

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle

Bure au international



(43) Date de la publication internationale
12 janvier 2012 (12.01.2012)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2012/004543 A1

(51) Classification internationale des brevets :
G01N 27/333 (2006.01) G01N 27/48 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR201 1/05 1627

(22) Date de dépôt international :
7 juillet 2011 (07.07.2011)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
10/55597 9 juillet 2010 (09.07.2010) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
UNIVERSITE PARIS DIDEROT-PARIS 7 [FR/FR];
5, rue Thomas Mann, F-75205 Paris Cedex 13 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **PIRO, Benoît** [FR/FR]; 12, rue Lally-Tollendal, F-75019 Paris (FR). **NOËL, Vincent** [FR/FR]; 13bis, rue Thiers, F-95300 Pontoise (FR). **PHAM, Minh-Chau** [FR/FR]; 28bis, rue du Colonel Candelot, F-92340 Bourg La Reine (FR). **REISBERG, Steeve** [FR/FR]; 29, rue Traversière, F-75012 Paris (FR).

(74) Mandataires : **MOUGET-GONNOT, Claire** et al;
Grosset-Fournier & Demachy, 54, rue Saint-Lazare,
F-75009 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h))
- avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : DEVICE FOR DETECTING MOLECULES OF INTEREST, ITS MANUFACTURING PROCESS AND ITS USE

(54) Titre : DISPOSITIF DE DETECTION DE MOLECULES D'INTERET, SON PROCEDE DE FABRICATION ET SON UTILISATION

(57) Abstract : The detection device comprises at least one transducer, having a primary aminé functional group linked to a quinone, or to a quinone derivative, via a carbon atom or a heteroatom of a carbon chain, at least one receptor possessing a primary aminé functional group, possibly a functionalized carbon nanotube, and an electrically conducting support, and in which said at least one transducer and said at least one receptor are respectively linked, covalently, to the support or to the carbon nanotube, by the electrooxidation of at least one of their primary aminé functional groups, and said carbon nanotube is covalently linked to the support.

(57) Abrégé : Dispositif de détection comprenant au moins un transducteur, comprenant une fonction aminé primaire liée à une quinone, ou à un dérivé de quinone, par un atome de carbone ou un hétéroatome d'une chaîne carbonée, au moins un récepteur possédant une fonction aminé primaire, éventuellement un nanotube de carbone fonctionnalisé, et un support conducteur électrique et dans lequel ledit au moins un transducteur et ledit au moins un récepteur sont respectivement liés de façon covalente au support ou au nanotube de carbone, par l'électrooxydation d'au moins une de leurs fonctions aminé primaire, et ledit nanotube de carbone est lié de façon covalente au support.



WO 2012/004543 A1

DISPOSITIF DE DETECTION DE MOLECULES D'INTERET, SON PROCEDE DE FABRICATION ET SON UTILISATION

La présente invention a pour objet un dispositif de détection de molécules d'intérêt, son procédé de fabrication et son utilisation.

Depuis plusieurs années, les biopuces sont utilisées pour leur capacité à générer un nombre très important de données tout en utilisant de faibles quantités de molécules de capture et d'échantillons biologiques. Des biopuces à peptides ont ainsi été réalisées et développées sur des substrats (lames de verre ou silicium) pour le dépistage d'anticorps dirigés contre des pathogènes comme le virus de l'hépatite C ou B. De façon à améliorer les tests diagnostics, l'immobilisation de sondes peptidiques doit conduire à une forte densité de peptides liés de manière stable aux supports sans modifier leur bioréactivité.

Les biopuces sont constituées d'un microréseau de sondes d'ADN ou de peptides c'est-à-dire d'un arrangement bidimensionnel de biomolécules sondes déposées de façon contrôlée sur une surface telle que du verre ou toute autre matière (plastique, nitrocellulosique, métallique, ...) de telle sorte que ces sondes soient accessibles aux cibles présentes en solution. L'accroche des sondes se fait habituellement en créant, sur la surface du capteur, de petits "spots" localisés (de quelques centaines de micromètres carrés) porteurs de fonctions chimiques aptes à greffer les sondes. La disposition régulière des spots permet ensuite la lecture (le plus souvent optique) du résultat.

Les techniques de formation de ces spots sont communément rangées dans deux catégories : impression avec contact et sans contact ("*contact printing*" et "*non-contact printing*"). L'impression avec contact est la technologie la plus largement utilisée car elle permet une excellente reproductibilité. Toutefois, les technologies d'impression sans contact, plus récentes, sont plus prometteuses (gravure photochimique, laser, jet d'encre, électrospray,...).

Des techniques de modification de surface basées sur la construction de spots d'oligodéoxynucléotides (ODN) sondes directement sur une surface plane (de type plaque de verre) ont été développées. On trouve parmi ces techniques la synthèse *in situ* de séquences d'ODN par photoactivations-désactivations successives, ou le dépôt local (par micro-robots) d'ODN modifiés sur des surfaces pré-activées (verre, silice, polymères,...). Ces deux approches sont développées ci-dessous :

Surfaces pré-activées : Brockman et al. (*Annu. Rev. Phys.Chem.*, 2000, **51**, 41) ont montré la possibilité de former, sur des surfaces d'or, des réseaux de plots d'alkylthiols fonctionnalisés par un groupe aminé terminal. La "tête" thiol se greffe sur l'or tandis que la "queue" aminé reste disponible. Les brins d'ODN sondes sont ensuite greffés sur ces spots. D'autres configurations sont possibles, comme celles de Shumaker-Parry et al. (*Anal. Chem.*, 2004, **76**, 918) en utilisant par exemple l'enchaînement biotine - avidine - biotine. L'avantage majeur de ces techniques est qu'elles conduisent à des couches parfaitement définies pour lesquelles les séquences d'ODN, greffées après leur synthèse, ont été préalablement purifiées. Le désavantage est qu'elles nécessitent au moins deux étapes : pré-activation de la surface, puis greffage des séquences sondes.

Synthèse in-situ / Photo activation : une approche plus simple est la synthèse directe des séquences sondes sur la surface de la puce, en exploitant le principe développé par Fodor et al. (*Nature*, 1993, **364**, 555 ; *Science*, 1991, **251**, 767) et utilisé commercialement par Affymetrix. Le concept repose sur la modification successive d'une surface portant des groupements photolabiles activables-désactivables à volonté. L'usage de masques permet le dessin des "spots" sur la surface de la puce, chacun des spots étant porteur d'un et d'un seul type de séquence sonde. Chaque étape du processus nécessite l'utilisation d'un masque photolithographique différent. La nécessité de fabriquer un nouvel ensemble de masques photographiques pour chaque spot rend la méthode extrêmement chère et peu adaptée à l'automatisation. La méthode est complexe et longue car chaque étape de synthèse nécessite le déplacement, le remplacement et le réalignement mécaniques d'un masque photolithographique. Ainsi, synthétiser un grand nombre de bibliothèques de spots avec cette méthode est un processus peu efficace et peu économique.

Les procédures électrochimiques (« *electro-printing* ») semblent très prometteuses. Ainsi il a été démontré que des techniques comme la Microscopie Electrochimique à Balayage (SECM) permettent l'électrodéposition locale d'ADN, par exemple par l'électropolymérisation sous forme de spots de motifs pyrroles modifiés par des brins d'oligonucléotides (Livache et al. *Nucleic Acids Res.*, 1994, **22**, 2915.; Szunerits et al. *Langmuir*, 2004, **20**, 9236 ; E. Fortin et al., *Electroanalysis*, 2005, **17**, 495). Il est en effet d'ores et déjà démontré que les polymères conducteurs tels que le polypyrrole ou le polythiophène sont des substrats appropriés pour l'immobilisation de brins d'ODN sonde (Cha, et al. *Biosens. Bioelectron.*, 2003, **18**, 1241; Garnier et al. *Synth. Met.*, 1999, **100**, 89).

Une autre méthode consiste à déprotéger localement par électrochimie une fonction chimique qui par la suite réagira avec une sonde présente dans le milieu.

Au cours de leurs travaux les inventeurs ont déjà décrit (Reisberg *et al.* *TALANTA* 2010, **80**, 1318) un biocapteur électrochimique qui se présente sous la forme d'un film mince à base de 5-hydroxy-1,4-naphtoquinone sur laquelle est greffée du glutathion tripeptide porteur d'une fonction aminé primaire. Le Glu-NHQ présente trois groupes fonctionnels parmi lesquels seul le groupe hydroxy de l'hydroxynaphtoquinone est utilisé pour l'électropolymérisation ; le groupe aminé du glutathion est utilisé uniquement pour fixer les biomolécules par post-fonctionnalisation. WO 2008/132304 décrit un procédé de production d'un détecteur d'ions dans une phase liquide ledit détecteur étant formé d'un support électro-conducteur recouvert d'une couche de polyjuglone. Cette couche de polyjuglone peut être préparée à partir de 3-mercapto-aniline-5-hydroxy-1,4-naphtalenedione, laquelle se fixe sur le support par une liaison carbone-carbone suite à l'élimination de la fonction aminé aromatique par le biais de la formation d'un sel de diazonium.

Néanmoins ces différentes méthodes ne sont pas satisfaisantes et il existe un besoin de mettre à la disposition des spécialistes, une méthode qui permette un adressage non manuel et direct des différentes sondes biologiques sur des microélectrodes individuelles.

Des dispositifs existant de détection comprennent :

- au moins un transducteur, comprenant une fonction aminé primaire liée à une quinone, ou à un dérivé de quinone, par un atome de carbone ou un hétéroatome d'une chaîne carbonée,

- au moins un récepteur possédant une fonction aminé primaire,

- éventuellement un nanotube de carbone fonctionnalisé, et

- un support conducteur électrique,

et dans lequel

ledit au moins un transducteur et ledit au moins un récepteur sont respectivement liés de façon covalente au support ou au nanotube de carbone, par au moins une de leurs fonctions aminé primaire et ledit nanotube de carbone est lié de façon covalente au support.

Les inventeurs ont découvert qu'en utilisant les propriétés électrochimiques des fonctions aminés primaires aliphatiques il était possible de former directement des couches organiques ultra-minces capables de traduire un événement de reconnaissance biologique de façon plus sensible et plus fiable que l'ensemble des systèmes existants.

Aussi la présente invention a pour objet un dispositif de détection comprenant :

- au moins un transducteur, comprenant une fonction aminé primaire aliphatique liée à une quinone, ou à un dérivé de quinone, par un atome de carbone ou un hétéroatome d'une chaîne carbonée,

- au moins un récepteur possédant une fonction aminé primaire aliphatique,
- éventuellement un nanotube de carbone fonctionnalisé, et
- un support conducteur électrique,

et dans lequel

ledit au moins un transducteur et ledit au moins un récepteur sont respectivement liés de façon covalente au support ou au nanotube de carbone, par l'électrooxydation d'au moins une de leurs fonctions aminé primaire aliphatique, et

ledit nanotube de carbone est lié de façon covalente au support.

Au sens de la présente invention, on entend par aminé aliphatique toute aminé possédant une chaîne carbonée acyclique ou cyclique, saturée ou insaturée à l'exclusion des aminés aromatiques.

Conformément à l'invention, la monocouche ainsi produite par électrogreffage du transducteur sur le support conducteur constitue un ensemble transducteur d'un événement de reconnaissance (bio)moléculaire.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, le dispositif de détection comprend :

- au moins un transducteur, comprenant une fonction aminé primaire, de préférence une aminé primaire aliphatique, liée à une quinone, ou à un dérivé de quinone, par un atome de carbone ou un hétéroatome d'une chaîne carbonée,
- au moins un récepteur possédant une fonction aminé primaire aliphatique,
- un nanotube de carbone fonctionnalisé, et
- un support conducteur électrique,

et dans lequel

ledit au moins un transducteur et ledit au moins un récepteur sont respectivement liés de façon covalente au nanotube de carbone, par au moins une de leurs fonctions aminé primaire, de préférence par l'électrooxydation d'au moins une de leurs fonctions aminé primaire aliphatique, et

ledit nanotube de carbone est lié de façon covalente au support.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, ledit au moins un récepteur et ledit au moins un transducteur sont liés chacun de façon covalente au nanotube de carbone par l'électrooxydation de leurs aminés aliphatiques primaires respectives.

Dans un autre mode de réalisation avantageux, le dispositif de détection selon l'invention comprend :

- au moins un transducteur, comprenant une fonction amine primaire aliphatique, liée à une quinone, ou à un dérivé de quinone, par un atome de carbone ou un hétéroatome d'une chaîne carbonée,
- au moins un récepteur possédant une fonction amine primaire aliphatique,
- un nanotube de carbone fonctionnalisé, et
- un support conducteur électrique,

et dans lequel

ledit au moins un récepteur est lié de façon covalente au nanotube de carbone, par au moins une des fonctions amine primaire aliphatique,

ledit au moins un transducteur est lié de façon covalente au support, par au moins une des fonctions amine primaire aliphatique, et

ledit nanotube de carbone est lié de façon covalente au support.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, ledit au moins un récepteur est lié de façon covalente au nanotube de carbone par l'électrooxydation d'au moins une de ses fonctions amine primaire aliphatique, et ledit au moins un transducteur est lié de façon covalente au support par l'électrooxydation d'au moins une de ses fonctions amine primaire aliphatique.

Dans un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le dispositif de détection comprend :

- au moins un transducteur, comprenant une fonction amine primaire liée aliphatique, à une quinone, ou un dérivé de quinone, par un atome de carbone ou un hétéroatome d'une chaîne carbonée,
- au moins un récepteur possédant une fonction amine primaire aliphatique,
- un nanotube de carbone fonctionnalisé, et
- un support conducteur électrique,

et dans lequel

ledit au moins un transducteur est lié de façon covalente au nanotube de carbone, par l'électrooxydation d'au moins une des fonctions amine primaire aliphatique,

ledit au moins un récepteur est lié de façon covalente au support, par l'électrooxydation d'au moins une des fonctions amine primaire aliphatique, et

ledit nanotube de carbone est lié de façon covalente au support.

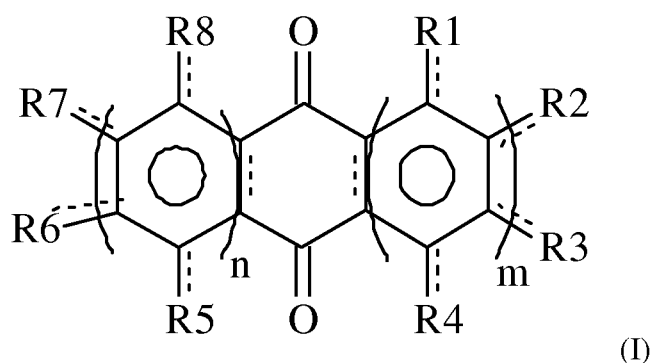
Dans un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le dispositif de détection comprend :

- au moins un transducteur, comprenant une fonction amine primaire aliphatique, liée à une quinone, ou à un dérivé de quinone, par un atome de carbone ou un hétéroatome d'une chaîne carbonée,
- au moins un récepteur possédant une fonction amine primaire aliphatique, et
- un support conducteur électrique,

et dans lequel

ledit au moins un transducteur et ledit au moins un récepteur sont respectivement liés de façon covalente au support par l'électrooxydation d'au moins une de leurs fonctions amine primaire aliphatique,

Conformément à l'invention, le transducteur peut être un composé correspondant à la formule I suivante :



dans laquelle

n est égal à 0 ou 1,

m est égal à 0 ou 1,

R1, R2, R3, R4, R5, et R8 indépendamment les uns des autres, sont choisis parmi : H, O, S, NH₂, NO₂, NH, OH, COOH, SH, et un groupement de 1 à 10 atomes de carbones, linéaire, ramifié, cyclique ou aromatique,

R6 et R7 indépendamment l'un de l'autre sont choisis parmi :

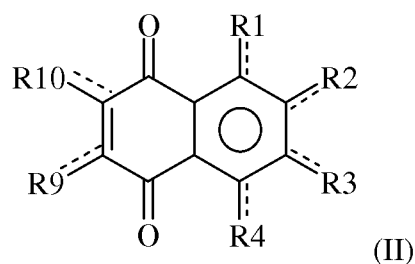
- H, O, S, NH₂, NO₂, NH, OH, COOH, SH,
- un groupement de 1 à 10 atomes de carbones, linéaire, ramifié, cyclique ou aromatique, ou

- un groupe $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{X}$

avec p représentant un nombre entier variant de 0 à 12 et X étant choisi parmi CH₂, O, NH, S, et

les liaisons $\begin{array}{c} | \\ \vdots \\ | \end{array}$, indépendamment les unes des autres, représentent des liaisons covalentes simples ou doubles selon la nature des groupements R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 et R8 et selon les valeurs de m et n.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, le transducteur correspond à la formule II suivante :



dans laquelle

R1, R2, R3, et R4, indépendamment les uns des autres, sont choisis parmi : H, O, S, NH₂, NO₂, NH, OH, COOH, SH et un groupement de 1 à 10 atomes de carbones, linéaire, ramifié, cyclique ou aromatique,

R9 et R10 indépendamment l'un de l'autre sont choisis parmi :

- H, O, S, NH₂, NO₂, NH, OH, COOH, SH,
- un groupement de 1 à 10 atomes de carbones, linéaire, ramifié, cyclique ou aromatique ou,

- un groupe $\text{H}_{2\text{N}} \left(\text{---} \right)_p \text{X}$

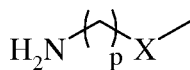
avec p représentant un nombre entier variant de 0 à 12 et X étant choisi parmi CH₂, O, NH, S, et

les liaisons $\begin{array}{c} | \\ \vdots \\ | \end{array}$, indépendamment les unes des autres, représentent des

liaisons covalentes simples ou doubles selon la nature des groupements R1, R2, R3, R4, R9 et R10.

