doi: 10.1016/j.coelec.2020.03.003.

-
- [119] J. P. Chambers *et al.* « Biosensor recognition elements », *Curr Issues Mol Biol*, vol. 10, n° 1-2, p. 1-12, 2008.
- [120] C. Xi, M. Balberg *et al.* « Use of DNA and Peptide Nucleic Acid Molecular Beacons for Detection and Quantification of rRNA in Solution and in Whole Cells », *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, n° 9, p. 5673-5678, sept. 2003, doi: 10.1128/AEM.69.9.5673-5678.2003.
- [121] C. Xi *et al.* « Evaluation of Microfluidic Biosensor Development Using Microscopic Analysis of Molecular Beacon Hybridization Kinetics », *Biomed Microdevices*, vol. 7, n° 1, p. 7-12, mars 2005, doi: 10.1007/s10544-005-6166-8.
- [122] B. D. Malhotra *et al.* « Nanomaterials in Biosensors », *Nanomaterials for Biosensors*, p. 1-74, 2018, doi: 10.1016/B978-0-323-44923-6.00001-7.
- [123] Q. Palomar, « Intégration de matériaux nanostructurés dans la conception et la réalisation de biocapteurs sans marquage pour la détection de cibles d'intérêt », phdthesis, Université Grenoble Alpes, 2017. Consulté le: 30 mai 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://theses.hal.science/tel-01715215>
- [124] C. Rosano *et al.* « The X-ray three-dimensional structure of avidin », *Biomolecular Engineering*, vol. 16, n° 1, p. 5-12, déc. 1999, doi: 10.1016/S1050-3862(99)00047-9.
- [125] S. Cosnier *et al.* « Electrosynthesized polymers for biosensing », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, n° 5, p. 2146-2156, avr. 2011, doi: 10.1039/C0CS00090F.
- [126] J. Davis *et al.* « Spectroscopic Evaluation of Protein Affinity Binding at Polymeric Biosensor Films », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 121, n° 17, p. 4302-4303, mai 1999, doi: 10.1021/ja984467+.
- [127] L. M. Lechuga, « Chapter 5 Optical biosensors », in *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. 44, in *Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques*, vol. 44. , Elsevier, 2005, p. 209-250. doi: 10.1016/S0166-526X(05)44005-2.
- [128] P. W. Walton *et al.* « Gravimetric biosensors based on acoustic waves in thin polymer films », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 8, n° 9, p. 401-407, janv. 1993, doi: 10.1016/0956-5663(93)80024-J.
- [129] P. Mishra *et al.* *Biosensors in Food Safety and Quality: Fundamentals and Applications*, 1^{re} éd. Boca Raton: CRC Press, 2022. doi: 10.1201/9780429259890.
- [130] A. Chaubey *et al.* « Mediated biosensors », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 17, n° 6, p. 441-456, juin 2002, doi: 10.1016/S0956-5663(01)00313-X.
-

-
- [131] D. R. Thevenot *et al.* « Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification », *Pure and Applied Chemistry*, vol. 71, n° 12, p. 2333-2348, janv. 1999, doi: 10.1351/pac199971122333.
- [132] N. Elgrishi *et al.* « A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry », *J. Chem. Educ.*, vol. 95, n° 2, p. 197-206, févr. 2018, doi: 10.1021/acs.jchemed.7b00361.
- [133] F. Scholz, « Voltammetric techniques of analysis: the essentials », *ChemTexts*, vol. 1, n° 4, p. 17, sept. 2015, doi: 10.1007/s40828-015-0016-y.
- [134] F. Van den Brink, « Microreactor for electrochemical conversion in drug screening and proteomics », 2016. doi: 10.3990/1.9789036541459.
- [135] B. Jean-Louis, *Méthodes électrochimiques d'analyse*. Lavoisier, 2012.
- [136] C. Tan *et al.* « Recent Advances in In Vivo Neurochemical Monitoring », *Micromachines*, vol. 12, n° 2, Art. n° 2, févr. 2021, doi: 10.3390/mi12020208.
- [137] A. A. Karyakin *et al.* « A High-Sensitive Glucose Amperometric Biosensor Based on Prussian Blue Modified Electrodes », *Analytical Letters*, vol. 27, n° 15, p. 2861-2869, déc. 1994, doi: 10.1080/00032719408000297.
- [138] H. Hou *et al.*, « Single-atom electrocatalysis: a new approach to in vivo electrochemical biosensing », *Sci. China Chem.*, vol. 62, n° 12, p. 1720-1724, déc. 2019, doi: 10.1007/s11426-019-9605-0.
- [139] V. Scognamiglio, « Nanotechnology in glucose monitoring: Advances and challenges in the last 10 years », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 47, p. 12-25, sept. 2013, doi: 10.1016/j.bios.2013.02.043.
- [140] S. Vaddiraju *et al.* « Emerging synergy between nanotechnology and implantable biosensors: A review », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 25, n° 7, p. 1553-1565, mars 2010, doi: 10.1016/j.bios.2009.12.001.
- [141] « Cyclic Voltammetry Basic Principles, Theory & Setup », Ossila. Consulté le: 4 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ossila.com/en-eu/pages/cyclic-voltammetry>
- [142] A. J. Bard *et al.* White, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, 2022.
- [143] J.-M. Savéant, *Elements of Molecular and Biomolecular Electrochemistry: An Electrochemical Approach to Electron Transfer Chemistry*. John Wiley & Sons, 2006.
- [144] H. Wang *et al.*, « Redox Flow Batteries: How to Determine Electrochemical Kinetic Parameters », *ACS Nano*, vol. 14, n° 3, p. 2575-2584, mars 2020, doi: 10.1021/acsnano.0c01281.
-

