

Applications analytiques de l'électrochimiluminescence

Laurent Bouffier, Alexander Kuhn et Neso Sojic

- Résumé** La compréhension fine de la complexité des processus électrochimiluminescents (ECL) permet de proposer de nouvelles stratégies analytiques basées sur des nanoélectrodes ou des objets originaux remplissant une fonction analytique, tels que des « nageurs » luminescents. Ce propos est illustré dans cet article par quelques travaux s'inscrivant dans cette dualité féconde de l'ECL entre la photochimie et l'électrochimie.
- Mots-clés** **Électrochimiluminescence, immunodosage, photochimie, électrochimie bipolaire.**
- Abstract** **Analytical applications of electrochemiluminescence**
Electrochemiluminescence (ECL) processes are complex but their fine understanding allows the conception of new analytical methods based on nano-objects or smart analytical devices such as light-emitting « swimmers ». In this article, ECL potential is illustrated with a selection of recent works. This highlights well the duality of ECL taking benefit from the combination of photochemistry and electrochemistry.
- Keywords** **Electrochemiluminescence, immunoassay, photochemistry, bipolar electrochemistry.**

L' électrochimiluminescence (ECL) est un phénomène d'émission de lumière par un luminophore porté à l'état excité suite à une réaction électrochimique initiale [1] ; elle associe donc intimement l'électrochimie et la photochimie. L'ECL a trouvé de nombreuses applications bioanalytiques du fait de ses caractéristiques intrinsèques remarquables : grande sensibilité, linéarité du signal, sélectivité, génération *in situ* des réactifs [2]. Le luminophore est classiquement utilisé comme marqueur pour le diagnostic médical.

Plus de 150 immunotests basés sur l'ECL sont actuellement commercialisés⁽¹⁾ pour des pathologies variées allant de maladies cardiaques à la détection de marqueurs tumoraux, etc. [2a]. Dans ces immunodosages de type sandwich, des billes magnétiques sont utilisées pour attacher un anticorps de capture [3]. En présence de l'antigène cible, un anticorps de détection est reconnu et un dérivé d'un complexe de ruthénium est utilisé comme marqueur (*figure 1a*). Les systèmes modèles ECL sont constitués d'un luminophore tel que le complexe de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ et de la tri-*n*-propylamine (TPra) comme co-réactif sacrificiel. L'oxydation de ces deux composés induit une cascade de réactions, impliquant des radicaux à courtes durées de vie et de différents potentiels redox, qui va conduire *in fine* à la formation de l'état excité.

Différentes voies mécanistiques ont été proposées pour expliquer les observations expérimentales [4]. Cependant, ces mécanismes ne permettent pas d'expliquer l'excellente sensibilité des immunodosages utilisant des billes micrométriques comme support. Une voie alternative proposée par Bard *et coll.* implique seulement l'oxydation électrochimique du co-réactif TPra [4a]. Les radicaux ainsi produits, $\text{TPra}^{\bullet+}$ et TPra^\bullet , diffuseraient sur des distances micrométriques pour générer l'état excité plus loin de l'électrode.

Afin d'extraire des informations optiques et cinétiques pertinentes sur ces immunodosages, notre approche a

reposé sur l'imagerie 3D de la distribution de l'intensité ECL [5]. Nous avons pu montrer que la bille se comportait optiquement comme une lentille [6] et focalisait l'intensité lumineuse en son centre, d'où une concentration du signal ECL (*figure 1b*). À partir de la distribution de l'intensité ECL observée de profil (*figure 1c*), nous avons pu remonter, en collaboration avec F. Kanoufi (Laboratoire ITODYS, Paris), à la durée de demi-vie du radical cation $\text{TPra}^{\bullet+}$ (0,24 ms) qui gouverne la formation des gradients de concentration de $\text{TPra}^{\bullet+}$ et de TPra^\bullet . Ces deux espèces peuvent diffuser et réagir avec le luminophore immobilisé [5]. L'intensité maximum est atteinte dans la zone réactive où les concentrations de ces deux radicaux sont simultanément les plus importantes. Seuls les luminophores situés dans la région de 3 μm de distance à l'électrode peuvent être excités par cette voie mécanistique. Cela définit la dimension optimale pour les billes utilisées en immunodosage ECL avec ce co-réactif modèle.