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention l'un au moins

de R₆ et R₇ représente un groupe

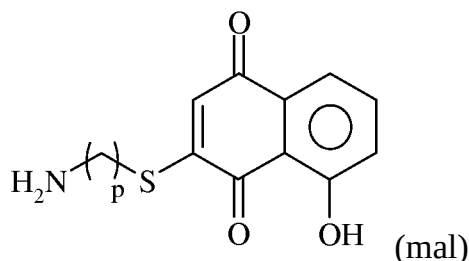


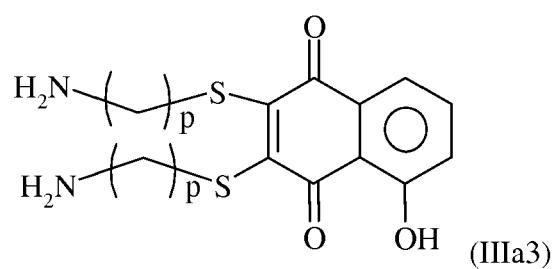
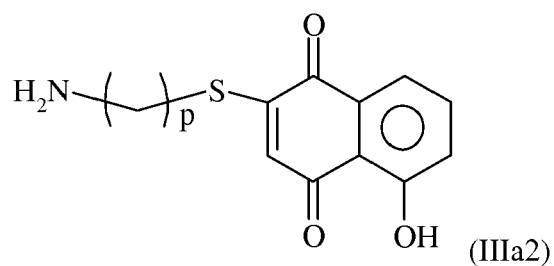
Au sens de la présente invention, on entend par dérivé de quinone, un dérivé de l'une au moins des quinones choisies notamment dans le groupe comprenant les quinones suivantes : 1,4-benzoquinone, 1,4-naphtoquinone et anthraquinone, notamment ceux choisis dans le groupe comprenant l'acide benzoquinonetétracarboxylique, le bicarbonate de tétrahydroxy-1,4-benzoquinone, le bisoxalate de tétrahydroxy-1,4-benzoquinone, le coenzyme Q10, le dianhydride 1,4-benzoquinonetétracarboxylique, la duroquinone, l'idarubicine, lajuglone, la plastoquinone, la 5-amino-1,4-naphtoquinone, la tétrahydroxy-1,4-benzoquinone et la vitamine K.

Au sens de la présente invention, on entend par « un atome de carbone ou un hétéroatome d'une chaîne carbonée », soit un atome de carbone, soit un atome d'azote, de soufre ou d'oxygène appartenant à une chaîne carbonée comprenant entre 1 et 12 atomes de carbone.

Au sens de la présente invention, on entend par groupement de 1 à 10 atomes de carbones, linéaire, ramifié, aromatique ou cyclique une chaîne choisie dans le groupe comprenant notamment le méthyle, l'éthyle, le propyle, l'isopropyle, le n-butyle, l'isobutyle, le t-butyle, le n-pentyle, le n-héxyle, l'heptyle, l'octyle, le nonyle, et le décyle. Ces chaînes carbonées peuvent contenir une ou plusieurs doubles liaisons et on obtient alors des chaînes alcényles droites ou ramifiées. Elles peuvent également être cycliques et comprendre dans la chaîne un cycle choisi parmi les groupes cyclopropyle, cyclobutyle, cyclopentyle et cyclohexyle, ou aromatique et comprendre dans la chaîne un groupe aromatique, comme par exemple un group aryle, en particulier un groupe phényle.

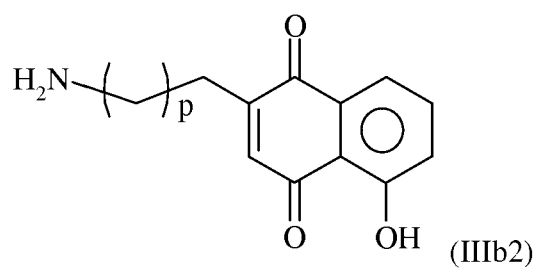
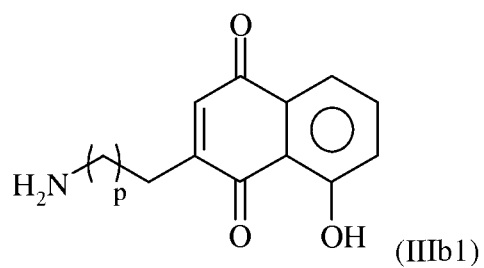
Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, le composé de formule (II) correspond aux composés de formules (IIIa1) à (IIIa3) suivantes :

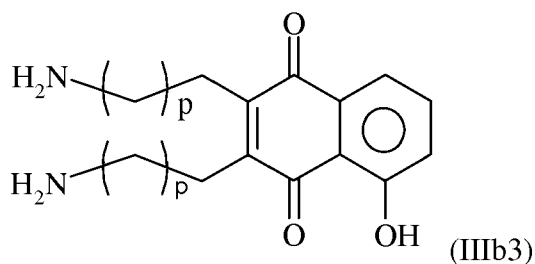




dans lesquelles p est un nombre entier variant de 0 à 12, notamment égal à 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12.

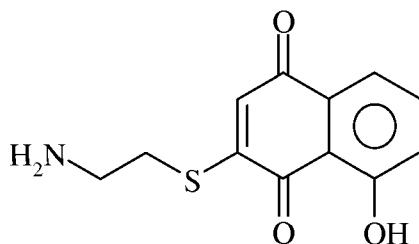
Dans un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le composé de formule (II) correspond aux composés de formules (IIIb1) à (IIIb3) suivantes:



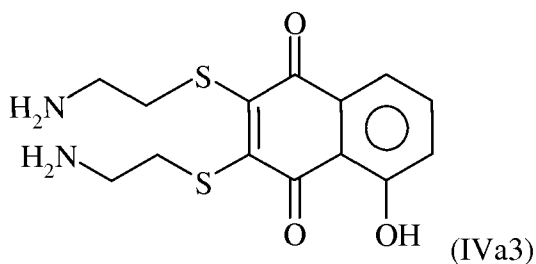
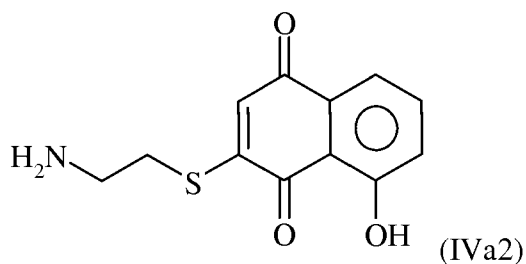


dans lesquelles p est un nombre entier variant de 0 à 12, notamment égal à 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12.

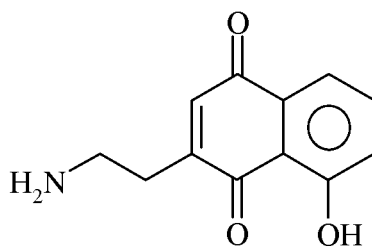
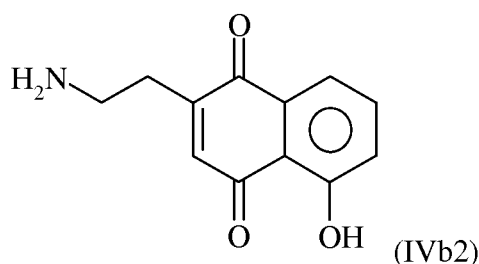
Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, le transducteur correspond à un des composés de formule (IVa1) à (IVa3) suivantes :



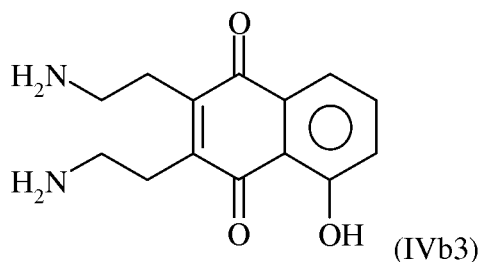
(IVa1) ou JugThioNH₂, ou 3-mercaptoéthylamine-5-hydroxy-1,4-naphtoquinone



Dans un autre mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, le transducteur correspond à un des composés de formule (IVb1) à (IVb3) suivantes :

(IVb1) ou JugNH₂, ou 3-éthylamino-5-hydroxy-1,4-naphtoquinone

(IVb2)



(IVb3)

Les composés de formule (I), (II), (IIIa) à (IIIa3), (IIIb) à (IIIb3), (IVa) à (IVa3) et (IVb) à (IVb3) peuvent être synthétisés par des méthodes connues de l'homme du métier à partir de composés décrits dans la littérature ou disponibles dans le commerce.

Conformément à l'invention, la concentration de transducteur en surface du support, ou du nanotube de carbone, peut être d'environ 10^{-12} à 10^{-8} mol.cm⁻², notamment environ 10^{-12} à 10^{-10} mol.cm⁻², notamment d'environ 10^{-10} à 10^{-8} mol.cm⁻².

Les transducteurs de l'invention permettent de transférer les électrons à des potentiels extrêmement bas, d'environ 0,2 à -1,6 V / ECS (électrode au calomel saturé), notamment d'environ 0 à -1,5 V / ECS, notamment d'environ -0,2 à -1,2 V / ECS, c'est-à-dire des potentiels auxquels les molécules biologiques ne sont ni oxydées, ni réduites. Cela permet d'éliminer tout risque d'interférence comme par exemple les risques d'oxydation ou de réduction parasites de molécules à doser.

Conformément à l'invention, le récepteur est un composé susceptible d'entrer dans un processus d'association sélectif avec un ligand, ledit ligand étant choisi parmi les peptides,

les protéines (protéines de structure qui permettent à la cellule de maintenir son organisation dans l'espace, protéines de reconnaissance comme par exemple des antigènes (par exemple l'ovalbumine dans le couple ovalbumine/anti-ovalbumine, ou le couple HPV/anti-HPV détaillé plus loin) ou les protéines à activité catalytique comme les enzymes, les lipides, les oligosaccharides, les polysaccharides, les oligonucléotides naturels ou artificiels, les oligonucléotides aptamères, les polynucléotides naturels ou artificiels, les acides ribonucléiques, des petites molécules immunogènes comme par exemple des allergènes d'origine protéique ou de bas poids moléculaire tels que les haptènes (isocyanates ou anhydrides), et les petites molécules organiques comme par exemple des produits pharmacologiquement actifs, par exemple des drogues comme les amphétamines, des produits phytosanitaires, comme les herbicides (atrazine etc....), des pesticides ou des polluants. Le récepteur fixé sur le support est spécifique du ligand à détecter, avec lequel il forme avantageusement un couple anti-ligand/ligand.

Conformément à l'invention, la concentration de récepteur en surface du support, ou du nanotube de carbone, est d'environ 10^{-13} à 10^{-9} mol.cm⁻², notamment environ 10^{-13} à 10^{-11} mol.cm⁻², notamment environ 10^{-11} à 10^{-9} mol.cm⁻².

Les dispositifs selon la présente invention permettent de détecter un ligand dans tout type d'échantillon. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'échantillon est un échantillon biologique. Avantageusement, cet échantillon peut avoir été prélevé sur un patient à des fins de diagnostic et peut-être dans ce cas par exemple, de l'urine, du sang, du sérum, du plasma, des extraits cellulaires ou un fluide corporel. L'échantillon peut être également de l'eau dans laquelle ont été dilués les échantillons biologiques.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, le dispositif de détection comprend un nanotube de carbone fonctionnalisé avec au moins une fonction aminé primaire.

Dans un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le nanotube de carbone fonctionnalisé a un diamètre d'environ 5 à 50 nm, notamment d'environ 5 à 20 nm, notamment d'environ 20 à 50 nm, et une longueur 50 à 500 nm.

Conformément à l'invention, la concentration de nanotube de carbone fonctionnalisé à la surface du support est d'environ 10^{-10} à 10^{-14} mol.cm⁻², notamment d'environ 10^{-10} à 10^{-12} mol.cm⁻², notamment d'environ 10^{-12} à 10^{-14} mol.cm⁻².

Conformément à l'invention, le nanotube de carbone fonctionnalisé peut être un nanotube simple- ou multi- paroi, contenant ou pas un catalyseur, de diamètre 5 à 10 nm et de longueur 50 à 200 nm.

Ainsi le nanotube de carbone fonctionnalisé peut être un nanotube simple paroi, contenant un catalyseur, de diamètre 5 à 10 nm et de longueur 50 à 200 nm ou un nanotube simple paroi, ne contenant pas de catalyseur, de diamètre 5 à 10 nm et de longueur 50 à 200 nm ou un nanotube multi paroi, contenant un catalyseur, de diamètre 5 à 10 nm et de longueur 50 à 200 nm ou un nanotube multi paroi, ne contenant pas de catalyseur, de diamètre 5 à 10 nm et de longueur 50 à 200 nm.

Conformément à l'invention, tout support conducteur électrique connu de l'homme du métier peut être utilisé, en particulier ceux en matériau conducteur ou semi-conducteur ayant une résistivité comprise entre 10^6 et 10^{-10} Ohm.m, notamment 10^4 et 10^{-8} Ohm.m, notamment 10^3 et 10^{-8} Ohm.m.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, le support est macroscopiquement plan et macroscopiquement lissé, poreux ou rugueux. Il peut être rigide ou souple et être constitué d'un seul matériau (support massif) ou de plusieurs matériaux (support multi matériaux).

Conformément à l'invention, ce support peut être obtenu par toute technique connue de l'homme du métier, notamment par impression sérigraphiée, ou par toute méthode de dépôt d'un conducteur électrique sur une surface quelconque.

Le support peut être choisi parmi les métaux, le carbone vitreux, les encres conductrices déposées sur support et les métaux déposés sur support. On peut notamment citer à titre d'exemples de supports, les électrodes métalliques massives et les électrodes obtenues par dépôt d'un conducteur électrique sur un support isolant, notamment les électrodes obtenues par procédés d'imprimerie, notamment de lithographie, de sérigraphie ou de jet d'encre.

L'invention a également pour objet, un procédé de préparation d'un dispositif de détection comprenant un support, un transducteur, un récepteur, et éventuellement un nanotube de carbone fonctionnalisé, et caractérisé en ce que ledit procédé comprend :

- au moins une étape de greffage du transducteur sur le support ou le nanotube de carbone, ledit greffage étant la création d'une liaison covalente par l'électrooxydation d'une aminé primaire aliphatique, fonctionnalisant ledit transducteur, sur respectivement ledit support ou ledit nanotube de carbone,

- au moins une étape de greffage du récepteur sur le support ou le nanotube de carbone éventuellement fonctionnalisé, ledit greffage étant la création d'une liaison covalente par l'électrooxydation d'une aminé primaire aliphatique, fonctionnalisant ledit récepteur, sur respectivement ledit support ou ledit nanotube de carbone éventuellement fonctionnalisé, et

- éventuellement une étape de greffage du nanotube de carbone sur le support, ledit greffage étant la création d'une liaison covalente par l'électrooxydation d'une amine primaire aliphatique fonctionnalisant ledit nanotube de carbone, sur ledit support.

Lorsque le dispositif selon l'invention ne comprend pas de tube de carbone, alors le procédé de préparation d'un tel dispositif comprenant un support, un transducteur et un récepteur, comprend :

- au moins une étape de greffage du transducteur sur le support, ledit greffage étant la création d'une liaison covalente par l'électrooxydation d'une amine primaire aliphatique, fonctionnalisant ledit transducteur, sur ledit support,

- au moins une étape de greffage du récepteur sur le support, ledit greffage étant la création d'une liaison covalente par l'électrooxydation d'une amine primaire aliphatique, fonctionnalisant ledit récepteur, sur ledit support.

Lorsque le transducteur est greffé sur le nanotube, alors le procédé de préparation d'un dispositif de détection selon l'invention comprenant un support, un transducteur, un récepteur, et un nanotube de carbone fonctionnalisé, comprend :

- au moins une étape de greffage du transducteur sur le nanotube de carbone, ledit greffage étant la création d'une liaison covalente par l'électrooxydation d'une amine primaire aliphatique, fonctionnalisant ledit transducteur, sur ledit nanotube de carbone,

- au moins une étape de greffage du récepteur sur le support, ledit greffage étant la création d'une liaison covalente par l'électrooxydation d'une amine primaire, de préférence une amine primaire aliphatique, fonctionnalisant ledit récepteur, sur ledit support, et

- au moins une étape de greffage du nanotube de carbone sur le support, ledit greffage étant la création d'une liaison covalente par l'électrooxydation d'une amine primaire aliphatique, fonctionnalisant ledit nanotube de carbone, sur ledit support.

