



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par** *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*  
**Discipline ou spécialité :** *Chimie- Biologie -Santé*

---

**Présentée et soutenue par** *Armelle MONTROSE*  
**Le** *22 Mars 2013*

**Titre :**

*Développement d'un immunocapteur impédimétrique pour la détection  
et la quantification d'une sous- population cellulaire :  
Application au diagnostic précoce des infections*

---

**JURY**

*Eric BENOIST, Professeur d'université, SPCMIB Toulouse (Président)*  
*Rosaria FERRIGNO, Professeur d'université, INL Lyon (Rapporteur)*  
*Laurence MORA-PONSONNET, Professeur d'université, LBPC Paris13 (Rapporteur)*  
*Anne- Marie GUE, Directrice de Recherche CNRS, LAAS-CNRS Toulouse*  
*Karine REYBIER, Maître de conférences, PHARMA-DEV Toulouse 3*

---

**Ecole doctorale :** *Ecole Doctorale Sciences de la Matière*  
**Unité de recherche :** *Laboratoire de Pharmacochimie et Pharmacologie pour le développement,  
UMR 152 IRD-Université*  
**Directeur(s) de Thèse :** *Dr. Karine REYBIER*



*A mes deux grands-mères,  
Mamie Julie et Mamie Raymonde,*

*A mes parents,  
Maman et JP,*

*A ma famille et à ma tante qui m'ont toujours soutenue,*

*A la mémoire de mon père,*

« Le guerrier de la lumière doit toujours garder à l'esprit les cinq règles du combat écrites par Tchouang-tseu il y a plus de deux mille ans :

- La foi : avant d'entreprendre une bataille, il faut croire au motif de la lutte.
- Le compagnon : choisis tes alliés et apprends à combattre à leurs côtés, car personne ne gagne une guerre tout seul.
- Le temps : une bataille en hiver est différente d'une bataille en été ; un bon guerrier choisit le moment d'entreprendre le combat.
- L'espace : on ne lutte pas pareillement dans un défilé et dans une plaine. Considère l'espace qui t'entoure et la meilleure manière de t'y mouvoir.
- La stratégie : le meilleur guerrier est celui qui planifie son combat. »

Paulo Coelho, *Manuel du guerrier de la lumière*

« Le guerrier de la lumière connaît la valeur de la persévérance et du courage. Très souvent, au cours du combat, il reçoit des coups auxquels il ne s'attendait pas. Il sait que, durant la guerre, l'ennemi gagnera quelques batailles. Lorsque cela se produit, il pleure de tristesse et se repose pour reprendre des forces. Puis aussitôt il retourne lutter pour ses rêves. Car plus il restera à l'écart, plus il risquera de se sentir faible, craintif, intimidé. Si un cavalier tombe de cheval et ne remonte pas en selle dans la minute qui suit, jamais il n'aura le courage de recommencer. »

Paulo Coelho, *Manuel du guerrier de la lumière*

# Remerciements

---

Après un peu plus de 3 ans passés au sein du Laboratoire de Pharmacochimie et de pharmacologie pour le développement, PHARMA-DEV, UMR 152, IRD- Université Paul Sabatier, je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude à Françoise Nepveu, pour m'avoir accueillie dans l'unité et dans son équipe de recherche, pour sa disponibilité, son aide et ses conseils précieux.

Je remercie bien sûr Karine Reybier, ma directrice de thèse, pour avoir su me soutenir, m'encourager et partager ses connaissances, sa curiosité scientifique et son temps toujours avec le sourire et la convivialité. J'ai pu profiter quotidiennement avec Jan Sudor de sa bonne humeur communicative et chaleureuse. Je tiens à les remercier tous les deux du fond du cœur. Leur disponibilité malgré leur emploi du temps chargé et leur humanité m'ont permis de mener ce travail dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier Laurence Mora-Ponsonnet et Rosaria Ferrigno d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. De même, je remercie Eric Benoist pour avoir accepté de faire partie du jury de thèse. Enfin, je remercie Emmanuelle Guillot-Combe et la Direction Générale de l'Armement (DGA) pour leur soutien durant ces trois ans de thèse.

Je tiens également à remercier le personnel de la plateforme biologique de l'UMR 152, dirigé par Alexis Valentin et celui du laboratoire de la FONDEREPHAR. Merci particulièrement à Haouria, Ingrid et à Leila pour le temps qu'elles m'ont consacré et leurs nombreux conseils. Un grand merci particulier à Béatrice Moukarzel pour m'avoir formée aux techniques de manipulations biologiques et pour m'avoir consacrée du temps. Merci pour ta bonne humeur et ton oreille attentive !

Je remercie tous les membres, passés et présents, permanents et non permanents, du laboratoire qui m'ont permis de travailler dans une ambiance sympathique : Marie-Agnès Bellières, Eliane Péliou, Fabrice Collin, Nicolas Fabre, Hany Ibrahim, Marion Rivaud, Valérie Jullian, Anne-Cécile Lelamer, Marie-France Lecompte, Geneviève Bourdy, Eric Deharo, Mohamed Haddad, Valérie Gouaze-Andersson, Stéphanie Caze-Subra, Agnès Aubouy, Alexis Valentin... J'en oublie forcément en voulant tous les citer et je m'en excuse d'avance mais j'ai une pensée pour Romain Duval et Ennaji Najahi et je les remercie pour leur compagnie durant mes manips tardives. Merci à Pierre Perio pour avoir toujours répondu à mes sollicitations techniques et pour sa patience.

Et merci à tous ceux avec qui j'ai partagé les repas du midi dans le laboratoire, Thu, Lulu, L-E, Gandalf, Nambi. Merci pour les fous rires, l'horoscope quotidien et votre bonne humeur ! Merci à Yen, Cycy, Nehal pour nos petites discussions et les bons moments ensemble.

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé en partie au Laboratoire d'Analyses et d'architecture Structurale, dans le cadre d'un accueil RENATECH. Je souhaite remercier Raja Chatila et Jean Arlat, directeurs successifs du LAAS, d'avoir rendu possible cette collaboration. Je tiens à remercier tout particulièrement Anne-Marie Gué, directrice adjointe au LAAS, pour m'avoir accueillie et encadrée au LAAS une 1<sup>ère</sup> fois lors de mon stage de master 2, et une seconde fois dans le cadre de cette thèse. Un grand merci à tous pour la confiance et le soutien infaillible que vous m'avez accordé.

Je tiens à adresser tous mes remerciements à l'ensemble du service TEAM, et plus particulièrement à Véronique Conédéra, Laurent Mazenq et Adrian Laborde pour m'avoir initiée à la photolithographie et aidée à surmonter chaque difficulté ou bêtise (oui, j'en ai fait plus d'une !!) en salle blanche. De même, j'exprime toute ma gratitude à Boubou (Laurent Bouscayrol) pour son aide, sa présence et sa bonne humeur à chacun de mes passages au LAAS.

Merci à Sébastien Cargou, doctorant au LAAS pour sa persévérance et son dévouement lors de nos manips communes.

Je remercie toutes les personnes croisées au laboratoire et à travers différentes activités parallèles (telles que le rugby, les soirées, la salsa) qui ont égayés mes trois années : Mes Zoulouzaines !!!, Flo, Mathou, Gayou, Cédric, Nadia, Lionel.

Merci Toulouse pour ces belles rencontres professionnelles et personnelles !!!

Enfin, Merci à mes parents, à ma famille et à tous ceux qui m'ont soutenue et encouragée de près ou de loin dans toutes mes entreprises.

# Sommaire

---

|   |            |
|---|------------|
| <b>Remerciements</b> .....  | <b>iii</b> |
| <b>Sommaire</b> .....   | <b>iv</b>  |
| <b>Introduction générale</b> .....  | <b>1</b>   |
| <b>Chapitre 1 : Les biocapteurs au service du diagnostic</b> .....                          | <b>3</b>   |
| <b>Introduction</b> .....   | <b>5</b>   |
| <b>I. Généralités sur les biocapteurs</b> .....   | <b>6</b>   |
| I.1. Définition .....   | 6          |
| I.2. Biorécepteurs .....  | 8          |
| I.2.1. Biorécepteurs d'affinité .....   | 8          |
| I.2.2. Biorécepteurs métaboliques .....   | 11         |
| I.2.3. Biorécepteurs biomimétiques .....  | 12         |
| I.3. Transducteurs .....  | 13         |
| I.3.1. Transduction optique .....   | 14         |
| I.3.2. Transduction piézoélectrique .....   | 18         |
| I.3.3. Transduction thermique .....   | 22         |
| I.3.4. Transduction électrochimique .....   | 22         |
| I.4. Bio-fonctionnalisation des transducteurs .....   | 28         |
| I.4.1. Couplage covalent .....  | 29         |
| I.4.2. Réticulation .....   | 29         |
| I.4.3. Adsorption .....   | 30         |
| I.4.4. Emprisonnement physique .....  | 30         |
| <b>II. Biocapteurs et diagnostic</b> .....  | <b>30</b>  |
| II.1. Diabète .....   | 31         |
| II.1.1. Présentation du diabète sucré .....   | 31         |
| II.1.2. Biocapteurs pour le diagnostic et le suivi thérapeutique du diabète sucré .....     | 32         |
| II.2. Maladies cardio-vasculaires .....   | 41         |
| II.2.1. Présentation des maladies cardiovasculaires .....                                   | 41         |
| II.2.2. Biocapteurs pour le diagnostic et le pronostic des maladies cardiovasculaires ..... | 42         |
| II.3. Dérèglements neurologiques .....  | 45         |
| II.3.1. Présentation des dérèglements neurologiques .....                                   | 45         |
| II.3.2. Biocapteurs pour le diagnostic des maladies neurodégénératives .....                | 47         |
| II.4. Cancer .....  | 49         |
| II.4.1. Présentation du cancer .....  | 49         |
| II.4.2. Biocapteurs pour le diagnostic et le suivi des traitements du cancer .....          | 50         |
| II.5. Maladies infectieuses .....   | 52         |
| II.5.1. Présentation des maladies infectieuses .....  | 52         |
| II.5.2. Biocapteurs pour le diagnostic des maladies infectieuses .....                      | 54         |
| <b>Conclusion</b> .....   | <b>56</b>  |

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| <b>Bibliographie .....</b> | <b>57</b> |
|----------------------------|-----------|

## **Chapitre 2 : Présentation du sujet de thèse :Un biocapteur pour le tri et le comptage d'une sous population cellulaire..... 65**

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| <b>Introduction.....</b> | <b>67</b> |
|--------------------------|-----------|

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I. Alternative au cytomètre de flux .....</b>                       | <b>67</b> |
| I.1. Contexte du projet .....  | 67        |
| I.2. Dispositif de tri et de comptage .....                            | 68        |
| <b>II. Application à la détection précoce des infections .....</b>     | <b>70</b> |
| II.1. Modèle des monocytes : un marqueur cellulaire précoce .....      | 71        |
| II.1.1. Choix de l'analyte .....                                       | 71        |
| II.1.2. Rôle des monocytes lors d'infections .....                     | 71        |
| II.2. Biocapteur impédimétrique pour la détection des infections ..... | 73        |
| II.2.1. Choix du biorécepteur.....                                     | 73        |
| II.2.2. Choix du transducteur.....                                     | 75        |
| II.2.3. Choix de la bio-fonctionnalisation .....                       | 80        |

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| <b>Conclusion .....</b> | <b>84</b> |
|-------------------------|-----------|

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| <b>Bibliographie .....</b> | <b>85</b> |
|----------------------------|-----------|

## **Chapitre 3 : Modification et caractérisation de l'immunocapteur pour la détection cellulaire.....88**

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| <b>Introduction.....</b> | <b>90</b> |
|--------------------------|-----------|

|   |            |
|---|------------|
| <b>I. Biofonctionnalisation des électrodes d'or .....</b>                               | <b>90</b>  |
| I.1. Fabrication des électrodes d'or .....  | 90         |
| I.2. Procédé de modification des électrodes .....                                       | 91         |
| I.2.1. Nettoyage des électrodes .....   | 91         |
| I.2.2. Protocole de fonctionnalisation.....   | 91         |
| I.3. Caractérisation de la bio-fonctionnalisation .....                                 | 93         |
| I.3.1. Caractérisation électrochimique de l'immunocapteur .....                         | 93         |
| I.3.2. Caractérisation piézoélectrique .....  | 98         |
| I.3.3. Caractérisation optique .....  | 102        |
| I.4. Optimisation du protocole de fonctionnalisation .....                              | 107        |
| I.4.1. Utilisation des aminothiols .....  | 107        |
| I.4.2. Réduction du temps de dépôt des SAMs mixtes avec une fonction carboxylique ..... | 111        |
| I.4.3. Réduction du temps de dépôt de la PG .....                                       | 113        |
| <b>II. Piégeage immunologique de la sous population cellulaire cible .....</b>          | <b>115</b> |
| II.1. Caractérisation du piégeage cellulaire .....                                      | 115        |
| II.1.1. Détection des monocytes par spectroscopie d'impédance électrochimique .....     | 115        |
| II.1.2. Caractérisation optique du piégeage .....                                       | 120        |
| II.2. Optimisation de la détection cellulaire .....                                     | 121        |
| II.2.1. Influence de la conductivité.....   | 121        |
| II.2.2. Influence de la taille des électrodes.....                                      | 122        |
| II.3. Caractérisation des performances de l'immunocapteur impédimétrique .....          | 125        |



|   |            |
|---|------------|
| II.3.1. Piégeage sélectif et spécifique des monocytes.....                                | 125        |
| II.3.2. Calibration de l'immunocapteur .....  | 126        |
| <b>Conclusion .....</b>   | <b>132</b> |
| <b>Bibliographie .....</b>  | <b>133</b> |
| <br>  |            |
| <b>Chapitre 4 : Intégration de l'immunocapteur dans un dispositif microfluidique.....</b> | <b>135</b> |
| <br>  |            |
| <b>Introduction.....</b>  | <b>137</b> |
| <br>  |            |
| <b>I. Miniaturisation des électrodes d'or .....</b>                                       | <b>137</b> |
| I.1. Méthodes générales de fabrication des microélectrodes <sup>1</sup> .....             | 137        |
| I.1.1. La définition des motifs.....  | 138        |
| I.1.2. La métallisation .....   | 138        |
| I.1.3. La structuration des électrodes .....  | 140        |
| I.1.4. La passivation .....   | 141        |
| I.2. Fabrication des microélectrodes d'or du système électrochimique .....                | 142        |
| I.2.1. Choix du design des microélectrodes .....  | 142        |
| I.2.2. Choix du procédé technologique .....   | 144        |
| I.2.3. Procédés de fabrication réalisés .....   | 145        |
| <br>  |            |
| <b>II. Validation de la miniaturisation de l'immunocapteur impédimétrique .....</b>       | <b>149</b> |
| II.1. Caractérisation des microélectrodes du procédé 1.....                               | 149        |
| II.2. Caractérisation des microélectrodes du procédé 2.....                               | 151        |
| II.2.1. En mode faradique.....  | 151        |
| II.2.2. En mode non faradique.....  | 151        |
| <br>  |            |
| <b>III. Fabrication du dispositif microfluidique .....</b>                                | <b>153</b> |
| III.1. Fabrication de la canalisation microfluidique .....                                | 153        |
| III.1.1. Fabrication du moule en SU-8 par photolithographie .....                         | 154        |
| III.1.2. Moulage du dispositif microfluidique .....                                       | 155        |
| III.2. Assemblage des microélectrodes et de la canalisation .....                         | 155        |
| III.3. Perspectives de l'intégration des microélectrodes .....                            | 156        |
| <br>  |            |
| <b>Conclusion .....</b>   | <b>158</b> |
| <b>Bibliographie .....</b>  | <b>159</b> |
| <br>  |            |
| <b>Conclusion générale.....</b>   | <b>160</b> |
| <b>Annexes.....</b>   | <b>162</b> |
| <b>Résumé.....</b>  | <b>175</b> |
| <b>Abstract.....</b>  | <b>176</b> |

# Introduction générale

---

L'émergence de nouvelles technologies et la combinaison des sciences des matériaux, de la biologie moléculaire et de la génomique ont permis le développement d'une nouvelle classe de dispositifs analytiques. Les outils de détection analytiques existants et utilisés en routine sont souvent encombrants, onéreux à l'achat et surtout lents. La technologie des biocapteurs propose des solutions d'analyse rapides, sensibles, simples de mise en œuvre, de faible coût et facilement adaptables à la production de masse. Les biocapteurs sont ainsi devenus des outils essentiels dans de nombreux domaines d'applications liés à l'analyse des aliments, à la qualité de l'environnement, au bioterrorisme et au biomédical. C'est d'ailleurs pour les applications médicales que les biocapteurs connaissent l'engouement le plus important. Ils permettent à travers une approche pluridisciplinaire de développer des dispositifs portables intégrés de type laboratoire sur puce pour le diagnostic précoce et/ou le pronostic médical.

L'objectif de ce mémoire est de développer un biocapteur pour le tri et le comptage d'une sous-population cellulaire. Il s'intègre dans un projet de recherche plus vaste consistant à réaliser un laboratoire sur puce pour le tri et le comptage de sous-populations cellulaires composé de deux modules : le module 1 qui permet le tri magnétique des cellules cibles marquées par des billes magnétiques et le module 2 qui permet un tri immunologique et quantitatif d'une sous-population cellulaire des cellules marquées. Un tel laboratoire sur puce apporterait une alternative majeure pour le diagnostic de premier niveau ou le suivi de traitement. La première application visée est le diagnostic précoce des maladies infectieuses *via* la détection des monocytes anti-inflammatoires et pro-inflammatoires du sang, la différenciation se faisant par la surexpression des antigènes CD 16 à la surface des monocytes dès les premiers stades du processus infectieux.

Le travail réalisé dans ce mémoire concerne essentiellement le module 2, c'est-à-dire la réalisation d'un dispositif de piégeage immunologique, la détection et le comptage des monocytes étant réalisés par spectroscopie d'impédance électrochimique.

La première partie de ce mémoire est consacrée, dans un premier temps, à la présentation générale des biocapteurs puis, dans un second temps, à l'état de l'art concernant l'utilisation de biocapteurs pour le diagnostic précoce et en temps réel d'états pathologiques.

Dans une seconde partie, le contexte dans lequel se situe le sujet de thèse ainsi que les différents choix technologiques associés à la conception du biocapteur sont discutés au travers de l'application envisagée.

La troisième partie est dédiée au développement et à la caractérisation du biocapteur pour la détection cellulaire. L'immobilisation du biorécepteur, étape critique de la conception d'un capteur, est d'abord présentée pour des électrodes d'or macroscopiques. Puis, la détection du piégeage cellulaire et les performances du capteur sont étudiées.

Enfin dans une dernière partie, la miniaturisation du capteur en vue de son intégration dans un dispositif microfluidique est présentée. Les différentes technologies utilisées pour la fabrication des microélectrodes ainsi que les résultats obtenus pour le piégeage des cellules sont détaillés. Le protocole d'intégration des microélectrodes dans une canalisation microfluidique est également abordé.

# Chapitre 1

---

## Les biocapteurs au service du diagnostic



## *Les biocapteurs au service du diagnostic*

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Introduction.....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>I. Généralités sur les biocapteurs .....</b>   | <b>6</b>  |
| I.1. Définition.....  | 6         |
| I.2. Biorécepteurs .....  | 8         |
| I.2.1. Biorécepteurs d'affinité .....   | 8         |
| I.2.2. Biorécepteurs métaboliques.....  | 11        |
| I.2.3. Biorécepteurs biomimétiques.....   | 12        |
| I.3. Transducteurs.....   | 13        |
| I.3.1. Transduction optique.....  | 14        |
| I.3.2. Transduction piézoélectrique .....   | 18        |
| I.3.3. Transduction thermique .....   | 22        |
| I.3.4. Transduction électrochimique .....   | 22        |
| I.4. Bio-fonctionnalisation des transducteurs .....   | 28        |
| I.4.1. Couplage covalent.....   | 29        |
| I.4.2. Réticulation .....   | 29        |
| I.4.3. Adsorption .....   | 30        |
| I.4.4. Emprisonnement physique .....  | 30        |
| <b>II. Biocapteurs et diagnostic.....</b>   | <b>30</b> |
| II.1. Diabète .....   | 31        |
| II.1.1. Présentation du diabète sucré .....   | 31        |
| II.1.2. Biocapteurs pour le diagnostic et le suivi thérapeutique du diabète sucré.....      | 32        |
| II.2. Maladies cardio-vasculaires .....   | 41        |
| II.2.1. Présentation des maladies cardiovasculaires .....                                   | 41        |
| II.2.2. Biocapteurs pour le diagnostic et le pronostic des maladies cardiovasculaires ..... | 42        |
| II.3. Dérèglements neurologiques .....  | 45        |
| II.3.1. Présentation des dérèglements neurologiques .....                                   | 45        |
| II.3.2. Biocapteurs pour le diagnostic des maladies neurodégénératives .....                | 47        |
| II.4. Cancer.....   | 48        |
| II.4.1. Présentation du cancer .....  | 49        |
| II.4.2. Biocapteurs pour le diagnostic et le suivi des traitements du cancer .....          | 50        |
| II.5. Maladies infectieuses .....   | 52        |
| II.5.1. Présentation des maladies infectieuses.....   | 52        |
| II.5.2. Biocapteurs pour le diagnostic des maladies infectieuses.....                       | 54        |
| <b>Conclusion .....</b>   | <b>56</b> |
| <b>Bibliographie .....</b>  | <b>57</b> |

## Introduction

Depuis l'année 1962 au cours de laquelle Clark et Lyon<sup>1</sup> ont développé le premier biocapteur pour la détection du glucose, la recherche dans ce domaine a connu un développement considérable. Le nombre de références bibliographiques comportant le terme « biocapteur » dans le titre ou le résumé a suivi une croissance exponentielle au cours des vingt dernières années. De 42 références en 1991, ce nombre est passé à 1046 en 2011 (source pubmed), montrant ainsi l'engouement autour de ces technologies.

