

Dispositifs portables pour l'analyse d'acides nucléiques

Daciana Botta

Laboratoire de Nanostructures Fonctionnelles
Institut National de Physique des Matériaux
(NIMP)
Magurele-Bucarest, Roumanie

Victor C. Diculescu

Laboratoire de Nanostructures Fonctionnelles
Institut National de Physique des Matériaux
(NIMP)
Magurele-Bucarest, Roumanie

Ioan Alexandru Ivan

Laboratoire de Magnétisme et de Supraconductivité
Institut National de Physique des Matériaux
(NIMP)
Magurele-Bucarest, Roumanie

Résumé— Les dispositifs électrochimiques portables permettent des tests sur site, évitant ainsi le besoin d'installations de laboratoire conventionnelles [1]. Ces appareils analytiques compacts ont suscité un intérêt considérable dans divers domaines, notamment le diagnostic médical, la surveillance de l'environnement, la sécurité alimentaire et le contrôle de qualité industriel. En mesurant les signaux électriques induits par des réactions chimiques, ces appareils peuvent détecter des analytes spécifiques avec précision et une réponse rapide.

L'intérêt des dispositifs électrochimiques portables réside dans leur capacité à fournir des résultats immédiats, ce qui est important pour une prise de décision rapide. Contrairement aux configurations de laboratoire conventionnelles, ces appareils sont conçus pour être légers, économiques et simples à utiliser. Cette portabilité est particulièrement précieuse dans les tests PoC (point-of-care), où elle permet d'effectuer des évaluations de santé directement au chevet du patient, ainsi que dans des environnements éloignés ou limités en ressources où l'accès à des équipements de laboratoire sophistiqués est restreint.

Cette étude présente un capteur électrochimique innovant pour les acides nucléiques, utilisant du papier intégré avec des fibres polymères électrofilées métallisées. L'écoulement du fluide est géré par des régions hydrophobes formées par des polymères imprimés en 3D semblables à de la cire. Le capteur utilise une configuration à trois électrodes : or pour l'électrode de travail, platine pour l'électrode auxiliaire et argent pour l'électrode de référence. La détection des acides nucléiques est réalisée par voltampérométrie différentielle à impulsions avec le bleu de méthylène servant de sonde redox, à une limite de détection de $(0,147 \pm 0,005) \mu\text{g ml}^{-1}$.

Mots-clés — Dispositifs électrochimiques portables, Détection des acides nucléiques, Capteurs électrochimiques, Voltampérométrie différentielle

I. INTRODUCTION

Au cours des dernières décennies, les avancées en science des matériaux et en microfabrication ont permis le développement de capteurs électrochimiques portables hautement sensibles et sélectifs. Des innovations telles que les électrodes miniaturisées utilisant des matériaux de film mince et des substrats flexibles ont élargi le champ d'application de ces appareils. De plus, l'intégration de la technologie numérique pour le traitement des données et la transmission sans fil a amélioré l'accessibilité et le partage des données en temps réel, renforçant encore l'attrait pratique de ces appareils dans divers domaines [2].

Ce domaine en pleine croissance continue de progresser rapidement, avec des recherches en cours visant à améliorer la sensibilité des appareils, réduire les coûts et élargir les possibilités d'application [3,4]. Dans ce travail, les stratégies actuelles de fabrication de cellules électrochimiques portables sont examinées, en mettant l'accent sur les matériaux de substrat et d'électrode utilisés dans le processus de fabrication, et une nouvelle approche est présentée. La cellule électrochimique a été développée avec des électrodes fabriquées à partir de mailles de fibres polymères électrofilées conductrices fixées à un substrat en papier. Comme preuve de concept, la détection des acides nucléiques a été effectuée par analyse voltampérométrique en présence de la sonde redox bleue de méthylène.

II. MATERIEL ET METHODES

A. Matériaux pour les substrats

Les substrats poreux sont devenus des composants essentiels des dispositifs électrochimiques, offrant un support structurel et une surface accrue pour le transport des analytes, le stockage des réactifs et la transduction des signaux. Parmi les matériaux poreux les plus couramment utilisés, on trouve le papier, les polymères et les substrats à base de carbone, chacun offrant des avantages uniques en fonction de l'application spécifique.