Lorsque le récepteur est greffé sur le nanotube, alors le procédé de préparation d'un dispositif de détection comprenant un support, un transducteur, un récepteur, et un nanotube de carbone fonctionnalisé comprend :

- au moins une étape de greffage du transducteur sur le support, ledit greffage étant la création d'une liaison covalente par l'électrooxydation d'une amine primaire aliphatique, fonctionnalisant ledit transducteur, sur ledit support,

- au moins une étape de greffage du récepteur sur le nanotube de carbone, ledit greffage étant la création d'une liaison covalente par l'électrooxydation d'une amine primaire, de préférence une amine primaire aliphatique, fonctionnalisant ledit récepteur, sur ledit nanotube de carbone et

- au moins une étape de greffage du nanotube de carbone sur le support, ledit greffage étant la création d'une liaison covalente par l'électrooxydation d'une aminé primaire aliphatique, fonctionnalisant ledit nanotube de carbone, sur ledit support.

Lorsque le récepteur et le transducteur sont greffés sur un nanotube, alors le procédé de préparation d'un dispositif comprenant un support, un transducteur, un récepteur, et un nanotube de carbone fonctionnalisé, comprend :

- au moins une étape de greffage du transducteur sur le nanotube de carbone, ledit greffage étant la création d'une liaison covalente par l'électrooxydation d'une aminé primaire aliphatique, fonctionnalisant ledit transducteur, sur ledit nanotube de carbone,

- au moins une étape de greffage du récepteur sur le nanotube de carbone, ledit greffage étant la création d'une liaison covalente par l'électrooxydation d'une aminé primaire aliphatique, fonctionnalisant ledit récepteur, sur ledit nanotube de carbone et

- au moins une étape de greffage du nanotube de carbone sur le support, ledit greffage étant la création d'une liaison covalente par l'électrooxydation d'une aminé primaire aliphatique, fonctionnalisant ledit nanotube de carbone fonctionnalisé, sur ledit support.

La fixation du transducteur par une liaison covalente indique que celui-ci n'est pas polymérisé et ne peut pas former de polymère ce qui donne la possibilité de les obtenir sous forme de couches minces qui confèrent aux systèmes selon l'invention de sérieux avantages par rapport aux systèmes connus de l'état de la technique.

Conformément à l'invention, le solvant utilisé dans le procédé mentionné précédemment peut être un solvant aqueux acide ou neutre, notamment une solution aqueuse acide tamponnée ou non, en particulier une solution aqueuse saline neutre tamponnée ou non. A titre d'exemple de solvant, on peut citer notamment le PBS (tampon phosphate salin - phosphate buffer saline), le tampon TRIS (trihydroxyméthylaminométhane), ou le tampon HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique).

Conformément à l'invention, le solvant utilisé dans le procédé mentionné précédemment peut être un solvant organique choisi dans le groupe comprenant l'acétonitrile, le diméthylformamide (DMF), le tétrahydrofurane (THF), le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le chloroforme.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le solvant peut être un mélange d'au moins un solvant aqueux et d'au moins un solvant organique.

Le solvant aqueux ou organique peut être additionné d'ions électrolytiques choisis dans le groupe comprenant K^+ , Li^+ , ClO_4^- , NBu_4^+ , BF_4^- , Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , HSO_4^- , $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} , Mg^{2+}

Les réactions de greffage sont avantageusement réalisées à une température comprise entre environ 5°C et environ 40°C, notamment entre environ 10°C et environ 35°C, en particulier entre environ 15°C et environ 25°C.

Dans un mode de réalisation avantageux du procédé de l'invention, la concentration de transducteur par rapport à la surface du support, est d'environ 10^{-8} à 10^{-12} mol.cm⁻², notamment d'environ 10^{-8} à 10^{-10} mol.cm⁻², notamment d'environ 10^{-10} à 10^{-12} mol.cm⁻², lors de l'étape de greffage du transducteur respectivement sur le support, ou sur le nanotube de carbone fonctionnalisé.

Dans un autre mode de réalisation avantageux du procédé de l'invention la concentration de récepteur par rapport à la surface de support, ou de nanotube de carbone fonctionnalisé, est d'environ 10^{-13} à 10^{-9} mol.cm⁻², notamment d'environ 10^{-13} à 10^{-11} mol.cm⁻², notamment d'environ 10^{-11} à 10^{-9} mol.cm⁻², lors de l'étape de greffage du récepteur respectivement sur le support, ou sur le nanotube de carbone fonctionnalisé.

Dans un mode de réalisation avantageux du procédé de l'invention, la concentration de nanotube de carbone fonctionnalisé par rapport à la surface de support est d'environ 10^{-11} à 10^{-14} mol.cm⁻², notamment d'environ 10^{-11} à 10^{-12} mol.cm⁻², notamment d'environ 10^{-12} à 10^{-14} mol.cm⁻², lors de l'étape de greffage du nanotube de carbone fonctionnalisé sur le support.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, le potentiel d'oxydation électrochimique appliqué au support, ou au nanotube de carbone fonctionnalisé, lors de l'étape de greffage du transducteur respectivement sur ledit support, ou sur ledit nanotube de carbone fonctionnalisé, est d'environ 0 à 1,5 V/ECS, notamment d'environ 0 à 1 V/ECS, notamment d'environ 0,3 à 0,7 V/ECS.

Dans un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le potentiel d'oxydation électrochimique appliqué au support, ou au nanotube de carbone fonctionnalisé, lors de l'étape de greffage du récepteur respectivement sur ledit support, ou sur ledit nanotube de carbone fonctionnalisé, est d'environ 0 à 1,5 V/ECS, notamment d'environ 0 à 1 V/ECS, notamment d'environ 0,3 à 0,7 V/ECS.

Dans un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le potentiel d'oxydation électrochimique appliqué au support, lors de l'étape de greffage du nanotube de carbone fonctionnalisé sur ledit support, est d'environ 0 à 1,5 V/ECS, notamment d'environ 0 à 1 V/ECS, notamment d'environ 0,3 à 0,7 V/ECS.

La durée d'application du potentiel d'oxydation électrochimique appliqué au support, ou au nanotube de carbone fonctionnalisé, lors des différentes étapes de greffage, relève des connaissances générales de l'homme du métier qui saura l'adapter en fonction des potentiels

utilisés. A titre d'exemple la durée d'application peut être d'environ 0,1 à 3600 secondes, notamment d'environ 0,1 à 600 secondes, notamment d'environ 5 à 60 secondes.

Dans un mode particulièrement avantageux de l'invention, le procédé de préparation d'un dispositif de détection comprenant un support, un transducteur, et un récepteur, est caractérisé en ce que le support est une électrode sérigraphiée, et en ce que les étapes de greffage du récepteur et du transducteur sur ladite électrode sérigraphiée sont réalisés

- durant environ 10 secondes à environ 120 secondes, notamment environ 30 secondes à environ 90 secondes, particulièrement environ 60 secondes,

- à un potentiel d'environ 0,1 V à environ 2 V, notamment environ 0,5 V à environ 1 V, particulièrement environ 0,7 V, et

- à une température d'environ 10°C à environ 35°C, notamment d'environ 15°C à environ 25°C, particulièrement environ 20°C.

La présente invention a également pour objet un dispositif de détection susceptible d'être obtenu selon la mise en œuvre d'un procédé selon l'invention.

La combinaison entre l'électrooxydation d'une amine aliphatique primaire portée par des dérivés de quinones, ou portée par un nanotube de carbone fonctionnalisé par un dérivé de quinone et formant ainsi ledit « transducteur » et la transduction électrochimique directe de la reconnaissance moléculaire entre un analyte et sa sonde immobilisée sur ledit « transducteur », permet d'aboutir à la transduction électrochimique directe d'une reconnaissance moléculaire à partir d'une couche mince électroactive composée de dérivés de quinone greffés de manière covalente sur l'électrode par l'intermédiaire d'une amine primaire aliphatique électrooxydée.

Aussi la présente invention a également pour objet l'utilisation d'un dispositif de détection tel que décrit précédemment pour la mise en œuvre d'une méthode de détection d'un ligand du récepteur dans un milieu de détection, par observation d'une modification significative de l'électro-activité du transducteur par une méthode de mesure électrochimique.

Au sens de la présente invention, le milieu de détection peut être tout type de solution, par exemple de l'urine, du sang, du sérum, du plasma, des extraits cellulaires, un fluide corporel ou de l'eau dans laquelle ont été dilués les échantillons biologiques.

Au sens de la présente invention, une modification significative de l'électro-activité du transducteur correspond à un rapport signal sur bruit de 3 ou plus.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, la méthode de détection d'un ligand comprend :

- une étape de mise en contact dudit ligand avec un dispositif de détection tel que décrit précédemment dans un milieu de détection,
- une étape d'application d'un potentiel électrique au dit dispositif de détection et
- une étape de détection, par une méthode de mesure électrochimique de la présence dudit ligand dans le milieu de détection, par observation d'une modification de l'électroactivité du transducteur compris dans le dispositif de détection.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, le milieu de détection comprend une solution aqueuse, notamment une solution aqueuse neutre tamponnée ou non.

La mesure électrochimique peut être réalisée par toute technique connue de l'homme du métier, notamment par une méthode choisie dans le groupe comprenant la chronoampérométrie, la voltamétrie cyclique, la voltamétrie à vagues carrées et toute autre voltamétrie puisée, ou encore la spectroscopie d'impédance électrochimique.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, la détection est effectuée par le transducteur contenu dans le dispositif de détection, sans ajout de réactif dans le milieu de détection et sans modification du ligand, On parle alors de transduction directe.

La méthode de détection selon l'invention permet de détecter un ligand choisi parmi :

- un peptide,
- une protéine de structure
- une protéine de reconnaissance (Antigène/Anticorps)
- une protéine à activité catalytique (enzyme)
- un oligonucléotide,
- un polynucléotide,
- un oligonucléotide aptamère,
- un acide ribonucléique,
- un oligosaccharide,
- un polysaccharide,
- un composé pharmacologiquement actif,
- un composé phytosanitaire,
- une petite molécule immunogène.

Elle permet de détecter un ligand présent à une concentration d'environ 300 fmol.L^{-1} à environ 1 mmol.L^{-1} , notamment d'environ 1 pmol.L^{-1} à environ $1 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, notamment d'environ 10 pmol.L^{-1} à environ 100 nmol.L^{-1}

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, le potentiel appliqué au support lors de la détection d'un ligand est d'environ 0,2 à -1,6 V / ECS, notamment d'environ 0 à -1,5 V / ECS, notamment d'environ -0,2 à -1,2 V / ECS.

Les exemples 1 à 7 et les figures 1 à 17 qui suivent illustrent l'invention.

La figure 1 illustre le courant enregistré lors de l'application d'un potentiel de +0,7 V / ECS à l'électrode WORK pendant 30 s conformément à l'exemple 2.

La figure 2 représente le courant enregistré lorsque l'électrode WORK est balayée par un potentiel de 0 à +0,7 V / ECS conformément à l'exemple 2.

La figure 3 est un voltammogramme cyclique d'une électrode modifiée par électro-greffage par JugThioNH₂ (courbe a), et d'une électrode n'ayant pas subi d'électro-greffage (courbe b) conformément à l'exemple 2.

La figure 4 représente la caractérisation électrochimique d'une électrode modifiée par une monocouche de JugThioNH₂, en milieu PBS selon l'exemple 2. (a) Tracés des courants de pics anodique et cathodique en fonction de la vitesse de balayage ; (b) Tracés des courants de pics anodique et cathodique en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage.

La figure 5 est le spectre PM-IRRAS effectué sur une électrode après oxydation dans une solution de JugThioNH₂. (b) Spectre IRTF classique réalisé par transmission sur une pastille de JugThioNH₂ dans KBr.

La figure 6 représente les voltammogrammes cycliques d'une électrode modifiée par électro-greffage de HPV-16-L1-31 1-325, pour différentes concentrations de cet oligopeptide en solution. (a) 10.10⁻⁶ M ; (b) 1.10⁻⁶ M ; (c) 5.10⁻⁷ M ; (d) 2,5.10⁻⁷ M ; (e) pas d'oligopeptide en solution conformément à l'exemple 3.

La figure 7 représente les voltammogrammes cycliques : (a) d'une électrode modifiée par électro-greffage de HPV-16-L1-31 1-325 à une concentration 2,5.10⁻⁷ M puis incubée dans une solution de PBS contenant l'anticorps anti-HPV-16 ; (b) même électrode, avant incubation avec l'anticorps ; (c) même électrode, avant électro-greffage de l'oligopeptide conformément à l'exemple 4.

La figure 8A représente les voltammogrammes obtenus par voltamétrie à vagues carrées (SWV) d'une électrode modifiée par JUGNH₂ 5.10⁻⁴M (trait plein) ; sur laquelle est ensuite greffée la sonde HPV-16-L1 5.10⁻⁸M à +0,5 V pendant 50s (trait discontinu) ; puis incubée dans du PBS pendant 4h à 37°C (pointillés) conformément à l'exemple 4. La figure 8B représente les voltammogrammes obtenus par voltamétrie à vagues carrées SWV d'une électrode modifiée par JUGNH₂ 5.10⁻⁴M (trait plein) ; sur laquelle est ensuite greffée la sonde

HPV-16-L1 $5.10^{-8}M$ à +0,5 V pendant 50s (trait discontinu) ; puis incubée dans une solution de PBS + antiHPV à $5,4.10^{-10}M$ pendant 4h à 37°C (pointillés) conformément à l'exemple 4.

La figure 9 illustre la sensibilité du système. 9A représente la courbe de calibration en échelle linéaire, et 7B représente la courbe de calibration en échelle logarithmique, mesurée dans les conditions de l'exemple 4.

La figure 10 représente les voltammogrammes cycliques entre 0 V et +0,6 V/ECS d'une électrode plongée dans une solution de PBS contenant $5.10^{-6}M$ d'ODN GEM- C_6-NH_2 conformément à l'exemple 5.

La figure 11 représente les voltammogrammes cycliques entre -0,2 V et +0,4 V/ECS d'une électrode plongée dans une solution de PBS contenant le couple ferri-ferro, soit $K_4Fe(CN)_6$ $10^{-3}M$ et $K_3Fe(CN)_6$ $10^{-3}M$ conformément à l'exemple 5. La courbe (a) correspond à une électrode modifiée par électro-greffage de l'ODN GEM- C_6-NH_2 . La courbe (b) correspond à une électrode ayant seulement été trempée dans la solution de GEM- C_6-NH_2 , sans électro-greffage.

La figure 12 représente les voltammogrammes obtenus par voltamétrie à vagues carrées (SWV) d'une électrode (a) modifiée par JugThio NH_2 , et (b) modifiée à la fois par JugThio NH_2 et par GEM- C_6-NH_2 conformément à l'exemple 6.

La figure 13 représente les voltammogrammes obtenus par voltamétrie à vagues carrées (SWV) d'une électrode modifiée par JUG- NH_2 et par GEM- C_6-NH_2 . (GEM) : avant hybridation ; (HIV) : après hybridation avec le brin cible complémentaire ; (MHIV) : après ajout d'un brin cible non-complémentaire conformément à l'exemple 6.

La figure 14 représente le voltammogramme cyclique d'une électrode initialement nue, puis sur laquelle sont greffés les CNT-JUG- NH_2 conformément à l'exemple 7. Vitesse de balayage = $50 mV.s^{-1}$. Milieu PBS, pH 7,2.

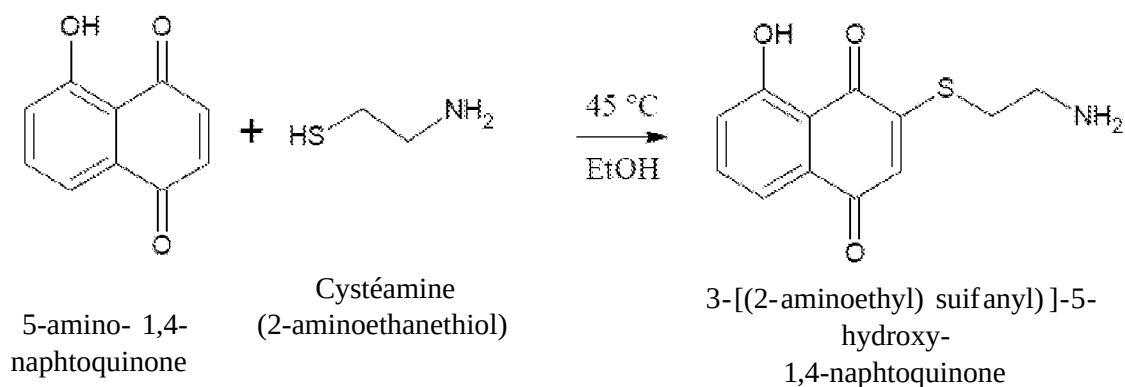
La figure 15 représente les voltammogrammes cycliques d'une électrode modifiée par SWCNT-JUG- NH_2 avant (trait plein) et après (trait pointillé) greffage par la sonde oligonucléotidique GEM conformément à l'exemple 7.