La compréhension de ce mécanisme ECL nous a permis de développer un nouveau type d'immunodosage pour lequel nous avons séparé spatialement la zone où les biomolécules sont immobilisées de la zone où les réactions électrochimiques se produisent. Nous avons ainsi utilisé des réseaux de nanoélectrodes d'or préparés à partir de membranes « track-etched » de polycarbonate (PC). Les biomolécules s'adsorbent spontanément sur le PC [7]. En collaboration avec P. Ugo (Université de Venise), nous avons développé un test d'immunodosage fondé sur cette stratégie analytique pour le diagnostic de la maladie de cœliaque [8]. Il s'agit d'une pathologie auto-immune qui se manifeste par une intolérance au gluten. Le but est de détecter le niveau de l'anticorps anti-transglutaminase (anti-tTG) dans le sérum sanguin. La protéine de capture utilisée est la transglutaminase (tTG) qui est directement immobilisée sur le PC en une seule étape. Le réseau est ensuite mis en présence de l'échantillon sanguin contenant l'analyte cible (*i.e.* anti-tTG). Un anticorps secondaire

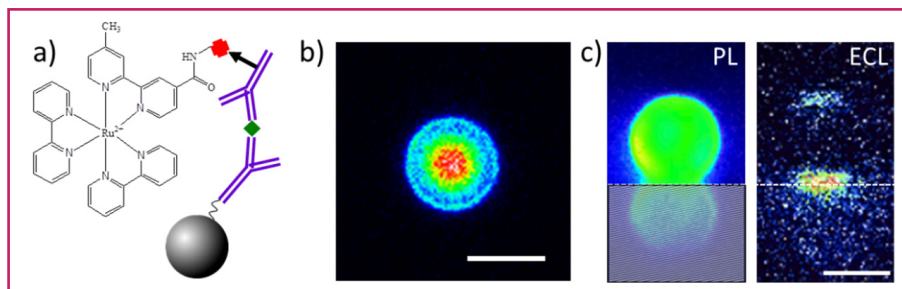


Figure 1 - a) Immunodosage de type sandwich réalisé au niveau de billes micrométriques. b) Image ECL d'une bille de 6 µm de rayon en vue de dessus. c) Images en photoluminescence (PL) et en ECL d'une même bille en vue de profil. La zone hachurée représente la réflexion de la PL de la bille sur la surface de l'électrode. Barre d'échelle : 10 µm.

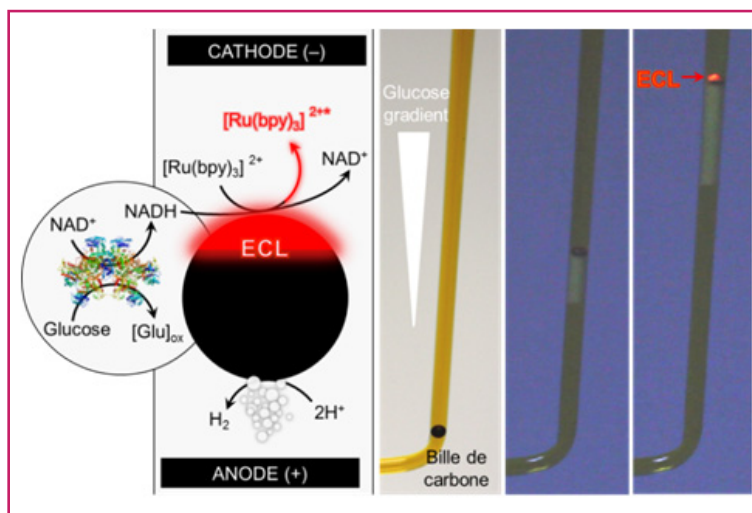


Figure 2 - « Nageurs ECL » bipolaires couplés à une réaction enzymatique pour explorer et analyser un gradient de concentration de glucose.

biotinylé sert de relais dans la chaîne de biorecognition. Enfin, une streptavidine fonctionnalisée par un marqueur dérivé de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ permet d'accrocher le marqueur ECL dans le cas d'un échantillon positif contenant l'anticorps cible anti-tTG. L'oxydation de la TPrA au niveau des nanoélectrodes d'or génère des flux locaux importants de $\text{TPrA}^{\bullet+}$ et de TPrA^\bullet qui réagissent avec le marqueur immobilisé et induisent le signal ECL. Ce dispositif d'analyse a donné des résultats remarquables sur des échantillons de sérum de patients avec une réponse linéaire en concentration entre 1 ng/mL et 10 µg/mL.