Cet intérêt croissant pour les biocapteurs peut être attribué aux progrès technologiques importants dans le domaine de la microélectronique, des matériaux et de la biologie moléculaire. De plus, les biocapteurs constituent une nouvelle classe de dispositifs analytiques plus spécifiques, rapides et sensibles que les méthodes traditionnelles dans de nombreux domaines d'applications<sup>2</sup> dont les principaux sont présentés sur la Figure 1.

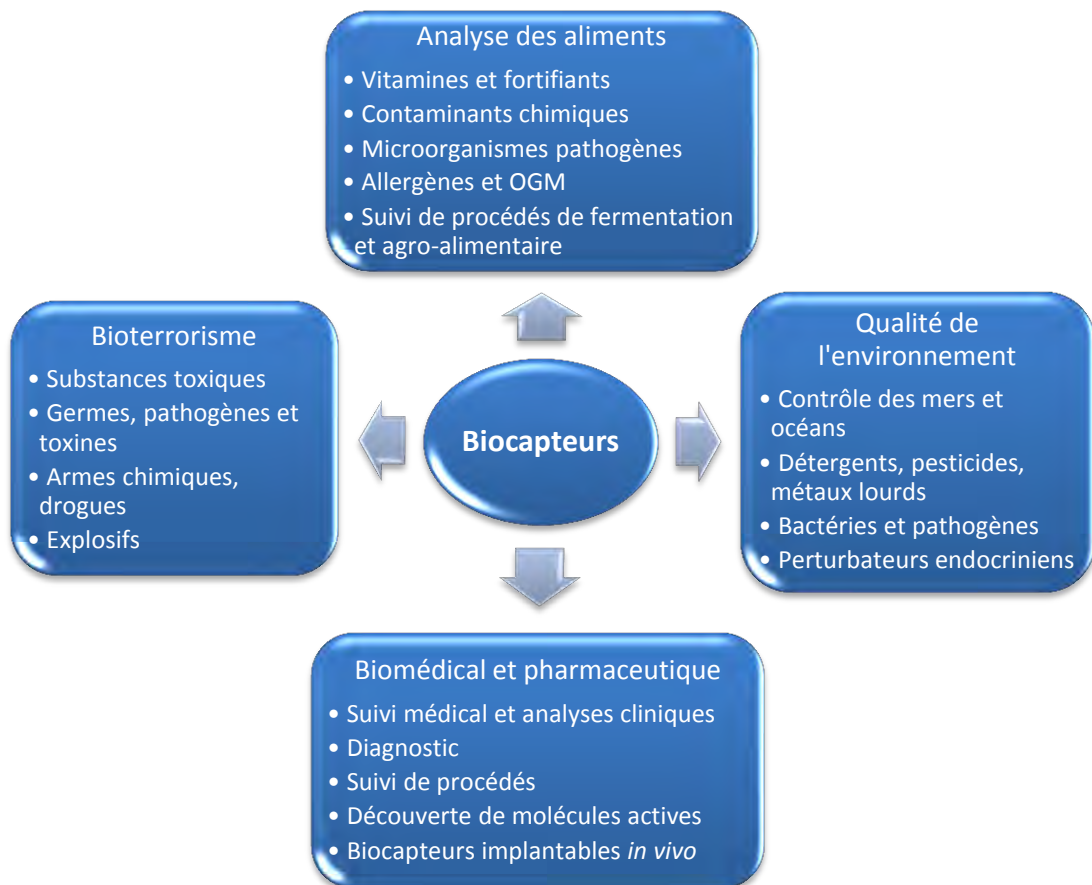


Figure 1 : Principales applications des biocapteurs

L'évolution des normes de plus en plus strictes de l'industrie alimentaire a contribué au développement de biocapteurs pour l'analyse des produits (essentiellement de grande consommation). Ils permettent l'étude de la qualité de viandes, de poissons, de la composition de nourriture ou de la présence de toxines d'origine bactérienne<sup>2,3</sup>. De même, le contrôle de la qualité de l'environnement étant une préoccupation majeure, les

biocapteurs environnementaux donnent des informations importantes sur la qualité de l'eau, allant de la détection de détergents, de polluants considérés comme perturbateurs endocriniens<sup>4</sup> à la détermination de la composition chimique de l'eau<sup>5</sup>, en passant par la détection d'algues marines toxiques.

Depuis le 11 septembre 2001 et les envois de courriers contenant de l'anthrax, le besoin de renforcer la sécurité nationale et les techniques de biosurveillance a contribué au développement de nombreux biocapteurs pour la lutte contre le terrorisme<sup>6-8</sup>.

Les applications dans le domaine médical et pharmaceutique connaissent les succès les plus importants et lucratifs. C'est d'ailleurs dans ces domaines que les efforts en termes de recherche et développement sont les plus remarquables. De nombreux biocapteurs ont été développés pour le contrôle de biomarqueurs de santé tels que le cholestérol<sup>9</sup>, le glucose<sup>10</sup>, les applications de diagnostic rapide en temps réel, de type « *point-of-care* », et la découverte de nouveaux médicaments<sup>11</sup>.

Ce chapitre n'a pas l'ambition de décrire l'ensemble des systèmes existants mais de donner une vue globale du fonctionnement des biocapteurs dans les applications biomédicales. La première partie de ce chapitre sera consacrée à la présentation générale des biocapteurs et en particulier des différents types de biorécepteurs, de transducteurs existants et des techniques générales d'assemblage associées. La seconde partie sera quant à elle dédiée à l'utilisation des biocapteurs pour des applications de diagnostic ainsi qu'à la présentation des avancées scientifiques dans ce domaine.

## I. Généralités sur les biocapteurs<sup>12-15</sup>

### I.1. Définition

Un biocapteur<sup>16</sup> est généralement défini comme étant un outil analytique qui convertit une réponse biologique en un signal physique mesurable. Il associe une membrane, appelée biorécepteur, qui comprend une espèce biologique permettant la reconnaissance sélective de la molécule recherchée, et un transducteur permettant de détecter et/ou de quantifier les biomolécules dans les aliments, l'environnement ou dans les liquides biologiques (Figure 2). Selon l'Union internationale de la Chimie Pure et Appliquée (IUPAC), un biocapteur doit être petit et compact, avoir un signal réversible, donner des déterminations précises et établir une connexion réelle entre le matériel biologique et le transducteur.

Le choix du biorécepteur dépend de l'analyte recherché. Au fil des années, différents biorécepteurs ont été utilisés. Il est possible d'utiliser toute molécule biologique permettant l'analyse spécifique de l'analyte cible. Les plus communs sont les enzymes, les acides nucléiques, les récepteurs de molécules biologiquement actives (hormones, toxines, facteurs

de croissance, neurotransmetteurs), les cellules entières, les organites cellulaires et les anticorps.

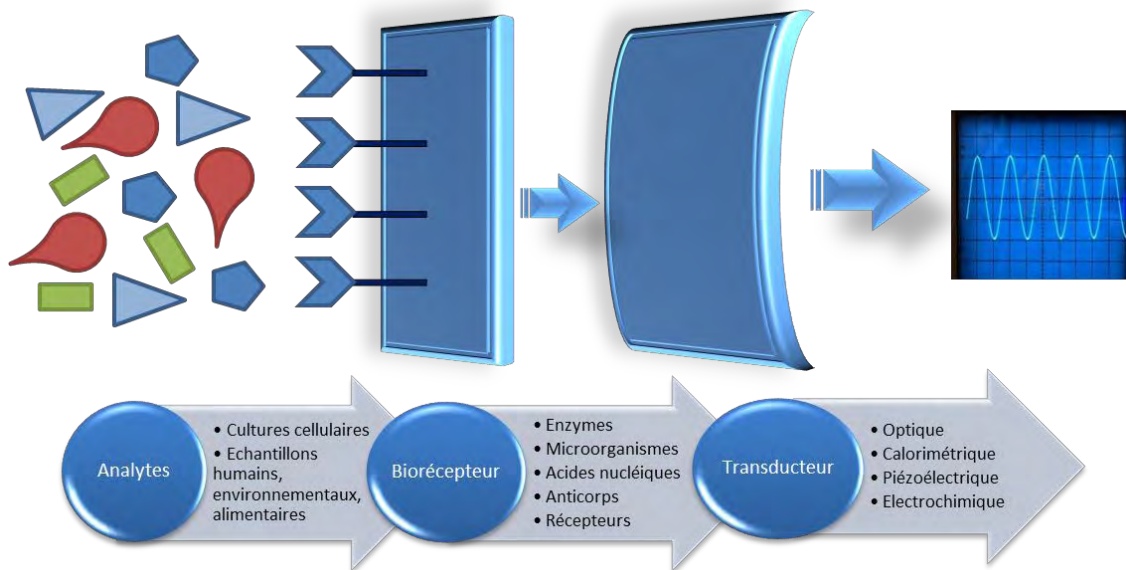


Figure 2 : Schéma du principe de fonctionnement d'un biocapteur

Chaque événement ayant lieu au niveau du biorécepteur peut produire un changement qui est transformé en un signal électrique quantifiable par le transducteur. Le type de transducteur est choisi en fonction des modifications biochimiques se produisant au niveau du biorécepteur. Le transducteur convertit ces changements en signaux électriques mesurables qui sont amplifiés et traités par des circuits électroniques. Les plus utilisés reposent sur l'optique, la calorimétrie, la piézoélectricité et l'électrochimie.

Comme toute méthode d'analyse, les performances des biocapteurs sont caractérisées par différents paramètres :

- ✓ la sélectivité : l'aptitude à détecter l'espèce cible à l'exclusion de toute autre. Ce paramètre dépend principalement du biorécepteur, bien que le choix du transducteur puisse contribuer à une bonne sélectivité.
- ✓ la sensibilité : le rapport entre la réponse du capteur et la variation correspondante de la grandeur à mesurer.
- ✓ la reproductibilité : la capacité du biocapteur à donner des réponses très voisines pour des mesures répétées de la même quantité d'analyte à mesurer.
- ✓ la limite de détection : la plus petite valeur de la grandeur à mesurer pouvant être détectée de façon significative.
- ✓ l'exactitude : c'est l'accord entre le résultat de la mesure et la valeur vraie de la grandeur mesurée ; l'écart est appelé erreur absolue.
- ✓ la durée de vie : période pendant laquelle les caractéristiques du capteur permettent son utilisation avec un degré de précision suffisant.



- ✓ la dérive : l'évolution de la ligne de base du capteur en l'absence de l'espèce cible.

Les biocapteurs peuvent être classés suivant différents types de critères :

- la réaction suivie,
- le biorécepteur,
- le transducteur.

Nous nous intéressons aux deux derniers critères car le choix de la biomolécule de reconnaissance et du transducteur peut directement influencer sur les performances du biocapteur.

## I.2. Biorécepteurs

Le biorécepteur correspond à tout composé biologique immobilisé sur un substrat qui reconnaît de manière spécifique l'analyte recherché. Les composés biologiques fixés peuvent être séparés en deux catégories : ceux fixant simplement l'analyte sans modification et ceux ayant une activité catalytique. L'étape de reconnaissance peut alors révéler soit un événement statique grâce aux biorécepteurs d'affinité soit un événement dynamique au travers des biorécepteurs métaboliques. Avec les progrès de la chimie et de la biochimie, une autre catégorie peut maintenant être intégrée : les récepteurs biomimétiques (Figure 3).

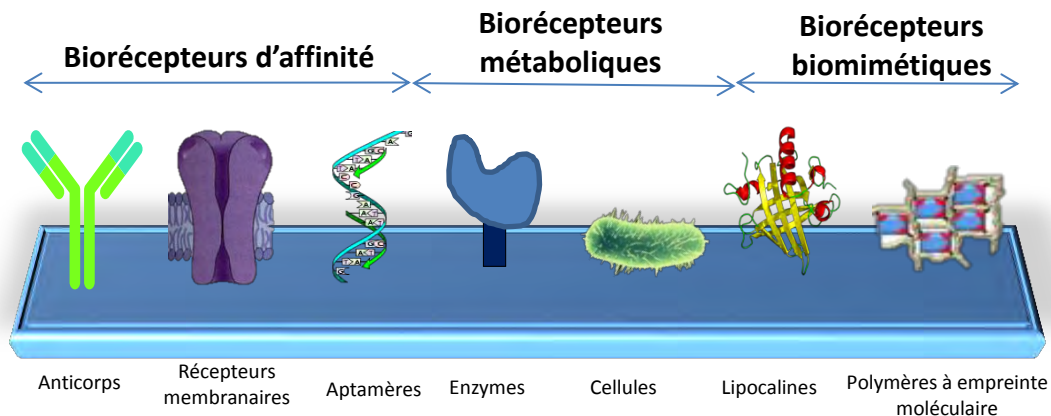
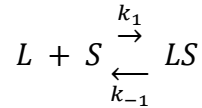


Figure 3 : Représentation des différents types de biorécepteurs

### I.2.1. Biorécepteurs d'affinité

Dans cette classe de biorécepteurs, nous retrouvons principalement les anticorps et les récepteurs membranaires. Ils fixent l'analyte sans provoquer de réaction chimique et présentent des avantages tels qu'une haute sélectivité, une forte affinité et une facilité de production.

Le principe des biocapteurs d'affinité repose sur la formation d'un complexe suite à l'interaction sélective entre l'analyte (L) et le biorécepteur (S) à l'équilibre. La reconnaissance de l'analyte est conditionnée par la constante d'équilibre K de la réaction suivante :



Avec  $k_1$  et  $k_{-1}$  les constantes de vitesse respectives des réactions directe et inverse et K étant définie par :

$$K = \frac{[LS]}{[L][S]} = \frac{k_1}{k_{-1}}$$

La constante d'équilibre K représente la constante d'affinité caractéristique de l'équilibre entre la surface fonctionnalisée par le biorécepteur et l'analyte. L'analyte détecté n'est pas détruit.

Pour un nombre de sites de ligands (L) donné, le nombre de complexes formés (LS) et le signal fourni par le transducteur devraient être proportionnels à la concentration de l'analyte (S). Ainsi, la sensibilité est d'autant plus grande que la valeur de K est grande. Cependant, pour K trop élevée, la réaction peut être irréversible, la dissociation du complexe étant lente.

La liaison mise en jeu lors de la formation du complexe n'est pas covalente, seules des liaisons hydrogènes, ioniques, de Van der Waals et hydrophobes sont formées. Cependant, la liaison est forte du fait des nombreuses interactions moléculaires.

#### 1.2.1.a. Les immunorécepteurs

Les biocapteurs utilisant des anticorps, des immunoglobines et leurs dérivés sont appelés immunocapteurs. Ils reposent sur la reconnaissance moléculaire spécifique des anticorps avec les antigènes correspondants. Les constantes d'affinité des anticorps varient entre  $10^5$  et  $10^{12} \text{ M}^{-1}$ . Grâce à leur grande spécificité, l'utilisation d'immunocapteurs convient particulièrement à la détection de faibles concentrations d'analytes dans des milieux complexes<sup>17</sup>.

Cependant, de tels biorécepteurs présentent un problème de réversibilité ce qui confine les biocapteurs dans lesquels ils sont intégrés à des mesures de détection « one shot » ou discontinues, entrecoupées d'une étape de régénération de la surface par un choc de pH qui induit une perte progressive de la sensibilité et de la spécificité du récepteur. Le manque de

reproductibilité, dû essentiellement à l'orientation des anticorps sur la surface de détection, constitue aussi un inconvénient majeur.

#### I.2.1.b. Les récepteurs membranaires

Les récepteurs membranaires sont des protéines non catalytiques et d'origines non-immunes, localisées dans la membrane cellulaire, dans le cytoplasme ou dans le noyau cellulaire. Ces molécules peuvent être des hormones, des neurotransmetteurs, des toxines, des facteurs de croissance ou encore des molécules odorantes. Leur constante d'affinité est supérieure ou égale à  $10^8 \text{ M}^{-1}$ .

On les différencie en trois classes selon leur structure moléculaire et leur mode d'action :

- Les récepteurs qui activent les canaux ioniques : la formation du complexe entraîne l'ouverture ou la fermeture des canaux ioniques<sup>18</sup>.
- Les récepteurs comportant une activité enzymatique associée ou intrinsèque : le complexe analyte-récepteur entraîne l'activation d'une réaction enzymatique<sup>19</sup>.
- Les récepteurs couplés aux protéines hétérotrimériques, les protéines G : le complexe active la protéine G ce qui entraîne la modulation de l'activité de différents effecteurs intracellulaires<sup>20</sup>.

Bien que ces biorécepteurs soient intéressants par leur spécificité et leur mode d'action, ils restent difficiles à intégrer dans des dispositifs de biodétection sans altérer leur activité.

#### I.2.1.c. Les acides nucléiques

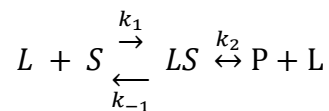
Les acides nucléiques sont des oligonucléotides constituant le matériel génétique cellulaire et les aptamères sont des fragments des brins d'ADN ou d'ARN. Ils peuvent être immobilisés en tant que double brin sur un transducteur physique pour le criblage rapide de toxines et pour l'identification de nouveaux principes actifs<sup>21</sup> ou sous forme d'un seul brin dans le but de détecter des processus d'hybridation<sup>22</sup> pour le diagnostic de maladies ou la génomique<sup>23</sup>. Ces molécules synthétiques ont la capacité de reconnaître différentes cibles avec des affinités et spécificités comparables à celles des anticorps pour des molécules variées (acides aminés, antibiotiques, ARN ou ADN, protéines)<sup>24</sup>.

L'équipe de Centi a réussi, à l'aide d'un aptamère antithrombine, à détecter la thrombine (protéine de la coagulation sanguine) à des concentrations subnanomolaires dans des milieux complexes<sup>25</sup>. Contrairement aux anticorps, les biocapteurs à aptamères sont réutilisables puisqu'une dénaturation du biorécepteur permet de régénérer le système. La principale limitation actuelle des aptamères développés est le nombre encore limité de cibles<sup>26</sup>.

### 1.2.2. Biorécepteurs métaboliques

Les biorécepteurs catalytiques ou métaboliques sont souvent choisis dans les biocapteurs pour leur capacité de reconnaissance et leur forte activité à de faibles concentrations. A la différence des biorécepteurs d'affinité, la réponse du biocapteur est basée sur une réaction catalysée par des macromolécules. La consommation continue des analytes est assurée par le biocatalyseur immobilisé à la surface du transducteur.

La réaction se déroule en deux étapes suivant la théorie de Michaelis-Menten : la formation rapide du complexe puis la conversion lente du complexe en produit (P).



Avec  $k_1$  et  $k_{-1}$  les constantes de vitesse respectives des réactions directe et inverse,  $k_2$  la constante de vitesse de formation du produit et  $K_M$ , la constante de Michaelis, définie par :

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

La constante d'affinité  $K_M$  correspond à la demi-saturation de l'enzyme et seules les concentrations inférieures à cette valeur sont exploitables pour une application biocapteur car à saturation, la production de P et le signal fourni par le capteur deviennent indépendants de la concentration de l'analyte.

#### 1.2.2.a. Les enzymes

A l'exception des acides ribonucléiques catalytiques, la plupart des enzymes sont des protéines structurées de façon à posséder un site actif qui leur confère la capacité de catalyser sur un substrat donné. Certaines enzymes sont de nature purement protéique et d'autres sont formées d'une protéine et d'un cofacteur. Le cofacteur peut être un ion métallique tel que  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ou une molécule organique telle que des vitamines. Les enzymes accélèrent de  $10^3$  à  $10^6$  fois la réaction correspondante qui se déroulerait sans catalyseur en abaissant l'énergie d'activation. De plus, les enzymes ont une stéréospécificité tellement forte qu'elles peuvent choisir parmi différents énantiomères et discriminer des groupes pratiquement identiques entre eux dans des mélanges complexes.

La détection d'analytes par les biorécepteurs enzymatiques relève de deux types de fonctionnement, la mesure directe de la substance cible ou du produit issu de l'activité enzymatique, ou la détection de l'inhibition de l'activité enzymatique<sup>27</sup>.

Les biocapteurs à enzymes permettent d'atteindre un seuil de détection satisfaisant mais posent des problèmes de stabilité dans le temps. L'activité catalytique dépend de la structure de la protéine native, de son domaine de pH, de la température et de la présence

d'activateurs ou d'inhibiteurs de la réaction, la dénaturation des enzymes supprimant toute activité. Enfin, les enzymes pures sont onéreuses.

#### 1.2.2.b. Les micro-organismes vivants

Ces biocapteurs cellulaires ou microbiens utilisent des microorganismes vivants comme élément de reconnaissance pour mesurer les changements physiologiques causés par un stimulus interne ou externe. Plusieurs types de microorganismes ont été utilisés, des bactéries, des levures, des champignons ou des tissus cellulaires. Les biocapteurs utilisant des cellules animales et végétales issues de cultures cellulaires sont exploités comme des indicateurs de toxicité pour l'étude de l'influence de paramètres exogènes sur l'activité cellulaire<sup>28</sup>. Grâce au génie génétique, il est également possible de modifier les cellules en introduisant un gène rapporteur qui génère un signal quand il est exposé à une substance cible.

Les microorganismes constituent une alternative intéressante à l'utilisation des enzymes. En effet, de nombreux enzymes et cofacteurs coexistant sur les cellules, ces dernières peuvent consommer et détecter plusieurs analytes. De tels systèmes de reconnaissance moléculaire présentent l'avantage de ne nécessiter aucune étape d'extraction ou de purification, par contre leur sélectivité et leur sensibilité sont souvent limitées. De plus, leur mise en œuvre est complexe car les cellules nécessitent un environnement particulier.

#### 1.2.3. Biorécepteurs biomimétiques

Les biorécepteurs biomimétiques sont des biorécepteurs synthétiques qui miment le comportement des biorécepteurs naturels avec les mêmes affinités et spécificités. Comme il a été mentionné dans les parties précédentes, les conditions d'utilisation et de conservation des biorécepteurs catalytiques et d'affinité limitent leur capacité (influence du milieu, stabilité thermique et temporelle) favorisant ainsi le développement de biorécepteurs synthétiques.