La figure 16 représente les voltammogrammes obtenus par voltamétrie à vagues carrées (SWV) d'une électrode modifiée par SWCNT-JUG- NH_2 et par la sonde GEM conformément à l'exemple 7. Trait continu : avant hybridation ; Trait pointillé : après hybridation avec le brin cible complémentaire HIV.

La figure 17 représente les voltammogrammes obtenus par voltamétrie à vagues carrées (SWV) d'une électrode modifiée par SWCNT-JUG- NH_2 et par la sonde GEM

conformément à l'exemple 7. Trait continu : avant hybridation ; Trait pointillé : après incubation avec le brin non-complémentaire RAND.

EXEMPLE 1: SYNTHÈSE DE LA 3-[(2-AMINOETHYL)SULFANYL]-5-HYDROXY-1,4-NAPHTHOQUINONE



450 mg ($2,6 \cdot 10^{-3}$ moles) de 5-hydroxy-1,4-naptoquinone (Juglone) sont dissous dans 25 mL d'éthanol. La solution est placée sous ultrasons pendant 10 minutes puis chauffée sous agitation jusqu'à 45°C. Une solution contenant 174 mg ($2,26 \cdot 10^{-3}$ moles) de cystéamine (2-aminoethanethiol) dans 10 mL d'éthanol est alors ajoutée. Après 10 minutes de réaction, le chauffage et l'agitation sont arrêtés. La solution est ensuite placée à -18°C pendant 48 heures, puis lavée par de l'éthanol froid (-18°C) sous filtration sous vide, et le solide récupéré.

On obtient 250 mg environ de produit sous forme d'un solide de couleur orangée.

Le produit est ensuite purifié par recristallisation dans l'éthanol, puis analysé par RMN. On obtient en ¹H RMN (CDCl₃) δ ppm : 14,54 (1 H) ; 7,59 - 7,40 - 7,16 (3H_{Ar}) ; 6,60 (1H_{ar}) ; 4,31 (2H-CH₂) ; 3,00 (2H-CH₂) ; aminé non visible en RMN mais visible en IRTF (Figure 5).

EXEMPLE 2 : ELECTRO-GREFFAGE DE LA 3-[(2-AMINOETHYL)SULFANYL)]-5-HYDROXY-1,4-NAPHTOQUINONE (JugThioNH₂)

2.1. Greffage

2.1.1. Mode opératoire

La 3-[(2-aminoethyl)sulfanyl]-5-hydroxy-1,4-naphtoquinone (JugThioNH₂) est dissoute à la concentration de 5.10⁻⁴ M dans 20 mL d'une solution d'acétonitrile (ACN) ou de diméthylformamide (DMF) + LiClO₄ 5.10⁻² M. La solution est introduite dans une cellule électrochimique classique à 3 électrodes (référence (REF), auxiliaire (AUX), de travail

(WORK)). La REF est une électrode à calomel saturé (ECS). Un potentiel de +0,7 V / ECS ou un balayage de potentiel entre 0 et 0,7 V, à 50 mV.s^{-1} est imposé à la WORK pendant 30 s, et le courant est enregistré.

A l'issue de l'un ou l'autre de ces traitements, l'électrode WORK est rincée à l'acétonitrile ou au diméthylformamide (DMF), puis séchée par un courant d'argon.

2.1.2. Résultats

Ils sont donnés dans les figures 1 et 2.

La figure 1 correspond au courant mesuré pendant l'électrooxydation potentiostatique à +0,7 V, dans les conditions décrites au point 2.1.2, et présente l'allure caractéristique de ce type de procédure.

La figure 2 correspond quant à l'oxydation par 6 balayages cycliques de potentiels, dans les conditions décrites au point 2.1.2. On note la présence d'un courant d'oxydation décroissant régulièrement, témoignage du dépôt progressif de la JugThioNH₂ sur la surface.

2.2. Mise en évidence du greffage

2.2.1. Caractérisations électrochimiques

2.2.1.1. Mode opératoire

L'électrode WORK (figure 3, courbe a) modifiée par électrooxydation, comme indiqué dans l'exemple 1.1.2 est introduite dans une cellule électrochimique classique à 3 électrodes contenant une solution de tampon phosphate (PBS, Phosphate Buffer Saline) de pH 7,4, puis un balayage de potentiel aller-retour est imposé entre 0 V et -0,65 V/ECS à 50 mV.s^{-1} . Le courant est enregistré et représenté sur la figure 3, courbe (a).

Comme référence, la courbe (b) correspond à une autre électrode WORK (notée b) auparavant trempée dans une solution de JugThioNH₂ mais n'ayant été soumise à aucun potentiel d'oxydation (tout autre paramètre étant identique par ailleurs).

2.2.1.2. Résultats

Ils sont donnés dans les figures 3 à 5.

L'électrode non soumise à un potentiel ne donne qu'un signal capacitif et aucun signal faradique (figure 3, courbe b).

En revanche, les résultats montrent l'électroactivité bien définie de l'électrode préparée selon l'invention (figure 3, courbe a) dans la zone d'électroactivité de la JugThioNH₂. Ceci montre le greffage de JugThioNH₂ sur la surface de l'électrode.

La densité surfacique de JugThioNH₂ électroactive a été mesurée par intégration des courants faradiques, et est égale à $1,9 \pm 0,3 \times 10^{-10}$ mol cm⁻². Cette valeur est à comparer avec celle obtenue dans le cas de la formation de monocouches auto-assemblées de juglone modifiée par un groupement alkylthiol (G. March et al, JACS 2008, 130,15752), pour lesquelles la densité surfacique a été mesurée à $2,2 \pm 0,3 \times 10^{-10}$ mol cm⁻². La couche électrodéposée de JugThioNH₂ est donc assimilable à une monocouche.

Une dernière caractérisation électrochimique permet de confirmer que la surface est modifiée par une monocouche de JugThioNH₂. En effet, les potentiels des pics (anodique, à -0,5 V/ECS et cathodique à -0,55 V/ECS) sont indépendants de la vitesse de balayage. D'autre part, leurs intensités varient linéairement avec la vitesse de balayage (cf. Figure 4 a) et non pas linéairement en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage (cf. Figure 4 b), ce qui est un comportement classique d'une électrode modifiée par une monocouche. Le courant est limité par le transfert électronique entre la monocouche électroactive et le substrat d'électrode, et non par la diffusion d'une espèce à l'intérieur de la couche organique.

2.2.2. Caractérisation spectroscopique

2.2.2.1. Mode opératoire

Une analyse de surface par spectroscopie infrarouge à modulation de polarisation (PM-IRRAS) a été utilisée afin de démontrer la présence de JugThioNH₂ sous forme de monocouche à la surface de l'électrode (Figure 5, courbe a) En référence, la courbe b montre le spectre infrarouge de la molécule JugThioNH₂, avant greffage.

2.2.2.2. Résultats

Ils sont donnés dans la figure 5.

La similarité entre les 2 spectres (a) et (b) démontre l'intégrité de la JugThioNH₂ greffée en surface. Les 2 différences marquées concernent la chaîne alkyle, particulièrement visible entre 3000 et 2800 cm⁻¹ sur le spectre PM-IRRAS (ceci probablement du fait de l'orientation de cette chaîne perpendiculairement à la surface d'électrode) et un pic centré à 1100 cm⁻¹, attribuable à la présence d'anions perchlorate ClO₄⁻ utilisés comme électrolyte lors de l'électro-oxydation.

EXEMPLE 3 : ELECTRO-GREFFAGE D'UN OLIGOPEPTIDE. APPLICATION A LA PROTEINE HPV-16-L1.

La protéine L1 est une protéine majeure du virus HPV de type 16. Il est maintenant connu que l'infection par le HPV est un facteur de risque au développement de cancer du col de l'utérus, notamment par les types 16 et 18. L'infection par le HPV-16 engendre la production d'anticorps spécifiques anti-HPV-16. La protéine L1 faisant partie de la capside, enveloppe du génome du virus, les anti-HPV-16 présentent une affinité spécifique pour cette protéine. Cette spécificité est conservée pour certaines séquences courtes de cette protéine, et notamment pour une séquences de 15 acides aminés nommées 311-325, dont la séquence est présentée ci-dessous (N-terminal à gauche):

HPV-16-L1-31 1-325 : Asn-Leu-Ala-Ser-Ser-Asn-Tyr-Phe-Pro-Thr-Pro-Ser-Gly-Ser-Met

L'aminé terminale de l'asparagine (Asn) peut ainsi être utilisée pour l'électro-greffage sur une électrode. Aucun autre acide aminé de cette séquence ne porte d'aminé aliphatique disponible.

3.1. Greffage

3.1.1. Mode opératoire

La séquence HPV-16-L1-31 1-325 est dissoute à la concentration de $5 \cdot 10^{-7}$ M dans 20 mL d'une solution aqueuse neutre de PBS. La solution est introduite dans une cellule électrochimique classique à 3 électrodes (REF, AUX, WORK). La REF est une électrode à calomel saturé (ECS). Un potentiel de +0,5 V / ECS est imposé à la WORK pendant 600 s. A l'issue de ce traitement, l'électrode WORK est rincée à l'eau puis séchée sous un courant d'argon.

3.2 Mise en évidence du greffage

3.2.1. Mode opératoire

Différentes concentrations de l'oligopeptide ont été utilisées, de $0,25 \cdot 10^{-6}$ M à $10 \cdot 10^{-6}$ M. L'électrode WORK modifiée est introduite dans une cellule électrochimique classique à 3 électrodes contenant une solution (appelée ferri/ferro) de $K_4Fe(CN)_6 \cdot 10^{-3}$ M et $K_3Fe(CN)_6 \cdot 10^{-3}$ M dans le PBS, puis lui est imposé un balayage de potentiel entre -0,4 V et +0,5 V/ECS à $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ et le courant enregistré.

Une électrode WORK non modifiée est également utilisée dans les mêmes conditions.

3.2.2. Résultats

Ils sont donnés dans la figure 6.

Ils montrent un blocage électrochimique partiel de l'électrode traitée par la protéine L1, dépendant de la concentration en protéine dans la solution d'électro-greffage, tous paramètres égaux par ailleurs. Ceci démontre le greffage de la protéine L1 à la surface de l'électrode (figure 6 courbes a à d). L'électrode non modifiée (figure 6, courbe e) conserve, elle, l'électroactivité typique de la sonde ferri/ferro mise en solution.

EXEMPLE 4 : CO-ELECTRO-GREFFAGE DE L'OLIGOPEPTIDE HPV-16-L1 ET DU MARQUEUR REDOX JUG-THIO-NH₂. APPLICATION A LA DETECTION D'UN ANTICORPS ANTI-HPV-16.

4.1. Détection indirecte de l'anticorps anti-HPV-16

4.1.1. Mode opératoire

L'anticorps anti-HPV-16 utilisé est un anticorps monoclonal de souris (AbD Serotec, Morphosys, Allemagne).

L'électrode préalablement traitée par électro-greffage de l'oligopeptide HPV-16-L1-311-325 (comme indiqué dans l'Exemple 3) a été incubée 1 h à 37°C dans 5 mL de PBS dans lequel a été ajouté 0,1 · g d'anticorps anti-HPV-16. A l'issue de ce traitement, l'électrode est brièvement rincée au PBS à 37°C, puis plongée dans une solution de $K_4Fe(CN)_6 \cdot 10^{-3}M$ et $K_3Fe(CN)_6 \cdot 10^{-3}M$ dans le PBS. On impose un balayage de potentiel entre -0,4 V et +0,5 V/ECS à 50 mV.s⁻¹ et le courant enregistré.

4.1.2. Résultats

Ils sont donnés dans la figure 7.

La courbe (a) présente la signature rédox du couple ferri-ferro après incubation avec l'anticorps anti-HPV-16, comme exposé ci-dessus.

Deux témoins sont présentés pour comparaison : la même électrode portant l'oligopeptide avant incubation avec l'anti-HPV-16 (courbe b), et la même électrode avant modification par l'oligopeptide HPV-16-L1 (courbe c). La diminution des courants rédox après incubation avec l'anticorps anti-HPV-16 démontre la complexation de l'anticorps sur la surface (par blocage stérique partiel),

4.2. Détection directe de l'anticorps anti-HPV-16

4.2.1. Mode opératoire

Le co-électro-greffage de la sonde HPV-16-L1 et du transducteur JUG est réalisé en deux temps. Premièrement, l'électrode WORK est modifiée par JugThioNH₂, comme décrit dans l'exemple 2. Deuxièmement, cette même électrode est à nouveau modifiée par HPV-16-L1, comme décrit dans l'exemple 3.

Cette fois-ci, aucun couple rédox (ferri/ferro) n'est rajouté en solution, puisque c'est le transducteur immobilisé JUG-Thio-NH₂ qui joue ce rôle. La voltamétrie à vague carrée (SWV) a été utilisée pour caractériser ces greffages successifs.

4.2.2. Résultats

Ils sont donnés dans les figures 8A et 8B.

Figure 8A, la courbe en trait plein montre la réponse électrochimique d'une l'électrode (dans le domaine d'électroactivité du transducteur JUG-Thio-NH₂) non modifiée par la sonde HPV-16-L1. La courbe en trait discontinu montre le résultat obtenu après électrogreffage de la sonde HPV-16-L1 (mais sans anticorps). La courbe en trait pointillé montre le résultat obtenu après incubation d'une électrode non modifiée par HPV-16-L1 avec l'anti-HPV 16, à la concentration de 1.10^{-8} M. Cette courbe montrent l'absence de complexation de l'anticorps anti-HPV-16, lorsque la sonde de complexation est absente.

Figure 8B, la courbe en trait plein montre le résultat obtenu après électrogreffage de la sonde HPV-16-L1 (mais sans anticorps). La courbe en trait discontinu montre le résultat obtenu après incubation de l'électrode modifiée par HPV-16-L1 avec l'anti-HPV 16, à la concentration de 1.10^{-11} M. La courbe en trait pointillé montre le résultat obtenu après incubation de l'électrode modifiée par HPV-16-L1 avec l'anti-HPV 16, à la concentration de 1.10^{-8} M.

La méthode selon l'invention permet donc de mettre en évidence la complexation de l'anticorps sur l'antigène correspondant, sélectivement avec une sensibilité satisfaisante.

4.3. Sensibilité

4.3.1. Mode opératoire

Les conditions sont reprises des résultats ci-dessus. On utilise, pour l'étape d'incubation, l'anti-HPV- 16 à des concentrations croissantes allant de 1.10^{-11} M à 1.10^{-8} M

4.3.2. Résultats

Ils sont donnés dans les figures 9, donnant la variation de courant relative en fonction de la quantité d'anticorps spécifiques ajoutée. Compte-tenu de ces résultats, la sensibilité de la méthode est de l'ordre de 0,1 nM.

EXEMPLE 5 : ELECTRO-GREFFAGE D'UN OLIGONUCLEOTIDE AMINO-MODIFIE

5.1. Greffage

5.1.1. Mode opératoire

On utilise l'oligonucléotide GEM-C6-NH₂ portion de gène TAG du virus HIV et dans lequel une aminé aliphatique primaire est disponible en position terminale 3', sur un espaceur aliphatique C₆ (Eurogentec, Belgique). Il est représenté par la séquence suivante :



L'oligonucléotide (ODN) est dissous à la concentration de 5.10^{-6} M dans 20 mL d'une solution aqueuse neutre de tampon phosphate salin (PBS). La solution est introduite dans une cellule électrochimique classique à 3 électrodes (référence (REF), auxiliaire (AUX), de travail (WORK)). La REF est une électrode à calomel saturé (ECS). Un potentiel de +0,5 V / ECS est imposé à la WORK pendant 300 s. Une autre méthode consiste à imposer un balayage de potentiel en 0 V et 0,6 V/ECS, pendant quelques cycles.

5.1.2. Résultats

Ils sont donnés dans la figure 10.

Un pic irréversible d'oxydation est clairement visible lors du premier balayage (1^{er} cycle), avec un maximum de courant vers +0,43 V/ECS. Lors des cycles suivants, les potentiels de pic se décalent vers la droite et les courants diminuent. Ceci témoigne de l'électro-greffage progressif de l'ODN en surface de l'électrode.

A l'issue de ce traitement, l'électrode WORK est rincée à l'eau puis séchée sous un courant d'argon.

5.2. Mise en évidence du greffage

52.1. Mode opératoire

L'électrode WORK modifiée comme indiqué ci-dessus est introduite dans une cellule électrochimique classique à 3 électrodes contenant une solution de K₄Fe(CN)₆ 10⁻³M et K₃Fe(CN)₆ 10⁻³M dans le PBS, puis lui est imposé un balayage de potentiel entre -0,2 V et +0,4 V/ECS à 50 mV.s⁻¹, et le courant est enregistré.

Une électrode WORK sur laquelle l'ODN sonde n'a pas été électrooxydé est également utilisée dans les mêmes conditions.

5.2.2. Résultats

Les résultats sont donnés dans la figure 11.