-
- [145] M. Alijanianzadeh *et al.* « Detection of methamphetamine using aptamer-based biosensor chip and cyclic voltammetry technique », *Journal of the Indian Chemical Society*, vol. 98, n° 11, p. 100189, nov. 2021, doi: 10.1016/j.jics.2021.100189.
- [146] J. Ding *et al.* « Recent advances in potentiometric biosensors », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 124, p. 115803, mars 2020, doi: 10.1016/j.trac.2019.115803.
- [147] J. H. Park *et al.* « Open Circuit (Mixed) Potential Changes Upon Contact Between Different Inert Electrodes–Size and Kinetic Effects », *Anal. Chem.*, vol. 85, n° 2, p. 964-970, janv. 2013, doi: 10.1021/ac3025976.
- [148] N. L. Walker *et al.* « Recent advances in potentiometric biosensing », *Current Opinion in Electrochemistry*, vol. 28, p. 100735, août 2021, doi: 10.1016/j.coelec.2021.100735.
- [149] M. A. Al-Ghobashy *et al.* « Label-Free Potentiometric Ion Flux Immunosensor for Determination of Recombinant Human Myelin Basic Protein: Application to Downstream Purification from Transgenic Milk », *ACS Sens.*, vol. 4, n° 2, p. 413-420, févr. 2019, doi: 10.1021/acssensors.8b01315.
- [150] J. Ding *et al.* « Sequential and Selective Detection of Two Molecules with a Single Solid-Contact Chronopotentiometric Ion-Selective Electrode », *Anal. Chem.*, vol. 90, n° 3, p. 1734-1739, févr. 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.7b03522.
- [151] E. Lv *et al.* « Potentiometric Detection of *Listeria monocytogenes* via a Short Antimicrobial Peptide Pair-Based Sandwich Assay », *Anal. Chem.*, vol. 90, n° 22, p. 13600-13606, nov. 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.8b03809.
- [152] E. Lv *et al.* « Potentiometric aptasensing of small molecules based on surface charge change », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 259, p. 463-466, avr. 2018, doi: 10.1016/j.snb.2017.12.067.
- [153] Y. Liu *et al.* « Thin-Layer Potentiometry for Creatinine Detection in Undiluted Human Urine Using Ion-Exchange Membranes as Barriers for Charged Interferences », *Anal. Chem.*, vol. 92, n° 4, p. 3315-3323, févr. 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.9b05231.
- [154] J. R. Macdonald, « Impedance spectroscopy », *Ann Biomed Eng*, vol. 20, n° 3, p. 289-305, mai 1992, doi: 10.1007/BF02368532.
- [155] R. A. Dorledo *et al.* « Faradaic and non-faradaic electrochemical impedance spectroscopy as transduction techniques for sensing applications », *IJBSE*, vol. 5, n° 1, févr. 2019, doi: 10.15406/ijbsbe.2019.05.00148.
- [156] F. Giroud, « Biomatériaux d'électrode appliqués à la réalisation et à la caractérisation d'un biocapteur immunologique et de biopiles enzymatiques », These de doctorat, Grenoble,
-

2011. Consulté le: 8 janvier 2024. [En ligne]. Disponible sur:

<https://www.theses.fr/2011GRENI048>

- [157] A. Ch. Lazanas *et al.* « Electrochemical Impedance Spectroscopy—A Tutorial », *ACS Meas. Sci. Au*, p. acsmeasuresciau.2c00070, mars 2023, doi: 10.1021/acsmeasuresciau.2c00070.
- [158] N. Pfeiffer *et al.* « Impact of normalization, standardization and pre-fit on the success rate of fitting in electrochemical impedance spectroscopy », *Current Directions in Biomedical Engineering*, vol. 7, p. 492-495, oct. 2021, doi: 10.1515/cdbme-2021-2125.
- [159] H. S. Magar *et al.* « Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): Principles, Construction, and Biosensing Applications », *Sensors*, vol. 21, n° 19, Art. n° 19, janv. 2021, doi: 10.3390/s21196578.
- [160] J. Sun *et al.* « Unique Constant Phase Element Behavior of the Electrolyte–Graphene Interface », *Nanomaterials*, vol. 9, n° 7, Art. n° 7, juill. 2019, doi: 10.3390/nano9070923.
- [161] J. R. Macdonald *et al.* *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*. John Wiley & Sons, 2018.
- [162] J. Ren *et al.* « Colorimetric Enantio-recognition of Oligopeptide and Logic Gate Construction Based on DNA Aptamer–Ligand–Gold Nanoparticle Interactions », *Chemistry – A European Journal*, vol. 19, n° 2, p. 479-483, janv. 2013, doi: 10.1002/chem.201202430.
- [163] B. Chovelon *et al.*, « Nile blue as reporter dye in salt aggregation based-colorimetric aptasensors for peptide, small molecule and metal ion detection », *Analytica Chimica Acta*, vol. 1243, p. 340840, févr. 2023, doi: 10.1016/j.aca.2023.340840.
- [164] J. Ren *et al.* « Enantioselective and label-free detection of oligopeptide via fluorescent indicator displacement », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 35, n° 1, p. 401-406, mai 2012, doi: 10.1016/j.bios.2012.03.028.
- [165] C.-H. Lu *et al.* « Amplified optical aptasensors through the endonuclease-stimulated regeneration of the analyte », *Chem. Sci.*, vol. 3, n° 8, p. 2616, 2012, doi: 10.1039/c2sc20426f.
- [166] Y. Liu *et al.* « Fluorescence anisotropy assay for D -vasopressin with a tetramethylrhodamine-labeled aptamer », *Anal. Methods*, vol. 8, n° 11, p. 2383-2390, 2016, doi: 10.1039/C6AY00315J.

