

Des moules aux lecteurs de glycémie

Les matériaux fonctionnels

L'impact socioéconomique des matériaux fonctionnels, ou dits « intelligents », devient de plus en plus important, en particulier dans le domaine de la santé. Dans le diagnostic médical et la surveillance de l'environnement, les biocapteurs permettent le dosage d'un analyte, une (bio)molécule, dans un fluide (biologique ou non). Prenons l'exemple du lecteur de glycémie : la bandelette, sur laquelle la goutte de sang est déposée, est composée d'une électrode recouverte par la glucose oxydase, une enzyme capable de catalyser l'oxydation d'une molécule de glucose en libérant deux électrons. Ces électrons sont récupérés par l'électrode (la bandelette) connectée au lecteur de glycémie qui lira une intensité électrique, proportionnelle à la quantité de glucose, et indiquera ainsi une valeur du taux de glycémie.

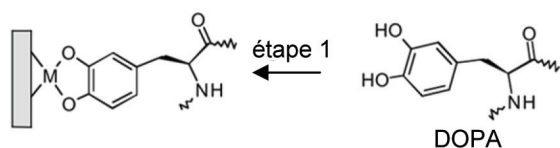
L'immobilisation d'enzymes sur les électrodes est un processus critique qui nécessite de sauvegarder l'activité de l'enzyme et d'assurer son accessibilité à l'analyte. L'électrodéposition de macromolécules (par exemple polymères, protéines, enzymes) est un procédé qui consiste à imposer un potentiel ou un courant électrique pour immobiliser une ou plusieurs macromolécules sur une électrode [1]. L'électrodéposition peut être réalisée soit par établissement d'interactions faibles [2-3], soit par formation de liaisons covalentes entre monomères, l'électropolymérisation [4], ou de polymères [5-6]. Simple et largement utilisée, l'électropolymérisation de monomères permet

de piéger physiquement les enzymes sur la surface de l'électrode. Cependant, une réticulation chimique est préférable afin d'empêcher la libération de l'enzyme dans le sang lors du test. Jusqu'à présent, la réticulation d'enzyme n'avait jamais été réalisée à l'aide d'un stimulus électrochimique.

Les moules et le principe de la colle bio-inspirée

Récemment, nous nous sommes inspirés des capacités impressionnantes d'adhésion des moules pour développer une colle afin d'immobiliser des enzymes par électroréticulation [7]. Ces coquillages, accrochés à la coque des bateaux, sécrètent une protéine ayant plusieurs répétitions de la molécule DOPA, composée d'une amine et d'un groupement catéchol (*figure 1*). Grâce à la chimie riche des catéchols, cette molécule peut d'une part interagir avec les métaux, et d'autre part réagir covalamment avec les groupements amine, présents dans toutes les protéines [8]. L'interaction avec les métaux est basée sur la formation de liaisons de coordination bidendates avec les groupements -OH des catéchols (*figure 1*, étape 1). L'oxygène, présent dans l'air, oxyde les catéchols en quinones (*figure 1*, étape 2) qui réagissent avec les groupements amine (*figure 1*, étape 3) formant des liaisons imine. Nous avons ainsi synthétisé une molécule originale, le biscatéchol, porteur de deux groupements catéchol (*figure 2a*), capable de se coller sur les métaux et, lorsqu'il est oxydé par électrochimie, de réticuler les

Adhésion aux métaux



Réaction covalente avec les amines

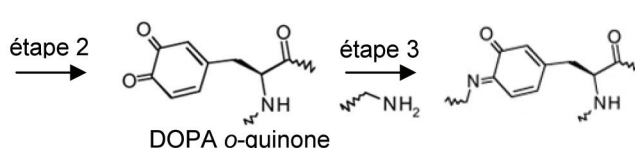


Figure 1 - La chimie des catéchols. Étape 1 : adsorption physique de la DOPA aux surfaces métalliques par formation de liaisons bidendates entre les groupements -OH du catéchol et les métaux. Étape 2 : oxydation du groupement catéchol en quinone de la DOPA, suivie par l'étape 3 : réaction de couplage avec une amine formant une imine.