Ils montrent un blocage électrochimique partiel de l'électrode traitée par l'ODN (figure 12, courbe a), tandis qu'aucun blocage n'est visible pour l'électrode non traitée par l'ODN (figure 12, courbe b). Ceci témoigne de l'électrogreffage de l'ODN sur la surface de l'électrode.

EXEMPLE 6 : CO-ELECTRO-GREFFAGE D'UN OLIGONUCLEOTIDE AMINO-MODIFIE ($\text{GEM-C}_6\text{-NH}_2$) ET DU TRANSDUCTEUR JUG-THIO- NH_2 . APPLICATION COMME BIOCAPTEUR ELECTROCHIMIQUE A ADN.

Comme pour l'exemple 4, il est possible de co-immobiliser deux molécules différentes. Par exemple, une biomolécule (l'ODN) et une molécule électroactive susceptible de jouer le rôle de transducteur lors d'une reconnaissance moléculaire. La JugThio NH_2 est une molécule électroactive susceptible de jouer le rôle de transducteur lors d'une hybridation entre le brin sonde $\text{GEM-C}_6\text{-NH}_2$ et un brin cible complémentaire.

6.1. Co-greffage

6.1.1. Mode opératoire

Le co-électro-greffage est réalisé en deux temps. Premièrement, l'électrode WORK est modifiée par JugThio NH_2 , comme décrit dans l'exemple 2. Deuxièmement, cette même électrode est à nouveau modifiée par $\text{GEM-C}_6\text{-NH}_2$, comme décrit dans l'exemple 5.

La voltamétrie à vague carrée (SWV) a été utilisée pour caractériser ces greffages successifs.

6.1.2. Résultats

Ils sont donnés dans la figure 12.

La courbe (a) de la figure 12 correspond à une électrode modifiée uniquement par JugThio NH_2 (sans ODN sonde), tandis que la courbe (b) de la figure 12 correspond à l'électrode portant à la fois la sonde $\text{GEM-C}_6\text{-NH}_2$ et la JugThio NH_2 . Les résultats montrent que le greffage du $\text{GEM-C}_6\text{-NH}_2$ modifie légèrement l'électroactivité de la JugThio NH_2 , qui diminue sensiblement.

6.2. Hybridation et caractérisation

6.2.1. Mode opératoire

L'hybridation d'un brin cible complémentaire sur le brin sonde électrogreffé peut être signée par la modification de l'électroactivité du rapporteur électroactif JugThioNH₂.

Le brin complémentaire est ici noté HIV. Un brin portant un mésappariement a également été utilisé, noté MHIV.

HIV : 3' -C GTG GGT AGA GAG AGG AAG A- 5'

MHIV : 3' -C GTG GGT AAA GAG ATG AAG A- 5'

Les conditions d'hybridation sont les suivantes : brins cibles à $0,1 \cdot 10^{-6}$ M dans PBS pendant 2h à 55°C, puis la température est laissée retomber jusqu'à l'ambiante (pour le HIV et le brin MHIV). Les électrodes sont ensuite rincées dans PBS à 37°C pour éliminer l'adsorption non spécifique.

6.2.2. Résultats

Ils sont donnés dans la figure 13.

La courbe notée GEM correspond à l'électrode avant hybridation. Après hybridation avec le brin complémentaire HIV, on observe une augmentation du courant de pic (courbe du haut), tandis que l'ajout d'un brin mésapparié n'engendre pas de variation significative (courbe notée MHIV). Le brin cible complémentaire est donc reconnu sélectivement, par un signal positif.

EXEMPLE 7 : ELECTRO-GREFFAGE DE NANOTUBES DE CARBONE (CNT)

7.1. Mode opératoire

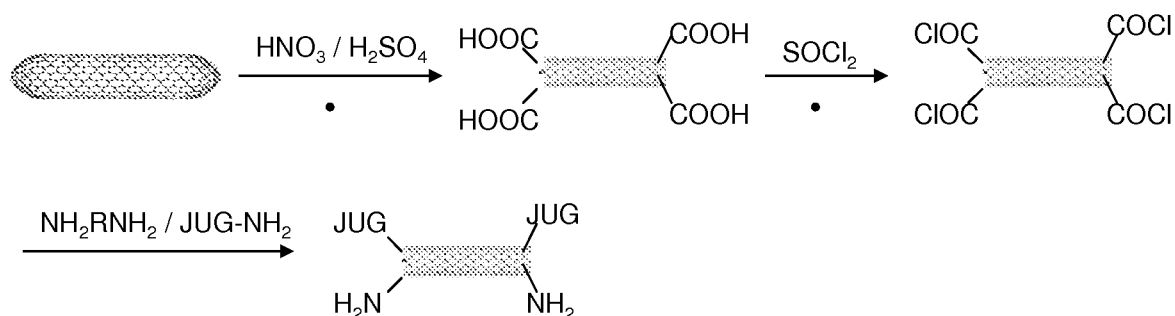
7.1.1. Modification chimique

Les nanotubes de carbone utilisés sont de type mono-parois (SWNT, dia.2-10 nm, longueur 1-5 microns).

Les SWNT sont oxydés dans le mélange d'acide sulfurique et nitrique (3:1) afin d'en réduire la longueur et d'y introduire des fonctions -COOH. Les nanotubes obtenus (SWNT-COOH) sont ensuite traités par SOCl₂ pour transformer les fonctions -COOH en fonctions

-COQ (chlorure d'acyle). Les SWNT-COC1 sont ensuite dispersés dans un mélange de Jug-NH₂ et NH₂-(CH₂)₃-NH₂ (10⁻³M), pour y greffer ces deux molécules.

Le schéma réactionnel de la synthèse des CNT-JUG-NH₂ est le suivant :



Plusieurs aminés aliphatiques sont donc disponibles en surface des CNT.

7.1.2. Greffage et Mise en évidence du greffage

2 mg de CNT-JUG-NH₂ sont mis en suspension dans 20 mL d'une solution de DMF + LiClO₄ 10⁻¹ M. La solution est introduite dans une cellule électrochimique classique à 3 électrodes (REF, AUX, WORK). La REF est une électrode à calomel saturé (ECS). Un potentiel de +0,5 V / ECS est imposé à la WORK pendant 600 s. A l'issue de ce traitement, l'électrode WORK est rincée dans le DMF et l'EtOH, puis séchée sous un courant d'argon. L'électrode est ensuite caractérisée par voltamétrie cyclique, dans un milieu PBS.

7.1.3. Application : détection électrochimique de l'hybridation d'ADN

Les SWCNT-JUG-NH₂ sont utilisés comme des nanoélectrodes individuelles, pour y greffer une sonde d'hybridation, selon une approche sensiblement équivalente à celle exposée dans l'Exemple 6 (les mêmes séquences sonde et cibles sont utilisées : sonde GEM représentée par la séquence suivante : 5' -TCG CAC CCA TCT CTC TCC TTC TAG CCT-3', cibles HIV et non-complémentaire).

Les conditions de greffage sont différentes ; la sonde GEM restant native (n'étant pas modifiée par un groupement aminé), on exploite alors la réactivité du groupe phosphate terminal, pour un couplage avec l'aminé portée par les SWCNT.

L'électrode est plongée dans une solution aqueuse de 2-méthyl-imidazole (MIA) (v/v =1/1) avec 10^{-3} M EDC et 10^{-6} M d'ODN GEM, pendant 12h à 60 °C. L'électrode est ensuite rincée dans le PBS pendant 30 min.

La caractérisation de l'hybridation se fait ensuite par voltammétrie à vague carrée (SWV)

Les conditions d'hybridation sont les suivantes : brins cibles à $0,1 \cdot 10^{-6}$ M dans PBS pendant 2h à 55°C, puis la température est laissée retomber jusqu'à l'ambiante. Les électrodes sont ensuite rincées dans PBS à 37°C pour éliminer l'adsorption non spécifique.

Un contrôle est systématiquement réalisé, en considérant la réponse après incubation dans une solution contenant non pas le brin complémentaire, mais une séquence non-complémentaire aléatoire (RAND). Les conditions d'hybridation sont identiques à celles décrites précédemment.

7.2. Résultats

Ils sont donnés dans les figures 14 à 17

Après électrogreffage des nanotubes de carbone fonctionnalisés par JUG-NH₂, il apparaît un couple rédox fin et réversible entre -0,8 V et -0,35 V, typique du groupe JUG (figure 14).

On observe une nette différence entre le voltammogramme avant (figure 15, courbe en trait plein) et après (figure 15 courbe en trait pointillé), greffage de la sonde GEM. Ceci témoigne des interactions entre la sonde GEM et le transducteur JUG-NH₂.

La figure 16 présente le résultat obtenu après hybridation avec le brin complémentaire HIV, caractérisé par voltammétrie à vague carrée (SWV), La courbe en trait continu présente la réponse de l'électrode avant hybridation, tandis que la courbe pointillée présente la réponse après hybridation, pour laquelle observe une nette augmentation du courant de pic(signal positif). En revanche (résultats exposés sur la figure 17),on n'observe aucune augmentation du courant de pic après incubation avec le brin non complémentaire RAND (courbe en trait plein, avant incubation : courbe en trait pointillé, après incubation). Ceci montre qu'il n'y a pas hybridation. On peut donc dire, d'après les figure 16 et 17, que le brin cible complémentaire est reconnu sélectivement, tandis que le brin non complémentaire n'est pas reconnu.

REVENDICATIONS

1. Dispositif de détection comprenant :

- au moins un transducteur, comprenant une fonction aminé primaire aliphatique liée à une quinone, ou à un dérivé de quinone, par un atome de carbone ou un hétéroatome d'une chaîne carbonée,

- au moins un récepteur possédant une fonction aminé primaire aliphatique,

- éventuellement un nanotube de carbone fonctionnalisé, et

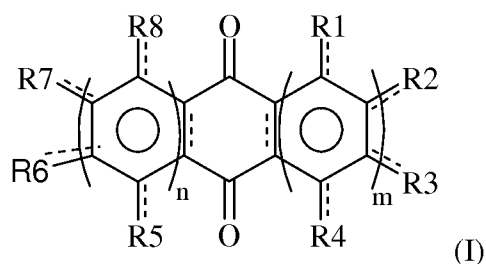
- un support conducteur électrique,

et dans lequel

ledit au moins un transducteur et ledit au moins un récepteur sont respectivement liés de façon covalente au support ou au nanotube de carbone, par l'électrooxydation d'au moins une de leurs fonctions aminé primaire aliphatique, et

ledit nanotube de carbone est lié de façon covalente au support.

2. Dispositif de détection selon la revendication 1, caractérisé en ce que le transducteur est un composé correspondant à la formulé I suivante :



dans laquelle

n est égal à 0 ou 1,

m est égal à 0 ou 1,

R1, R2, R3, R4, R5, et R8 indépendamment les uns des autres, sont choisis parmi : H, O, S, , NO₂, , OH, COOH, SH, et un groupement de 1 à 10 atomes de carbones, linéaire, ramifié, cyclique ou,

R6 et R7 indépendamment l'un de l'autre sont choisis parmi :

- H, O, S, NO₂, OH, COOH, SH,

- un groupement de 1 à 10 atomes de carbones, linéaire, ramifié, ou cyclique,

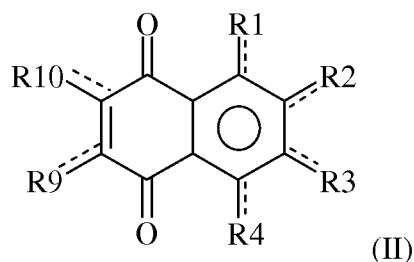
- un groupe $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}$

avec p représentant un nombre entier variant de 0 à 12 et X étant choisi parmi CH_2 , O, NH, S, et

les liaisons — , indépendamment les unes des autres, représentent des liaisons covalentes simples ou doubles selon la nature des groupements RI, R2, R3, R4, R5, R6, R7 et R8 et selon les valeurs de m et n,

à condition que l'un au moins des groupes R6 et R7 représente un groupe $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}$

3. Dispositif de détection selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le transducteur correspond à la formule II suivante :



dans laquelle

RI, R2, R3, et R4, indépendamment les uns des autres, sont choisis parmi : H, O, S, NO_2 , OH, COOH, SH et un groupement de 1 à 10 atomes de carbones, linéaire, ramifié, ou cyclique,

R9 et R10 indépendamment l'un de l'autre sont choisis parmi :

- H, O, S, NO_2 , OH, COOH, SH,
- un groupement de 1 à 10 atomes de carbones, linéaire, ramifié, cyclique ou aromatique, ou

- un groupe $\text{N}^{\frac{3}{4}}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}$

avec p représentant un nombre entier variant de 0 à 12 et X étant choisi parmi CH_2 , O, NH, S, et

les liaisons $\vdots$ indépendamment les unes des autres, représentent des liaisons

covalentes simples ou doubles selon la nature des groupements RI, R2, R3, R4, R9 et RIO.

4. Dispositif de détection selon la revendication 1, caractérisé en ce que le récepteur est un composé susceptible d'entrer dans un processus d'association sélectif avec un ligand, ledit ligand étant choisi parmi les peptides, les protéines, les polynucléotides naturels ou artificiels et les petites molécules organiques d'intérêts biologiques.

5. Dispositif de détection selon la revendication 4, caractérisé en ce que le récepteur est un composé choisi parmi :

- un peptide,
- une protéine de structure
- une protéine de reconnaissance (Antigène/Anticorps)
- une protéine à activité catalytique (enzyme)
- un oligonucléotide,
- un polynucléotide,
- un oligonucléotide aptamère,
- un acide ribonucléique,
- un oligosaccharide,
- un polysaccharide,
- un composé pharmacologiquement actif,
- un composé phytosanitaire,
- une petite molécule immunogène.

6. Dispositif de détection selon la revendication 1 caractérisé en ce que le nanotube de carbone fonctionnalisé est fonctionnalisé avec au moins une fonction aminé primaire aliphatique.

7. Dispositif de détection selon la revendication 1, caractérisé en ce que le support est un matériau conducteur ou semi-conducteur ayant une résistivité comprise entre 10^6 et 10^{-10} Ohm.m, notamment 10^4 et 10^{-8} Ohm.m, notamment 10^3 et 10^{-8} Ohm.m.

8. Dispositif de détection selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le support est choisi parmi les métaux, le carbone vitreux, les encres conductrices déposées sur support et les métaux déposés sur support.

9. Procédé de préparation d'un dispositif de détection comprenant un support, un transducteur, un récepteur, et éventuellement un nanotube de carbone fonctionnalisé, et caractérisé en ce que ledit procédé comprend :

- au moins une étape de greffage du transducteur sur le support ou le nanotube de carbone, ledit greffage étant la création d'une liaison covalente par l'électrooxydation d'une aminé primaire aliphatique fonctionnalisant ledit transducteur, sur respectivement ledit support ou ledit nanotube de carbone

- au moins une étape de greffage du récepteur sur le support ou le nanotube de carbone, ledit greffage étant la création d'une liaison covalente par l'électrooxydation d'une aminé primaire aliphatique fonctionnalisant ledit récepteur, sur respectivement ledit support ou ledit nanotube de carbone, et

- éventuellement une étape de greffage du nanotube de carbone sur le support, ledit greffage étant la création d'une liaison covalente par l'électrooxydation d'une aminé primaire aliphatique fonctionnalisant ledit nanotube de carbone, sur ledit support.

10. Procédé de préparation d'un dispositif de détection selon la revendication 9, caractérisé en ce que la concentration de récepteur par rapport à la surface de support, ou de nanotube de carbone fonctionnalisé, est d'environ 10^{-13} à 10^{-9} mol.cm⁻², notamment d'environ 10^{-13} à 10^{-11} mol.cm⁻², notamment d'environ 10^{-11} à 10^{-9} mol.cm⁻², lors de l'étape de greffage du récepteur respectivement sur le support, ou sur le nanotube de carbone.

11. Procédé de préparation d'un dispositif de détection selon la revendication 9, caractérisé en ce que la concentration de nanotube de carbone fonctionnalisé par rapport à la surface de support est d'environ 10^{-11} à 10^{-14} mol.cm⁻², notamment d'environ 10^{-11} à 10^{-12} mol.cm⁻², notamment d'environ 10^{-12} à 10^{-14} mol.cm⁻², lors de l'étape de greffage du nanotube de carbone fonctionnalisé sur le support.

12. Procédé de préparation d'un dispositif de détection selon la revendication 9 caractérisé en ce que le potentiel d'oxydation électrochimique appliqué au support, ou au nanotube de carbone, lors de l'étape de greffage du transducteur respectivement sur ledit support, ou sur

ledit nanotube de carbone, est d'environ 0 à 1,5 V/ECS, notamment d'environ 0 à 1 V/ECS, notamment d'environ 0,3 à 0,7 V/ECS.

13. Procédé de préparation d'un dispositif de détection selon la revendication 9 caractérisé en ce que le potentiel d'oxydation électrochimique appliqué au support, ou au nanotube de carbone, lors de l'étape de greffage du récepteur respectivement sur ledit support, ou sur ledit nanotube de carbone, est d'environ 0 à 1,5 V/ECS, notamment d'environ 0 à 1 V/ECS, notamment d'environ 0,3 à 0,7 V/ECS.