-
- [167] B. Chovelon *et al.* « Mirror-image aptamer kissing complex for arginine-vasopressin sensing », *Analytica Chimica Acta*, vol. 1001, p. 143-150, févr. 2018, doi: 10.1016/j.aca.2017.11.043.
- [168] S. Li *et al.*, « A General Chemiluminescence Strategy for Measuring Aptamer–Target Binding and Target Concentration », *Anal. Chem.*, vol. 86, n° 11, p. 5559-5566, juin 2014, doi: 10.1021/ac501061c.
- [169] J. Yang *et al.* « Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Based Quantitative Bioassay on Aptamer-Functionalized Nanopillars Using Large-Area Raman Mapping », vol. 7, n° 6, 2013.
- [170] Y. S. Huh *et al.* « Aptamer based surface enhanced Raman scattering detection of vasopressin using multilayer nanotube arrays », *Biosens Bioelectron*, vol. 25, n° 5, p. 1240, janv. 2010, doi: 10.1016/j.bios.2009.09.040.
- [171] P. He *et al.* « Label-free electrochemical monitoring of vasopressin in aptamer-based microfluidic biosensors », *Analytica Chimica Acta*, vol. 759, p. 74-80, janv. 2013, doi: 10.1016/j.aca.2012.10.038.
- [172] H. Qin *et al.* « An electrochemical aptasensor for chiral peptide detection using layer-by-layer assembly of polyelectrolyte-methylene blue/polyelectrolyte-graphene multilayer », *Analytica Chimica Acta*, vol. 712, p. 127-131, janv. 2012, doi: 10.1016/j.aca.2011.10.044.
- [173] Y. Du *et al.* « Target-induced conjunction of split aptamer as new chiral selector for oligopeptide on graphene–mesoporous silica–gold nanoparticle hybrids modified sensing platform », *Chem. Commun.*, vol. 48, n° 6, p. 799-801, 2012, doi: 10.1039/C1CC15303J.
- [174] R. S. Selvarajan *et al.* « Ultrasensitive and Highly Selective Graphene-Based Field-Effect Transistor Biosensor for Anti-Diuretic Hormone Detection », *Sensors*, vol. 20, n° 9, p. 2642, mai 2020, doi: 10.3390/s20092642.
- [175] J. Yang *et al.* « A microfluidic aptasensor integrating specific enrichment with a graphene nanosensor for label-free detection of small biomolecules », in *2015 28th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)*, janv. 2015, p. 569-572. doi: 10.1109/MEMSYS.2015.7051019.
- [176] J. Baur *et al.* « Immobilization of biotinylated biomolecules onto electropolymerized poly(pyrrole-nitrilotriacetic acid)–Cu²⁺ film », *Electrochemistry Communications*, vol. 12, n° 10, p. 1287-1290, oct. 2010, doi: 10.1016/j.elecom.2010.07.001.
-

-
- [177] S. Cosnier *et al.* « A Biotinylated Conducting Polypyrrole for the Spatially Controlled Construction of an Amperometric Biosensor », *Anal. Chem.*, vol. 71, n° 17, p. 3692-3697, sept. 1999, doi: 10.1021/ac9901788.
- [178] Q. Palomar *et al.* « Controlled carbon nanotube layers for impedimetric immunosensors: High performance label free detection and quantification of anti-cholera toxin antibody », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 97, p. 177-183, nov. 2017, doi: 10.1016/j.bios.2017.05.052.
- [179] J. Baur *et al.* « Label-Free Femtomolar Detection of Target DNA by Impedimetric DNA Sensor Based on Poly(pyrrole-nitrilotriacetic acid) Film », *Anal. Chem.*, vol. 82, n° 3, p. 1066-1072, févr. 2010, doi: 10.1021/ac9024329.
- [180] H. Xu *et al.*, « Label-free impedimetric thrombin sensor based on poly(pyrrole-nitrilotriacetic acid)-aptamer film », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 41, p. 90-95, mars 2013, doi: 10.1016/j.bios.2012.07.044.
- [181] F. Haddache *et al.*, « A label-free photoelectrochemical cocaine aptasensor based on an electropolymerized ruthenium-intercalator complex », *Electrochimica Acta*, vol. 219, p. 82-87, nov. 2016, doi: 10.1016/j.electacta.2016.09.127.
- [182] I. Kazane *et al.*, « Highly Sensitive Bisphenol-A Electrochemical Aptasensor Based on Poly(Pyrrole-Nitrilotriacetic Acid)-Aptamer Film », *Anal. Chem.*, vol. 88, n° 14, p. 7268-7273, juill. 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b01574.
- [183] L. Sikich *et al.*, « Intranasal Oxytocin in Children and Adolescents with Autism Spectrum Disorder », *New England Journal of Medicine*, vol. 385, n° 16, p. 1462-1473, oct. 2021, doi: 10.1056/NEJMoa2103583.
- [184] Z. Yang *et al.*, « Energy Storage Application of All-Organic Polymer Dielectrics: A Review », *Polymers*, vol. 14, n° 6, Art. n° 6, janv. 2022, doi: 10.3390/polym14061160.
- [185] S. C. Rasmussen, « Conjugated and Conducting Organic Polymers: The First 150 Years », *ChemPlusChem*, vol. 85, n° 7, p. 1412-1429, juill. 2020, doi: 10.1002/cplu.202000325.
- [186] F. Ferrero *et al.* « Pyrrole chemical polymerization on textiles: Kinetics and operating conditions », *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 102, n° 5, p. 4121-4126, 2006, doi: 10.1002/app.24149.
- [187] A. Fakhry, « Synthèse par voie électrochimique de nanostructures de polymères conducteurs sans emploi d'une matrice support : applications aux (bio)capteurs », phdthesis, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Consulté le: 28 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://theses.hal.science/tel-01127179>
-