##### 1.2.3.a. Les lipocalines

Les lipocalines constituent une famille de protéines naturelles permettant le stockage ou le transport de composés organiques hydrophobes ou chimiquement sensibles comme les vitamines, les stéroïdes ou certains métabolites secondaires. Elles présentent une partie commune dont le repliement forme un baril  $\beta$  symétrique composé de huit feuillets antiparallèles reliés entre eux par des ponts hydrogènes et une cavité interne hydrophobe. La diversité structurale de la cavité donne lieu à une variété de spécificités de liaison<sup>29</sup>. Schlehuber *et al.*<sup>30</sup> ont démontré que la Bilin-Binding Protein (BBP), un membre de la famille des lipocalines, peut être modifiée structurellement afin de lui conférer une affinité vis-à-vis d'antigènes particuliers comme la digoxigénine.

Les lipocalines sont également utilisées pour la fabrication de protéines de liaison artificielles appelées anticalines<sup>31</sup>. Cette nouvelle classe de protéines est une alternative aux anticorps et aux fragments d'anticorps recombinants. En effet, elles sont très sélectives, résistantes aux changements de pH ou de température, cependant certains points critiques doivent encore être définis tels que la synthèse, la stabilité des anticalines et les constantes d'affinité associées.

### 1.2.3.b. Les polymères à impression moléculaire (MIP)

Les techniques d'impression moléculaire sont basées sur la préparation de polymères ayant une sélectivité prédéterminée pour une substance particulière et une spécificité similaire à celle d'une interaction antigène-anticorps<sup>32</sup>. Les polymères à empreinte moléculaire permettent d'encapsuler des analytes (Figure 4).

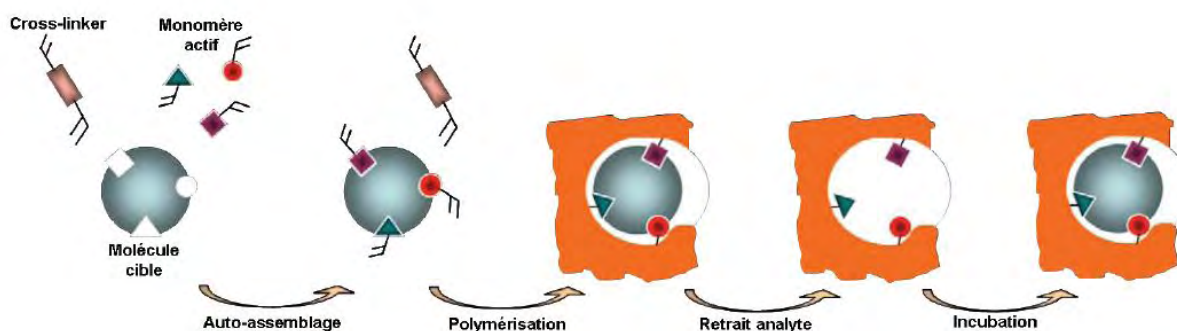


Figure 4 : Principe d'assemblage des polymères à empreinte moléculaire<sup>33</sup>

Des monomères fonctionnels de matériaux plastiques, tels que les méthacryliques ou les styrènes, sont capables de s'autoassembler avec des molécules cibles et de créer en présence d'un liant des interactions par polymérisation après irradiation sous UV ou des effets thermiques. La molécule d'intérêt est alors piégée à l'intérieur du polymère et est éliminée après polymérisation par extraction dans des solvants organiques. L'empreinte obtenue, moule de la substance cible, est maintenue dans le polymère rigide et possède une mémoire stérique (taille, forme) et chimique du ligand. Le moule peut alors se lier à l'analyte à détecter.

Les polymères à empreinte moléculaire offrent des propriétés de stabilité, de robustesse et de reproductibilité dans des conditions sévères<sup>34</sup> mais présentent quelques limitations dues aux difficultés d'optimisation des procédés de synthèse des polymères.

## 1.3. Transducteurs

Le transducteur est l'élément physique qui exploite la modification biochimique issue d'une interaction entre l'analyte et le biorecepteur pour la transformer en signal électrique. L'adéquation entre le type de transducteur et l'élément biologique permet d'obtenir un

signal sensible et facilement exploitable avec un minimum de bruit de fond. L'information donnée par le transducteur doit, tout comme le biorécepteur, être spécifique et ne doit correspondre qu'à la reconnaissance biologique.

Quatre types de transducteurs sont généralement utilisés pour la conception de biocapteurs. Ainsi le transducteur peut être :

- ✓ optique, mesurant des changements tels que l'absorption optique, la fluorescence ou l'indice de réfraction,
- ✓ piézoélectrique, mesurant un changement de masse,
- ✓ thermique, mesurant le changement de température accompagnant une réaction,
- ✓ électrochimique, basé sur le changement des propriétés électriques ou la production d'espèces rédox.

Les principes généraux des transducteurs les plus utilisés dans la littérature sont brièvement présentés de manière à pouvoir appréhender l'intérêt de chaque mode de transduction.

### ***1.3.1. Transduction optique<sup>35</sup>***

Le transducteur optique est un dispositif qui transforme la modification biochimique en information sous forme d'une grandeur optique. Ces informations, transportées par la lumière, sont la base des capteurs optiques qui forment le plus large groupe de transducteurs qui sont liés à la mesure de la lumière absorbée ou émise. Les principaux atouts de ces transducteurs sont généralement leur caractère non destructif qui autorise des mesures *in situ* et en temps réel, une insensibilité aux interférences électromagnétiques et une sensibilité de détection élevée.

La majorité de ces capteurs utilise les techniques d'absorption et de fluorescence ou fait appel à des phénomènes d'interférence de la lumière.

#### **1.3.1.a. L'absorbance**

Le principe des biocapteurs mesurant l'absorbance repose sur l'interaction entre le biorécepteur et l'analyte qui se traduit par l'apparition d'une coloration détectable à une certaine longueur d'onde dans le milieu réactionnel.

#### **1.3.1.b. La fluorescence**

L'association de l'analyte à détecter avec une molécule fluorescente, fluorophore ou fluorochrome, se traduit par l'émission ou la diminution de lumière. L'analyse quantitative est possible mais est difficile car le nombre de fluorophores sur chaque molécule cible ne peut être contrôlé avec précision.

Cette technique de détection est largement utilisée dans les systèmes miniaturisés et pour la mesure d'interactions biomoléculaires, grâce à sa sensibilité, sa sélectivité et sa capacité d'analyse simultanée d'un très grand nombre de données. Cependant, le marquage des analytes modifie la molécule qui n'est plus native et peut affecter la spécificité et la qualité de la reconnaissance avec les biorécepteurs. De plus, les marqueurs fluorescents présentent un certain nombre de limitations telles que le « quenching » qui résulte de l'absorption d'une partie de l'énergie par les autres molécules dans le milieu et le photoblanchiment, caractérisé par la perte des propriétés fluorescentes sous l'effet d'une excitation par une forte intensité lumineuse.

L'émission de lumière peut également provenir d'un organisme vivant suite à une réaction chimique au cours de laquelle l'énergie chimique est convertie en énergie lumineuse. On parle alors de bioluminescence.

#### I.3.1.c. La réflectométrie

La réflectométrie est basée sur le principe du radar et fait appel aux phénomènes d'interférences de la lumière. Cette technique ne nécessite pas de marquage de molécules. Un signal de sonde, envoyé sur la surface à analyser, se propage selon les lois de propagation du milieu étudié et lorsqu'il rencontre une discontinuité, une partie de son énergie est renvoyée vers le point d'injection. L'analyse du signal réfléchi permet de déduire des informations sur le système en mesurant la variation de l'indice de réfraction induite à la surface par l'interaction biologique ou chimique. Les capteurs optiques issus de cette dernière technologie sont l'ellipsométrie, l'interférométrie et la résonance de plasmon de surface.

#### L'ellipsométrie<sup>36</sup>

L'ellipsométrie est une technique d'analyse de surface permettant de caractériser les propriétés optiques des matériaux et de déterminer l'épaisseur des couches minces et des multicouches complexes. Le principe de base de l'ellipsométrie est la mesure de la modification de l'état de polarisation d'une onde lumineuse après réflexion sur l'échantillon à analyser. Une onde incidente, polarisée linéairement selon les composantes parallèle (p) et perpendiculaire (s), est envoyée en incidence oblique sur un échantillon. Lors de la réflexion sur la surface de l'échantillon, une partie de l'onde est transmise ou absorbée à travers la surface, et l'autre partie est réfléchie. L'état de polarisation du faisceau incident est par conséquent modifié. L'onde réfléchie est ensuite décomposée par un analyseur (Figure 5).



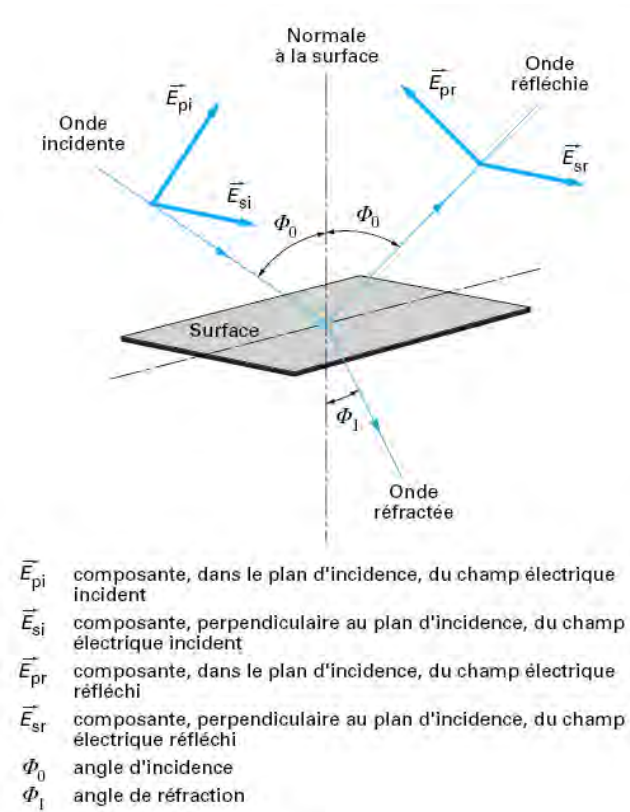


Figure 5 : Principe de l'ellipsométrie<sup>36</sup>

Cette technique, nécessitant un équipement sophistiqué, est très sensible et permet par une mesure indirecte de détecter des variations d'épaisseur de l'ordre de l'Angström<sup>37</sup>.

### L'interférométrie<sup>38,39</sup>

L'interférométrie permet de mesurer la différence de parcours optique entre deux faisceaux lumineux grâce aux franges d'interférences. Généralement, un faisceau laser est divisé en deux, puis ces faisceaux empruntent des parcours différents avant d'être recombinaés.

Pour être utilisés en tant que biocapteurs, les interféromètres nécessitent un guide d'ondes tel que la fibre optique. Un guide d'ondes diélectriques est composé d'un film, appelé structure guidante d'indice de réfraction élevé  $n_c$ , encadré de deux milieux d'indices plus faibles, le substrat d'indice  $n_g$  et le milieu d'indice  $n_s$  dans lequel les interactions biomoléculaires ont lieu. Lorsqu'un faisceau lumineux est injecté dans le guide, une onde électromagnétique, appelée onde évanescente, est générée et se propage perpendiculairement aux deux interfaces de la structure guidante. L'adsorption de molécules sur l'interface perturbe la propagation de l'onde évanescente entraînant alors des variations de phase et d'amplitude du faisceau réfléchi (Figure 6).

La sensibilité de détection étant inversement proportionnelle à l'épaisseur effective du guide d'ondes, l'épaisseur du guide doit être la plus faible possible.

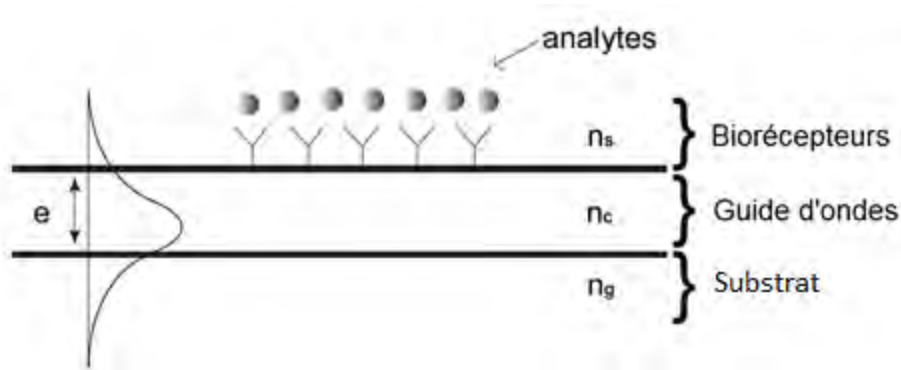


Figure 6 : Propagation d'une onde dans un guide d'ondes d'épaisseur  $e$ <sup>38</sup>

Plusieurs interféromètres ont été développés selon ce principe du guide d'ondes diélectriques tels que l'interféromètre de Young, de Mach-Zehnder, d'Hartman et l'interféromètre par rétrodiffusion.

Les interféromètres de Young, de Mach-Zehnder et d'Hartman ont des configurations et des performances semblables. Un faisceau laser injecté dans le guide génère une onde évanescente qui est divisée en deux. Le premier parcours de l'interféromètre est un guide d'onde fonctionnalisé par les biorécepteurs spécifiques à un analyte alors que le second parcours n'est pas fonctionnalisé. Le biocapteur interférométrique révèle alors la présence d'analytes par la modification de la phase d'un des faisceaux et de l'indice de réfraction. L'un de leurs principaux inconvénients est la nécessité d'une longueur de fenêtre de détection assez importante pour avoir une sensibilité suffisante<sup>40</sup>.

#### La Résonance Plasmonique de Surface (SPR)<sup>38,40,41</sup>

La résonance plasmonique de surface est le phénomène de résonance dû aux oscillations de charges électroniques suite à la génération d'une onde évanescente entraînée par la réflexion totale d'un faisceau lumineux à travers un coupleur, un prisme de verre par exemple, à l'interface d'un métal, or ou argent, et d'un diélectrique. Les photons de l'onde évanescente entrent en résonance avec les nuages électroniques du métal, appelés plasmons. La résonance des plasmons de surface fait chuter le coefficient de réflexion du métal dû au pic d'absorption d'énergie du faisceau incident près de l'angle de résonance. Cet angle varie en fonction de l'indice de réfraction et de l'épaisseur du milieu présent dans le champ évanescent. L'information pourra alors être recueillie soit sur la phase soit sur l'amplitude du faisceau réfléchi (Figure 7). La mesure de l'angle de résonance permet donc de détecter et de quantifier les molécules fixées en surface.

Les capteurs de type SPR sont parmi les plus performants actuellement. Ils sont très sensibles, à la fois à l'indice de réfraction et à l'épaisseur de la couche déposée à la surface du transducteur, et sont l'instrument privilégié pour la mesure en temps réel de toute interaction biologique (d'affinité ou métabolique) sans marquage<sup>42</sup>. Leur fabrication et leur mise en place étant bien maîtrisées, il existe des versions commerciales de capteurs SPR

telles que le Biacore ou Spreeta<sup>43</sup>. Le seul inconvénient de ces systèmes est que le phénomène de résonance plasmonique est non spécifique et que la variation de l'indice de réfraction peut être due ou non à la présence de molécules fixées.

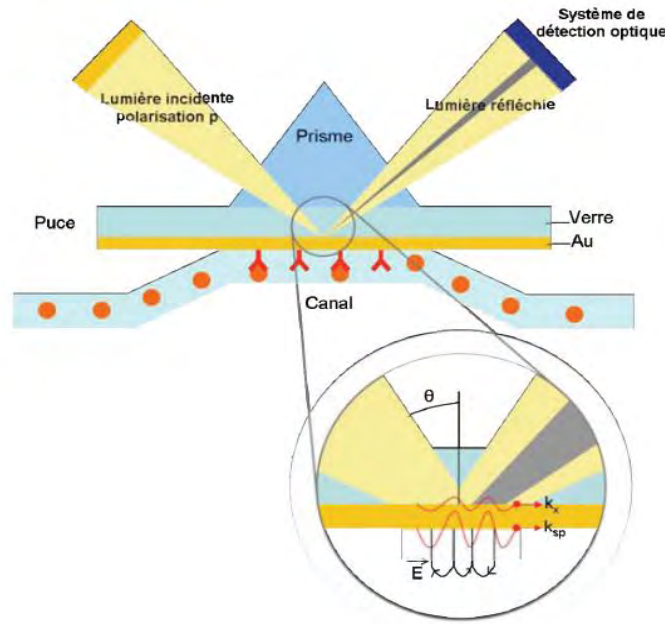


Figure 7 : Principe de mesure de la SPR<sup>33</sup>

### 1.3.2. Transduction piézoélectrique<sup>44,45</sup>

La piézoélectricité traduit l'interdépendance des propriétés électriques et mécaniques de certains matériaux diélectriques anisotropes, i.e. qui ne possèdent pas de centre de symétrie dans la maille cristalline, comme le quartz. On distingue :

- l'effet piézoélectrique direct, qui correspond au phénomène ayant lieu lorsque, soumis à une contrainte mécanique appliquée sur leurs faces, le solide cristallin se polarise. La variation de la polarisation électrique est proportionnelle à la force appliquée.
- l'effet piézoélectrique inverse, qui induit une déformation mécanique au sein d'un solide cristallin soumis à un champ électrique. Lorsque le champ électrique est alternatif, une onde acoustique est générée au sein du matériau entraînant la mise en résonance du cristal à une certaine fréquence suivant l'état de surface.

La piézoélectricité inverse est à la base du fonctionnement des transducteurs piézoélectriques. Différents types de biocapteurs ont été développés suivant l'onde acoustique générée :

- les ondes de volume dans un milieu infini (« Bulk Acoustic Wave », BAW),

- les ondes de surface dans un milieu semi-infini (« Surface Acoustic Wave », SAW),
- les ondes de plaque dans un milieu fini (entre deux surfaces parallèles),
- les ondes guidées dans un milieu inhomogène.

Les capteurs à BAW se distinguent des trois autres par la réalisation des électrodes permettant de générer l'onde. Le développement des microtechnologies a permis de développer des dispositifs de plus en plus sensibles et a donné naissance aux bio-microsystèmes électromécaniques, les BioMEMS.

Les biocapteurs à effet piézoélectrique sont très sensibles aux variations de vitesse de l'onde et aux effets de masse. Un changement au niveau de la zone de passage de l'onde propagée affecte sa vitesse et/ou son amplitude. Ces biocapteurs apportent une réponse rapide sans marquage mais ont pour inconvénient la fixation de composés non spécifiques et un manque de sensibilité.

#### 1.3.2.a. Les capteurs à ondes de volume

Le capteur à onde de volume le plus connu est la microbalance à quartz (QCM)<sup>46</sup>. Elle est constituée d'une lame de quartz extrêmement fine sur laquelle sont déposées de part et d'autre des couches minces métalliques (argent, or, platine ou aluminium). L'une des faces sert au contact électrique et l'autre à l'immobilisation du biorécepteur. Par application d'une tension sinusoïdale sur une des couches métalliques, une onde transverse se propage dans le volume du quartz. Toute modification de la masse à la surface du détecteur entraîne une modification de la fréquence de résonance. La loi de Sauerbrey permet de relier la variation de masse ( $\Delta m$ ) due aux espèces adsorbées à la surface du capteur à la variation de fréquence de résonance ( $\Delta f$ ) pour un dépôt uniforme, rigide et mince :

$$\Delta m = \frac{-\Delta f}{f_0^2} S \sqrt{\rho_c \mu_c}$$

avec  $f_0$  la fréquence de résonance intrinsèque du cristal,  $S$  la surface du cristal,  $\rho_c$  la densité du cristal et  $\mu_c$  le module de cisaillement du cristal.

Les dispositifs à ondes de volume présentent des avantages en termes de robustesse, de stabilité et de simplicité de réalisation et d'utilisation. Cependant, malgré une sensibilité de l'ordre de quelques  $\text{ng}/\text{cm}^2$ , les performances des microbalances à quartz sont limitées par les vibrations parasites extérieures au dispositif ainsi que par la présence d'impuretés dans l'échantillon. De plus, l'utilisation du biocapteur en milieu liquide rend l'interprétation des variations de fréquence plus complexe du fait de l'interaction de la surface vibrante avec le fluide. Enfin, l'inconvénient majeur de ces dispositifs est leur incapacité à être miniaturisés et multiplexés<sup>47</sup>.

### 1.3.2.b. Les capteurs à ondes de surface

Le principe de ces capteurs réside dans la propagation d'une onde en surface d'un substrat piézoélectrique grâce à des électrodes interdigitées déposées de manière coplanaire sur le substrat. Ainsi, l'énergie acoustique n'est plus répartie dans le volume du substrat mais concentrée en surface, ce qui améliore la sensibilité. Dans les capteurs SAW, l'onde générée est généralement une onde de Rayleigh, qui possède une composante longitudinale et une composante transverse verticale déphasée. La variation de fréquence consécutive à un dépôt de masse sous forme de film reste le paramètre d'étude.

La Figure 8 présente un biocapteur SAW avec une géométrie de type ligne de retard, c'est à dire constitué de deux électrodes interdigitées séparées par un chemin de propagation.

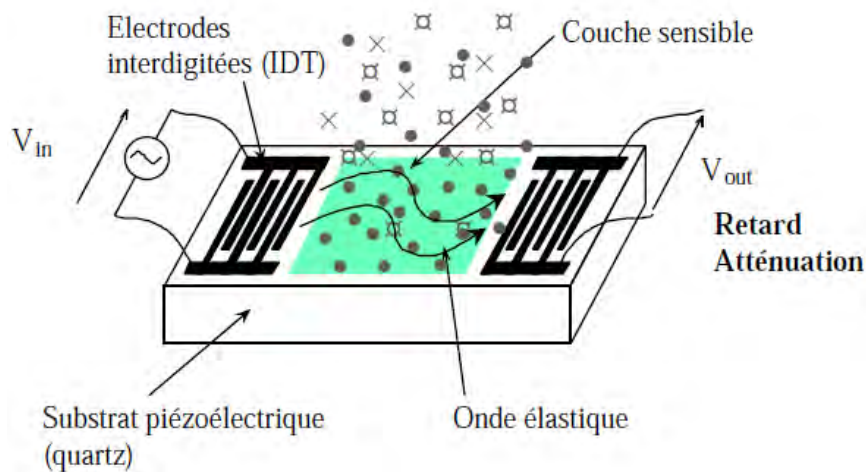


Figure 8 : Principe d'un biocapteur à ondes de surface<sup>44</sup>

Les dispositifs à ondes de surface donnent de bien meilleurs résultats que les capteurs à ondes de volume, tout en conservant certains de leurs avantages comme la bonne stabilité ainsi que la simplicité d'utilisation. Cependant, leur limitation vient de l'impossibilité de les utiliser dans des milieux liquides du fait de l'absorption considérable de l'onde par le liquide qui provoque une perte du signal.