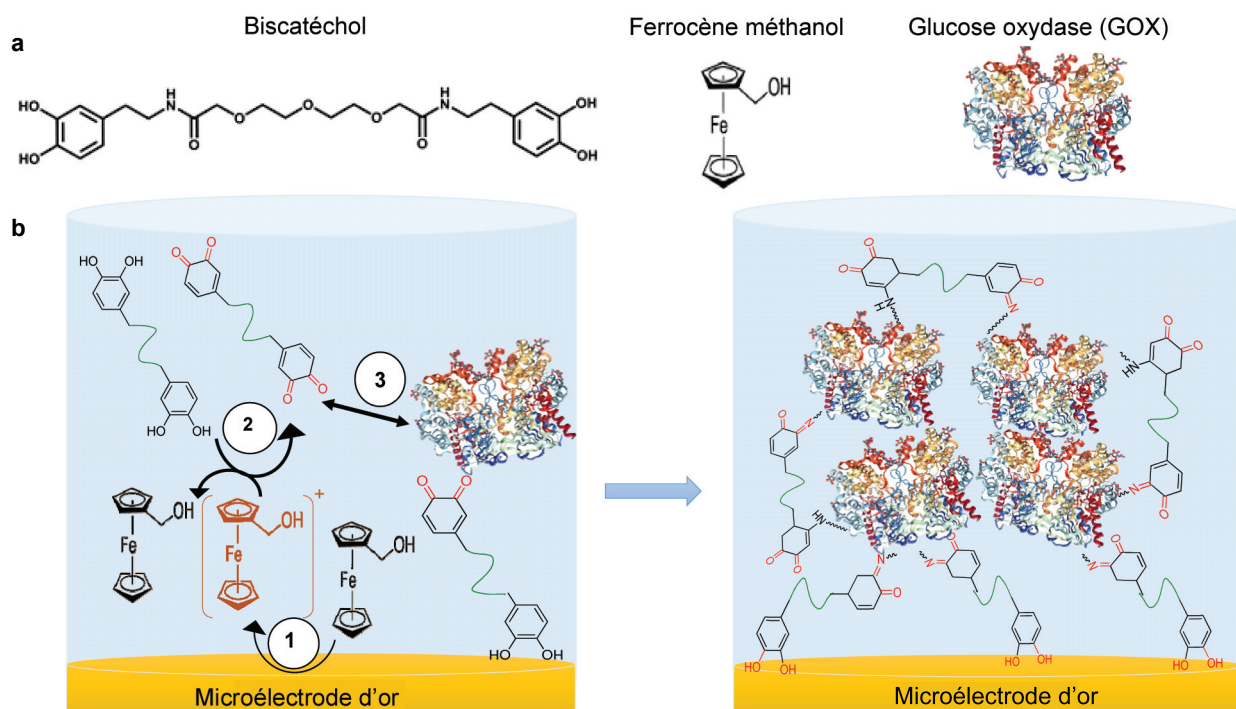


Figure 2 - (a) Formule chimique du biscatéchol, synthétisé au laboratoire, du ferrocène méthanol et structure de la glucose oxydase. (b) Principe du procédé bio-inspiré d'électroréticulation d'enzyme basé sur l'utilisation d'un mélange biscatéchol, ferrocène méthanol et glucose oxydase. Le ferrocène méthanol joue le rôle de médiateur électrochimique, c'est-à-dire transporteur d'électrons.