La méthode courante pour manipuler et analyser de petits volumes de fluide repose sur des canaux microfluidiques fabriqués à partir de substrats à base de polymères, tels que le poly(diméthylsiloxane) (PDMS), qui offrent une flexibilité et un contrôle précis du flux de fluide. Ils sont fréquemment utilisés dans les applications nécessitant une manipulation microfluidique pour la détection multiplexée ou séquentielle des analytes, en particulier dans le diagnostic médical et l'analyse environnementale [5,6].

Cependant, les substrats en papier, y compris la cellulose et la nitrocellulose, ont gagné en popularité en raison de leur faible coût, de leur biodégradabilité et de leur action capillaire naturelle, qui facilite le transport des fluides et simplifie l'architecture des appareils pour les tests au point de soin (PoC). Les substrats à base de papier sont particulièrement utiles pour la détection visuelle et électrochimique, notamment dans les environnements à ressources limitées, où ils servent de plateformes idéales pour les dosages colorimétriques et enzymatiques [7]. De plus, les substrats en papier offrent la possibilité de moduler le flux de fluide et le transport des solutés par des modifications chimiques ou physiques [8]. Les matériaux poreux à base de carbone, tels que le papier carbone, le tissu de carbone et les mousses de graphène, offrent une excellente conductivité et une grande surface, ce qui les rend adaptés aux applications électrochimiques sensibles, y compris la détection des métaux lourds et la biosurveillance enzymatique [9], bien que ces derniers soient plutôt utilisés pour l'immobilisation et la transduction, plutôt que pour la manipulation des fluides.

B. Matériaux pour les électrodes

Les matériaux des électrodes sont essentiels pour définir les performances et la sensibilité des cellules électrochimiques portables, les choix étant souvent déterminés par l'analyte cible, la sensibilité souhaitée et le contexte d'application. Les matériaux à base de carbone, tels que le graphite, le graphène et les nanotubes de carbone (CNT), sont parmi les plus couramment utilisés pour développer des électrodes dans des appareils portables en raison de leur haute conductivité, de leur grande surface et de leur faible coût. Bien que les électrodes en graphite et en carbone sérigraphié soient abordables et faciles à fabriquer, elles peuvent souffrir d'une sensibilité réduite et d'une stabilité du signal moindre en raison de l'encrassement de la surface dans des matrices complexes [8]. En revanche, le graphène et les CNT offrent une conductivité supérieure et une grande sensibilité grâce à leur morphologie unique à l'échelle nanométrique, bien qu'ils puissent être plus difficiles à intégrer dans des appareils à faible coût et produits en masse en raison de coûts de fabrication plus élevés et de la nécessité d'une manipulation précise [10].

Les électrodes à base de métaux, telles que l'or, le platine et l'argent, sont également largement utilisées en raison de leur excellente conductivité, de leur stabilité chimique et de leur facilité de fonctionnalisation. Les électrodes en or, en particulier, sont très favorables pour l'immobilisation d'enzymes et sont couramment appliquées dans la biosurveillance pour la détection du glucose et des métaux lourds. Cependant, leur coût élevé peut limiter leur utilisation généralisée dans les dispositifs jetables [11]. Les électrodes en argent, souvent utilisées sous forme d'électrodes de référence en chlorure d'argent/argent (Ag/AgCl), offrent un contrôle stable du potentiel et sont peu coûteuses, mais sujettes à la lixiviation des ions, ce qui peut affecter la stabilité à long terme dans les applications de surveillance continue [12]. De plus, ces matériaux étaient couramment utilisés sous forme de fils ou de couches minces fixées ou déposées sur des substrats poreux, limitant ainsi la flexibilité des dispositifs fabriqués.

Les électrodes composites, qui combinent des particules de carbone ou de métal avec des polymères ou des céramiques, représentent une catégorie en pleine croissance visant à équilibrer les performances et le coût. Par exemple, les électrodes à encre de carbone ou à encre d'or incorporent des particules conductrices dans une matrice polymérique, permettant des conceptions flexibles et imprimables adaptées aux applications portables. Bien que ces composites améliorent la flexibilité mécanique et réduisent les coûts de production, ils peuvent présenter une conductivité inférieure et une résolution de signal réduite par rapport aux électrodes en carbone ou en métal pur [13]. Les mailles de fibres polymères électrofilées se sont également révélées être des candidats prometteurs pour des électrodes flexibles, avec leurs propriétés et fonctionnalités largement examinées dans des études précédentes [14]. Ces électrodes peuvent être facilement transférées sur des supports poreux, tels que le papier et les textiles [15], ce qui en fait une alternative viable pour les applications au point de soin (PoC).