### 1.3.2.c. Les capteurs à ondes de plaque

Les ondes à plaques transverses résultent de la superposition des ondes de surface et de volume. En effet, bien que les électrodes soient interdigitées, comme pour les capteurs SAW, les déformations ont lieu dans le volume du substrat piézoélectrique, comme les capteurs BAW. L'énergie acoustique se répartit sur les deux faces du substrat par réflexion ce qui permet d'utiliser une face pour la génération de l'onde et l'autre pour la détection.

L'utilisation en milieu liquide est ainsi possible malgré une diminution de la sensibilité à l'effet de masse par rapport aux capteurs SAW.

#### I.3.2.d. Les capteurs à ondes guidées

Les capteurs à ondes guidées les plus utilisés sont les capteurs à ondes de Love. L'ajout d'une couche guidante de type rigide ( $\text{SiO}_2$ , ZnO) ou polymère (SU8, PMMA) comme guides d'ondes sur un capteur SAW permet de générer une onde de surface transverse horizontale pure. L'onde acoustique se propageant dans la couche guidante, l'onde y est confinée et est perturbée par effet de masse dû à l'ajout d'une couche sensible.

Les capteurs à ondes guidées sont les plus performants mais il est nécessaire, lors de leur réalisation, d'optimiser la couche guidante et de trouver un compromis entre sensibilité et pertes. Ils peuvent être utilisés en milieu liquide car aucune composante transverse verticale n'étant générée, le rayonnement de l'énergie acoustique dans le liquide est limité.

Des dispositifs commerciaux ont été développés tels que le S-sens K5 biosensor de Nanofilm qui utilise cinq capteurs à ondes de Love simultanément sur un substrat. L'intérêt de ce système repose sur la versatilité des applications proposées. Cependant, le protocole à utiliser est très différent d'une application à une autre et nécessite un temps de développement non négligeable.

#### I.3.2.e. Les microleviers

L'essor des BioMEMS a permis le développement de petits capteurs de force et de masse extrêmement sensibles appelés microleviers. Ce sont des microponts et/ou micropoutres qui transforment une réaction chimique en mouvement mécanique à l'échelle nanométrique. Lorsque la micropoutre, sur laquelle le biorécepteur a été immobilisé, entre en contact avec l'espèce cible, une modification mécanique intervient et se traduit par une courbure de la poutre en mode statique, ou une variation de sa fréquence de résonance en mode dynamique. Il est possible de mesurer ces deux signaux avec une très grande précision permettant ainsi une détection quantitative de l'espèce cible (Figure 9).

Les microleviers permettent théoriquement d'obtenir des limites de détection très basses, mais, en pratique, la présence d'un milieu de test liquide affecte le coefficient de qualité et il en résulte des courbes de détection bruitées et des mesures moins précises. L'un des principaux inconvénients de ce type de capteur est l'encombrement des appareils qui composent le banc de manipulation.

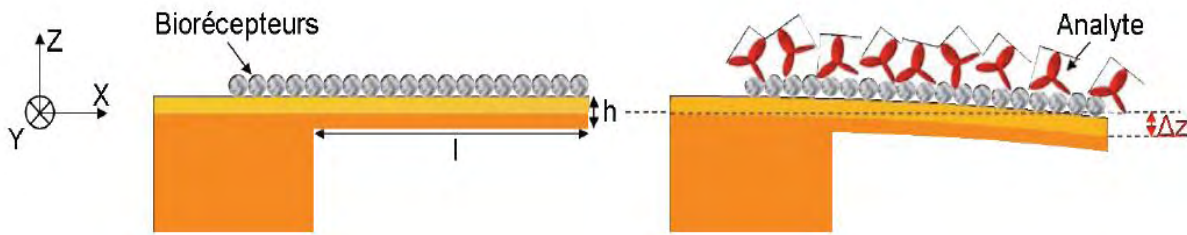


Figure 9 : Principe de détection des microleviers en mode statique<sup>33</sup>

### 1.3.3. Transduction thermique<sup>48</sup>

Les transducteurs thermiques sont généralement des thermocouples ou des thermorésistances. Les biocapteurs thermiques mesurent l'énergie produite ou absorbée au cours d'une réaction biochimique. Ce changement de température ( $\Delta T$ ) est relié aux variations d'enthalpie ( $\Delta H$ ) et à la capacité de chaleur massique du réacteur  $C_p$ , par la relation suivante :

$$\Delta T = \frac{n \Delta H}{C_p}$$

avec n nombre de moles de substrat ayant réagi.

Les biocapteurs thermiques les plus utilisés sont enzymatiques mais il existe des biocapteurs thermiques immunochimiques, appelés « Thermometric Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay » (TELISA). Ces biocapteurs, adaptés aux mesures en continu, présentent de nombreux avantages tels que la rapidité de réponse, la reproductibilité, l'absence d'interférence électrochimique ou optique. Cependant, ils sont très peu utilisés à cause du coût élevé de l'instrumentation et des contraintes technologiques qui imposent des volumes d'échantillons importants. De plus, ces capteurs sont peu sensibles et nécessitent un montage différentiel afin de compenser toute variation de température parasite.

### 1.3.4. Transduction électrochimique<sup>49-51</sup>

Les méthodes de transduction électrochimique sont très populaires dans le domaine des biocapteurs, non seulement pour des raisons historiques, le premier biocapteur mis au point en 1962 est électrochimique<sup>1</sup>, mais aussi pour leur simplicité. Le principe des biocapteurs électrochimiques repose sur une réaction d'oxydoréduction ou une modification de conductivité électrique au niveau de l'interface, qui modifie un signal électrique suite à la fixation de l'élément à analyser. La détection électrochimique est fiable avec une limite de détection basse et un coût de revient très faible. De plus, ces transducteurs sont facilement miniaturisables. En revanche, ils peuvent manquer de sélectivité.

Un capteur électrochimique est généralement un système composé de deux ou trois électrodes, une de travail, une de référence et une auxiliaire. Il existe différents types de biocapteurs électrochimiques qui sont classés selon leur mode de transduction :

- ✓ potentiométrique, mesurant un changement de potentiel entre les électrodes,
- ✓ ampérométrique, mesurant un changement de courant à un potentiel donné,
- ✓ conductimétrique, mesurant un changement de conductivité ou de transport de charges,
- ✓ impédancemétrique, mesurant un changement d'impédance.

Les capteurs potentiométriques et ampérométriques sont les plus répandus. Toutefois, depuis les années 1980, les capteurs conductimétriques et impédancemétriques sont de plus en plus utilisés compte tenu de leur facilité d'élaboration et de la simplicité du circuit de mesure.

#### 1.3.4.a. La potentiométrie

Les biocapteurs potentiométriques mesurent les variations de potentiels entre une électrode active et une électrode de référence causées par des ions, des réactions chimiques ou les charges électriques de biomolécules. La mesure du potentiel se fait dans des conditions d'équilibre par l'intermédiaire d'une électrode de référence (électrode au calomel saturé (ECS) ou Ag/AgCl) dont le potentiel est constant. La différence de potentiel mesurée ( $E$ ) est proportionnelle au logarithme de la concentration de l'analyte ( $C$ ) selon la loi de Nernst :

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln C$$

avec  $E_0$  le potentiel standard de l'espèce,  $R$  la constante des gaz parfaits,  $T$  la température absolue,  $F$  la constante de Faraday et  $n$  le nombre d'électrons échangés.

Les transducteurs potentiométriques sont nombreux et varient suivant l'application visée et le dosage que l'on veut effectuer. On peut malgré tout les classer en deux catégories.

La première se compose des électrodes à ion sélectif (Ion Selective Electrode (ISE)). Le potentiel de l'électrode de travail varie lorsque l'analyte réagit avec le biorécepteur fixé sur l'électrode de travail qui constitue le transducteur. Les transducteurs les plus utilisés sont l'électrode de verre pour la mesure du pH ou des ions monovalents, les électrodes spécifiques sensibles aux anions et aux cations et les électrodes à gaz telles que les électrodes à  $CO_2$ . Les ISE ont une large gamme d'applications et permettent d'atteindre des limites de détection très faibles mais elles sont fragiles, chères et nécessitent une maintenance régulière.



Les transistors à effet de champ constituent le deuxième volet des capteurs potentiométriques<sup>52</sup>. Ils dérivent directement des MOSFETs (Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor) dont le principe est de pouvoir contrôler le courant entre deux électrodes semi-conductrices (la source et le drain) par l'application d'un potentiel sur la grille (Figure 10).

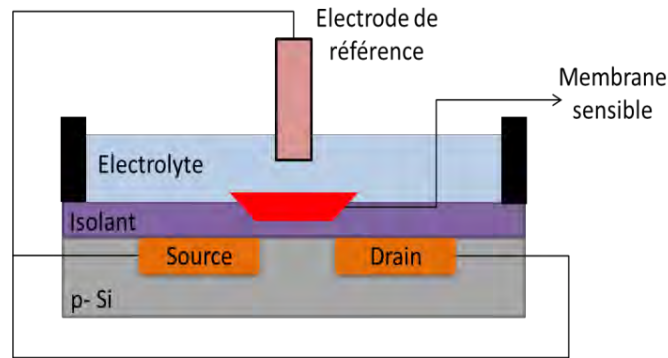


Figure 10 : Représentation schématique d'un ISFET

Dans les capteurs ChemFET (Chemical Field Effect Transistor), la grille métallique est remplacée par une membrane sensible en contact avec la solution électrolytique et une électrode de référence. Des modifications à l'interface de la solution et/ou le piégeage de l'espèce cible dans la membrane entraîne une chute de potentiel à sa surface et modifie le courant. Ces capteurs ont été développés au départ comme une alternative aux électrodes en verre fragiles mais son principe de détection a été étendu à différentes espèces (ions, protéines, cellules) en ne modifiant que la couche sensible<sup>53</sup>. Ainsi, coexistent les capteurs ionosensibles, ISFET (Ion Specific Field Effect Transistor), les capteurs enzymatiques, ENFET (ENzyme Field Effect Transistor), pour lesquels la réaction enzymatique conduit à une variation de pH détectable sur la surface sur laquelle est fixée l'enzyme spécifique, et les capteurs immunologiques, IMMUNOFET (IMMUNOlogic Field Effect Transistor), qui détectent des molécules organiques par réaction antigène-anticorps.

La miniaturisation de ces transducteurs à des échelles micro et nanométriques a donné naissance à des nanoFET hautement sensibles à base de nanofils placés entre deux électrodes. Néanmoins, le potentiel de ces structures est limité car l'alignement des nanofils entre deux électrodes n'est pas aisé<sup>54</sup>.

Enfin, une classe particulière des capteurs à effet de champ, le capteur LAPS<sup>55,56</sup> (Light Addressable Potentiometric Sensor), a été développée selon le principe de la capacitance électrolyte-isolant-semiconducteur (EIS). Une source lumineuse, issue d'une diode, est appliquée sur le semi-conducteur qui s'active. Le capteur LAPS mesure une variation de potentiel en fonction du pH ou de la concentration de l'espèce cible de la zone activée.

Les biocapteurs potentiométriques sont simples d'utilisation et sont nombreux à être commercialisés mais, à l'exception de l'ISFET, leur sensibilité est faible à cause des nombreuses interférences possibles dues à la variation de pH.

#### I.3.4.b. L'ampérométrie<sup>57</sup>

L'ampérométrie consiste à mesurer le courant issu de l'électrolyse d'une espèce électroactive à un potentiel constant entre une électrode de travail sur laquelle est fixé le biorécepteur et une électrode de référence. Lorsque le courant est mesuré avec une variation contrôlée des potentiels, on parle de voltammétrie. L'intensité du courant mesuré varie linéairement avec la concentration des corps électroactifs qui seront oxydés ou réduits à une électrode indicatrice. Les principales électrodes indicatrices utilisées sont : l'électrode à goutte de mercure, les électrodes métalliques inattaquables (platine, or), les électrodes en carbone vitreux ou en graphite.

Les biocapteurs ampérométriques utilisent généralement des biorécepteurs catalytiques. Il existe trois générations de capteurs catalytiques ampérométriques<sup>58</sup> :

- Les biocapteurs de première génération où l'espèce produite est directement oxydée ou réduite à l'électrode. Ils sont basés sur la détection ampérométrique du peroxyde d'hydrogène et/ou de l'oxygène.
- Les biocapteurs de seconde génération qui emploient un médiateur redox, tel que le ferrocène, des quinones ou des sels organiques, permettant le transfert d'électrons. L'élimination de la dépendance à l'oxygène a permis de mieux contrôler la réaction enzymatique et les performances du biocapteur par rapport à celui de première génération.
- Les biocapteurs ampérométriques de troisième génération permettent un transfert d'électrons direct des électrons de l'enzyme jusqu'à la surface de l'électrode et offrent tous les avantages des capteurs de seconde génération, avec une nouvelle autonomie et une meilleure répétabilité des mesures

Cette technique de mesure a l'avantage d'être rapide, plus sensible que la potentiométrie, avec une limite de détection faible, et peu coûteuse. Il n'est pas nécessaire que l'équilibre thermodynamique soit atteint et la réponse est linéaire en fonction de la concentration de l'analyte sous certaines conditions. Cependant, la sélectivité est faible car des substances électroactives interférentes peuvent être oxydées ou réduites dans les conditions de travail et le courant mesuré peut donc inclure plusieurs espèces différentes.

La miniaturisation des transducteurs ampérométriques a permis d'améliorer la sensibilité et les temps de réponse.

L'application la plus connue des biocapteurs ampérométriques est le biocapteur à glucose. De nombreux dispositifs commerciaux ont été réalisés et la recherche a permis le développement de biocapteurs pour la surveillance en continu de glucose implantables, avec l'électrode de travail et de référence intégrées sur la même puce<sup>59,60</sup>, tels que le biocapteur sous-cutané CGMS<sup>®</sup> (Continuous Glucose Monitoring System) de Medtronic et le GlucoWatch<sup>®</sup> G2 Biographer de Cygnus (Figure 11).



Figure 11 : Le biocapteur à glucose : GlucoWatch<sup>®</sup> G2 Biographer (Cygnus)<sup>60</sup>

#### I.3.4.c. La conductimétrie

La conductimétrie est une technique de mesure électrochimique alternative aux techniques potentiométriques et ampérométriques. Les biocapteurs conductimétriques mesurent les changements de conductance d'une solution électrolytique ou d'un composé biologique situé entre deux électrodes.

La mesure de la conductance électrique d'un électrolyte s'effectue en immergeant dans la solution une cellule de mesure comprenant deux électrodes dont la surface des plaques métalliques A et la longueur séparant les deux plaques L sont données. La conductance G pour un élément de solution, géométriquement défini, soumis à un champ électrique est :

$$G = \frac{A}{L} \sigma = k \sigma$$

avec  $\sigma$  la conductivité électrique.

La détermination de la constante de la cellule k est effectuée en mesurant sa conductance  $G_e$  pour un électrolyte de conductivité  $\sigma_e$  connue :

$$k = \frac{G_e}{\sigma_e}$$

Ainsi, l'étalonnage de la cellule permet, à partir de la mesure de la conductance G, de déterminer la conductivité d'un électrolyte quelconque.

A la différence des autres méthodes électrochimiques, la conductimétrie ne peut s'effectuer qu'en courant alternatif pour éviter une électrolyse qui viendrait perturber la mesure du signal. De plus, elle ne nécessite pas de réactions électrochimiques à la surface de l'électrode. Il est possible de mesurer la conductivité de surface entre deux électrodes après immobilisation de biorécepteurs à sa surface et de suivre la modification de la conductivité due à la formation du complexe.

Cette technique est de plus en plus utilisée pour la mise au point de biocapteurs car ils sont très sensibles pour les analytes à fortes concentrations, simples d'utilisation et faciles à miniaturiser. Cependant, leur sélectivité est très faible, c'est pourquoi les transducteurs conductimétriques sont souvent associés à des biorécepteurs catalytiques.

#### 1.3.4.d. L'impédancemétrie électrochimique

L'impédance électrochimique est le rapport potentiel-courant obtenu en imposant un potentiel alternatif entre deux électrodes et en mesurant le courant. Elle traduit l'opposition d'une interface au passage d'un courant alternatif sinusoïdal à fréquence fixe ou variable, on parle alors de spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE). L'impédance est un nombre complexe ( $Z$ ) défini par l'équation ci-dessous :

$$\bar{Z} = R + j X$$

avec  $R$ , partie réelle qui représente la résistance et  $X$ , partie imaginaire, la réactance.

Lorsqu'un analyte se lie au biorécepteur, les propriétés électriques de l'électrode de travail fonctionnalisée sont modifiées. La détection se fait donc en mesurant la variation de l'impédance du système. Les biocapteurs impédancemétriques<sup>61</sup> permettent d'étudier sensiblement une grande variété de propriétés chimiques et physiques, en mesurant à hautes fréquences le transfert d'électrons et à basses fréquences le transfert de masse. Ils sont utilisés pour caractériser et quantifier les modifications à la surface des électrodes dues à une reconnaissance moléculaire. Deux types de mesures peuvent être réalisés :

- l'impédance en mode faradique, qui met en jeu un couple redox, appelé sonde, qui s'oxyde et se réduit à la surface de l'électrode. La sonde diffuse à travers le biorécepteur pour réagir à la surface de l'électrode et la reconnaissance de l'analyte modifie la capacité à diffuser de la sonde.
- l'impédance en mode non faradique, ne faisant pas intervenir de processus faradiques. Ces biocapteurs sont souvent appelés biocapteurs capacitifs, mais généralement la mesure est réalisée à une seule fréquence. Ce mode est moins sensible que le mode faradique.

L'inverse de la résistance étant la conductance, de nombreux chercheurs ont assimilé ces systèmes comme étant conductimétriques, d'autres les considèrent comme étant ampérométriques car un courant est mesuré mais ils constituent de plus en plus une classe de biocapteurs électrochimiques à part entière.

Comme nous l'avons vu, le biorécepteur et le transducteur peuvent influencer sur la sensibilité et la sélectivité d'un biocapteur. Cependant, choisir le meilleur biorécepteur et transducteur ne garantit pas d'avoir un bon biocapteur. Les performances du biocapteur sont également conditionnées par l'immobilisation du biorécepteur sur le transducteur qui constitue une étape clé dans le développement des biocapteurs.

#### I.4. Bio-fonctionnalisation des transducteurs

Pour qu'un biocapteur soit opérationnel, l'élément permettant la reconnaissance moléculaire doit être immobilisé sur une surface adaptée à la fois au greffage et à la transduction. L'immobilisation du biorécepteur est l'une des étapes les plus délicates dans la conception d'un biocapteur. Il existe plusieurs techniques générales d'assemblage des biorécepteurs aux matériaux des transducteurs allant de la simple adsorption à l'élaboration de structures complexes (Figure 12).

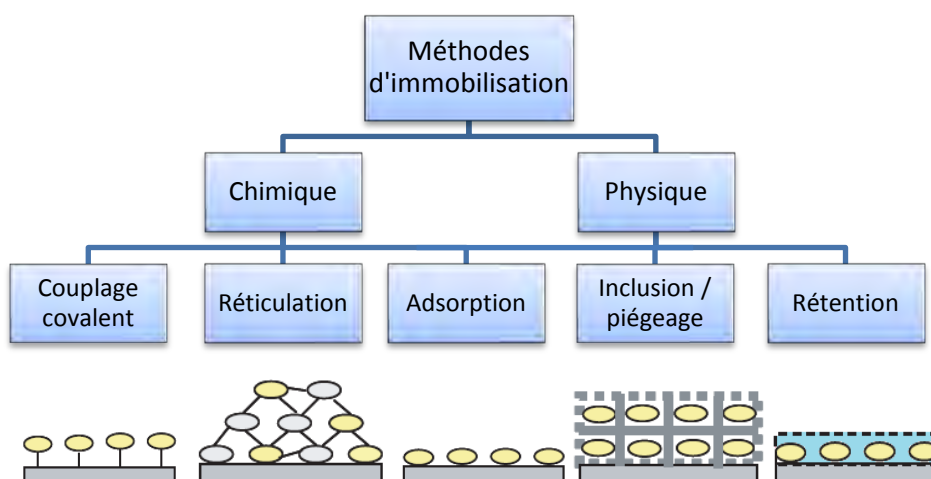


Figure 12 : Représentation schématique des différentes méthodes de bio-fonctionnalisation des transducteurs<sup>15</sup>

Le choix du procédé d'immobilisation dépend du biorécepteur. Il doit être non dénaturant et doit permettre la conservation de sa spécificité et de sa sensibilité. De plus, le biorécepteur ne doit pas se décrocher pendant l'activité de reconnaissance et doit résister aux changements de milieu (pH, température, etc...). Enfin, la couche d'immobilisation doit être reproductible et garantir la stabilité au cours du temps du biocapteur.

### ***1.4.1. Couplage covalent***

L'immobilisation par liaison covalente est l'une des techniques les plus répandues. Elle permet la formation d'une liaison de forte énergie entre le biorécepteur et le transducteur sans perte de l'activité de biorecognition. Cette liaison est résistante aux changements de pH ou de force ionique et permet le contrôle de l'uniformité et de la distribution du biorécepteur sur la surface. Cet accrochage reproductible peut être direct ou indirect.

Le couplage direct est la technique de référence pour la fixation des biomolécules de petite taille sur des surfaces d'or ou de silice *via* une monocouche auto-assemblée ou un film polymère conducteur. Les biomolécules immobilisées sont stables mais leur réactivité diminue généralement à cause de l'inaccessibilité ou de la dénaturation des centres actifs. De plus, des étapes supplémentaires d'activation des groupements fonctionnels sont préconisées pour améliorer le rendement et la sensibilité ce qui allonge le temps de fabrication des bioélectrodes.