-
- [188] S. Sadki *et al.* « The mechanisms of pyrrole electropolymerization », *Chemical Society Reviews*, vol. 29, n° 5, p. 283-293, 2000, doi: 10.1039/A807124A.
- [189] A. F. Diaz *et al.* « Electrochemical polymerization of pyrrole », *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, n° 14, p. 635, 1979, doi: 10.1039/c39790000635.
- [190] J. Baur, « Autoassemblage de macromolécules biologiques via des poly(pyrroles) et/ou des nanotubes de carbone fonctionnalisés », phdthesis, Université de Grenoble, 2010. Consulté le: 7 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://theses.hal.science/tel-00540304>
- [191] A. Jaramillo *et al.* « XPS characterization of nanosized overoxidized polypyrrole films on graphite electrodes », *Analyst*, vol. 124, n° 8, p. 1215-1221, 1999, doi: 10.1039/a902578b.
- [192] T. F. Otero *et al.* « Polypyrrole: Diffusion Coefficients and Degradation by Overoxidation », *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, n° 39, p. 15429-15433, sept. 2004, doi: 10.1021/jp0490608.
- [193] K. P. Williams *et al.*, « Bioactive and nuclease-resistant l-DNA ligand of vasopressin », *PNAS*, vol. 94, n° 21, p. 11285-11290, oct. 1997, doi: 10.1073/pnas.94.21.11285.
- [194] « Oligo modification—Post-synthesis conjugation | IDT », Integrated DNA Technologies. Consulté le: 15 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/oligo-modification-post-synthesis-conjugation-explained>
- [195] A. Erdem *et al.* « Methylene Blue as a Novel Electrochemical Hybridization Indicator », *Electroanalysis*, vol. 13, n° 3, p. 219-223, 2001, doi: 10.1002/1521-4109(200103)13:3<219::AID-ELAN219>3.0.CO;2-7.
- [196] I. C. Monge-Romero *et al.* « Electrocatalysis of the hydroquinone/benzoquinone redox couple at platinum electrodes covered by a thin film of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) », *Synthetic Metals*, vol. 175, p. 36-41, juill. 2013, doi: 10.1016/j.synthmet.2013.04.027.
- [197] A. B. Steel *et al.* « Electrostatic Interactions of Redox Cations with Surface-Immobilized and Solution DNA », *Bioconjugate Chem.*, vol. 10, n° 3, p. 419-423, mai 1999, doi: 10.1021/bc980115g.
- [198] D. Pan *et al.*, « Electrochemical Interrogation of Interactions between Surface-Confined DNA and Methylene Blue », *Sensors (Basel)*, vol. 7, n° 11, p. 2671-2680, nov. 2007.
- [199] C. Song, S. Zhang, et H. Huang, « Choosing a suitable method for the identification of replication origins in microbial genomes », *Frontiers in Microbiology*, vol. 6, 2015,
-

Consulté le: 8 janvier 2024. [En ligne]. Disponible sur:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.01049>

- [200] K. Asai *et al.* « Continuous and selective measurement of oxytocin and vasopressin using boron-doped diamond electrodes », *Sci Rep*, vol. 6, n° 1, Art. n° 1, sept. 2016, doi: 10.1038/srep32429.
- [201] K. Lacina *et al.* « Biosensing based on electrochemical impedance spectroscopy: Influence of the often-ignored molecular charge », *Electrochemistry Communications*, vol. 93, p. 183-186, août 2018, doi: 10.1016/j.elecom.2018.07.015.
- [202] M. C. Rodriguez *et al.* « Aptamer biosensor for label-free impedance spectroscopy detection of proteins based on recognition-induced switching of the surface charge », *Chemical Communications*, vol. 0, n° 34, p. 4267-4269, 2005, doi: 10.1039/B506571B.
- [203] Y. Ram *et al.* « Impact of Molecular Surface Charge on Biosensing by Electrochemical Impedance Spectroscopy », *Electrochimica Acta*, vol. 200, p. 161-167, mai 2016, doi: 10.1016/j.electacta.2016.03.162.
- [204] M. Holzinger *et al.* « Adamantane/beta-cyclodextrin affinity biosensors based on single-walled carbon nanotubes », *Biosens Bioelectron*, vol. 24, n° 5, p. 1128-1134, janv. 2009, doi: 10.1016/j.bios.2008.06.029.
- [205] M. R. Eftink *et al.* « Cyclodextrin inclusion complexes: studies of the variation in the size of alicyclic guests », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 111, n° 17, p. 6765-6772, août 1989, doi: 10.1021/ja00199a041.
- [206] A. Fragoso *et al.* « Immobilization of Adamantane-Modified Cytochrome c at Electrode Surfaces through Supramolecular Interactions », *Langmuir*, vol. 18, n° 13, p. 5051-5054, juin 2002, doi: 10.1021/la0256679.
- [207] « Biotin-β-Cyclodextrin: A New Host-Guest System for the Immobilization of Biomolecules ». Consulté le: 3 août 2023. [En ligne]. Disponible sur:
<https://pubs.acs.org/doi/epdf/10.1021/la301963v>
- [208] M. V. Rekharsky *et al.*, « A synthetic host-guest system achieves avidin-biotin affinity by overcoming enthalpy-entropy compensation », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, n° 52, p. 20737-20742, déc. 2007, doi: 10.1073/pnas.0706407105.

-
- [209] J.-B. Jorcin *et al.* « CPE analysis by local electrochemical impedance spectroscopy », *Electrochimica Acta*, vol. 51, n° 8-9, p. 1473-1479, janv. 2006, doi: 10.1016/j.electacta.2005.02.128.
- [210] L. Szente *et al.* « Cyclodextrins: Assessing the Impact of Cavity Size, Occupancy, and Substitutions on Cytotoxicity and Cholesterol Homeostasis », *Molecules*, vol. 23, n° 5, p. 1228, mai 2018, doi: 10.3390/molecules23051228.
- [211] M. Kundu *et al.* « Evidences for complexations of β -cyclodextrin with some amino acids by ^1H NMR, surface tension, volumetric investigations and XRD », *Journal of Molecular Liquids*, vol. 240, p. 570-577, août 2017, doi: 10.1016/j.molliq.2017.05.123.
- [212] N. Haddour *et al.* « Electrogenation of a Poly(pyrrole)-NTA Chelator Film for a Reversible Oriented Immobilization of Histidine-Tagged Proteins », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, n° 16, p. 5752-5753, avr. 2005, doi: 10.1021/ja050390v.
- [213] N. Haddour, « Réalisation d'assemblages biologiques électroactifs : application aux biocapteurs d'affinité », These de doctorat, Université Joseph Fourier (Grenoble ; 1971-2015), 2005. Consulté le: 6 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2005GRE10120>
- [214] A. Fontana *et al.* « Etablissement de diagrammes tension-pH cinétiques du cuivre en milieu de chlorures », *Electrochimica Acta*, vol. 30, n° 5, p. 641-647, mai 1985, doi: 10.1016/0013-4686(85)80106-7.
- [215] M. Wilchek *et al.* « The avidin-biotin complex in bioanalytical applications », *Analytical Biochemistry*, vol. 171, n° 1, p. 1-32, mai 1988, doi: 10.1016/0003-2697(88)90120-0.
- [216] R. Griesser *et al.* « Stability and structure of binary and ternary metal ion complexes with biocytin, the sulfoxide and sulfone, N-acetyl-L-lysine, and L-alanine », *Biochemistry*, vol. 9, n° 17, p. 3285-3293, août 1970, doi: 10.1021/bi00819a001.
- [217] F. V. Oberhaus *et al.* « Immobilization Techniques for Aptamers on Gold Electrodes for the Electrochemical Detection of Proteins: A Review », *Biosensors (Basel)*, vol. 10, n° 5, p. 45, avr. 2020, doi: 10.3390/bios10050045.
- [218] PubChem, « Nitrilotriacetic acid ». Consulté le: 3 octobre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8758>
- [219] M. Bloemendaal *et al.*, « Neuro-Cognitive Effects of Acute Tyrosine Administration on Reactive and Proactive Response Inhibition in Healthy Older Adults », *eNeuro*, vol. 5, n° 2, p. ENEURO.0035-17.2018, avr. 2018, doi: 10.1523/ENEURO.0035-17.2018.
-