Le développement d'objets miniaturisés capables de s'auto-propulser de façon autonome et éventuellement d'accomplir des fonctions analytiques a attiré l'intérêt de la communauté scientifique au cours de la dernière décennie [9]. En associant l'électrochimie bipolaire (EBP) [10] et l'ECL, nous avons récemment montré qu'il était également possible de concevoir des « nageurs ECL » (figure 2) capables d'analyser une solution présentant un gradient de concentration en analyte (glucose) [11]. L'EBP consiste à appliquer un champ électrique suffisamment grand pour déclencher des réactions électrochimiques asymétriques de part et d'autre d'une bille de carbone, qui se comporte donc comme une électrode bipolaire. Le dessous de la bille devient une cathode où les protons sont réduits en dihydrogène. Ces bulles de gaz poussent naturellement la bille vers le haut du capillaire, d'où le terme de « nageur ». Le dessus de la bille se comporte comme

une anode où l'ECL est générée [11]. L'idée ici est d'utiliser comme co-réactif ECL une espèce dont la production dépend directement de la concentration locale en glucose. En effet, une enzyme de type déshydrogénase est ajoutée en solution car elle oxyde le glucose en utilisant comme co-facteur le NAD^+ , lequel est transformé en NADH (figure 2). En solution, seul le NADH permet d'initier le mécanisme ECL. De ce fait, la bille n'émet de la lumière qu'à partir d'une position haute dans le capillaire où le glucose est présent [12]. Ce couplage original entre ECL et EBP permet d'envisager de nombreuses applications pour la détection en temps réel et l'imagerie de gradients moléculaires.

Note et références

- (1) 1,3 milliard d'analyses immunologiques basées sur la technologie ECL ont été réalisées en 2013. Source : Roche Diagnostics, Business Overview Report.
- [1] Bard A.J., *Electrogenerated Chemiluminescence*, M. Dekker, **2004**.
- [2] a) Miao W., *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, p. 2506 ; b) Rampazzo E. *et al.*, *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, *256*, p. 1664.
- [3] Deiss F., LaFratta C.N., Symer M., Blicharz T.M., Sojic N., Walt D.R., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, p. 6088.
- [4] a) Miao W., Choi J.-P., Bard A.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, p. 14478 ; b) Klymenko O.V., Svir I., Amatore C., *ChemPhysChem*, **2013**, *14*, p. 2237.
- [5] Sentic M., Milutinovic M., Kanoufi F., Manojlovic D., Arbault S., Sojic N., *Chem. Sci.*, **2014**, *5*, p. 2568.
- [6] Aouani H., Deiss F., Wenger J., Ferrand P., Sojic N., Rigneault H., *Opt. Express*, **2009**, *17*, p. 19085.
- [7] Bottari F., Oliveri P., Ugo P., *Biosens. Bioelectron.*, **2014**, *52*, p. 403.
- [8] Habtamu H.B., Sentic M., Silvestrini M., De Leo L., Not T., Arbault S., Manojlovic D., Sojic N., Ugo P., *soumis*.
- [9] a) Duan W. *et al.*, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **2015**, *8*, p. 311 ; b) Ismagilov R.F., Schwartz A., Bowden N., Whitesides G.M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *42*, p. 652.
- [10] a) Fosdick S.E., Knust K.N., Scida K., Crooks R.M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, p. 10438 ; b) Mavrè F. *et al.*, *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, p. 6218 ; c) Loget G., Zigah D., Bouffier L., Sojic N., Kuhn A., *Acc. Chem. Res.*, **2013**, *46*, p. 2513.
- [11] a) Sentic M., Loget G., Manojlovic D., Kuhn A., Sojic N., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, p. 11284 ; b) Bouffier L., Zigah D., Adam C., Sentic M., Fattah Z., Manojlovic D., Kuhn A., Sojic N., *ChemElectroChem*, **2014**, *1*, p. 95.
- [12] Sentic M., Arbault S., Goudeau B., Manojlovic D., Kuhn A., Bouffier L., Sojic N., *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, p. 10202.



L. Bouffier



A. Kuhn



N. Sojic

Laurent Bouffier est chargé de recherche au CNRS, **Alexander Kuhn** et **Neso Sojic** (auteur correspondant), professeurs à l'INP Bordeaux, Institut des Sciences Moléculaires, Équipe « Nanosystèmes analytiques »*.

* Institut des Sciences moléculaires, UMR CNRS 5255, Équipe « Nanosystèmes analytiques », ENSCBP, Université de Bordeaux, 16 avenue Pey Berland, F-33607 Pessac.
Courriels : Laurent.Bouffier@enscbp.fr ; Alexander.Kuhn@enscbp.fr ; Neso.Sojic@enscbp.fr