III. PARTIE EXPERIMENTALE

A. Objectif et méthode

L'objectif de ce travail est le développement et le test d'un capteur électrochimique innovant pour les acides nucléiques utilisant la fluidique en papier combinée à des électrodes flexibles en fibres polymères électrofilées métallisées. Pour y parvenir, des régions hydrophobes sont créées par des polymères imprimés en 3D semblables à de la cire pour la manipulation des fluides. Une configuration à trois électrodes (avec de l'or pour l'électrode de travail, du platine pour l'auxiliaire et de l'argent pour la référence) est nécessaire pour la détection des acides nucléiques par voltampérométrie différentielle à impulsions et le bleu de méthylène comme sonde redox.

Les électrodes en maille de fibres ont été fabriquées comme décrit dans [15]. En résumé, une solution de 10% (p/v) de PMMA dans du DMF a été électrofilée sur des cadres en acier inoxydable positionnés à 15 cm de l'aiguille en utilisant une tension de 15 kV, à une humidité relative de 22-25 % et une température de 22-25 °C. La conductivité des mailles de fibres a été assurée par pulvérisation magnétron DC de couches minces de métal sur la surface des fibres, en utilisant de l'or pour l'électrode de travail, du platine pour l'auxiliaire et de l'argent pour la référence. L'électrode de référence et l'électrode de travail pourraient être fabriquées sur une seule maille de fibres par métallisation sélective avec l'utilisation de masques imprimés en 3D. Le papier filtre de chromatographie Whatman grade 1 a été structuré avec des couches de polymère semblable à de la cire déposées par impression 3D. Le papier structuré a été soumis à un traitement thermique dans un four de laboratoire à 180 °C pendant 20 minutes, conduisant à la formation

d'une barrière hydrophobe dans la profondeur du papier délimitant un canal fluide comprenant des régions d'injection et d'analyse. Enfin, les mailles de fibres métallisées ont été placées sur le papier traité thermiquement et l'ensemble a été traité à 100 °C pendant 10 minutes (Figure 1).

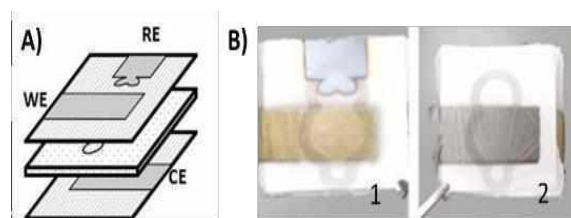


Figure 1
A) Représentation schématique
B) Photographies du capteur, 1-face avant et 2-face arrière

La détection des acides nucléiques double brin (dsDNA) a été réalisée en présence de bleu de méthylène par voltamétrie par impulsions directes (DPV). Brièvement, un volume de 40 μL de 500 μM de MB a été injecté dans le canal et laissé pendant 30 minutes afin que le gradient de concentration s'équilibre, avant d'enregistrer le voltammogramme de référence. La détection du dsDNA a été réalisée en injectant 4 μL de solutions à des concentrations croissantes. La limite de détection (LoD) a été évaluée comme $\text{LoD} = 3\text{SD}/b$, où SD est l'écart type et b est la pente de la courbe d'ajustement. La limite de quantification (LOQ) a été déterminée comme $\text{LOQ} = 10 \text{SD}/b$.

B. Résultats

La détection des acides nucléiques est basée sur l'intercalation du MB au sein des paires de bases empilées du dsDNA. Lorsque le groupement MB s'intercale entre les paires de bases du dsDNA, il entrave le transfert d'électrons depuis l'intérieur de la double hélice vers la surface de l'électrode, contrairement aux molécules de MB libres non liées qui sont plus proches de l'électrode (Figure 2). Par conséquent, l'interaction entre le dsDNA et le MB dans le dispositif fluide réduit le nombre de molécules de MB libres disponibles pour le transfert de charge avec l'électrode. Les pics de MB observés après l'ajout de dsDNA sont dus aux molécules de MB restantes non liées.



Figure 2. Représentation schématique de l'interaction entre MB et ssDNA et dsDNA.

Le voltammogramme DP enregistré de +0,10 V vers des potentiels négatifs a montré le pic de réduction du MB (Figure 3A). Après l'injection de 4 μL de dsDNA à 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, un voltammogramme DP subséquent a indiqué une diminution du courant de pic de réduction du MB.