Lorsque le couplage direct est peu convenable ou impossible, les biomolécules sont immobilisées sur la surface du transducteur en formant des interactions d'affinité à l'aide d'un intermédiaire chimique ou biologique, comme la biotine ou la streptavidine. Cette stratégie permet d'avoir un biocapteur stable et surtout régénérable.

Le greffage chimique par couplage covalent se prête aux biorécepteurs protéiques tels que les enzymes, les anticorps et les acides nucléiques qui possèdent des groupes fonctionnels, généralement amines ou carboxyles mais aussi thiols, utilisables pour leur immobilisation et n'interférant pas avec les parties nécessaires à la reconnaissance.

### ***1.4.2. Réticulation***

La réticulation est un processus facile à mettre en œuvre par lequel des biomolécules sont liées entre elles à l'aide d'un agent réticulant, comme la glutaraldéhyde. On obtient un gel insoluble difficilement manipulable et peu stable qui relargue les biomolécules. Pour pallier à cet effet, la réticulation est utilisée en complément d'autres méthodes, comme l'adsorption, on parle alors de co-réticulation. Bien que la structure co-réticulée soit très stable, des problèmes de superposition de biomolécules apparaissent et peuvent influencer sur la sensibilité du biocapteur.

Cette technique est principalement utilisée pour la fixation d'enzymes ou d'anticorps. Les conditions de réaction, parfois trop agressives pour les cellules, peuvent engendrer une modification de l'intégrité de la structure des cellules.

### ***1.4.3. Adsorption***

L'immobilisation par adsorption représente la méthode la plus simple et la moins coûteuse à mettre en œuvre. Elle consiste à déposer le matériel biologique à la surface du transducteur pendant une durée définie. L'adsorption des biomolécules est peu, voire pas dénaturante, et peut se faire par l'intermédiaire d'interactions physiques ou chimiques. Les liaisons physiques sont de faibles énergies. Ce sont des liaisons ioniques, des interactions hydrophobes ou des liaisons de Van Der Waals. Les liaisons chimiques impliquent le partage ou le transfert d'électrons pour former des ponts chimiques ce qui les rend plus sélectives et plus fortes.

Malgré une bonne accessibilité des sites actifs des biorécepteurs et l'élimination des molécules non adsorbées par simple rinçage, cette technique manque de stabilité et les biomolécules peuvent facilement se désorber lors de la modification physico-chimique du milieu. De plus, le manque d'uniformité de la couche biologique entraîne une distribution irrégulière et non orientée des biorécepteurs, induisant des interactions non spécifiques et diminuant ainsi la sensibilité et la spécificité du biocapteur.

### ***1.4.4. Emprisonnement physique***

La méthode d'inclusion et de rétention consiste à incorporer la biomolécule dans un gélifiant tel que la gélatine, le polyacrylamide ou l'agarose. Le biorécepteur est mélangé à la matrice et déposé dans des conditions contrôlées sur la surface afin de le piéger mécaniquement dans les mailles de la matrice. Le polymère permet la diffusion des analytes et des réactifs nécessaires à la biorecognition.

Cette méthode d'immobilisation, souvent appliquée à des cellules entières, permet une bonne conservation du biorécepteur du fait qu'il ne soit pas réellement fixé. Cependant son utilisation est limitée par la taille des pores de la matrice qui peut relarguer les biomolécules. De plus, la présence du film génère une barrière diffusionnelle supplémentaire ce qui entraîne une augmentation du temps de réponse et une diminution de la sensibilité.

Après avoir défini les biocapteurs et ses différentes composantes, nous allons aborder la manière dont ces dispositifs sont intégrés pour des applications biomédicales et plus précisément pour le diagnostic médical.

## **II. Biocapteurs et diagnostic<sup>2,15,62,63</sup>**

Les applications des biocapteurs dans le domaine pharmaceutique sont multiples, allant des analyses cliniques (immunoessais, analyses d'ADN), au suivi médical en milieu hospitalier (contrôle de dialyse), à la découverte de nouveaux médicaments en recherche universitaire

et industrielle, jusqu'au diagnostic. La possibilité d'évaluer, de manière précise et rapide, l'état de santé, l'apparition et/ou la progression d'une maladie et de suivre un traitement par une méthode non invasive est l'un des principaux objectifs de la recherche dans le diagnostic médical. Le diagnostic précoce apparaît comme une étape cruciale pour la survie du patient et le pronostic des maladies. De plus, il permettrait une réduction non négligeable du coût de la santé publique.

De nombreuses maladies peuvent être détectées et suivies grâce à la technologie des biocapteurs, qui, comme nous l'avons vu dans la partie précédente, apporte une réponse spécifique, fiable et rapide. Dans cette partie, les principales maladies pour lesquelles les biocapteurs sont pertinents en raison de leur incidence, de leur prévalence dans le monde entier et des taux de mortalité associés seront abordées. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les principales causes de morbidité mondiale sont les maladies cardiovasculaires, qui représentent 30 % de la mortalité mondiale, puis les maladies infectieuses, 15 %, le cancer, 13 %, les maladies dues à des désordres neurologiques, 2,3 % et le diabète sucré, 2,2%. Les principaux dispositifs commerciaux existants seront également présentés avant de conclure sur le marché économique des biocapteurs.

## II.1. Diabète

L'origine du mot diabète vient du grec «diabainen » qui met en avant les urines abondantes des malades. De cette définition, ont été définies deux grandes classes de diabète: le diabète sucré, due à une hyperglycémie et caractérisée par une urine sucrée, et le diabète insipide, caractérisé par des urines abondantes. Dans le langage courant, le terme « diabète » est généralement assimilé au diabète sucré que nous développerons dans cette partie.

Selon l'OMS<sup>64</sup>, plus de 346 millions de personnes sont diabétiques et le diabète sucré a tué, en 2005, environ 3,4 millions de personnes. Cette maladie est devenue un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale aussi bien en termes de personnes touchées, puisqu'elle est amenée à devenir, d'ici 2030, la 7<sup>ème</sup> principale cause de décès dans le monde, qu'en termes de coût. L'espérance de vie des diabétiques étant comparable à l'espérance de vie moyenne, le coût des soins prodigués sur le long terme est extrêmement élevé.

### II.1.1. Présentation du diabète sucré

Le diabète sucré<sup>65</sup>, aussi appelé diabète *mellitus*, est un dysfonctionnement du système de régulation de la glycémie dû soit à une insuffisance génétique ou acquise de production d'insuline dans l'organisme, diabète de type 1, soit à l'inactivation de l'insuline, diabète de type 2. L'insuline est une hormone, produite dans le pancréas par les cellules  $\beta$ , qui régule la concentration de glucose dans le sang en lui permettant de pénétrer les cellules des organes



pour produire de l'énergie. Si elle est insuffisante ou si elle ne remplit pas son rôle, le glucose s'accumule dans le sang et est déversé dans l'urine, provoquant de nombreuses complications parfois mortelles, notamment au niveau des yeux, des reins, des nerfs, du cœur et des vaisseaux sanguins.

Le diabète étant défini par une glycémie supérieure à 2 g/L à un moment quelconque de la journée ou à 1,26 g/L, mesurée deux fois à jeun, une simple analyse de sang permet de le diagnostiquer<sup>66</sup>. Les symptômes permettant d'établir son diagnostic sont une urine abondante, une soif intense, une faim excessive et un amaigrissement. Ces signes apparaissent de façon brutale chez les diabétiques de type 1 et sont souvent accompagnés de fatigue générale. Le diabète de type 1 apparaît à tout âge et est souvent dû à la destruction auto-immune des cellules  $\beta$ , alors que le diabète de type 2 est généralement asymptomatique. Il représente 90 % des diabétiques et survient généralement chez l'adulte, mais aussi de plus en plus chez les adolescents. Il est souvent lié aux antécédents familiaux, à l'obésité et à l'inactivité physique qui augmentent avec l'urbanisation et le vieillissement de la population.

Le maintien d'un bon équilibre glycémique est essentiel pour la survie des diabétiques et pour prévenir les complications. Le traitement de cette pathologie impose à vie un contrôle régulier de la concentration de glucose dans le sang, trois à quatre fois par jour pour les diabétiques de type 1, et une auto-régulation de la glycémie grâce à un régime alimentaire équilibré et par injection d'insuline ou par absorption d'hypoglycémisants oraux. Ces contrôles répétitifs sont parfois complexes, contraignants et douloureux pour le patient, d'où la nécessité de développer des dispositifs simples, rapides, sensibles, précis, miniaturisables et à faibles coûts. Dans le cas du diabète, les biocapteurs participent au diagnostic et au traitement du diabète mais ils peuvent également permettre la détection précoce de complications. Seule la première classe des capteurs sera présentée.

### *II.1.2. Biocapteurs pour le diagnostic et le suivi thérapeutique du diabète sucré<sup>67-70</sup>*

De nombreux dispositifs portables invasifs et non-invasifs ont été développés pour le diagnostic et le suivi du traitement des diabétiques, tels que des bandelettes urinaires ou sanguines, des glucomètres, et des biocapteurs implantables.

Le diagnostic et le suivi du traitement des diabétiques imposent un suivi régulier de la glycémie. C'est pourquoi le glucose est le principal biomarqueur des biocapteurs pour le diabète sucré. D'autres biomarqueurs ont été mis en évidence comme une fraction de l'hémoglobine glyquée, le HbA1c, qui caractérise le taux d'hémoglobine liée au glucose. La glycation étant favorisée par une glycémie élevée, le taux d'hémoglobine glyquée est corrélé à la glycémie moyenne au cours des deux à trois derniers mois, c'est pourquoi elle est très utile dans le cadre de la surveillance du diabète.

Suivant l'application des dispositifs, ils doivent répondre à un cahier de charges bien défini en termes de nécessité de calibration, de délai de mesure, de spécificité de réponse et d'exactitude. Par exemple, le diagnostic du diabète nécessite une faible incertitude de mesure, alors que le suivi thérapeutique nécessite surtout une bonne reproductibilité.

Les biocapteurs utilisant le glucose comme biomarqueur sont les plus nombreux et les plus utilisés. Leur principe de détection repose sur la transformation du glucose par une enzyme, la glucose oxydase (GOx) ou la glucose déshydrogénase (GDH), en gluconolactone, qui s'hydrolyse ensuite en acide gluconique. La GOx est l'enzyme la plus utilisée dans les applications des biocapteurs car elle catalyse l'oxydation du glucose de façon très spécifique. Elle est ensuite oxydée par l'oxygène ( $O_2$ ), ce qui permet sa régénération et la production de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). La GDH est indépendante de l' $O_2$ , mais peut oxyder d'autres sucres tels que le maltose, le galactose et le xylose, et manque de stabilité comparée à la GOx.

Les premiers dispositifs de détection du glucose, développés en 1957, sont des bandelettes colorimétriques urinaires, Clinistix<sup>71</sup>. La transformation du glucose par l'enzyme, la GOx, fixée sur la bandelette, est suivie, en présence de peroxyde d'hydrogène, d'une oxydation d'un chromagène, l'orthotolidine, catalysée par une autre enzyme, la peroxydase donnant lieu à un changement de couleur de la bandelette. Ces bandelettes, faciles d'utilisation, permettent de rechercher la présence de glucose et d'acétone dans les urines. La détection peut être semi-quantitative grâce à l'échelle colorimétrique de la bandelette réactive colorimétrique, allant du gris au bleu foncé. De nos jours, les bandelettes urinaires commercialisées sont utilisées comme outil de diagnostic de nombreuses maladies<sup>72</sup>, telles que les infections urinaires, les insuffisances rénales, les tumeurs des reins ou de la vessie et les états pathologiques du canal intestinal. Cependant, ces bandelettes urinaires ont de nombreuses limitations. Elles détectent le glucose lorsque le seuil rénal est dépassé et la corrélation entre le glucose urinaire et plasmatique n'est pas reproductible. C'est pourquoi, le sang est devenu l'échantillon le plus adapté à une mesure du glucose en temps réel.

Kohn<sup>73</sup> a montré qu'il est possible d'estimer la glycémie sanguine avec les bandelettes Clinistix. La première bandelette sanguine pour la détection du glucose, le Dextrostix, est commercialisée en 1965. Elle utilise les mêmes réactions enzymatiques que les bandelettes urinaires mais possède une membrane semi-perméable qui piège les globules rouges et laisse passer le glucose soluble. Une grosse goutte de sang est déposée sur la zone réactive de la bandelette, puis rincée délicatement après une minute pour visualiser le changement de couleur de la zone réactive. Le glucose sanguin est détecté de façon semi-quantitative grâce à une échelle colorimétrique. Cependant, la détermination des couleurs étant dépendantes des conditions d'éclairage ambiant et de l'acuité visuelle, il est difficile d'obtenir des lectures précises et exactes. Cette limitation a conduit au développement d'un

lecteur de bandelettes automatique et électronique pour améliorer la précision de la détection du glucose.

En 1970, Bayer a lancé le premier lecteur de glycémie portable du monde, appelé Réflectomètre Ames (Figure 13). Cet appareil mesure la lumière réfléchiée par la surface de la bandelette colorée par une cellule photoélectrique qui produit un signal affiché par le mouvement d'un pointeur. Le dispositif exige une quantité de sang relativement grande pour déterminer la glycémie et pèse plus d'un kilogramme, à cause de son boîtier et de batteries au plomb rechargeables.



Figure 13 : Le premier lecteur de glycémie, le réflectomètre Ames<sup>65</sup>

Dans une quête de miniaturisation et d'amélioration des performances de détection, de nombreux glucomètres utilisant la photométrie ont été développés dans les années 80. Parallèlement, d'autres modes de transduction comme l'électrochimie ont été étudiés. En effet, en 1962, Clark & Lyons<sup>1</sup> développent la première électrode enzymatique pour la détection électrochimique du glucose dans le sang. Le principe de détection ampérométrique du glucose repose sur l'oxydation de  $H_2O_2$  après transformation du glucose par la GOx, immobilisée à la surface d'une électrode de travail. Les électrons générés lors la réaction d'oxydation sont mesurés par l'électrode de travail sous la forme d'un courant électrique, dont l'intensité est directement proportionnelle à la concentration de glucose. Cependant, la présence de substances facilement oxydables, telles que l'acide ascorbique, au potentiel du peroxyde d'hydrogène cause des interférences qui influencent la qualité de la détection du biocapteur. De plus, l'utilisation de  $O_2$ , dont la concentration dans le sang est variable, pour réoxyder la GOx, limite la gamme de détection du biocapteur. C'est pourquoi d'autres stratégies de détection ampérométrique indépendantes de l'oxygène, ont été développées (Figure 14), telles que l'utilisation d'un médiateur redox. Le médiateur choisi doit être capable de réagir très rapidement avec les co-facteurs de l'enzyme à des potentiels redox faibles pour garantir la spécificité et la sensibilité du biocapteur.

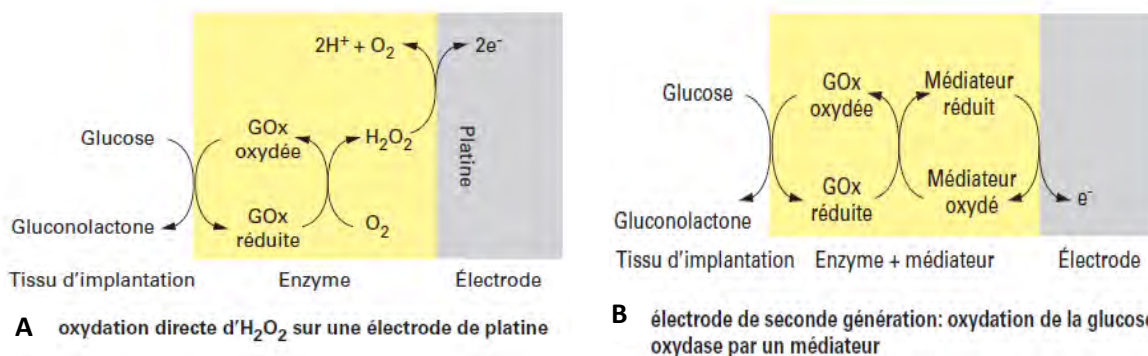


Figure 14 : Evolution des différentes stratégies de détection ampérométrique du glucose sur une électrode de platine<sup>58</sup>

La plupart des biocapteurs électrochimiques commerciaux utilise cette deuxième stratégie de détection avec un médiateur redox, le plus souvent le ferrocyanure ou un dérivé du ferrocène, et permet de détecter le glucose de façon quantitative. Les biocapteurs électrochimiques sont les dispositifs de référence pour la surveillance du traitement à domicile. De nombreux glucomètres sont commercialisés et sont maintenant de petits dispositifs qui permettent à partir d'une goutte de sang du doigt, obtenue à l'aide d'un stylo auto-piqueur, de connaître la concentration de glucose en quelques secondes. La mesure de la glycémie se fait en une seule étape de manière fiable et rapide.



Figure 15 : Le glucomètre Accu-Check Aviva de Roche Diagnostics<sup>69</sup>

A l'image du glucomètre Accu-Check® Aviva de Roche Diagnostics<sup>74</sup> (Figure 15), la majorité de ces glucomètres est composé d'une bandelette sanguine d'électrodes réactives à usage unique et d'un boîtier de lecture. Chaque bandelette est constituée d'un système d'électrodes, une de travail, une de référence, et parfois une contre électrode, et d'une membrane hydrophobique (Figure 16). La distance entre l'électrode de travail et celle de référence est minimisée de manière à diminuer le volume de sang nécessaire à la mesure. L'électrode de travail est recouverte par une couche sensible, contenant les enzymes, les médiateurs redox, un stabilisateur d'enzyme, et d'une membrane semi-perméable. La membrane permet la séparation des globules rouges et un recouvrement uniforme de l'électrode, tout en limitant l'excès de glucose et les substances interférentes. Cette configuration permet de mesurer le potentiel de l'électrode de travail par rapport à

l'électrode de référence sans compromettre la stabilité de l'électrode de référence. Généralement, l'électrode de référence est une électrode Ag/AgCl. Le sang diffuse dans la chambre capillaire à travers la membrane poreuse jusqu'à l'électrode de travail, où le glucose est oxydé ou réduit, en présence de ferrocyanure, générant ainsi un courant converti par le lecteur de glycémie.

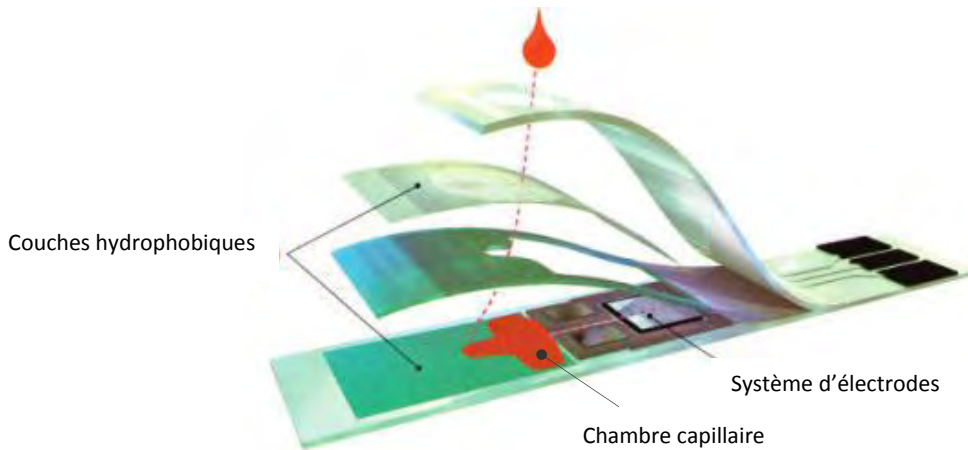


Figure 16 : Composition d'une bandelette pour la détection du glucose sanguin<sup>69</sup>

Des améliorations technologiques sont régulièrement ajoutées à ces dispositifs de manière à les rendre plus portables, plus fiables, plus rapides, plus automatisés et à faciliter l'analyse de la glycémie au patient, qui a de moins en moins de préparation à faire. C'est ainsi que le dernier glucomètre commercialisé récemment, en 2012, Accu Check® Mobile de Roche, est un système tout intégré, qui détecte la glycémie en trois secondes, avec son dispositif de lancette attaché. Il ne nécessite ni la manipulation des aiguilles de prélèvement du stylo autopiqueur ni la manipulation et la calibration de bandelettes réactives qui sont intégrées dans le boîtier de lecture.

Malgré ces avancées, le suivi du traitement est contraignant et douloureux pour le patient, le doigt étant une région riche en vaisseaux capillaires. C'est pourquoi dans un souci d'amélioration du confort des patients, d'autres biocapteurs dits non invasifs, c'est-à-dire ne nécessitant pas de prélèvement sanguin, ont été développés<sup>75,76</sup>. De plus, de nombreux efforts de recherche ont été fournis pour la mesure du glucose en continu. En effet, l'auto-surveillance ponctuelle, au bout du doigt, présente d'importantes limitations et ne permet pas d'observer la cinétique glycémique réelle pour prévenir les pics hyperglycémiques ou hypoglycémiques et ajuster au mieux la thérapeutique<sup>77</sup>.

Parmi ces biocapteurs non invasifs, on observe une diversification des zones d'analyse qui peuvent être la salive, les larmes<sup>78</sup>, la sueur, pour des mesures sporadiques, et la peau, l'oreille, l'humeur aqueuse pour des mesures en continue. D'autres approches de détection ont également été étudiées, telles que la spectroscopie infrarouge<sup>79</sup>, la fluorescence<sup>80</sup>, la spectroscopie Raman, la tomographie à cohérence optique<sup>81</sup>, la spectroscopie

photoacoustique, les ultrasons<sup>82</sup>, la spectroscopie thermique<sup>83</sup>, la polarimétrie, la bioimpédance<sup>84</sup>. Plusieurs revues<sup>85-89</sup> décrivent ces différentes méthodes et les biocapteurs à glucose non invasifs issus de ces techniques. Les trois techniques les plus utilisées ayant conduit à la commercialisation de dispositifs sont :

- La spectroscopie infrarouge, qui permet d'estimer la concentration de glucose en mesurant les variations d'intensité de la lumière transmise à un tissu contenant du glucose et réfléchi par le tissu. Cette mesure est possible car l'intensité de la lumière réfléchi par une peau de diabétique est différente de celle d'une personne saine pour une glycémie égale. Il est important de noter que la concentration de glucose mesurée n'est pas que celle du sang mais aussi celle des compartiments interstitiels et intravasculaires. Malgré les interférences liées à la mesure, cette technique est à la base de plusieurs dispositifs de détection du glucose comme le Diasensor<sup>®</sup> de Biocontrol Technology. Ce dispositif (Figure 17), qui mesure la glycémie dans l'avant-bras du patient, est relativement volumineux et n'est plus commercialisé.