-
- [220] J. Ruta *et al.* « Noncompetitive Fluorescence Polarization Aptamer-based Assay for Small Molecule Detection », *Anal. Chem.*, vol. 81, n° 17, p. 7468-7473, sept. 2009, doi: 10.1021/ac9014512.
- [221] Z. Zhu *et al.*, « Optimization of the structure-switching aptamer-based fluorescence polarization assay for the sensitive tyrosinamide sensing », *Analytica Chimica Acta*, vol. 707, n° 1, p. 191-196, nov. 2011, doi: 10.1016/j.aca.2011.09.022.
- [222] R. Deng *et al.*, « Recognition-Enhanced Metastably Shielded Aptamer for Digital Quantification of Small Molecules », *Anal. Chem.*, vol. 90, n° 24, p. 14347-14354, déc. 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.8b03763.
- [223] B. Billet *et al.* « Detection of small molecules by fluorescence intensity using single dye labeled aptamers and quencher transition metal ions », *Biosens Bioelectron*, vol. 205, p. 114091, juin 2022, doi: 10.1016/j.bios.2022.114091.
- [224] S. Sheth *et al.* « Adenosine Receptors: Expression, Function and Regulation », *Int J Mol Sci*, vol. 15, n° 2, p. 2024-2052, janv. 2014, doi: 10.3390/ijms15022024.
- [225] J. Li *et al.*, « Adenosine A2aReceptors Increase Arterial Endothelial Cell Nitric Oxide », *Journal of Surgical Research*, vol. 80, n° 2, p. 357-364, déc. 1998, doi: 10.1006/jsre.1998.5439.
- [226] C. N. Wilson *et al.* « Adenosine Receptors and Asthma », *Handb Exp Pharmacol*, n° 193, p. 10.1007/978-3-540-89615-9_11, 2009, doi: 10.1007/978-3-540-89615-9_11.
- [227] M. Kimura, « Adenosine serves a “good night sleep” via the A2A receptor », *Sleep Biol. Rhythms*, vol. 18, n° 3, p. 161-162, juill. 2020, doi: 10.1007/s41105-020-00276-8.
- [228] W. Shen *et al.*, « Blocking Agent Optimization for Nonspecific Binding on Phage Based Magnetoelastic Biosensors », *J. Electrochem. Soc.*, vol. 159, n° 10, p. B818, août 2012, doi: 10.1149/2.057210jes.
- [229] S. Gundagatti *et al.* « An optimization of blocking agents for designing reliable electrochemical biosensors for ovarian cancer », *Materials Today: Proceedings*, mai 2023, doi: 10.1016/j.matpr.2023.04.460.
- [230] S. Sheikh *et al.* « Sacrificial BSA to block non-specific adsorption on organosilane adlayers in ultra-high frequency acoustic wave sensing », *Surface and Interface Analysis*, vol. 45, n° 11-12, p. 1781-1784, 2013, doi: 10.1002/sia.5322.
- [231] C. Sanchez-Cano *et al.* « Recent Developments in the Design of Non-Biofouling Coatings for Nanoparticles and Surfaces », *Int J Mol Sci*, vol. 21, n° 3, p. 1007, févr. 2020, doi: 10.3390/ijms21031007.
-

-
- [232] F. Giroud *et al.*, « Impedimetric immunosensor based on a polypyrrole-antibiotic model film for the label-free picomolar detection of ciprofloxacin », *Anal Chem*, vol. 81, n° 20, p. 8405-8409, oct. 2009, doi: 10.1021/ac901290m.
- [233] K. Singh *et al.* « Development of Impedimetric Biosensor for Total Cholesterol Estimation Based on Polypyrrole and Platinum Nanoparticle Multi Layer Nanocomposite », *International Journal of Organic Chemistry*, vol. 2013, déc. 2013, doi: 10.4236/ijoc.2013.34038.
- [234] D. Zane *et al.* « An Impedimetric Glucose Biosensor Based on Overoxidized Polypyrrole Thin Film », *Electroanalysis*, vol. 23, n° 5, p. 1134-1141, 2011, doi: 10.1002/elan.201000576.
- [235] A. Ulman, « Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers », *Chem. Rev.*, vol. 96, n° 4, p. 1533-1554, janv. 1996, doi: 10.1021/cr9502357.
- [236] K. Doblhofer *et al.* « Stability and electrochemical behavior of “self-assembled” adsorbates with terminal ionic groups », *Langmuir*, vol. 8, n° 7, p. 1811-1816, juill. 1992, doi: 10.1021/la00043a021.
- [237] C. Vericat *et al.* « Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system », *Chem Soc Rev*, vol. 39, n° 5, p. 1805-1834, mai 2010, doi: 10.1039/b907301a.
- [238] L. Bábelová *et al.* « Label-free Electrochemical Aptasensor for Jurkat Cells Detection as a Potential Diagnostic Tool for Leukemia », *Electroanalysis*, vol. 30, n° 7, p. 1487-1495, 2018, doi: 10.1002/elan.201800091.
- [239] M. Jarczewska *et al.* « Application of RNA Aptamers as Recognition Layers for the Electrochemical Analysis of C-Reactive Protein », *Electroanalysis*, vol. 30, n° 4, p. 658-664, 2018, doi: 10.1002/elan.201700620.
- [240] R. Salimian *et al.* « Specific Picomolar Detection of a Breast Cancer Biomarker HER-2/neu Protein in Serum: Electrocatalytically Amplified Electroanalysis by the Aptamer/PEG-Modified Electrode », *ChemElectroChem*, vol. 4, n° 4, p. 872-879, avr. 2017, doi: 10.1002/celec.201700025.
- [241] R. Ahirwar *et al.*, « An aptasensor for rapid and sensitive detection of estrogen receptor alpha in human breast cancer », *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 116, n° 1, p. 227-233, 2019, doi: 10.1002/bit.26819.
- [242] G. Ying *et al.* « Construction and application of an electrochemical biosensor based on an endotoxin aptamer », *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 65, n° 3, p. 323-327, 2018, doi: 10.1002/bab.1610.
-