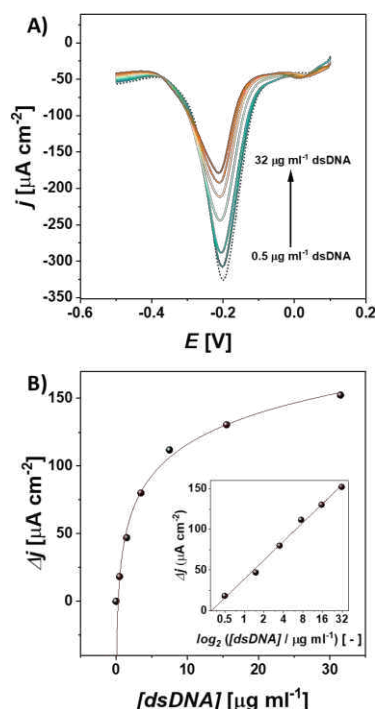


Fig. 3. A) Voltammogrammes réalisés en présence de MB dans un tampon phosphate pH 6,9 avec ajouts de différentes concentrations de dsDNA. B) Courbe d'étalonnage des données expérimentales. Encadré : représentation log-log des points expérimentaux.

En suivant la même procédure, des injections consécutives de 4 μL de concentrations variées de MTHFR ont été effectuées, entraînant une diminution progressive du pic de réduction du MB.

Les résultats expérimentaux sur la variation de la densité de courant en fonction de la concentration d'acides nucléiques ont été interpolés avec une ligne décrite par $\Delta j = a + b \log_2([dsDNA] / \mu g ml^{-1})$, où $a = (24,94 \pm 1,46) \mu A cm^{-2}$, et $b = (49,25 \pm 1,63) \mu A cm^{-2} (\mu g ml^{-1})^{-1}$, pour lequel $R^2 = 0,996$ a été obtenu, dans la plage de linéarité entre 0,5 et 32,0 $\mu g ml^{-1}$. La limite de détection de $(0,147 \pm 0,005) \mu g ml^{-1}$, la sensibilité de $(49,25 \pm 1,63) \mu A cm^{-2} (\mu g ml^{-1})^{-1}$ et la limite de quantification de $(0,491 \pm 0,016) \mu g ml^{-1}$ ont été obtenues.

CONCLUSIONS

Tout d'abord, les avancées actuelles des dispositifs électrochimiques portables ont été examinées en mettant l'accent sur les stratégies de conception concernant les matériaux de substrat et d'électrode. Les matériaux poreux sont très prometteurs pour les dispositifs au point de soin, car leurs surfaces peuvent être modifiées chimiquement et physiquement pour une distribution contrôlée des échantillons; mais pour obtenir de hautes performances, ceux-ci doivent être associés à des électrodes ayant des propriétés mécaniques similaires.

Une nouvelle approche a été présentée en associant du papier de chromatographie structuré en 3D à des électrodes en fibres polymères électrofilées conductrices, car celles-ci présentent une grande surface spécifique et une flexibilité. La conductivité a été obtenue par dépôt par pulvérisation de couches minces de métal sur la surface des mailles de fibres, employant de l'or, du platine et de l'argent pour les électrodes de travail, auxiliaires et de référence, respectivement. La cellule électrochimique a été développée par intégration thermique des mailles de fibres avec le substrat en papier. Le dispositif à base de papier a été appliqué pour la détection et la quantification des acides nucléiques par analyse voltampérométrie en présence de bleu de méthylène. Le principe de fonctionnement repose sur la propriété du bleu de méthylène

d'interagir avec les acides nucléiques en s'intercalant entre les paires de bases, entraînant une diminution du nombre de molécules libres pouvant effectuer le transfert de charge à la surface de l'électrode. Cette hypothèse a été confirmée par les résultats expérimentaux, qui ont montré une diminution du pic de réduction du bleu de méthylène avec des ajouts progressifs de solutions d'acides nucléiques, et une limite de détection de $(0,147 \pm 0,005) \mu g ml^{-1}$, une sensibilité de $(49,25 \pm 1,63) \mu A cm^{-2} (\mu g ml^{-1})^{-1}$ et une limite de quantification de $(0,491 \pm 0,016) \mu g ml^{-1}$ ont été obtenues.