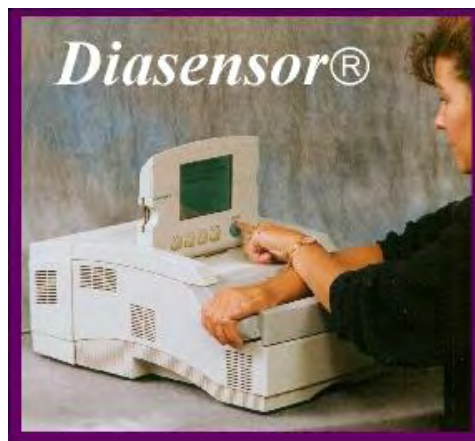


Figure 17 : Le biocapteur Diasensor<sup>®</sup> 90

- La bioimpédance, dont le dispositif le plus connu est la montre Pendra<sup>®</sup>. Positionné sur le poignet, le biocapteur mesure les variations d'impédance liées à la composition du sang sous la zone de mesure. En effet, une variation de la glycémie entraîne une variation du potentiel des membranes des globules rouges liée à une variation des concentrations en ions calcium et potassium. Ce dispositif a été commercialisé jusqu'en 2005 bien qu'il présente de nombreuses limitations, telles qu'une étape d'équilibration d'une heure avant toutes mesures et une forte variation de lecture des mesures qui peut être causée par un changement de température, la transpiration ou des mouvements. De plus, ce dispositif ne peut être utilisé que pour quelques personnes, pour qui la constante diélectrique de la peau a une fréquence de résonance faible.
- L'ionophorèse inverse, qui a permis le développement d'un biocapteur à glucose de mesures en continue, la GlucoWatch Biographer<sup>®</sup>. Ce dispositif, sous forme de

montre, permet, en imposant un faible potentiel entre une anode et une cathode positionnées sur la peau, de générer un courant électrique grâce aux mouvements des ions calcium et chlorure (Figure 18). Ainsi le liquide interstitiel et des molécules de glucose sont extraits à travers la peau et collectés sur des disques contenant la GOx. Une détection enzymatique et ampérométrique sur une électrode de platine permet ensuite de déterminer la glycémie interstitielle de façon précise et exacte. En effet, les échanges de glucose entre le sang et le liquide interstitiel étant rapides, la glycémie entre ces deux fluides est fortement corrélée. Cependant, un retard, variant de quelques secondes à une quinzaine de minutes, est observé entre les changements de concentration de glucose dans le sang et ceux dans le liquide interstitiel. De plus, ce biocapteur nécessite une calibration avec la glycémie capillaire et une période d'échauffement de 3h pour une utilisation pendant 12h consécutives. Enfin, il n'est pas disponible en France et est très discuté en raison d'effets secondaires importants pour la peau.

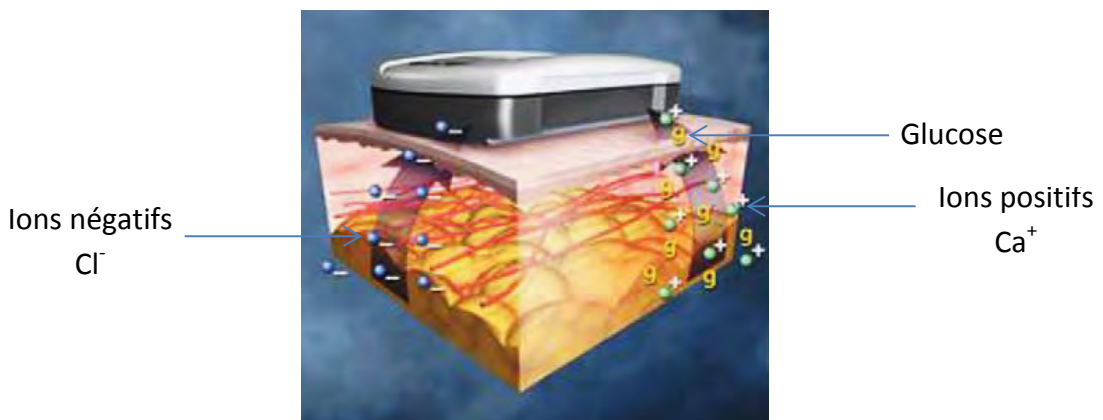


Figure 18 : Principe de l'ionophorèse inverse utilisée dans la Glucowatch<sup>67</sup>

Bien que très étudiés dans la bibliographie, les biocapteurs non invasifs ne permettent pas pour l'instant une mesure fiable et exacte de la glycémie par rapport aux mesures de glucose capillaire. Actuellement, aucun biocapteur non invasif n'est disponible en France.

Les recherches se poursuivent tout de même pour améliorer la sensibilité de détection en utilisant des dispositifs multiparamétriques tels que le GlucoTrack de Integrity Applications, qui, positionné sur l'oreille, prédit la concentration en glucose dans le sang grâce à l'ultrason, la conductivité et la capacité calorifique. Ce dispositif (Figure 19) n'est pas encore commercialisé par l'entreprise qui améliore les logiciels de traitement associés.

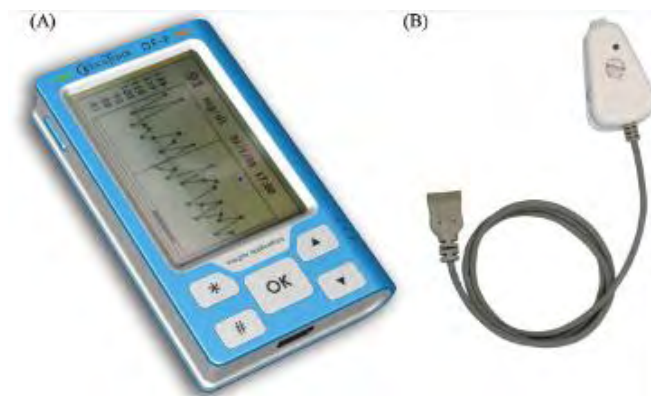


Figure 19 : Le biocapteur GlucoTrack et sa pince à fixer sur le lobe de l'oreille<sup>85</sup>

La recherche de la mesure en continue du glucose et en temps réel a conduit à la mise au point de biocapteurs invasifs sous cutanés utilisant soit des électrodes sous forme d'aiguilles placées sous la peau du bras ou de l'abdomen, soit des cathéters de microdialyse<sup>91</sup>.

L'un des premiers biocapteurs sous cutanés pour la mesure de la glycémie interstitielle est le CGMS © (Continuous Glucose Monitoring System) de Minimed<sup>10</sup>. Ce dispositif, introduit sur le marché européen en 2004, est composé d'une électrode, ayant la forme d'un fil recouvert de GOx, introduite dans le tissu sous-cutané du bras du patient, d'un câble connecteur et d'un moniteur portable. Il mesure, *via* le capteur enzymatique ampérométrique, la concentration de glucose contenu dans le liquide interstitiel toutes les dix secondes. Le moniteur prend en compte une moyenne de ces valeurs toutes les cinq minutes pendant 72 heures. Cependant, chaque implantation provoque une réaction inflammatoire et induit une réponse immunitaire par une libération d'espèces oxygénées réactives et par la création d'une capsule fibreuse autour du capteur, limitant ainsi la diffusion du glucose jusqu'à l'électrode. C'est pourquoi il est nécessaire que le patient calibre le dispositif, quatre fois par jour, en introduisant sa glycémie capillaire dans le moniteur. De plus, il ne permet pas d'avoir une mesure en temps réel de la glycémie mais qu'une analyse a posteriori des résultats enregistrés par le capteur.

Cette dernière limitation a été dépassée grâce au développement de plusieurs capteurs plus récents permettant ainsi un suivi continu et en temps réel de la glycémie et diminuant le nombre de calibrations nécessaires grâce à la miniaturisation du capteur et à l'utilisation de matériaux biocompatibles. Ces dispositifs peuvent être reliés à une pompe à insuline de manière à adapter le traitement en temps réel et d'améliorer l'équilibre glycémique<sup>58</sup>. Pour cela, le capteur envoie l'information à un transmetteur qui l'envoie par radiofréquence à la pompe à insuline reliée à l'organisme par un cathéter souple placé sous la peau. Récemment, Medtronic a mis sur le marché le « MiniMed Paradigm® REAL-Time insulin pump and continuous glucose-monitoring system » (Figure 20) utilisable pendant 3 jours consécutifs. Ce dispositif est presque en boucle fermée car il nécessite encore l'intervention du patient pour la prise de décision de l'injection d'insuline.



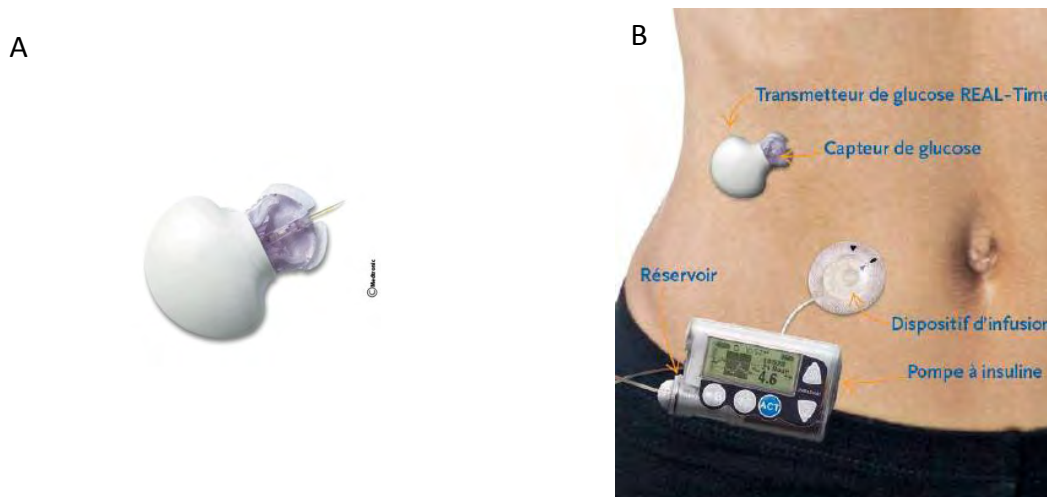


Figure 20 : A/ Capteur de glucose sous forme de micro-aiguille ; B/ Dispositif de mesure continue du glucose relié à une pompe à insuline MiniMed Paradigm de Medtronic

Ces dispositifs portables, discrets et efficaces, sont maintenant indispensables dans la vie de millions de personnes mais ne peuvent pas encore remplacer les glucomètres à cause de la dérive entre la mesure et le niveau glycémique réel, d'où la nécessité de contrôler aussi la glycémie capillaire pour une thérapeutique fiable.

La recherche se poursuit et progresse dans l'espoir de développer le biocapteur idéal, implantable à long terme, en boucle fermée et qui ne nécessite pas l'intervention du patient. Une des perspectives majeures est l'utilisation d'un pancréas artificiel, composé d'un biocapteur à glucose implantable, d'une pompe à insuline et d'un système de contrôle permettant de moduler les injections d'insuline en fonction de la glycémie. Un capteur implantable bioélectronique pour le contrôle des besoins en insuline<sup>92</sup> a récemment été breveté par l'équipe de Jochen Lang de Bordeaux.

D'autres systèmes invasifs encore plus sophistiqués ont été développés mais n'ont jamais été mis sur le marché. Par exemple, la société américaine ChipRx<sup>93,94</sup> a proposé un système de gélule intégrant un biocapteur et un système de pompe permettant le contrôle et la régulation de biomarqueurs.

En attendant, ces technologies révolutionnaires pour le traitement des diabétiques, la surveillance à domicile de la glycémie peut être complétée par le dosage de l'HbA1c, appelé hémoglobine glyquée. Ce marqueur reflète la glycémie moyenne des deux derniers mois et sa valeur est exprimée en pourcentage de l'hémoglobine totale. Elle se situe entre 3,5 % et de 6,5 % pour un individu sain, et peut atteindre 15 % chez un sujet diabétique. De nombreux dispositifs de détection de l'hémoglobine glyquée ont été développés et commercialisés mais ces derniers sont chers et nécessitent une maintenance régulière<sup>95,96</sup>. Le dernier dispositif de mesure de l'HbA1c, commercialisé en 2007, est l'A1CNow+<sup>®</sup> de Metrika, une filiale de Bayer. Comme ses prédécesseurs, ce biocapteur est un spectrophotomètre équipé d'une diode électroluminescente et de deux bandelettes sur

lesquelles la détection immunologique de l'hémoglobine glyquée est réalisée. Ce capteur est facile à utiliser, portable et jetable. De plus, il permet à partir d'une goutte de sang du doigt d'obtenir une mesure fiable et précise en 5 minutes.

## II.2. Maladies cardio-vasculaires

Les maladies cardio-vasculaires (MCV) sont l'une des principales complications du diabète et sont la première cause de mortalité dans le monde. Bien que ces maladies soient évitables, 30 % de la mortalité mondiale totale est imputable aux MCV. Ces maladies ont un impact majeur sur les individus et leur qualité de vie mais aussi sur les coûts de santé publique et l'économie mondiale. L'OMS<sup>97</sup> estime qu'en 2030 près de 24 millions de personnes mourront d'une MCV.

### II.2.1. Présentation des maladies cardiovasculaires

Les maladies cardio-vasculaires constituent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins. Il y a six types de MCV :

- La cardiopathie ischémique due à une mauvaise irrigation sanguine du muscle cardiaque,
- La maladie cérébrovasculaire dont font partie les accidents vasculaires cérébraux suite à un problème de circulation sanguine dans les vaisseaux du cerveau dû à la présence de caillots ou de dépôts gras,
- La maladie vasculaire périphérique qui affecte la circulation sanguine des bras et des jambes,
- L'insuffisance cardiaque lorsque l'activité de pompage du cœur ne permet pas d'atteindre le niveau de circulation sanguine dont le cœur a besoin,
- Le rhumatisme cardiaque qui touche le muscle et les valves cardiaques,
- La cardiopathie congénitale, qui découle d'une anomalie de la structure du cœur présente dès la naissance.

Ces maladies peuvent être causées par différents facteurs qui sont la génétique, l'âge, le genre, une forte pression artérielle, le cholestérol, le diabète, l'obésité, le stress et la cigarette. Ces facteurs de risque peuvent pour la plupart être maîtrisables par le patient. Ils interviennent en amont du développement des MCV et c'est le cumul de ces facteurs qui augmente leur potentiel. Bien que la détection précoce des facteurs de risques des MCV et leur suivi, comme l'hypercholestérolémie et/ou l'hypertension, permet de prévenir l'apparition des MCV en les maîtrisant, il est important de dissocier les facteurs de risques des maladies.

Actuellement, le diagnostic des MCV est basé sur des critères définis par l'OMS tels qu'une douleur à la poitrine, une anomalie des électrocardiogrammes et une augmentation des

marqueurs biochimiques cardiaques dans le sang. Un patient est considéré comme malade s'il répond à au moins deux de ces trois conditions. Cependant, les symptômes des maladies cardiovasculaires apparaissent une fois que cette dernière est installée, et les électrocardiogrammes peuvent sembler normaux à cause des symptômes transitoires. La mesure des biomarqueurs cardiaques est donc l'élément critique pour le diagnostic. De nombreux biomarqueurs peuvent être suivis pour caractériser l'état pathogène puisque les MCV sont associées à de nombreuses maladies affectant différentes parties du corps. Anderson et *al.*<sup>98</sup> ont recensé, en 2005, 177 biomarqueurs dont la variation de concentration peut refléter le processus pathologique des MCV, tels que des troponines cardiaques, sécrétées en cas de nécrose myocardique, mais aussi des facteurs de croissance, des cytokines, des peptides natriurétiques, la protéine C réactive, des myéloperoxydases liées au stress oxydant. L'augmentation de ces marqueurs dans le sang est souvent associée à des MCV et à un taux de mortalité élevé. Ainsi, la quantification de ces biomarqueurs et le diagnostic précoce et fiable des MCV entraineraient une baisse de la mortalité et un gain de temps et de coût important dans le pronostic de ces maladies.

### ***II.2.2. Biocapteurs pour le diagnostic et le pronostic des maladies cardiovasculaires<sup>99-102</sup>***

Vu le nombre de biomarqueurs existants, un nombre incommensurable de biocapteurs ont été développés pour la détection de biomarqueurs de maladies cardiovasculaires. Cependant, tous les biomarqueurs ne sont de bons analytes pour le développement de biocapteurs. Le biomarqueur idéal doit avoir une sensibilité et une spécificité élevées, être rapidement libéré dans le sang de manière à permettre un diagnostic précoce et être quantifiable. Qureshi et *al.*<sup>99</sup> récapitulent les principaux biomarqueurs cardiaques les plus utilisés pour le diagnostic suivant le type de maladies cardiovasculaires impliqué (Tableau 1).

Ces biomarqueurs sont plus ou moins spécifiques à un type de maladies cardiovasculaires et ne permettent pas forcément une détection précoce mais sont des outils précieux pour le pronostic et la différenciation des MCV. Par exemple, la myoglobine n'est pas un marqueur très spécifique car elle est aussi présente en cas de douleur du muscle, mais elle est la première protéine libérée en cas de détérioration des cellules cardiaques, alors que d'autres marqueurs, apparaissant après la myoglobine et ne permettant pas de diagnostic précoce, sont spécifiques à certaines affections. La troponine I (cTnI) est le marqueur de référence, présent que chez les patients malades, pour la détection des infarctus et le peptide natriurétique de type B (BNP) est utilisé pour le diagnostic d'urgence des insuffisances cardiaques et aide au pronostic des patients atteints du syndrome coronarien aigu.

**Tableau 1 : Les principaux biomarqueurs cardiaques utilisés pour la détection des MCV<sup>98-100</sup>**

| Infarctus aigu du myocarde   | Facteur de risque cardiaque/ Inflammation   | Syndrômes coronariens aigus/ Insuffisance cardiaque/Surcharge de pression ventriculaire   |
|--|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Troponine I (cTnl) et Troponine T (cTnT)</li> <li>• Myoglobine</li> <li>• Créatine kinase MB (CK-MB)</li> <li>• Protéine de liaison d'acides gras dans le coeur (H-FABP)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Protéine C-réactive (CRP)</li> <li>• Le facteur de nécrose tumorale (TNF-<math>\alpha</math>)</li> <li>• Interleukine-6 (IL-6)</li> <li>• Myéloperoxydase</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptide natriurétique B-type (BNP)</li> <li>• Peptide natriurétique N-terminal pro-B-type (NT-proBNP)</li> </ul> |

De nombreux biocapteurs, utilisant différents transducteurs optiques, électrochimiques, piézoélectriques et même magnétiques<sup>103</sup>, ont été développés pour la détection de ces marqueurs. Seuls quelques marqueurs sont utilisés en routine tels que la troponine et la myoglobine. Une fois la maladie avérée il est important de pouvoir différencier les maladies cardiovasculaires entre elles car les traitements et les besoins de surveillance ne sont pas les mêmes. Dans ce cas, plusieurs tests en série sont effectués pour rechercher une augmentation des différents biomarqueurs et estimer la sévérité des dommages cardiaques.

La plupart de ces systèmes de détection repose sur la méthode immunoenzymatique sur support solide, appelée ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay), ou l'immunochromatographie, basées sur l'observation de la détection immunologique des biomarqueurs. Une structure en «sandwich» est utilisée pour augmenter la sensibilité de détection qualitative, semi-quantitative ou quantitative. Les principaux types de transduction utilisés sont optiques et électrochimiques.

Il existe deux principaux types de biocapteurs commercialisés : les petits analyseurs de paillasse, qui sont des miniaturisations des systèmes d'analyses cliniques existants, et les dispositifs portables. Plusieurs fabricants dont Roche diagnostics, Biomérieux, Radiometer, Abbott commercialisent dans les hôpitaux et laboratoires d'analyses des dispositifs de diagnostic pour la détection des principaux biomarqueurs essentiels en cas d'urgence cardiaque.

Par exemple, les laboratoires Roche Diagnostics ont développé un analyseur de paillasse, le Cardiac Reader®<sup>104,105</sup> commercialisé depuis 2005 (Figure 21), et un dispositif portatif, le Cobas h232<sup>106</sup> (Figure 22), pour doser, à partir d'une prise de sang veineux total hépariné, la cTnT, la myoglobine, les D-dimères et le NT-pro-BNP. Ces deux capteurs sont des systèmes de test immunochromatographique, constitués d'un lecteur optique et d'une cartouche jetable de test de détection pour chaque biomarqueur recherché. La bandelette de la cartouche est composée d'une zone de contrôle interne et d'une zone de détection du biomarqueur cible. Elle est recouverte par deux anticorps monoclonaux spécifiques à

l'analyte cible, l'un biotinylé qui permet la capture de l'analyte et l'autre conjugué à des particules d'or pour la détection. Ces deux anticorps sont solubilisés par l'échantillon permettant la formation des complexes anticorps de capture/analyte/anticorps de détection et leur migration vers la zone de détection. Cette zone est recouverte de streptavidine de manière à capturer les complexes. Une ligne rouge, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de l'analyte dans le sang, apparaît et est mesurée par réflectométrie *via* un photodétecteur couplé à une lentille. La ligne de contrôle apparaît suite à l'immobilisation des anticorps conjugués aux particules d'or en excès sur les anticorps de la zone de contrôle<sup>107</sup>. Ces biocapteurs optiques permettent une détection quantitative, spécifique suivant le biomarqueur ciblé, reproductible et de sensibilité comparable aux tests cliniques, en 8 à 15 minutes.