14. Procédé de préparation d'un dispositif de détection selon la revendication 9 caractérisé en ce que le potentiel d'oxydation électrochimique appliqué au support, lors de l'étape de greffage du nanotube de carbone fonctionnalisé sur ledit support, est d'environ 0 à 1,5 V/ECS, notamment d'environ 0 à 1 V/ECS, notamment d'environ 0,3 à 0,7 V/ECS.

15. Procédé de préparation d'un dispositif de détection selon l'une quelconque des revendications 10, 12 et 13 comprenant un support, un transducteur, et un récepteur, caractérisé en ce que le support est une électrode sérigraphiée, et en ce que les étapes de greffage du récepteur et du transducteur sur ladite électrode sérigraphiée sont réalisés

- durant environ 10 secondes à environ 120 secondes, notamment environ 30 secondes à environ 90 secondes, particulièrement environ 60 secondes,
- à un potentiel d'environ 0,1 V à environ 2 V, notamment environ 0,5 V à environ 1 V, particulièrement environ 0,7 V, et
- à une température d'environ 10°C à environ 35°C, notamment d'environ 15°C à environ 25°C, particulièrement environ 20°C.

16. Dispositif de détection susceptible d'être obtenu selon la mise en œuvre d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 15.

17. Utilisation d'un dispositif de détection selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour la mise en œuvre de la détection d'un ligand du récepteur dans un milieu de détection, par observation d'une modification significative de l'électro-activité du transducteur par une méthode de mesure électrochimique.

18. Utilisation d'un dispositif de détection selon la revendication 17, caractérisé en ce que le ligand détecté est choisi parmi :

- un peptide,
- une protéine de structure
- une protéine de reconnaissance (Antigène/Anticorps)
- une protéine à activité catalytique (enzyme)
- un oligonucléotide,
- un polynucléotide,
- un oligonucléotide aptamère,
- un acide ribonucléique,
- un oligosaccharide,
- un polysaccharide,
- un composé pharmacologiquement actif,
- un composé phytosanitaire,
- une petite molécule immunogène.

19. Utilisation d'un dispositif de détection selon l'une quelconque des revendications 17 et 18, caractérisé en ce que le ligand à détecter est présent à une concentration d'environ 300 fmol.L⁻¹ à environ 1 mmol.L⁻¹, notamment d'environ 1 pmol.L⁻¹ à environ 1 "mol.L⁻¹, notamment d' environ 10 pmol.L⁻¹ à environ 100 nmol.L⁻¹

20. Utilisation d'un dispositif de détection selon l'une quelconque des revendications 17 à 19 caractérisé en ce que le potentiel appliqué au support lors de la détection d'un ligand est d'environ 0,2 à -1,6 V / ECS, notamment d'environ 0 à -1,5 V / ECS, notamment d'environ -0,2 à -1,2 V / ECS.