REFERENCES

- [1] R.A. O'Kelly, J.J. Brady, E. Byrne, K. Hooley, C. Mulligan, K. Mulready, P. O'Gorman, P. O'Shea, G. Boran, A survey of point of care testing in Irish hospitals: room for improvement, *Ir. J. Med. Sci.* 180 (2011) 237–240. <https://doi.org/10.1007/S11845-010-0535-X>.
- [2] A.C. Sun, D.A. Hall, Point-of-Care Smartphone-based Electrochemical Biosensing, *Electroanalysis*. 31 (2019) 2–16. <https://doi.org/10.1002/ELAN.201800474>.
- [3] J.B. Holman, Z. Shi, A.A. Fadahunsi, C. Li, W. Ding, Advances on microfluidic paper-based electroanalytical devices, *Biotechnol. Adv.* 63 (2023) 108093. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2022.108093>.
- [4] G. Ebrahimi, P.S. Pakchin, A. Mota, H. Omidian, Y. Omid, Electrochemical microfluidic paper-based analytical devices for cancer biomarker detection: From 2D to 3D sensing systems, *Talanta*. 257 (2023) 124370. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2023.124370>.
- [5] A.W. Martinez, S.T. Phillips, E. Carrilho, S.W. Thomas, H. Sindi, G.M. Whitesides, Simple telemedicine for developing regions: Camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3699–3707. https://doi.org/10.1021/AC800112R/SUPPL_FILE/AC800112R-FILE012.PDF.
- [6] A.K. Yetisen, M.S. Akram, C.R. Lowe, Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices, *Lab Chip*. 13 (2013) 2210–2251. <https://doi.org/10.1039/C3LC50169H>.
- [7] D.M. Cate, J.A. Adkins, J. Mettakoonpitak, C.S. Henry, Recent developments in paper-based microfluidic devices, *Anal. Chem.* 87 (2015) 19–41. https://doi.org/10.1021/AC503968P/ASSET/IMAGES/LARGE/AC-2014-03968P_0007.JPEG.
- [8] D. Botta, I. Enculescu, C. Balan, V.C. Diclescu, Integrated architectures of electrodes and flexible porous substrates for point-of-care testing, *Curr. Opin. Electrochem.* 42 (2023) 101418. <https://doi.org/10.1016/J.COEELEC.2023.101418>.
- [9] H.O. Kaya, A.E. Cetin, M. Azimzadeh, S.N. Topkaya, Pathogen detection with electrochemical biosensors: Advantages, challenges and future perspectives, *J. Electroanal. Chem.* 882 (2021) 114989. <https://doi.org/10.1016/J.JELECHEM.2021.114989>.
- [10] A. Ambrosi, C.K. Chua, A. Bonanni, M. Pumera, Electrochemistry of graphene and related materials, *Chem. Rev.* 114 (2014) 7150–7188. https://doi.org/10.1021/CR500023C/ASSET/IMAGES/LARGE/CR-2014-00023C_0020.JPEG.
- [11] K. Luciano, X. Wang, Y. Liu, G. Eyler, Z. Qin, X. Xia, Noble Metal Nanoparticles for Point-of-Care Testing: Recent Advancements and Social Impacts, *Bioeng.* 2022, Vol. 9, Page 666. 9 (2022) 666. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING9110666>.
- [12] M. Sophocleous, J.K. Atkinson, A review of screen-printed silver/silver chloride (Ag/AgCl) reference electrodes potentially suitable for environmental potentiometric sensors, *Sensors Actuators A Phys.* 267 (2017) 106–120. <https://doi.org/10.1016/J.SNA.2017.10.013>.
- [13] O. Kanoun, T. Lazarević-Pašti, I. Pašti, S. Nasraoui, M. Talbi, A. Brahém, A. Adiraju, E. Sheremet, R.D. Rodriguez, M. Ben Ali, A. Al-Hamry, A Review of Nanocomposite-Modified Electrochemical Sensors for Water Quality Monitoring, *Sensors* 2021, Vol. 21, Page 4131. 21 (2021) 4131. <https://doi.org/10.3390/S21124131>.
- [14] R.J.B. Leote, M. Beregoi, I. Enculescu, V.C. Diclescu, Metallized electrospun polymeric fibers for electrochemical sensors and actuators, *Curr. Opin. Electrochem.* 34 (2022) 101024. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2022.101024>.
- [15] C. Busuioc, A. Evangelidis, A. Galatanu, I. Enculescu, Direct and contactless electrical control of temperature of paper and textile foldable substrates using electrospun metallic-web transparent electrodes, *Sci. Reports* 2016 61. 6 (2016) 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep34584>.