-
- [243] B. Chakma *et al.* « Development of Electrochemical Impedance Spectroscopy Based Malaria Aptasensor Using HRP-II as Target Biomarker », *Electroanalysis*, vol. 30, n° 8, p. 1847-1854, 2018, doi: 10.1002/elan.201800142.
- [244] Francesca Malvano *et al.* « A new label-free impedimetric aptasensor for gluten detection », *Food control*, vol. 79, p. 200-206, 2017, doi: 10.1016/j.foodcont.2017.03.033.
- [245] D. V. Leff *et al.* « Synthesis and Characterization of Hydrophobic, Organically-Soluble Gold Nanocrystals Functionalized with Primary Amines », *Langmuir*, vol. 12, n° 20, p. 4723-4730, janv. 1996, doi: 10.1021/la960445u.
- [246] P. Sandström *et al.* « Nonspecific and Thiol-Specific Binding of DNA to Gold Nanoparticles », *Langmuir*, vol. 19, n° 18, p. 7537-7543, sept. 2003, doi: 10.1021/la034348u.
- [247] J. Kang *et al.* « Gold Film Surface Preparation for Self-Assembled Monolayer Studies », *Langmuir*, vol. 23, n° 2, p. 509-516, janv. 2007, doi: 10.1021/la0518804.
- [248] L. M. Fischer *et al.*, « Gold cleaning methods for electrochemical detection applications », *Microelectronic Engineering*, vol. 86, n° 4, p. 1282-1285, avr. 2009, doi: 10.1016/j.mee.2008.11.045.
- [249] J. Lee *et al.* « Regenerative Strategy of Gold Electrodes for Long-Term Reuse of Electrochemical Biosensors », *ACS Omega*, vol. 8, n° 1, p. 1389-1400, déc. 2022, doi: 10.1021/acsomega.2c06851.
- [250] J. Wan *et al.* « Signal-off impedimetric immunosensor for the detection of Escherichia coli O157:H7 », *Sci Rep*, vol. 6, n° 1, Art. n° 1, janv. 2016, doi: 10.1038/srep19806.
- [251] S. Lee *et al.* « Enhanced electrochemical biosensing on gold electrodes with a ferri/ferrocyanide redox couple », *Analyst*, vol. 146, n° 17, p. 5236-5244, sept. 2021, doi: 10.1039/d1an00952d.
- [252] M. C. O. Monteiro *et al.* « Alumina contamination through polishing and its effect on hydrogen evolution on gold electrodes », *Electrochimica Acta*, vol. 325, p. 134915, déc. 2019, doi: 10.1016/j.electacta.2019.134915.
- [253] T. M. Herne *et al.* « Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, n° 38, p. 8916-8920, sept. 1997, doi: 10.1021/ja9719586.
- [254] N.-B. Mincu *et al.* « Screen-Printed Electrodes (SPE) for In Vitro Diagnostic Purpose », *Diagnostics*, vol. 10, n° 8, Art. n° 8, août 2020, doi: 10.3390/diagnostics10080517.
-

-
- [255] N. Aliakbarinodehi *et al.*, « Aptamer-based Field-Effect Biosensor for Tenofovir Detection », *Sci Rep*, vol. 7, p. 44409, mars 2017, doi: 10.1038/srep44409.
- [256] D. C. Ferreira *et al.* « Aptasensor based on screen-printed electrode for breast cancer detection in undiluted human serum », *Bioelectrochemistry*, vol. 137, p. 107586, févr. 2021, doi: 10.1016/j.bioelechem.2020.107586.
- [257] P. Reich *et al.* « Development of An Impedimetric Aptasensor for the Detection of Staphylococcus aureus », *Int J Mol Sci*, vol. 18, n° 11, p. 2484, nov. 2017, doi: 10.3390/ijms18112484.



Experimental part



Experimental Part

I. Electrogenerated polymers based aptasensors

1. Materials

Monobasic and dibasic phosphates, potassium hexacyanoferrate (III) and potassium hexacyanoferrate (II), potassium hydroxide, potassium chloride, magnesium chloride, sodium chloride, sodium acetate, perchloric acid (HClO_4), sulfuric acid, (H_2SO_4), hexamine ruthenium (III) chloride, lithium perchlorate (LiClO_4), hydroquinone, copper (II) chloride (CuCl_2), bovine serum albumin (BSA), were purchased from Sigma. The β -Cyclodextrin-functionalized gold nanoparticles (AuNps- β -CD) were obtained from collaboration with Professor Villalonga (Complutense University of Madrid, Spain). All chemicals were used as received unless it is mentioned. 1-(11-pyrrol-1-ylundecanoyl)pyrrolidine-2,5-dione (pyrrole NHS), adamantyl-11-pyrrolyl-1-undecyl carboxylic acid amide (pyrrole adamantane) and 2-[bis(carboxymethyl)amino]-5-(11-pyrrol-1-ylundecanoylamino)pentanoic acid (pyrrole-NTA) were synthesized as described. All oligonucleotides were purchased from Eurogentec (Liège, Belgium).