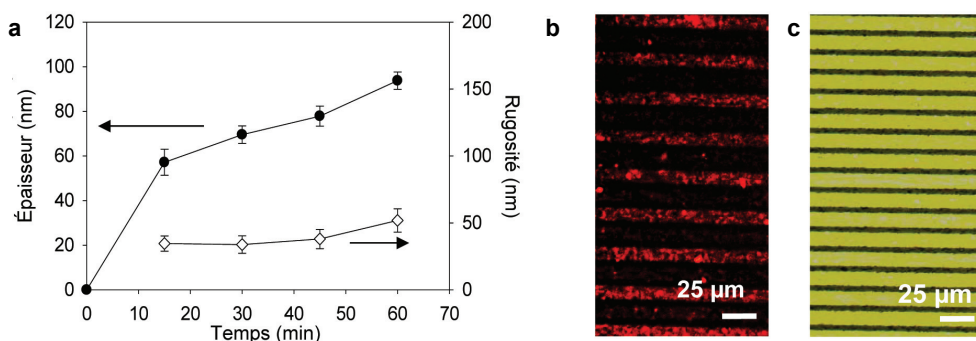


Figure 3 - (a) Évolution de l'épaisseur et de la rugosité des films biscatéchol/glucose oxydase électrodéposés en fonction du temps d'application d'une gamme de potentiel allant de 0 à 700 mV à 50 mV/s. Images de microscopie optique en fluorescence (b) et en champ clair (c) de réseaux de microélectrodes où une électrode sur deux a été fonctionnalisée par un film biscatéchol/glucose oxydase. La glucose oxydase a été marquée par un fluorophore (la rhodamine, fluorescente dans le rouge).

enzymes. Le biscatéchol a été synthétisé en partant d'un éthylène oxyde soluble dans l'eau afin de pouvoir l'utiliser en milieu aqueux en présence d'enzymes.

Procédé d'électroréticulation d'enzyme

Une fois le biscatéchol synthétisé, nous avons étudié par électrochimie son oxydation en bisquinone. Cette oxydation se produit uniquement lorsque la molécule est assez proche de l'électrode de travail pour perdre ses électrons. Afin d'oxyder les molécules les plus éloignées de l'électrode, nous avons ajouté un médiateur électrochimique, le ferrocène méthanol, qui agit comme un transporteur d'électron (figure 2a). Partant d'une solution contenant trois composés – la glucose oxydase, le biscatéchol, le ferrocène méthanol – en contact avec l'électrode, le procédé d'électroréticulation se déroule en trois étapes (figure 2b). La première consiste en l'oxydation du ferrocène par application d'un potentiel électrique, afin de créer un gradient de ferrocénium qui est utilisé comme médiateur électrochimique. La seconde est l'oxydation du biscatéchol en bisquinone par réaction d'oxydoréduction avec le ferrocénium, et la dernière s'appuie sur la réaction chimique du bisquinone avec les groupements amine accessibles de la glucose oxydase. Des films nanométriques de 60 à 100 nm d'épaisseur avec une rugosité de 50 nm ont été obtenus (figure 3a) et ont été électrodéposés sélectivement sur un réseau de microélectrodes en or (figure 3b-c).

Lecteur de glycémie

Une fois le procédé d'électrodéposition optimisé, les films biscatéchol/glucose oxydase ont été testés en tant que lecteur de glycémie en présence de ferrocène méthanol (figure 4a). Pour cela, des solutions de glucose, préparées à différentes concentrations dans un milieu physiologique, ont été mises au contact des films. La glucose oxydase transforme le glucose en gluconolactone, libérant ainsi des électrons ; le ferrocène méthanol permet de récupérer les électrons générés et de les transférer à l'électrode de travail. La quantité d'électrons transférés génère un courant électrique proportionnel à la quantité de glucose présent dans la solution. Le tracé de la valeur du courant électrique mesurée en fonction de la concentration de

glucose a permis d'obtenir une droite d'étalonnage sur une gamme de 1 à 12,5 mM, et ainsi de déterminer la sensibilité du film qui représente la pente de la droite et qui est de $0,66 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ par mM de glucose (figure 4b). Nous pouvons noter que ces films permettent de distinguer les sujets sains (dont le taux de glycémie se situe entre 3,8 et 6,5 mM de glucose) et les sujets hyperglycémiques (taux de glycémie > 7 mM) ou hypoglycémiques (taux de glycémie $< 3,8$ mM).

En résumé, grâce à l'utilisation du ferrocène comme médiateur électrochimique, le biscatéchol a permis l'immobilisation de la glucose oxydase par électroréticulation tout en maintenant son activité enzymatique. Ce nouveau procédé d'immobilisation enzymatique bio-inspiré présente plusieurs avantages. Les enzymes sont réticulées sur l'électrode et fortement liées à la surface grâce aux catéchols ; elles restent actives et permettent un dosage du glucose. Elles peuvent être immobilisées de manière sélective sur des microélectrodes. Cette technique est prometteuse pour le domaine en pleine expansion des biocapteurs miniaturisés où il est possible de doser différents analytes à partir d'un petit volume de fluide grâce à un réseau de microélectrodes fonctionnalisées par différentes enzymes [1].