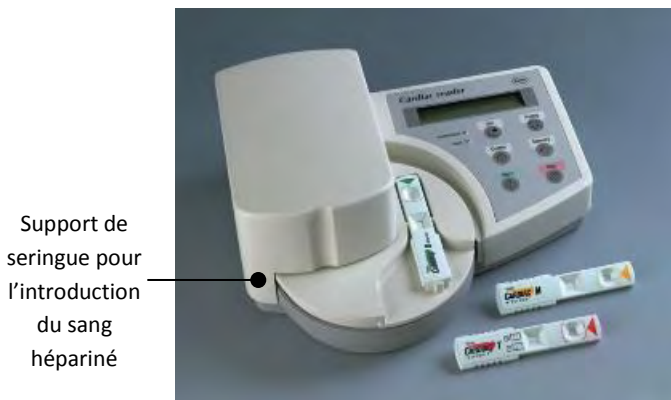


Figure 21 : Un analyseur de paillasse : le Cardiac Reader® de Roche Diagnostic<sup>105</sup>



Figure 22 : Un dispositif portable : le cobas h 232® de Roche Diagnostic<sup>106</sup>

Le développement de biocapteurs électrochimiques pour la détection des biomarqueurs cardiaques a conduit à la commercialisation du système i-STAT<sup>108</sup> d'Abbott. Cet immunocapteur ampérométrique permet de mesurer les concentrations de la cTnI, la CK-MB et du BNP à partir de sang capillaire, veineux ou artériel. Il est composé d'un analyseur portable, une cartouche jetable de test et d'une interface pour centraliser les données (Figure 23).

La cartouche contient, comme précédemment, deux anticorps spécifiques pour former une structure en sandwich, l'un conjugué à l'enzyme alcalinase phosphatase (AP) et l'autre immobilisé sur l'électrode de travail. Ainsi, l'échantillon sanguin solubilise l'anticorps conjugué à l'AP pour former un complexe antigène/anticorps piégé à la surface de l'électrode. L'excès de solution est rincé par une solution de rinçage qui contient un substrat catalysé en un produit électroactif qui donne lieu à un signal ampérométrique proportionnel à la quantité de l'analyte<sup>101,107</sup>. Ce dispositif unique, pour leur intégration de microélectrodes grâce à la technologie des puces en silicium, permet un diagnostic avec une bonne reproductibilité et une forte sensibilité, en moins de 10 minutes.



Figure 23 : Un dispositif portable : le i-STAT de Abbott<sup>102</sup>

La recherche de nouveaux biomarqueurs et en particulier du biomarqueur idéal pour la détection précoce des MCV se poursuit<sup>109,110</sup>. Parallèlement, les avancées en ingénierie des anticorps et des technologies sur puce ont permis le développement de biocapteurs multiplexés<sup>111–113</sup>. Zhang *et al.*<sup>112</sup> ont récemment mis au point un système de détection de trois biomarqueurs cardiaques de manière simultanée et multiplexée, en utilisant un réseau de nanofils de silicium fonctionnalisés avec les anticorps spécifiques des analytes cibles et une détection conductimétrique. La mesure de la variation de la résistance des nanofils fonctionnalisés avant et après l'immobilisation des biomarqueurs, par un lecteur de circuit intégré spécifique (ASIC), permet une intégration complète du biocapteur et une détection linéaire et très sensible des biomarqueurs.

## II.3. Dérèglements neurologiques

D'après le rapport de l'OMS, « Neurological disorders: Public health challenges » de 2007, les troubles neurologiques affectent près d'un milliard d'habitants de notre planète<sup>114</sup>. Ils incluent l'ensemble des maladies associées à des anomalies ou des lésions du cerveau, de la moelle épinière et du tissu nerveux. Ces atteintes lésionnelles entraînant des troubles moteurs et/ou cognitifs, voire psychiatriques ont un taux de mortalité de 2,3 %. De plus, souvent chroniques et évolutives, elles impliquent des prises en charge médico-sociales importantes.

### II.3.1. Présentation des dérèglements neurologiques<sup>114</sup>

Les dérèglements neurologiques désignent l'ensemble des maladies mentales et les affections neurologiques associées. D'après la classification internationale des maladies, on distingue :

- les troubles mentaux organiques qui incluent les maladies dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington et les démences associées,
- les troubles liés à l'utilisation de substances psycho-actives telles que la cocaïne, les drogues hallucinogènes, les hypnotiques et l'alcool,

- la schizophrénie et les troubles paranoïaques associés,
- les troubles de l'humeur, comme la dépression et les troubles bipolaires,
- les troubles névrotiques, liés aux phobies, à la somatisation et au stress,
- les troubles de la personnalité et du comportement tels que l'épilepsie et les troubles obsessionnels compulsifs,
- le retard mental,
- les troubles du développement psychologique comme l'autisme.

Ces maladies, par leur expression, sont souvent invalidantes et synonymes de ruptures aussi bien au niveau familial, professionnel et financier.

Le diagnostic et le traitement des troubles neurologiques sont différents suivant la maladie mais elle est organisée en trois grandes étapes :

- ✓ une enquête anamnestique, menée auprès du patient et surtout de son entourage, pour rechercher toutes modifications récentes ou inhabituelles du comportement et du caractère,
- ✓ un examen clinique variable suivant la maladie,
- ✓ un bilan biologique orienté en fonction des données de l'examen clinique.

Dans cette partie, l'accent est mis sur les maladies neurodégénératives, dont le taux d'incidence ne cesse d'augmenter et les répercussions familiales et sociales sont importantes, puisque 40 % des aidants meurent avant le malade. Les maladies neurodégénératives regroupent l'ensemble des maladies entraînant une détérioration des cellules nerveuses. Elles sont subdivisées en trois groupes en fonction de leur physiopathologie<sup>115</sup>:

- les amyloïdopathies, représentées par la maladie d'Alzheimer et les maladies à prions. Elles sont caractérisées par l'accumulation de l'amyloïde  $\beta$  sur les neurones, aboutissant à la formation de plaques séniles et à une dégénérescence neurofibrillaire dans le cytoplasme des cellules.
- les alphasynucléinopathies, telles que la maladie de Parkinson et la maladie de Lewy. Elles sont dues à l'aggrégation de la protéine  $\alpha$ -synucléine pour former des amas intracytoplasmiques, appelés corps de Lewy.
- les tauopathies, qui regroupent la démence fronto-temporale ou la paralysie supra nucléaire. Elles sont provoquées par un dysfonctionnement de la protéine tau, qui normalement confinée dans la fibre nerveuse, responsable de la transmission des messages nerveux, se retrouve en excès dans tout le neurone.

Le diagnostic des maladies neurodégénératives est essentiellement réalisé par des techniques de neuro-imagerie, telles que l'imagerie à résonance magnétique structurelle et fonctionnelle, la spectroscopie à résonance magnétique et la tomographie à émission de positons. Ces techniques d'imagerie permettent de mettre en évidence les plaques séniles,

les agrégats de la protéine Tau et la neurodégénération à des stades précoces de la maladie<sup>116</sup>.

Il n'existe aucun traitement curatif disponible à l'heure actuelle pour ces maladies. C'est pourquoi il est nécessaire d'établir un diagnostic précoce et d'identifier le plus rapidement la maladie pour retarder son développement.

### *II.3.2. Biocapteurs pour le diagnostic des maladies neurodégénératives<sup>117,118</sup>*

Le développement de nouveaux outils en génomique et protéomique a conduit à l'émergence de biomarqueurs et de tests biochimiques pour le diagnostic des maladies neurodégénératives. Deux approches de recherches de biomarqueurs ont été étudiées pour le développement de biocapteurs : la détection des marqueurs caractéristiques d'un sous-groupe de la maladie et la détection d'autres marqueurs impliqués dans ces maladies et/ou permettant un diagnostic différentiel<sup>119</sup>. Ces biomarqueurs étant présents essentiellement dans les tissus et les fluides du cerveau, dont l'extraction nécessite des procédures chirurgicales trop invasives, les chercheurs se sont intéressés au fluide cébrospinal, qui reflète les processus métaboliques du cerveau<sup>120-122</sup>. L'analyse de ce liquide céphalo-rachidien (LCR), extrait par ponction lombaire, permet la détection des biomarqueurs impliqués dans les maladies neurodégénératives, tels que l'amyloïde  $\beta$ , la protéine Tau totale, l' $\alpha$ -synucléine et la phospho-Tau-181. Leur détection repose essentiellement sur la méthode ELISA, des essais enzymatiques et la spectroscopie de masse.

Actuellement, aucun biocapteur n'est commercialisé mais les publications existantes montrent le potentiel de ces technologies pour la compréhension du développement des maladies et leur diagnostic<sup>123-131</sup>. Les principaux transducteurs utilisés sont optiques et électrochimiques.

Par exemple, Haes *et al.*<sup>128</sup> ont développé un biocapteur pour le dosage des oligomères de l'amyloïde  $\beta$  dans des extraits de cerveaux humains et de LCR. L'amyloïde  $\beta$ , d'abord découvert dans les plaques séniles comme une sous-unité monomérique de larges fibres d'amyloïdes insolubles, est capable de s'auto-assembler en petits oligomères solubles, appelés ADDL (amyloid-derived diffusible ligands). La détection des ADDL devrait permettre le diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer puisqu'il a été montré que les ADDL s'accumulent et entraînent des dysfonctionnements neurologiques dès les premiers stades de la maladie et avant l'apparition de la plaque sénile<sup>132</sup>. Le biocapteur présenté dans ces travaux est un nanocapteur à résonance plasmonique de surface (SPR) localisée. Chaque zone de détection est recouverte de nanoparticules d'argent fonctionnalisées sur lesquels les ADDL sont pris en sandwich entre deux anticorps spécifiques. Cette technique permet ainsi d'atteindre une sensibilité de détection inférieure au nanomolaire avec une grande spécificité.



Cependant, les ponctions lombaires étant inconfortables pour le patient, ces biomarqueurs et de nouveaux sont également recherchés dans d'autres fluides, et plus particulièrement dans le sang, bien que la corrélation entre la concentration des biomarqueurs du sang et l'état pathogénique reste encore inexpliquée<sup>116</sup>.

Parallèlement à ces études, des mini-biocapteurs implantables sont développés pour la détection des troubles neurologiques. Broderick et Kolodny<sup>126</sup> ont montré qu'il est possible de détecter de manière sélective des neurotransmetteurs *in vivo* dans le cerveau d'animaux atteints par la maladie de Parkinson grâce à un biocapteur ampérométrique, le BRODERICK PROBE® biosensor (Figure 24). Ce biocapteur est composé d'une microélectrode en acier inoxydable, dont le diamètre est inférieur à 1 nm, recouverte d'une pâte de graphite homogène, qui comprend du graphite pur, du Nujol ou d'autres substances huileuses, enrobée dans une matière inerte, le Teflon. Il est associé à deux autres électrodes implantables, une de référence en Ag/AgCl et une auxiliaire en platine ou en acier inoxydable. La sélectivité de détection est augmentée grâce à la modification de la surface du capteur par des acides gras ou des anticorps<sup>133</sup>.

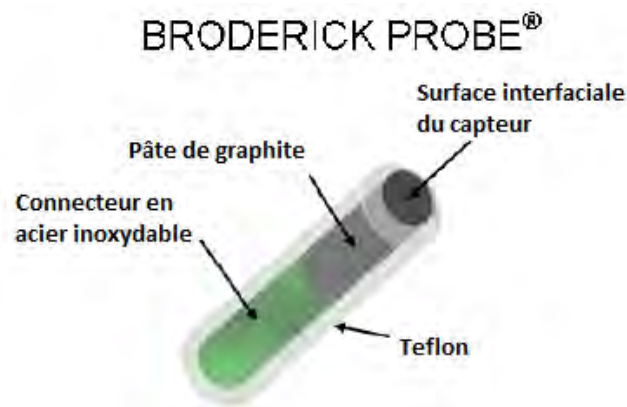


Figure 24 : Représentation schématique du biocapteur BRODERICK PROBE®<sup>126</sup>

Il détecte chaque neurotransmetteur de manière sélective, en mesurant le courant résultant du transfert d'électrons issus du neurotransmetteur à un potentiel d'oxydation spécifique, et quantitative, puisque le courant mesuré est proportionnel à la concentration du neurotransmetteur imagé. Ainsi, à un potentiel donné, il est possible de suivre de manière quantitative et en temps réel, dans les synapses neuronales des animaux, la libération de la dopamine, dont la diminution est l'une des causes biochimiques de la maladie de Parkinson.

#### II.4. Cancer

Chaque année, 11 millions de nouveaux cas de cancer sont diagnostiqués dans le monde. Le cancer est l'une des causes majeures de décès, représentant 13 % de la mortalité mondiale en 2008. Le taux d'incidence du cancer dans les pays en voie de développement est presque

deux fois plus faible que celui des pays développés avec un taux de mortalité équivalent. De plus, le type de cancer le plus fréquent est différent selon la richesse du pays et le sexe de l'individu. Par exemple, dans les pays en voie de développement 30 % des cas sont des cancers liés à des infections<sup>134</sup>. D'après les projections, l'adoption de comportements à risque pour le cancer et le vieillissement de la population entraînent une augmentation de la mortalité due au cancer, qui représentera 13,1 millions de décès en 2030.

#### *II.4.1. Présentation du cancer*

Le terme « cancer » ne s'applique pas à une seule et unique maladie mais regroupe un ensemble de maladies extrêmement variées. Environ 200 types de cancers, pouvant affecter tous les tissus du corps, existent. Le cancer peut être causé par un ensemble de facteurs, aussi bien environnementaux, tels que l'exposition à des produits chimiques carcinogènes, les radiations, l'alcool, le tabac, et les affections microbiennes, que génétiques.

Malgré la diversité des cancers existants, cette maladie est caractérisée par une prolifération importante et anarchique de cellules au sein d'un tissu normal de l'organisme, formant ainsi une tumeur et menaçant la survie du tissu. Cette prolifération anarchique résulte d'une perturbation du cycle cellulaire d'une cellule initialement normale, suite à une mutation et/ou instabilité génétique des oncogènes, qui contrôlent la mitose et la différenciation cellulaire, et des gènes suppresseurs de tumeur, qui inhibent les progressions anormales de cellules<sup>135</sup>. Deux types de tumeurs existent : les tumeurs dites bénignes, qui ont une prolifération limitée restant très localisées, et les tumeurs dites malignes, qui au contraire vont proliférer rapidement et migrer vers d'autres organes, formant des métastases.

Actuellement, le diagnostic du cancer est réalisé suivant les signes cliniques variant selon le type de cancer et sa localisation, les examens biologiques pour la détection de marqueurs tumoraux libérés par les cellules cancéreuses et/ou le système immunitaire, et l'imagerie médicale pour localiser la tumeur et ses métastases. Cependant, seul un examen anatomo-pathologique des cellules cancéreuses, extraites par biopsie, permet de confirmer totalement le diagnostic du cancer. Les cancers les plus diagnostiqués sont le cancer du sein chez les femmes et le cancer des poumons et de la prostate chez les hommes.

Les traitements existants du cancer, qui sont l'ablation de la tumeur, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie et l'immunothérapie, permettent la récession complète de certains cancers, mais le développement des métastases entraîne des récives et diminue l'efficacité des traitements, c'est pourquoi il est essentiel d'effectuer un diagnostic précoce du cancer.

#### II.4.2. Biocapteurs pour le diagnostic et le suivi des traitements du cancer<sup>62,136-138</sup>

La détection des biomarqueurs tumoraux est extrêmement utile pour diagnostiquer de manière précoce la maladie et suivre son évolution. Le cancer étant une maladie complexe, une pléthore de marqueurs, incluant des protéines, des enzymes, des hormones et des cellules, peuvent être analysés pour la classification de la tumeur, le diagnostic et le pronostic de la maladie (Tableau 2).

**Tableau 2: Les principaux biomarqueurs tumoraux selon le type de cancer**

| Types de cancer   | Biomarqueurs  |
|-------------------|---|
| Sein              | Récepteur de l'œstrogène (ER), récepteur de la progestérone (PR), Antigènes de cancer (CA) tels que CA15-3, CA125, CA27.29, CEA, NY-BR-1, Gènes suppresseurs de tumeurs BRCA1, BRCA2, Oncogène du récepteur de facteur de croissance épidermal (HER2), Protéine d'inhibition de croissance 1 (Inhibitor of growth protein 1 : ING-1 ) |
| Ovaire            | CA125, CEA, Hormone Chorionique Gonadotrope (hCG), Protéine plasmique Alpha-Foetoprotein (AFP), Gènes suppresseurs de tumeurs p53   |
| Prostate          | PSA, Enzyme phosphatase acide de la prostate (PAP)  |
| Foie              | AFP, CEA  |
| Estomac           | CA72-4, CEA, CA19-9   |
| Poumon            | Antigène de cancer immunogénique NY-ESO-1, CEA, CA19-9, Fragment de l'antigène cytokératine 19 (CYFRA21-1), Antigènes du carcinome à cellules squameuses (SCC), Enzyme enolase neuro-spécifique (NSE)   |
| Colon et pancréas | Antigènes du syndrome du cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC), CEA, CA19-9, CA24-2, p53  |
| Leucémie          | Anomalies chromosomiales  |
| Mélanome          | Enzyme tyrosinase, NY-ESO-1   |
| Tumeur solide     | Cellules tumorales circulantes  |

Le dysfonctionnement des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs étant impliqué dans la formation des cellules tumorales, ils peuvent être utilisés comme biomarqueurs tumoraux, c'est le cas de l'oncogène du récepteur de facteur de croissance épidermal 2, HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2), impliqué dans le cancer du sein, et du gène suppresseur de tumeur p53 qui contrôle le cycle cellulaire et l'apoptose, que l'on retrouve dans la plupart des cancers du sein, du poumon, du colon. D'autres marqueurs du type antigène, comme l'antigène carcino-embryonnaire, CEA (carcinoembryonic antigen) impliqué dans le processus d'adhésion cellulaire que l'on retrouve dans le cancer du sein, du foie, du poumon, du colon, ou l'antigène spécifique de la prostate, appelé PSA (prostate-specific antigen), et des modifications d'ADN et d'ARN ont également été suivis pour le diagnostic et le suivi de cancers.

Les biocapteurs pour la détection de ces biomarqueurs ont fait l'objet de très nombreux développements au cours des dernières années et le nombre de références bibliographiques sur le sujet est considérable<sup>135-137,139-141</sup>. La plupart de ces capteurs sont des

immunocapteurs avec des transducteurs optiques, électrochimiques et piézoélectriques<sup>142–145</sup>. Comme il n'existe pas un biomarqueur standard pour diagnostiquer un type de cancer ou une lignée tumorale, une détection multiparamétrique et un criblage simultané de plusieurs dizaines de marqueurs est donc nécessaire. Les immunocapteurs électrochimiques ont beaucoup contribué au développement de capteurs multiplexés<sup>144,146,147</sup> pour la détection de protéines, de l'hybridation et/ou des mutations de l'ADN.

Deux approches ont été étudiées pour augmenter la sensibilité de la détection : l'une implique une détection en sandwich du biomarqueur entre l'électrode fonctionnalisée et un anticorps secondaire marqué par des nanoparticules et l'autre, une détection sur un réseau de microélectrodes fonctionnalisées qui permet de détecter de façon simultanée de multiples marqueurs. Zhang *et al.*<sup>142</sup> proposent un multicapteur piézoélectrique utilisant comme ligands des anticorps spécifiques de plusieurs marqueurs tumoraux de différents types de cancer, l'AFP, le CEA, le PSA et le CA125. Chaque anticorps est immobilisé sur un capteur indépendant, ce qui limite les réactions croisées entre marqueurs et permet d'envisager une augmentation du nombre de marqueurs suivis afin de couvrir la plupart des cancers. Toutefois, les premiers essais de régénération indiquent qu'au-delà de trois utilisations, une diminution significative du signal généré par le multicapteur est observée, ce qui risque de limiter l'utilisation en routine de cette technique.

Malgré le développement abouti de certains biocapteurs pour le diagnostic du cancer, peu de technologies de détection sont disponibles sur le marché. Ce dernier point peut s'expliquer par un manque de compétitivité des biocapteurs avec les techniques immunochimiques classiques en termes de sensibilité et de coût. Plusieurs biocapteurs commerciaux sont malgré tout appliqués au diagnostic du cancer, tels que le Biacore™, biocapteur de type SPR utilisé pour la détection en sandwich des biomarqueurs tumoraux, et la biopuce Affymetrix GeneChip, utilisée pour le criblage et l'identification des mutations géniques cancérigènes. Depuis 2008, l'entreprise australienne HealthLinx Ltd commercialise dans certains pays un test de diagnostic précoce du cancer de l'ovaire, l'OvPlex™, qui détecte par immunochimie la présence de cinq biomarqueurs dans le sang<sup>148,149</sup>.

Récemment, Johnson & Johnson a annoncé l'évaluation clinique d'un dispositif de test sanguin pour la détection de cellules cancéreuses circulantes en vue d'une commercialisation prochaine. Ce biocapteur piège les cellules cancéreuses marquées par des aptamères thiolés, immobilisés sur des nanoparticules d'or, sur une bandelette fonctionnalisée par des aptamères biotinylés. Ainsi, en combinant la grande sélectivité et affinité des aptamères avec les propriétés optiques des nanoparticules d'or, la détection des cellules cancéreuses est validée par la présence d'une bande rouge de façon quantitative<sup>150</sup>.

## II.5. Maladies infectieuses

Les maladies infectieuses sont à l'origine de 17 millions de décès chaque année dans le monde, ce qui représente 15 % de la mortalité mondiale selon l'OMS. Elles touchent principalement les pays les plus pauvres et sont la principale cause de mortalité parmi les enfants et les jeunes adultes. En 2011, elle est responsable de 58 % de la mortalité des enfants de moins de cinq ans. Bien qu'elles ne soient plus la 1<sup>ère</sup> cause de mortalité mondiale, les maladies infectieuses restent une préoccupation majeure mondiale. Elles sont d'ailleurs impliquées dans quatre des huit Objectifs du Millénaire pour le Développement fixés par l'Organisations des Nations Unies, à la date limite de 2015.