2. Electrochemical measurements

Polymers films were electrodeposited by potentiostatic method with limited charge (2.5 mC cm^{-2}) in organic media ($\text{CH}_3\text{CN} + 0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ LiClO}_4$) with an AgNO_3/Ag $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ in $\text{CH}_3\text{CN} + 0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ LiClO}_4$ electrode used as reference electrode and a Pt wire, placed in a separate compartment, as counter electrode. Cyclic voltammetry was carried out with the same setup for the polymers layer's characterization.

Electrochemical measurements were performed in a conventional three electrode cell, containing 0.1 mol L^{-1} saline phosphate buffer (NaCl $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, MgCl_2 $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, and KCl $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7.4) with an Autolab potentiostat (Vionic, Utrecht, The Netherlands) using its INTELLO software. A platinum wire was used as the counter electrode and an Ag/AgCl in saturated KCl electrode served as the reference. Impedance measurements in $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ solution used as the redox probe were run by potentiostating the aptasensor at OCP versus Ag/AgCl in saturated KCl , at 25°C and impedance measurements in hydroquinone solution were run at a fixed potential from linear sweep voltammetry (LSV) curve. Potentials given in organic and aqueous media are referred to Ag/AgNO_3 and Ag/AgCl in saturated KCl , respectively.

3. Preparation of the sensor electrodes

The surface platinum electrodes (Pt) were polished with a 2 μm diamond paste purchased from Presi (France) and rinsed successively with water, acetone, and ethanol under sonication (5 min).

3.1. Polypyrrole NHS based sensor

An electropolymerized layer of poly (pyrrole NHS) was generated on the electrodes by chronoamperometry. The monomer (2.10^{-3} mol L⁻¹) was solubilized in CH₃CN + LiClO₄, 0.1 mol L⁻¹ (organic electrolyte) and electropolymerized at a fixed potential of 0.82 V. The formation of the electrogenerated film was then observed by cyclic voltammetry in CH₃CN + LiClO₄, 0.1 mol L⁻¹ (monomer free electrolyte solution). The as formed film was used for the attachment of denatured anti-AVP aptamer (80°C for 5 minutes, then left on ice for 30 minutes), via an amide bond between the NHS and the amine function at the 5' end of the aptamer (overnight incubation at 4°C). The resulting electrodes were rinsed in saline PB 0.1 mol L⁻¹ before use.

A 2.10^{-3} mol L⁻¹, K₄[Fe(CN)₆]³⁻/K₃[Fe(CN)₆]³⁻ (1:1) solution was used as a redox probe in saline phosphate buffer solution was used for the different EIS measurements. Impedance spectra were recorded by immersing the sensors into the abovementioned solution. A frequency range from 50000 to 0.1 Hz was scanned using an amplitude of 0.01 V and at OCP vs Ag/AgCl in saturated KCl solution.

3.2. Polypyrrole adamantane based sensor

An electropolymerized layer of poly (pyrrole adamantane) was generated on the electrodes by chronoamperometry ($E = 0.8$ V) from a 2.10^{-3} mol L⁻¹ pyrrole adamantane solution in the CH₃CN + LiClO₄, 0.1 mol L⁻¹ and characterized by cyclic voltammetry organic electrolyte as previously described.

A 0.5 mg/mL solution of AuNPs- β -CD was prepared in 0.1 mol L⁻¹ saline phosphate buffer (10 mmol L⁻¹ NaCl, 5 mmol L⁻¹ KCl, mmol L⁻¹ MgCl₂, pH = 7.4) and 15 μL of this was deposited on the polypyrrole adamantane-functionalized electrodes during 1 h incubation.

Prior to deposition on the electrode 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of 5' biotin-TEG-aptamer solution prepared in saline phosphate buffer was denatured at 80°C for 5 minutes, then left on ice for 30 minutes to set the structure. After rinsing the AuNPs-CD-functionalized electrodes, 15 μL of the

aptamer solution was deposited on the electrodes for overnight incubation. The resulting electrodes were rinsed in saline PB 0.1 mol L⁻¹ before use.

3.3. Polypyrrole NTA based sensors

As with the other 2 polymers tested, polypyrrole NTA was generated by chronomaperometry ($E = 0.85$ V) from a $2 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹ pyrrole adamantane solution in the CH₃CN + LiClO₄, 0.1 mol L⁻¹ and characterized by cyclic voltammetry organic electrolyte as previously described.

The coordination of Cu²⁺ ions within the poly(pyrroleNTA) film was carried out by immersing the modified electrode for 20 min in a stirred acetate buffer solution (0.1 mol L⁻¹, pH 4.8) containing CuCl₂ (10^{-2} mol L⁻¹). The resulting electrode was carefully washed with phosphate buffer. Before use, anti-AVP or anti-adenosine aptamer were heated at 80°C for 5 min and then cooling by immersion into the ice bath to obtain a proper folding structure. Then 15 µL of saline phosphate buffer solution containing heated–treated aptamer was dropped onto the poly(pyrrole-NTA)/Cu²⁺ film electrode.

To determine surface coverage of immobilized anti-AVP aptamer on the electrode surface, the electrode, once modified, was immersed in a solution containing [Ru^{III}(NH₃)₆]³⁺ at a concentration of 10^{-2} mol L⁻¹ in a phosphate buffer with a pH of 7.4. Following several rinses of the modified electrode in a stirring phosphate buffer solution, a cyclic voltammogram was recorded within the potential range of 0.00 V to -0.50 V vs Ag/AgCl in saturated KCl solution. The Ru^{III}/Ru^{II} couple's electroactivity, was used to evaluate [Ru^{III}(NH₃)₆]³⁺ and then aptamer surface coverage as [Ru^{III}(NH₃)₆]³⁺ forms a complex with the aptamer.

For AVP detection impedance measurements were run in both $2 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹ hydroquinone and K₄[Fe(CN)₆]³⁻/K₃[Fe(CN)₆]³⁻ (1:1) in saline phosphate buffer solutions. The setpoint potentials for impedance measurement were 0.14 V vs Ag/AgCl in saturated KCl solution for hydroquinone redox probe and OCP vs Ag/AgCl in saturated KCl solution for K₄[Fe(CN)₆]³⁻/K₃[Fe(CN)₆]³⁻

For L-tyrosinamide and adenosine detection impedance measurements were run using the $2 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹ hydroquinone in saline phosphate buffer solution as redox probe.