FIGURE 1

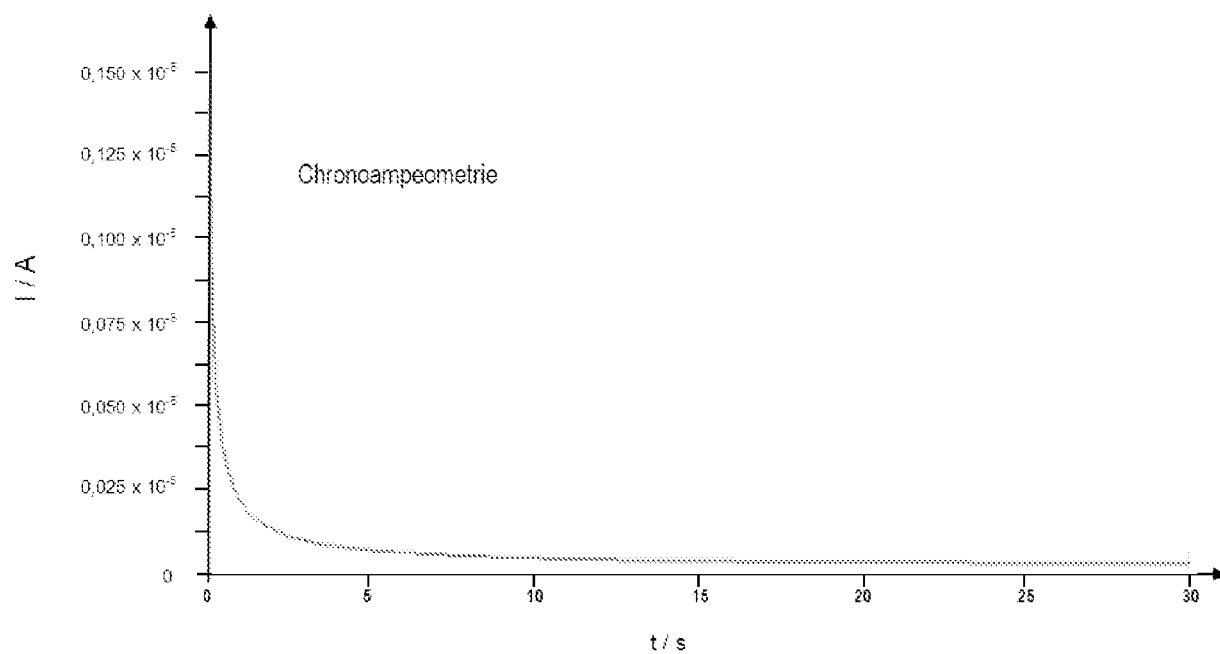


FIGURE 2

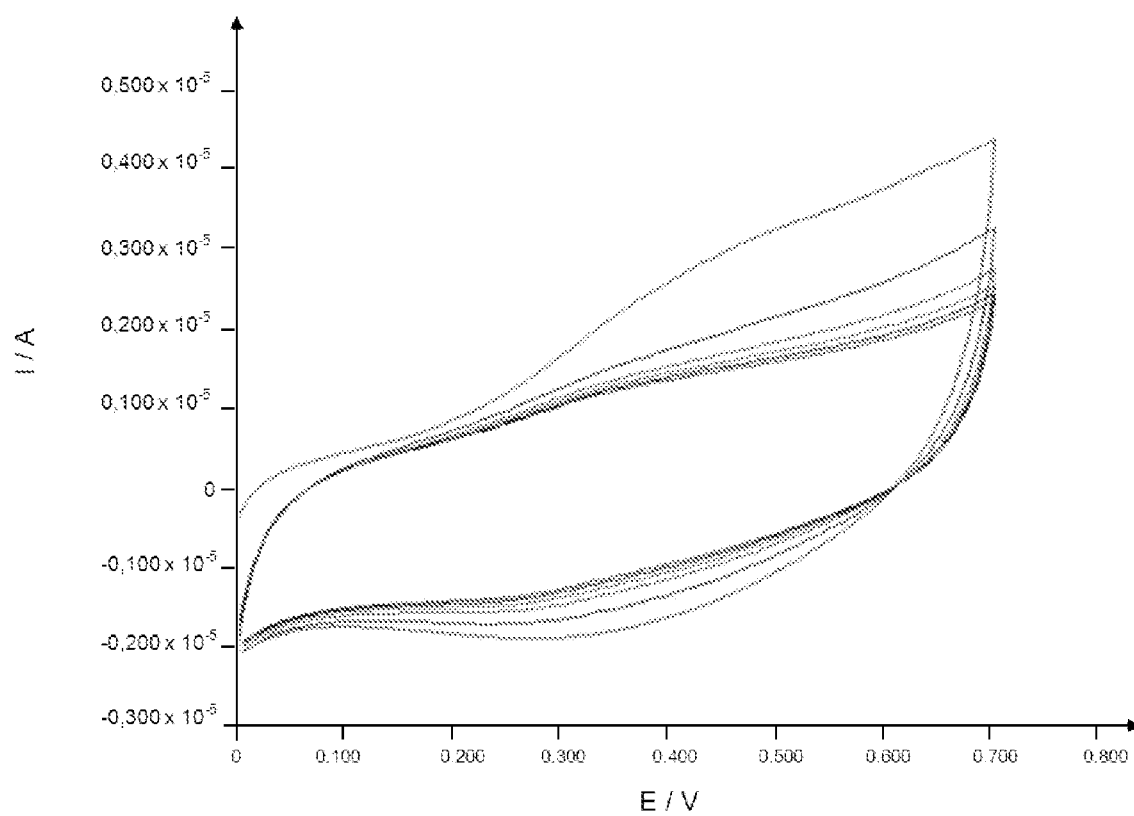


FIGURE 3

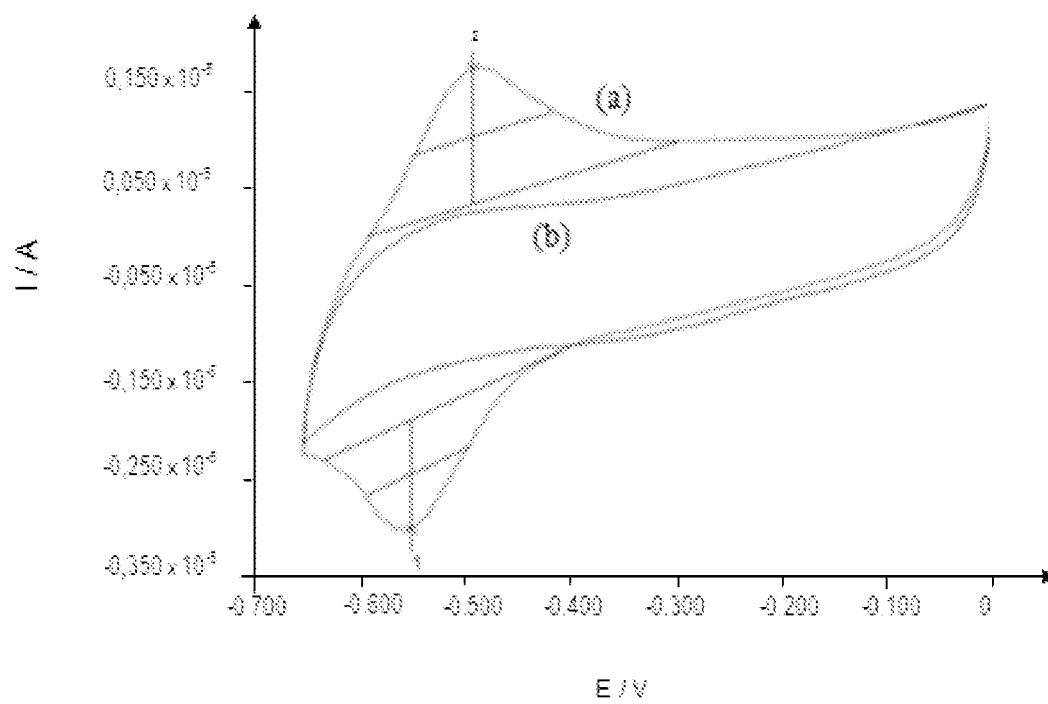


FIGURE 4

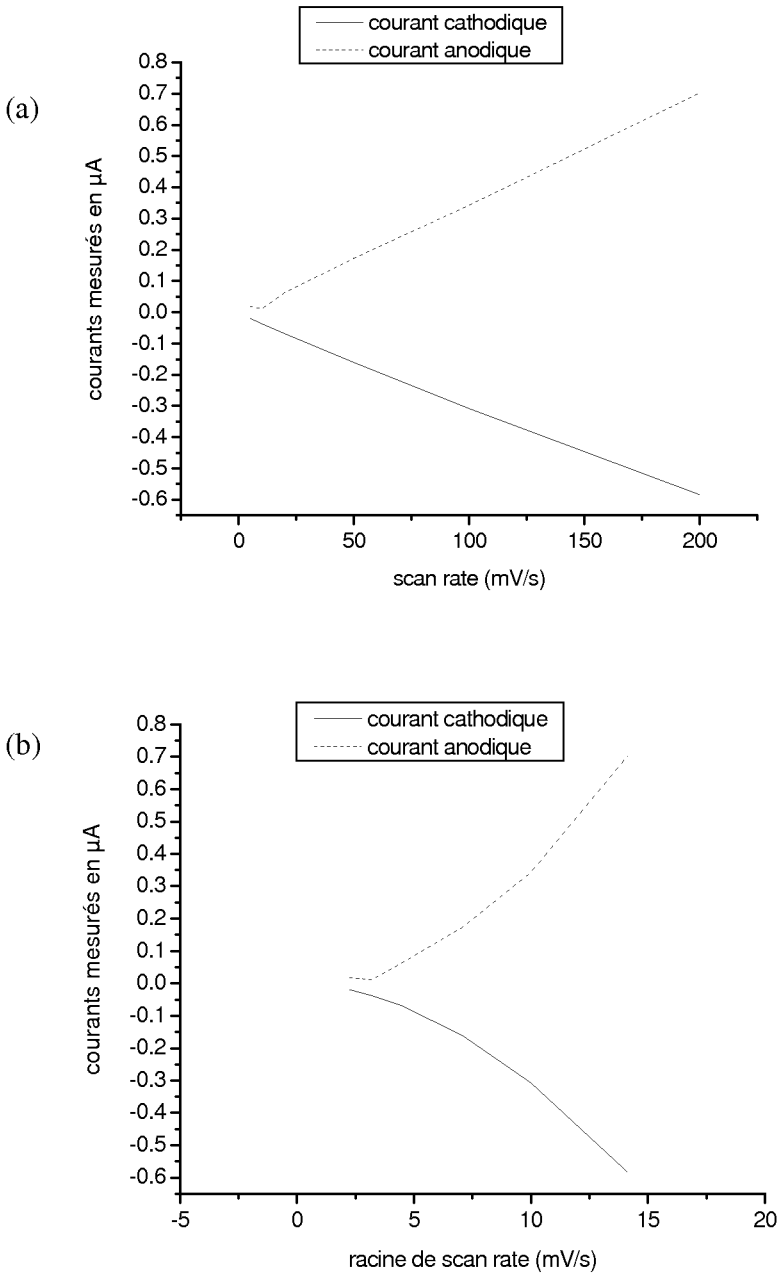


FIGURE 5

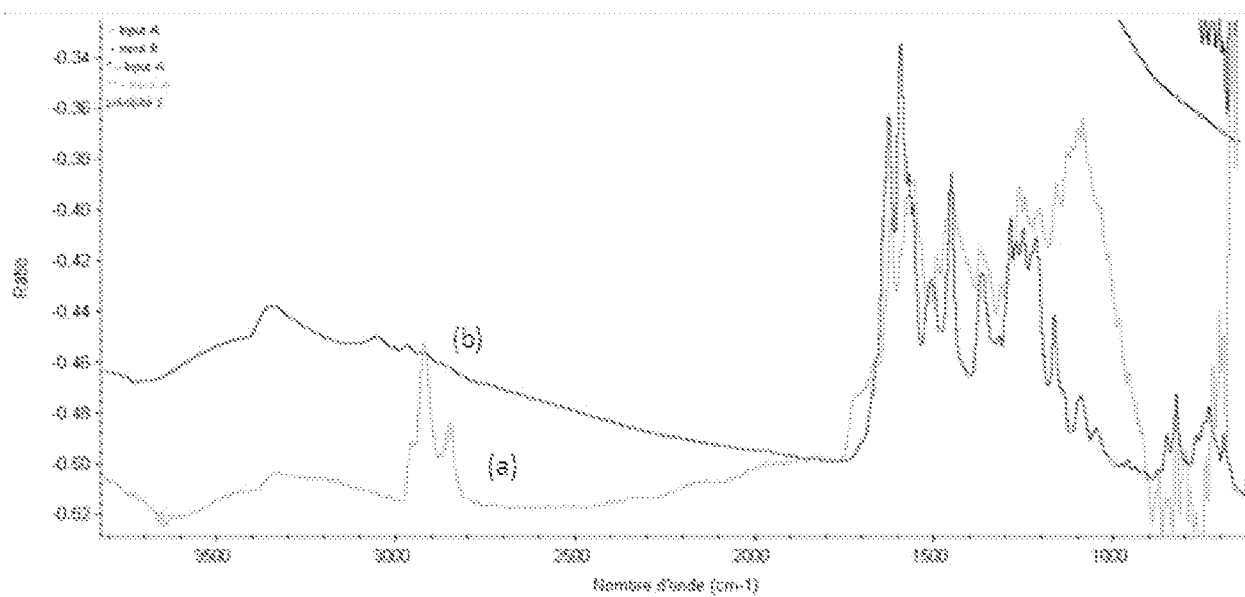


FIGURE 6

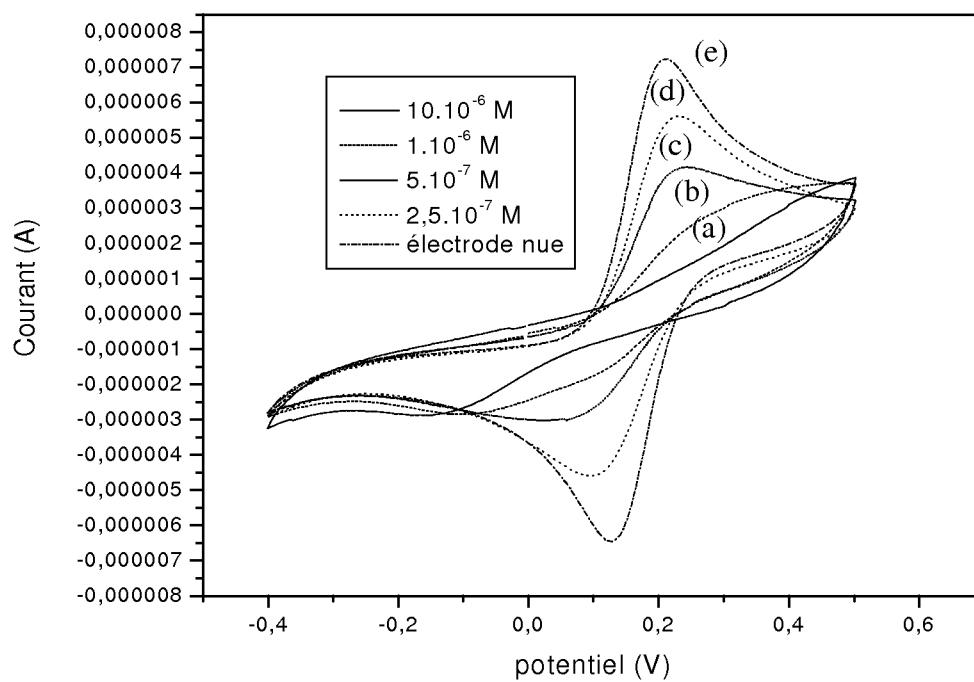


FIGURE 7

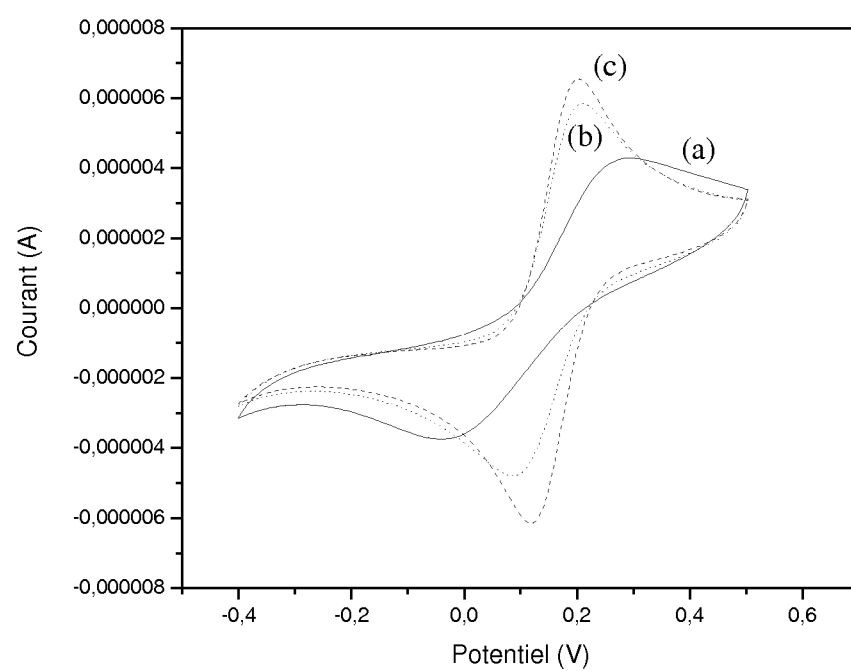


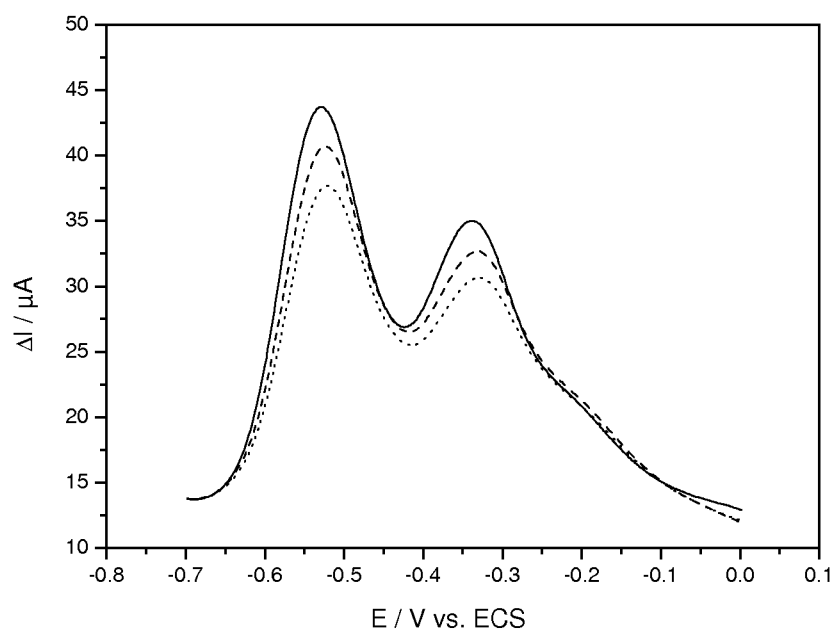
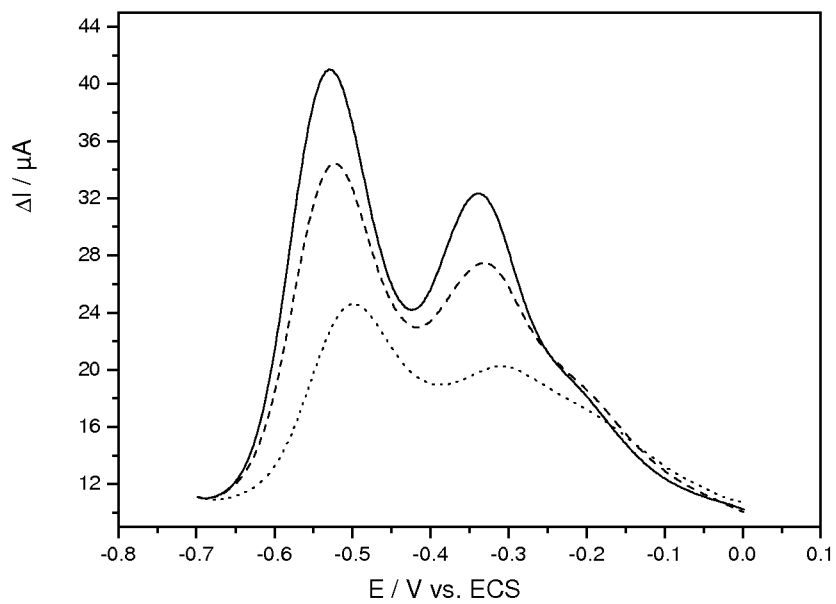
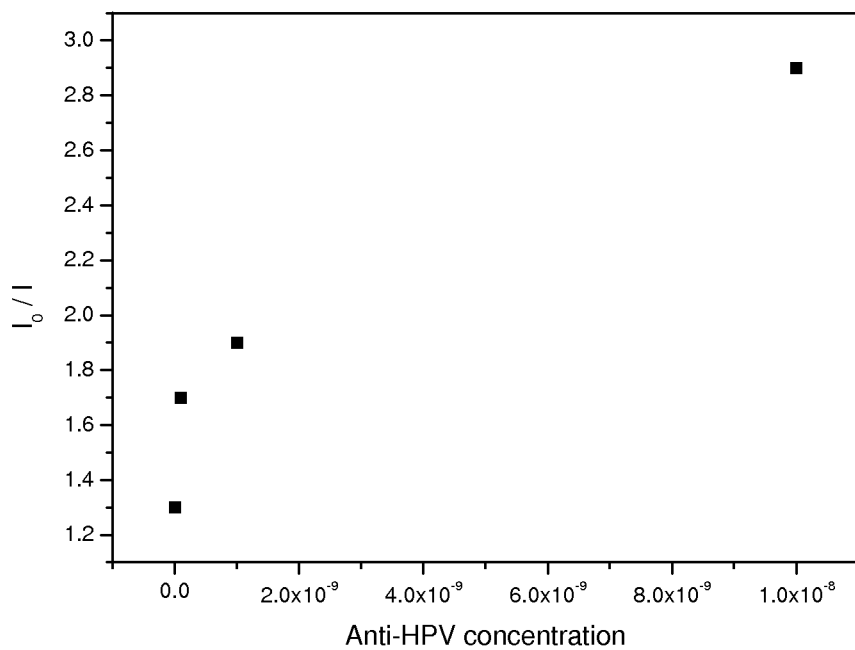
FIGURE 8**A****B**