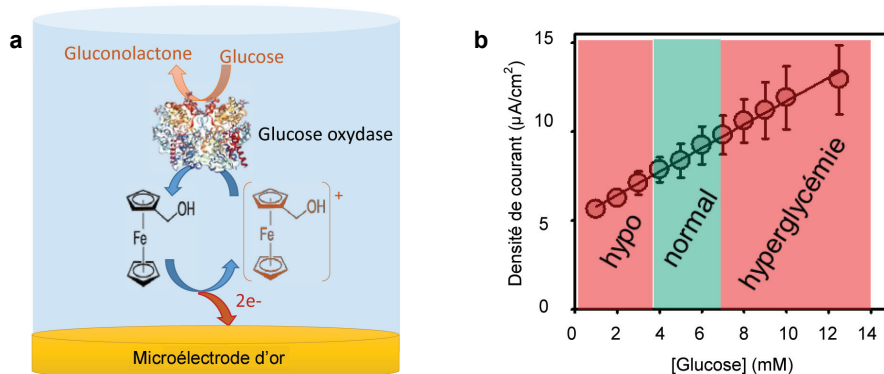


Figure 4 - (a) Représentation schématique de la réaction catalytique de la glucose oxydase avec le glucose et le ferrocène à la base du biocapteur ; (b) densité de courant mesurée lors de l'addition de glucose, à différentes concentrations, en présence de 0,5 mM de ferrocène. La moyenne et l'écart type de chaque point de mesure ont été évalués sur trois expériences indépendantes. La zone colorée en vert représente les limites inférieures et supérieures du taux de glycémie d'un sujet sain. Les deux zones colorées en rouge représentent les taux d'hypoglycémie et hyperglycémie.

Figures adapted with permission from [7].

- [1] Maerten C., Jierry L., Schaaf P., Boulmedais F., Review of electrochemically triggered macromolecular film buildup processes and their biomedical applications, *ACS Appl. Mater. Inter.*, **2017**, 9, p. 28117.
- [2] Krylova I., Painting by electrodeposition on the eve of the 21st century, *Prog. Org. Coat.*, **2001**, 42, p. 119.
- [3] Ammam M., Electrochemical and electrophoretic deposition of enzymes: principles, differences and application in miniaturized biosensor and biofuel cell electrodes, *Biosens. Bioelectron.*, **2014**, 58, p. 121.
- [4] Waltman R.J., Bargon J., Electrically conducting polymers: a review of the electropolymerization reaction, of the effects of chemical-structure on polymer film properties, and of applications towards technology, *Can. J. Chem.*, **1986**, 64, p. 76.
- [5] Rydzek G., Jierry L., Parat A., Thomann J.S., Voegel J.C., Senger B., Hemmerle J., Ponche A., Frisch B., Schaaf P., Boulmedais F., Electrochemically triggered assembly of films: a one-pot morphogen-driven buildup, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50, p. 4374.
- [6] Boulmedais F., L'autoconstruction de films de polyélectrolytes: approche morphogénique, *L'Act. Chim.*, **2014**, 384, p. 14.
- [7] El-Maiss J., Cuccarese M., Maerten C., Lupattelli P., Chiummiento L., Funicello M., Schaaf P., Jierry L., Boulmedais F., Mussel-inspired electro-cross-linking of enzymes for the development of biosensors, *ACS Appl. Mater. Inter.*, **2018**, 10, p. 18574.
- [8] Deming T.J., Mussel byssus and biomolecular materials, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1999**, 3, p. 100.

Cette fiche a été réalisée par **Fouzia BOULMEDAIS**, chercheuse au CNRS, Institut Charles Sadron (ICS, Université de Strasbourg, CNRS, fouzia.boulmedais@ics-cnrs.unistra.fr), prix Jeune chercheur 2013 de la division Chimie physique, commune à la Société Chimique de France et à la Société Française de Physique.

Les fiches « Un point sur » sont coordonnées par un comité éditorial mené par Jean-Pierre Foulon (jpfoulon@wanadoo.fr). Elles sont regroupées et en téléchargement libre sur www.lactualitechimique.org/spip.php?rubrique11.