4. Target detection

For each target, increasing concentrations were prepared in phosphate buffer 0.1 mol L^{-1} (pH = 7.4). For each concentration, $15 \text{ }\mu\text{L}$ of the target solution was deposited on the surface of the aptamer-functionalized electrodes for 30 minutes. The electrodes were then rinsed in phosphate buffer under agitation (2000 rpm) for 10 min. After rinsing, the electrodes are characterized by EIS or cyclic voltammetry. After each measurement, the electrodes were gently rinsed with phosphate buffer in a washbowl before adding the next increment in target.

II. Impedimetric biosensors based on a self-assembled monolayer on gold electrodes.

1. Materials

Alumina oxide powder suspension and diamond paste were purchased from Presi (France). Hydrogen peroxide and mercapto-1-hexanol were purchased from Sigma. C220AT gold SPEs were purchased from Metrohm DropSens.

2. Electrochemical measurements

Polycrystallin gold electrodes ($\Phi = 2 \text{ mm}$) and gold SPEs ($\Phi = 4 \text{ mm}$) were used as working electrodes for all the characterization. A platinum wire was used as the counter electrode. An Ag/AgCl in saturated KCl solution was used as the reference electrode.

3. Preparation of the sensor electrodes

Prior to any use, the surface of polycrystallin gold electrodes were polished with a $3 \text{ }\mu\text{m}$ alumina suspension or $2 \text{ }\mu\text{m}$ diamond paste. When polished with alumina suspension, electrodes were cleaned electrochemically by running 10 cycles of cyclic voltammetry in a $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ solution. While polished with diamond paste, the electrodes were chemically cleaned by immersing them in a $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KOH} + \text{H}_2\text{O}_2$ 25% mixture for 10 min and then by cyclic voltammetry in a $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KOH}$ solution (10 cycles). Gold SPEs were cleaned only by immersion in $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KOH} + \text{H}_2\text{O}_2$ 25% mixture for 10 min followed by cyclic voltammetry in a $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KOH}$ solution (10 cycles). The as-cleaned electrodes were rinsed with milli-Q water and dried with N_2 .

For aptamer/MCH SAM formation by co-immobilization, a mixture of aptamer and MCH was prepared in saline phosphate buffer at a fixed concentration ratio and after denaturation as previously described, 10 μL of the mixture was dropped at the electrode surface for an overnight incubation. For the SAM formation by backfilling, 10 μL denatured aptamer in saline phosphate buffer solution was dropped at the surface electrode for an overnight incubation. The electrodes were then rinsed and 10 μL of MCH in saline phosphate buffer were dropped on the as-prepared electrodes for 1h. The concentrations of aptamer and MCH were fixed according to the wanted ratio. Afterwards, the electrodes were rinsed in saline phosphate buffer before use.

A $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (1:1) solution was used as a redox probe in saline phosphate buffer solution was used for the different EIS measurements.

4. Preparation of the sensor electrodes

As for polymer-based aptasensors, for each target, increasing concentrations were prepared in phosphate buffer 0.1 mol L^{-1} (pH = 7,4). For each concentration, 15 μL of the target solution was deposited on the surface of the aptamer-functionalized electrodes for 30 minutes. The electrodes were then rinsed in phosphate buffer under agitation (2000 rpm) for 10 min. After rinsing, the electrodes are characterized by EIS or cyclic voltammetry. After each measurement, the electrodes were gently rinsed with phosphate buffer in a washbowl before adding the next increment in target.





Résumé

Outils très prometteurs dans le domaine de la détection et de la quantification de petites molécules, les biocapteurs électrochimiques font aujourd'hui l'objet d'un grand centre d'intérêt. En plus d'être très sensibles et spécifiques, ils présentent l'avantage d'être rapides, simples d'utilisations, relativement peu coûteux à développer et miniaturisables, ce qui les rend très attrayants pour des applications dans des domaines tels que la médecine, l'agroalimentaire, l'environnement et la sécurité alimentaire.

Dans ce contexte, les aptamères qui sont des oligonucléotides en série ARN ou ADN ayant une grande affinité et une grande spécificité pour des molécules cibles sont devenus très utilisés comme outils de reconnaissance moléculaire dans le développement de ces biocapteurs qui prennent alors le nom d'aptacapteurs. De nombreuses techniques d'immobilisation de ces aptamères à la surface des électrodes continuent d'émerger afin de mettre au point des aptacapteurs de plus en plus performants.

Ces travaux de thèse consistent à trouver la technique d'immobilisation ainsi que les conditions opérationnelles optimales de la mise au point d'un aptacapteur électrochimique sensible et spécifique dans la gamme du picomolaire pour la détection de l'arginine vasopressine qui est une petite molécule d'intérêt médical. Deux principaux types d'immobilisation ont pu être testés : un premier type, innovant, basé sur l'utilisation de polymères organiques conducteurs électrogénérés et un deuxième plus conventionnel basé sur la réaction thiol-or. Des aptacapteurs capables de détecter de manière spécifique l'arginine vasopressine à des concentrations de l'ordre du picomolaire ont pu être mis au point.

Abstract

Electrochemical biosensors are highly promising tools for the detection and quantification of small molecules and are currently the focus of a great deal of interest. As well as being highly sensitive and specific, they have the advantage of being fast, easy to use, relatively inexpensive to develop and miniaturizable, making them highly attractive for applications in fields such as medicine, the environment, and food safety.

In this context, aptamers, which are serial RNA or DNA oligonucleotides with high affinity and specificity for target molecules, have become widely used as molecular recognition tools in the development of these biosensors, which are then called aptasensors. Numerous techniques for immobilizing these aptamers on electrode surfaces continue to emerge, with the aim of developing ever more effective aptamers.

The aim of this thesis was to find the immobilization technique and optimum operating conditions for the development of a sensitive and specific electrochemical sensor in the picomolar range for the detection of arginine vasopressin, a small molecule of medical interest. Two main types of immobilizations were tested: a first, innovative type based on the use of electrogenerated conductive organic polymers, and a second, more conventional type based on the thiol-gold reaction. Specific aptasensors, capable of detecting arginine vasopressin at picomolar concentrations have been successfully developed.