FIGURE 9

A



B

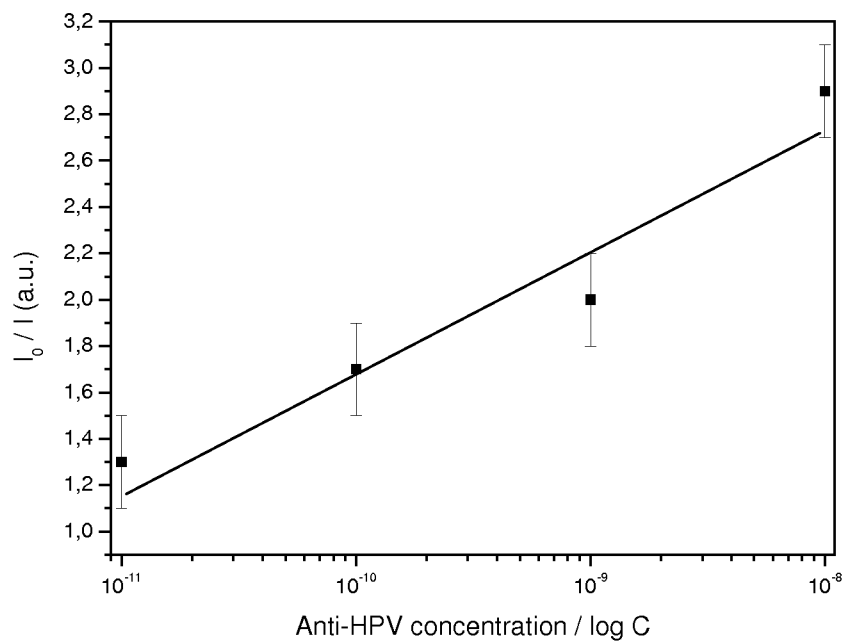


FIGURE 10

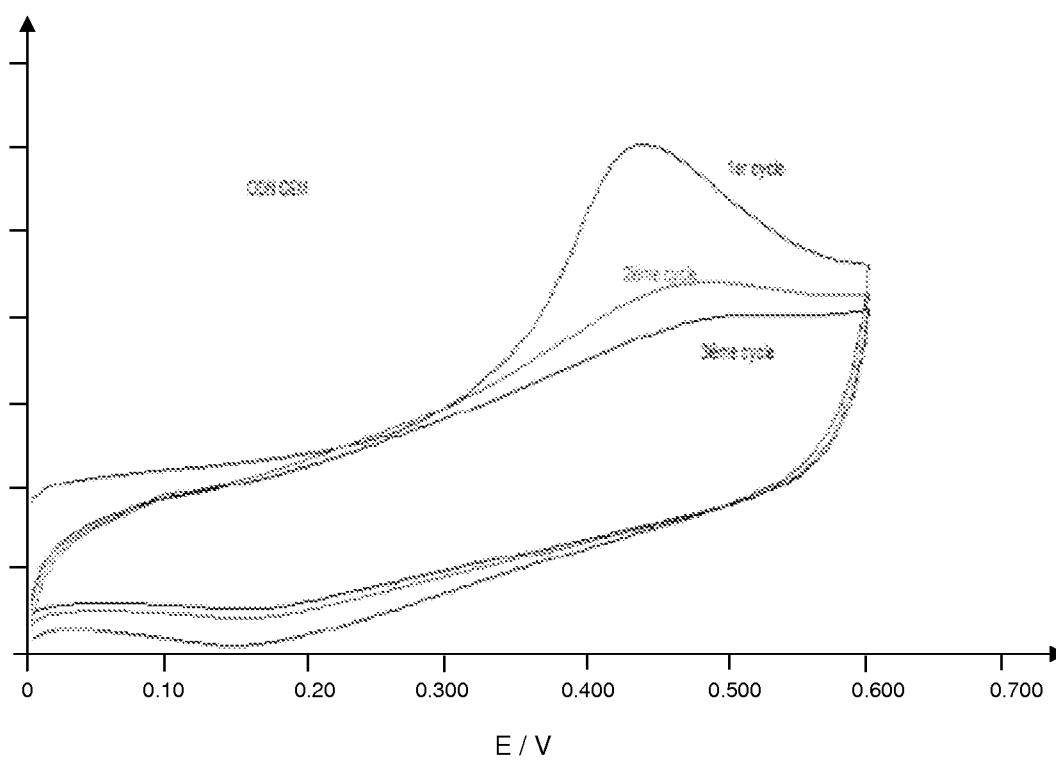


FIGURE 11

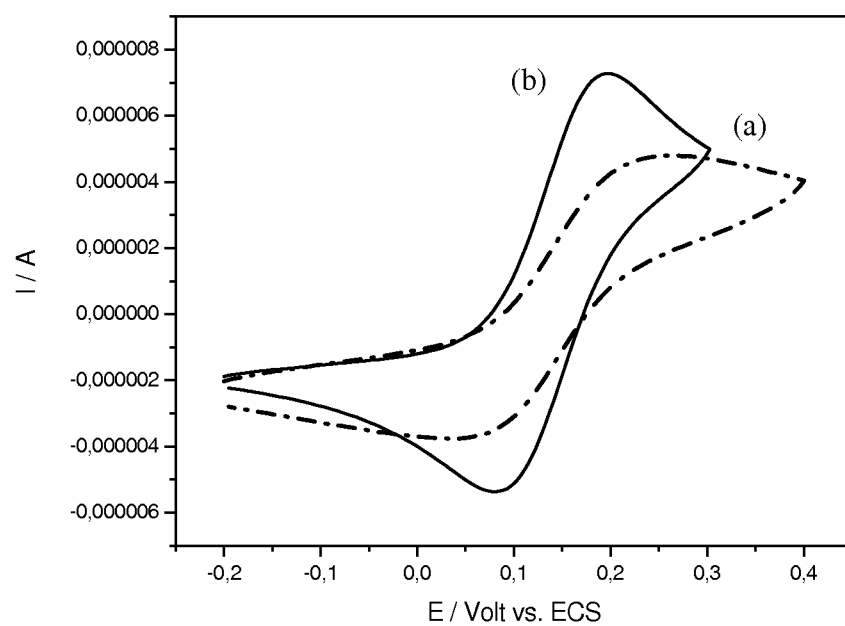


FIGURE 12

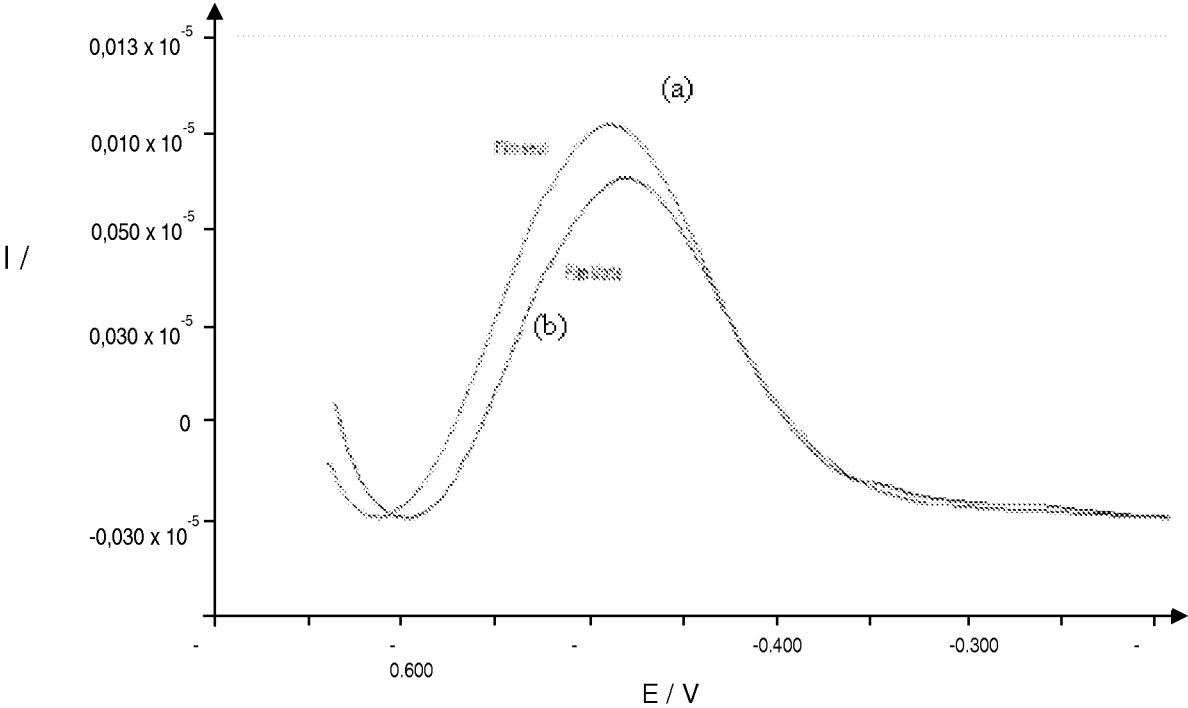


FIGURE 13

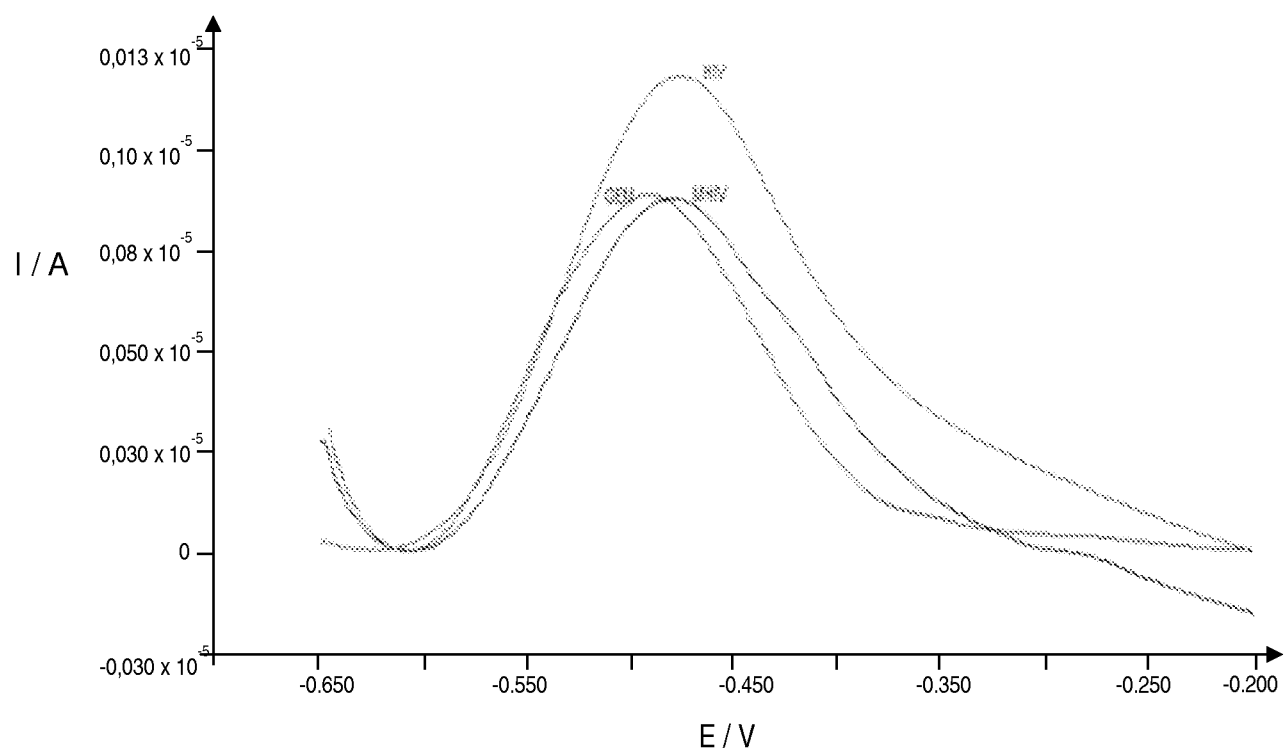


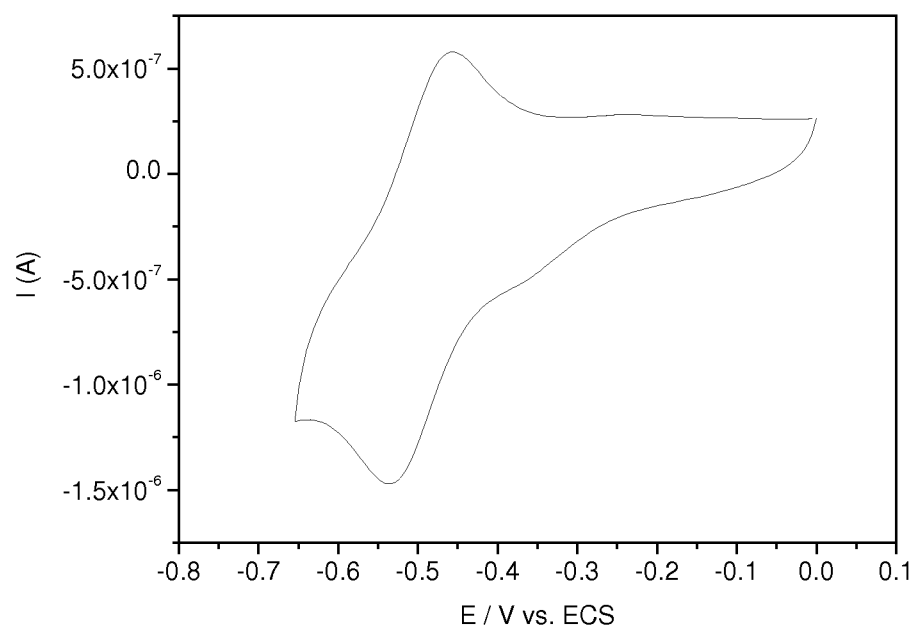
FIGURE 14

FIGURE 15

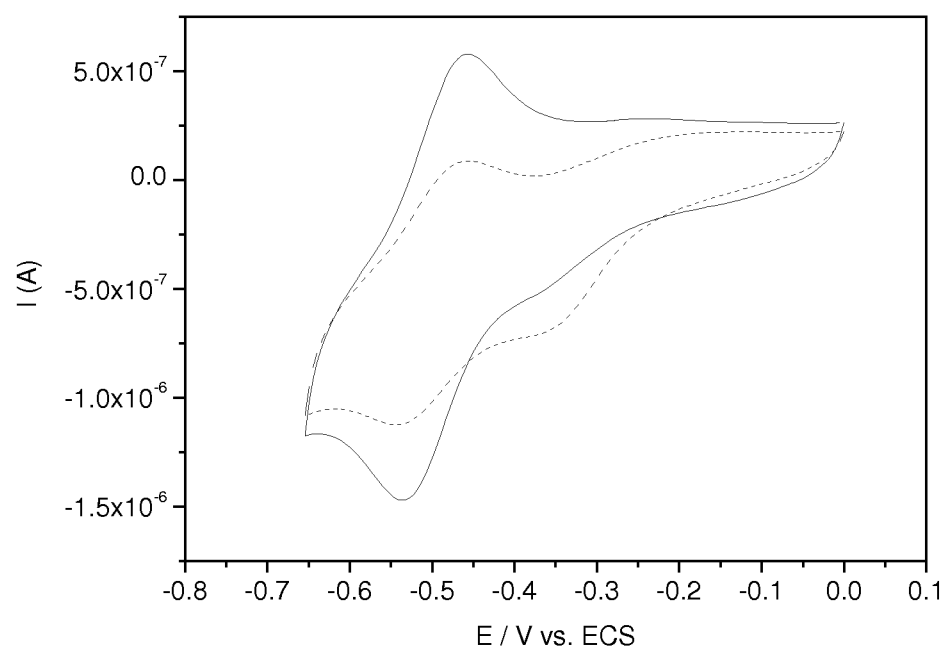


FIGURE 16

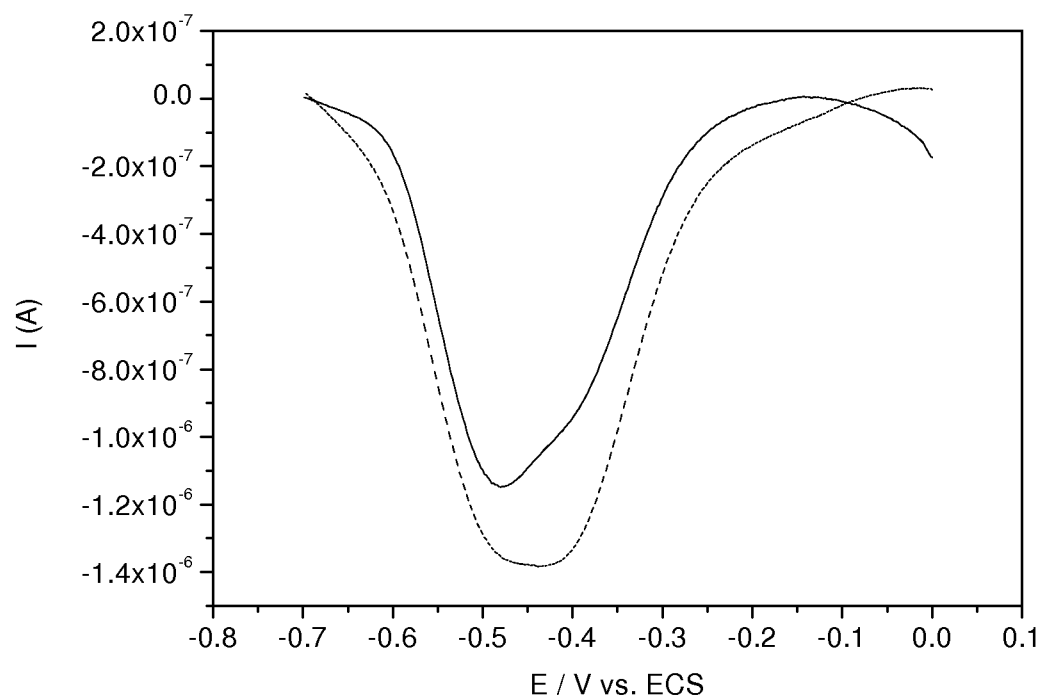
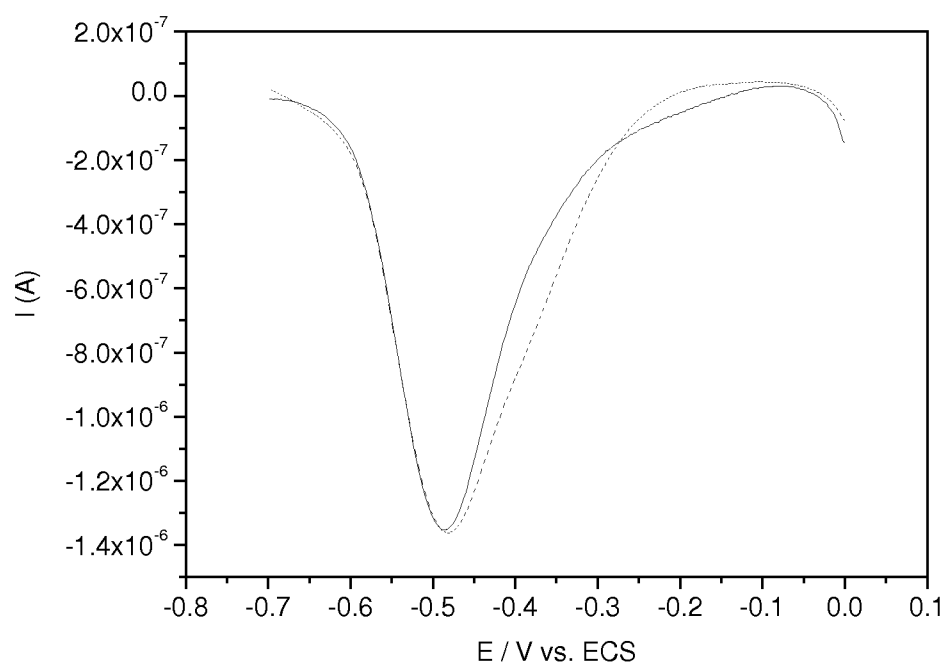


FIGURE 17



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2011/051627

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N27/333 G01N27/48 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification System followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal , BIOSIS, CHEM ABS Data, BEI LSTEIN Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	REISBERG S ET AL: "Design of a new electrogenerated polyquinoxaline substituted with glutathione. Towards direct electrochemical biosensors" , TALANTA, vol . 80, no. 3, January 2010 (2010-01) , pages 1318-1325 , XP002620154, ISSN: 0039-9140 the whole document	1-20
X	Wo 2008/132304 A1 (UNIV PARIS DIDEROT PARIS 7 [FR] ; PHAM MINH CHAU [FR] ; PIRO BENOIT [FR]) 6 November 2008 (2008-11-06) the whole document example IV ----- -/-	1-20
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Spécial catégories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 November 2011		Date of mailing of the international search report 18/11/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Cervigni, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2011/051627

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HACCOUN J ET AL: "The development of reagentless lactate biosensor based on a novel conducting polymer" , BIOELECTROCHEMISTRY, vol . 68, no. 2, May 2006 (2006-05) , pages 218-226, XP002620155 , ISSN: 1567-5394 the whole document	1-20
Y	ALAIN ADENIER ET AL: "Electrochemical Oxidation of Aliphatic Amines and Their Attachment to Carbon and Metal Surfaces" , LANGMUIR, vol . 20, no. 19, 1 September 2004 (2004-09-01) , pages 8243-8253 , XP55010668, ISSN: 0743-7463 , DOI : 10. 1021/1 a049194c the whole document	1-6
Y	FLORENCE GENESTE ET AL: "Electrochemically linking TEMPO to carbon via amine bridges" , NEW JOURNAL OF CHEMISTRY, vol . 29, no. 2, 1 January 2005 (2005-01-01) , page 269 , XP55010666, ISSN: 1144-0546, DOI : 10. 1039/b413627f the whole document	1-6
Y	WANG S G ET AL: "DNA biosensors based on self-assembled carbon nanotubes" , BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol . 325, no. 4, 24 December 2004 (2004-12-24) , pages 1433-1437 , XP002620156, ISSN: 0006-291X the whole document	1-20
Y	XU, YING ET AL: "Impedance DNA biosensor using electropolymerized polypyrrole/multiwalled carbon nanotubes modified electrode" , ELECTROANALYSIS , 18(15) , 1471-1478 CODEN : ELANEU; ISSN: 1040-0397 , 2006, XP002620157 , the whole document	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2011/051627

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 2008132304 A 1	06-11-2008	FR 2913268 A 1	05-09-2008

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2011/051627

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. G01N27/333 G01N27/48 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal , BIOSIS, CHEM ABS Data, BEI LSTEIN Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	REISBERG S ET AL: "Design of a new electrogenerated polyquinoxaline film substituted with glutathione. Towards direct electrochemical biosensors" , TALANTA, vol . 80, no. 3, janvier 2010 (2010-01) , pages 1318-1325 , XP002620154, ISSN: 0039-9140 Le document en entier	1-20
X	WO 2008/132304 A1 (UNIV PARIS DIDEROT PARIS 7 [FR] ; PHAM MINH CHAU [FR] ; PIRO BENOIT [FR]) 6 novembre 2008 (2008-11-06) Le document en entier exemple IV	1-20
X Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
X Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 7 novembre 2011		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 18/11/2011
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Cervigni, S

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	HACCOUN J ET AL: "The development of reagentless lactate biosensor based on a novel conducting polymer" , BIOELECTROCHEMISTRY, vol . 68, no. 2, mai 2006 (2006-05) , pages 218-226, XP002620155 , ISSN: 1567-5394 Le document en entier -----	1-20
Y	ALAIN ADENIER ET AL: "Electrochemical Oxidation of Aliphatic Amines and Their Attachment to Carbon and Metal Surfaces" , LANGMUIR, vol . 20, no. 19, 1 septembre 2004 (2004-09-01) , pages 8243-8253 , XP55010668, ISSN: 0743-7463 , DOI: 10.1021/la049194c Le document en entier -----	1-6
Y	FLORENCE GENESTE ET AL: "Electrochemically linking TEMPO to carbon via amine bridges" , NEW JOURNAL OF CHEMISTRY, vol . 29, no. 2, 1 janvier 2005 (2005-01-01) , page 269 , XP55010666, ISSN: 1144-0546, DOI: 10.1039/b413627f Le document en entier -----	1-6
Y	WANG S G ET AL: "DNA biosensors based on self-assembled carbon nanotubes" , BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol . 325, no. 4, 24 décembre 2004 (2004-12-24) , pages 1433-1437 , XP002620156, ISSN: 0006-291X Le document en entier -----	1-20
Y	XU, YING ET AL: "Impedance DNA biosensor using electropolymerized polypyrrole/multiwalled carbon nanotubes modified electrode" , ELECTROANALYSIS , 18(15) , 1471-1478 CODEN: ELANEU; ISSN: 1040-0397 , 2006, XP002620157 , Le document en entier -----	1-20

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

PCT/FR2011/051627

Document brevet cité
au rapport de recherche

Date de
publication

Membre(s) de la
famille de brevet(s)

Date de publication

W0 2008132304	Al	06-11-2008	FR	2913268 Al	05-09-2008
---------------	----	------------	----	------------	------------