### II.5.1. Présentation des maladies infectieuses

L'infection est la conséquence pathologique au niveau d'un tissu ou d'un organisme de la présence anormale d'un agent pathogène. Les maladies infectieuses sont causées par des microorganismes pathogènes, tels que les bactéries, les virus, les prions, les parasites et les champignons. Il existe plus de 1400 agents pathogènes. Ils peuvent être transmissibles ou non de l'homme à l'homme, mais aussi de l'animal à l'homme. Le monde animal est d'ailleurs responsable de 60 % des infections humaines<sup>151</sup>.

A la différence des autres maladies, les infections se caractérisent par leur capacité à évoluer et à réapparaître sous une forme nouvelle. Elles sont alors décrites selon trois catégories (Tableau 3).

Tableau 3: Catégories des maladies infectieuses (liste non exhaustive)

| Les maladies infectieuses établies  | Les maladies infectieuses nouvelles émergentes  | Les maladies infectieuses réémergentes  |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Maladies diarrhéique</li> <li>• Maladies respiratoires</li> <li>• Maladies dues à des protozoaires telles que le paludisme, la leishmaniose</li> <li>• Maladies tropicales</li> <li>• Tuberculose</li> <li>• Helminthiases</li> <li>• Infections nosocomiales</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Maladies dues au Virus Immunodéficient Humain (VIH)</li> <li>• Virus du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SRAS)</li> <li>• Virus Nipah (encéphalite)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Virus West Nile</li> <li>• Grippe</li> <li>• Maladies intestinales infectieuses dont choléra, staphylocoques</li> <li>• Poliomyélite</li> <li>• Fièvre virale comme la dengue</li> </ul> |

Les maladies infectieuses établies représentent les infections qui ont connues une prévalence importante pendant une période suffisamment longue pour permettre une prévision du taux de mortalité et de morbidité de la maladie. Les maladies infectieuses émergentes peuvent être dues à l'apparition d'un nouvel agent infectieux ou à la première transmission à l'homme d'un agent infectieux connu chez une espèce animale. Lorsqu'un agent infectieux a déjà été reconnu chez l'homme et qu'il se présente soit sous une forme

nouvelle généralement plus résistante, soit dans une nouvelle zone géographique, on parle de maladies infectieuses réémergentes<sup>152</sup>.

Les traitements actuels, antibiotiques, médicaments antiviraux et antifongiques, varient suivant la nature du pathogène et sont plus ou moins efficaces à cause de l'adaptabilité de certains pathogènes qui développent une pharmacorésistance.

Etant donné la nature des agents infectieux, la plupart de ces maladies peut être évitée par de nombreuses mesures de prévention de santé publique telles qu'une bonne hygiène de vie, une désinfection chimique et des mesures de précaution médicale comme la vaccination.

Le diagnostic des maladies infectieuses repose d'une part sur les signes cliniques, très variables suivant l'organe atteint et accompagnés de fatigue excessive et/ou de fièvre, et d'autre part sur les examens biologiques dont le but est d'isoler et d'identifier le microorganisme responsable de l'infection. La détection des pathogènes dans les échantillons biologiques des patients est réalisée soit par :

- ✓ une mise en culture cellulaire des microorganismes pour une observation microscopique et la réalisation d'un antibiogramme qui étudie la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.
- ✓ une détection moléculaire des antigènes viraux directement au sein des cellules infectées présentes grâce à la réaction en chaîne par polymérase, PCR (Polymerase Chain Reaction), associée à l'électrophorèse sur gel, l'immunochromatographie, l'immunofluorescence et la technique ELISA,
- ✓ une détection sérologique pour détecter les anticorps dirigés contre un agent infectieux grâce à la détection par agglutination ou la technique ELISA.

Ces techniques de détection présentent plusieurs inconvénients dont la nécessité d'un appareillage lourd et onéreux, indisponible dans les pays pauvres, pour la PCR et le manque de précision et de sensibilité. La culture cellulaire, bien que simple à réaliser et indispensable pour l'identification des pathogènes, nécessite plusieurs jours avant de pouvoir analyser les résultats. Enfin, la détection sérologique d'anticorps dirigés contre le pathogène implique une détection tardive de l'infection due au délai de mise en œuvre de la réponse immunitaire spécifique, généralement incompatible avec un diagnostic en temps utile et la prise de décision rapide pour la mise en route du traitement, le résultat du sérodiagnostic parvenant à la convalescence.

Plus de 95% de la mortalité étant due à un diagnostic tardif et un manque de traitement, le développement d'un dispositif pour le diagnostic précoce, rapide et à faible coût des infections est nécessaire.

### II.5.2. Biocapteurs pour le diagnostic et la surveillance des maladies infectieuses<sup>153-156</sup>

Les biocapteurs pour la détection des maladies infectieuses offrent le potentiel d'effectuer un diagnostic rapide et fiable dans des conditions d'urgence. Étant donné la nature contagieuse des échantillons, ils doivent aussi limiter les risques de contamination liés aux déchets biologiques. Grâce à ces tests, les autorités sanitaires peuvent déclencher une série de mesures visant à surveiller et à prévenir la diffusion d'une épidémie infectieuse pour une prise en charge rapide des malades.

De nombreux tests de diagnostic rapides sont commercialisés. Leur principe de détection repose soit sur l'immunochromatographie soit sur l'immunoenzymologie. Par exemple, le test de diagnostic rapide des gastro-entérites virales, le Diarlex® MB de Fumouze Diagnostics est un test immunochromatographique qui permet la détection des antigènes de l'adénovirus et du rotavirus dans les échantillons de selles. D'autres dispositifs miniaturisés basés sur les essais immunologiques sont également disponibles pour la détection du VIH, du paludisme, de la grippe, du SRAS et de la tuberculose. Malgré une sensibilité et une spécificité élevées, ces tests présentent l'inconvénient de donner des faux positifs ou faux négatifs, rendant nécessaire la confirmation des résultats par une autre méthode. De plus, ils ne prennent pas en compte la présence d'autres pathogènes et parfois ne permettent pas d'affirmer si l'infection est passée ou en cours.

Ces dispositifs de tests rapides peuvent être associés à des transducteurs optiques, électrochimiques et piézoélectriques de manière à obtenir des résultats quantitatifs. Des biocapteurs pour la détection précise et quantitative de cellules ou de pathogènes dans le sang ont ainsi été développés pour le diagnostic de maladies infectieuses telles que le VIH. Rodriguez *et al.*<sup>157</sup> ont développé un dispositif microfluidique simple, rapide et à faible coût pour le comptage des lymphocytes T CD 4<sup>+</sup> de manière à contrôler l'évolution du VIH dans les pays à faible revenu. Le VIH détruisant les cellules CD 4<sup>+</sup>, leur comptage précis permet de suivre les traitements antirétroviraux des patients infectés par le VIH. Dans ce dispositif, les cellules cibles sont marquées par des anticorps fluorescents avant d'être capturées sur une membrane servant de filtre pour la séparation des globules rouges et des globules blancs du sang. La détection et le comptage des cellules capturées sont réalisés par fluorescence grâce à un microscope couplé à un dispositif à transfert de charge (Charge-Coupled Device (CCD)). Ce biocapteur, appelé LabNow CD4, devrait être commercialisé par l'entreprise LabNow Corp (Figure 25). Le prototype développé est composé d'une plateforme microfluidique CD4Now™ BioChip, dans laquelle sont intégrés tous les réactifs pour l'étape de marquage des lymphocytes T et la membrane de capture des globules blancs, et d'un dispositif d'analyse portable de 6,5 kg dont lequel sont intégrés le microscope et la caméra CCD<sup>158</sup>.

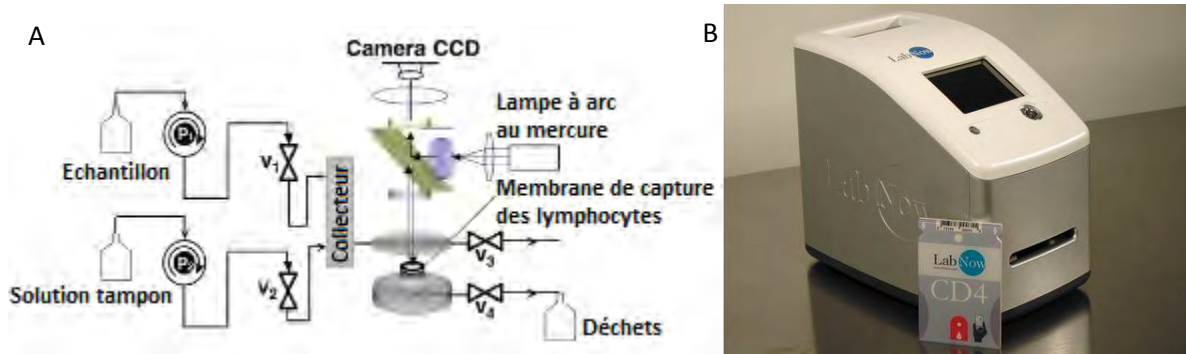


Figure 25 : A/ Représentation schématique du dispositif de comptage des cellules  $CD4^{+157}$  ; B/ Prototype du biocapteur LabNow  $CD4^{159}$ .

Ce biocapteur nécessitant toujours un marquage et un dispositif d'analyse optique onéreux, Moon *et al.*<sup>160,161</sup> ont développé une plateforme microfluidique couplé à un dispositif CCD à imagerie sans lentilles pour le comptage des lymphocytes  $CD4^{+}$ . Cette approche permet le piégeage sans marquage des lymphocytes T  $CD4^{+}$  par des anticorps  $CD4$  immobilisés dans la canalisation, la détection des cellules étant réalisée par imagerie des ombres des cellules capturées et le comptage grâce à un logiciel qui détermine les frontières entre les membranes cellulaires et l'arrière-plan.

Une autre approche a conduit à l'utilisation de la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) pour la détection et le comptage des cellules  $CD4^{+162}$ . Le biocapteur est constitué d'une matrice de pixels d'électrodes fonctionnalisées par des anticorps  $CD4$  qui permet le piégeage individuellement des lymphocytes  $CD4^{+}$ . La détection est réalisée par la mesure de la variation de l'impédance électrochimique de chaque électrode et le comptage est réalisé en additionnant les électrodes ayant piégées une cellule.

La SIE est utilisée pour la détection de nombreux virus dont la grippe, l'herpès, la dengue, l'hépatite, la rage. Bien que les résultats de ces biocapteurs impédimétriques soient prometteurs, la SIE est encore à ses balbutiements pour le diagnostic des maladies infectieuses. La société Biophage Inc. a breveté un biocapteur PDS-96® impédimétrique portable pour la détection rapide des bactéries dans des échantillons complexes. Ce biocapteur doit permettre de détecter les microorganismes pathogènes vivants avec une identification non-ambigüe grâce à la spécificité des phages et une quantification précise pour un traitement adéquat des patients et une médecine personnalisée.

Enfin, la technique des biopuces est prometteuse puisque Biomérieux et Affymétrie se sont associés pour le développement de biopuces pour la détection bactérienne et l'analyse de leur résistance aux antibiotiques. Cette méthode permet la détection multiplexée d'une grande diversité de pathogènes mais elle est encore expérimentale et présente actuellement un déficit de sensibilité et un temps d'analyse long, d'environ 4h, par rapport aux techniques recherchant spécifiquement un agent infectieux.



## Conclusion

La technologie des biocapteurs est devenue un outil essentiel pour les applications médicales et permet à travers une approche pluridisciplinaire de développer des dispositifs portables pour le diagnostic et le pronostic médical. Les outils de détection existants et utilisés en routine étant encombrants, onéreux à l'achat et surtout avec des temps d'analyse longs, les biocapteurs proposent des solutions rapides, sensibles, simples à mettre en œuvre, de faible coût et faciles à produire en masse en vue d'une commercialisation. Ils constituent ainsi un outil essentiel dans la réussite du traitement et la guérison des patients en permettant un diagnostic précis en temps réel des maladies.

Depuis plusieurs années, la demande de biocapteurs dans le domaine du diagnostic médical ne cesse d'augmenter. D'après le rapport de l'entreprise Global Industry Analyst, « Biosensors in Medical Diagnostics : A Global Strategic Business Report » publié en 2012, le marché mondial des biocapteurs pour le diagnostic devrait atteindre 12,5 milliards d'euros en 2017. Les biocapteurs pour la mesure de métabolites sanguins, utilisant des modes de transduction optique et électrochimique, sont bien ancrés dans le marché mondial et les biocapteurs à glucose représentent plus de 85% des biocapteurs commercialisés. La commercialisation des biocapteurs portables pour la détection des maladies infectieuses est l'application la plus attendue dans les dix prochaines années.

Bien que la croissance du marché ne reflète pas l'augmentation exponentielle du nombre de publications dans ce domaine, le marché des biocapteurs est stimulé par l'émergence de nouvelles technologies, comme la microtechnologie et la microfluidique, et par les activités de recherche et de développement des sciences des matériaux, de la biochimie, de la biologie moléculaire, de la génomique et des technologies liées aux transducteurs. La combinaison de ces avancées scientifiques devrait permettre le développement d'un biocapteur idéal tout intégré de type laboratoire sur puce, multiplexé ou versatile, c'est à dire avec des biorécepteurs interchangeables, précis, rapide, simple à utiliser et à un prix compétitif pour la détection précoce et en temps réel de pathologies.

## Bibliographie

- <sup>1</sup> L. C. Clark et C. Lyons, « Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery », *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1962, 102, 1, 29–45.
- <sup>2</sup> D. Dupont, « Applications des biocapteurs dans l'industrie agroalimentaire », *Techniques de l'ingénieur. Agroalimentaire*, 2005, F3, F4010.
- <sup>3</sup> L. D. Mello et L. T. Kubota, « Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries », *Food Chemistry*, 2002, 77, 2, 237-256.
- <sup>4</sup> S. Rodriguez-Mozaz, M.-P. Marco, M. J. Lopez de Alda, et D. Barceló, « Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: a review article », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 378, 3, 588-598.
- <sup>5</sup> I. Karube et Y. Nomura, « Enzyme sensors for environmental analysis », *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2000, 10, 1-3, 177-181.
- <sup>6</sup> T. B. Tims et D. V. Lim, « Rapid detection of Bacillus anthracis spores directly from powders with an evanescent wave fiber-optic biosensor », *J. Microbiol. Methods*, 2004, 59, 1, 127-130.
- <sup>7</sup> F. Arduini, A. Amine, D. Moscone, F. Ricci, et G. Palleschi, « Fast, sensitive and cost-effective detection of nerve agents in the gas phase using a portable instrument and an electrochemical biosensor », *Anal Bioanal Chem*, 2007, 388, 5-6, 1049-1057.
- <sup>8</sup> S. Singh, « Sensors--an effective approach for the detection of explosives », *J. Hazard. Mater.*, 2007, 144, 1-2, 15-28.
- <sup>9</sup> S. K. Arya, M. Datta, et B. D. Malhotra, « Recent advances in cholesterol biosensor », *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 23, 7, 1083-1100.
- <sup>10</sup> J. Mastrototaro, « The MiniMed Continuous Glucose Monitoring System (CGMS) », *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, 1999, 12 Suppl 3, 751-758.
- <sup>11</sup> M. Keusgen, « Biosensors: new approaches in drug discovery », *Naturwissenschaften*, 2002, 89, 10, 433-444.
- <sup>12</sup> M. Debliquy, « Capteurs Biochimiques », 12, 2010.
- <sup>13</sup> N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, et P. Clechet, « Capteurs chimiques et biochimiques », R420.1-R420.20, 1994.
- <sup>14</sup> T. Vo-Dinh et B. Cullum, « Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics », *Fresenius J Anal Chem*, 2000, 366, 6-7, 540-551.
- <sup>15</sup> J.-M. Kauffmann, « Les biocapteurs dans le domaine pharmaceutique », *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 2002, 60, 1, 28-37.
- <sup>16</sup> M. Gronow, « Biosensors », *Trends in Biochemical Sciences*, 1984, 9, 8, 336-340.
- <sup>17</sup> A. J. Killard, B. Deasy, R. O'Kennedy, et M. R. Smyth, « Antibodies: production, functions and applications in biosensors », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 1995, 14, 6, 257-266.
- <sup>18</sup> A. P. F. Turner, « Biosensors: Switching channels makes sense », *Nature*, 1997, 387, 6633, 555-557.
- <sup>19</sup> Y. Fang, A. M. Ferrie, N. H. Fontaine, et P. K. Yuen, « Characteristics of dynamic mass redistribution of epidermal growth factor receptor signaling in living cells measured with label-free optical biosensors », *Anal. Chem.*, 2005, 77, 17, 5720-5725.
- <sup>20</sup> Y. Fang, J. Lahiri, et L. Picard, « G protein-coupled receptor microarrays for drug discovery », *Drug Discovery Today*, 2003, 8, 16, 755-761.
- <sup>21</sup> M. Mehrvar et M. Abdi, « Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors », *Analytical Sciences*, 2004, 20, 8, 1113-1126.
- <sup>22</sup> E. Palecek et M. Fojta, « Detecting DNA hybridization and damage », *Anal. Chem.*, 2001, 73, 3, 74A-83A.
- <sup>23</sup> J. A. Ferguson, T. C. Boles, C. P. Adams, et D. R. Walt, « A fiber-optic DNA biosensor microarray for the analysis of gene expression », *Nat. Biotechnol.*, 1996, 14, 13, 1681-1684.

- <sup>24</sup> M. P. R. J Hesselberth, « In vitro selection of nucleic acids for diagnostic applications. », *Journal of biotechnology*, 2000, 74, 1, 15-25.
- <sup>25</sup> S. Centi, S. Tombelli, M. Minunni, et M. Mascini, « Aptamer-based detection of plasma proteins by an electrochemical assay coupled to magnetic beads », *Anal. Chem.*, 2007, 79, 4, 1466-1473.
- <sup>26</sup> B. Madru, « Développement d'un support d'extraction sélective à base d'aptamères: synthèse, caractérisation et application à des matrices complexes », Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2010.
- <sup>27</sup> G. Asch et M. Desjardins, *Les capteurs en instrumentation industrielle*. Paris: Dunod : "L'Usine nouvelle, 2010.
- <sup>28</sup> L. Su, W. Jia, C. Hou, et Y. Lei, « Microbial biosensors: a review », *Biosens Bioelectron*, 2011, 26, 5, 1788-1799.
- <sup>29</sup> D. R. Flower, A. C. North, et C. E. Sansom, « The lipocalin protein family: structural and sequence overview », *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, 1482, 1-2, 9-24.
- <sup>30</sup> S. Schlehuber, G. Beste, et A. Skerra, « A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin », *J. Mol. Biol.*, 2000, 297, 5, 1105-1120.
- <sup>31</sup> H. J. Kim, A. Eichinger, et A. Skerra, « High-affinity recognition of lanthanide(III) chelate complexes by a reprogrammed human lipocalin 2 », *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 10, 3565-3576.
- <sup>32</sup> R. J. Ansell, O. Ramström, et K. Mosbach, « Towards artificial antibodies prepared by molecular imprinting. », *Clinical Chemistry*, 1996, 42, 9, 1506-1512.
- <sup>33</sup> C. Ayela, « Micromembranes résonantes à actionnement et détection piézoélectriques intégrés pour la détection de molécules biologiques en temps réel », Université Paul Sabatier-Toulouse III, 2007.
- <sup>34</sup> D. Kriz, O. Ramström, et K. Mosbach, « Peer Reviewed: Molecular Imprinting: New Possibilities for Sensor Technology », *Analytical Chemistry*, 1997, 69, 11, 345A-349A.
- <sup>35</sup> X. Fan, I. M. White, S. I. Shopova, H. Zhu, J. D. Suter, et Y. Sun, « Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review », *Analytica Chimica Acta*, 2008, 620, 1-2, 8-26.
- <sup>36</sup> F. Bernoux, J.-P. Piel, B. Castellon, C. Defranoux, J.-H. Lecat, P. Boher, et J.-L. Stehle, « Ellipsométrie. Théorie », *Techniques de l'ingénieur. Mesures et contrôle*, RD3, R6490, R6490.1-R6490.11.
- <sup>37</sup> H. Arwin, « Is ellipsometry suitable for sensor applications? », *Sensors and Actuators A: Physical*, 2001, 92, 1, 43-51.
- <sup>38</sup> R. Bendoula, « Biocapteur optique : sonde fibrée à cavité Fabry-Pérot intrinsèque et à couplage évanescent », Université de Franche-comté, France, 2005.
- <sup>39</sup> A. Paquet, « Biodétection au moyen des modes de galerie de microsphères fluorescentes », Université Laval, 2011.
- <sup>40</sup> B. H. Schneider, J. G. Edwards, et N. F. Hartman, « Hartman interferometer: versatile integrated optic sensor for label-free, real-time quantification of nucleic acids, proteins, and pathogens », *Clin. Chem.*, 1997, 43, 9, 1757-1763.
- <sup>41</sup> M. Kanso, « Modélisation, réalisation et caractérisation d'un capteur plasmonique à fibre optique: Effets de la rugosité, des réactions de surface et de la cinétique dans un système microfluidique », Université de Nantes, 2008.
- <sup>42</sup> H. N. Daghestani et B. W. Day, « Theory and Applications of Surface Plasmon Resonance, Resonant Mirror, Resonant Waveguide Grating, and Dual Polarization Interferometry Biosensors », *Sensors*, 2010, 10, 11, 9630-9646.
- <sup>43</sup> C. L. Baird et D. G. Myszka, « Current and emerging commercial optical biosensors », *Journal of Molecular Recognition*, 2001, 14, 5, 261-268.
- <sup>44</sup> C. Zimmermann, « Conception, réalisation et étude de micro-capteurs à ondes de Love pour applications en milieu gazeux : Cas de la détection de composés organophosphorés », thesis, Université Bordeaux I, 2002.

- <sup>45</sup> L. Blanc, « Développement et modélisation de plateformes à ondes acoustiques de surface guidées: caractérisation des propriétés mécaniques de films minces mésoporeux », Université Sciences et Technologies-Bordeaux I, 2011.
- <sup>46</sup> T. Pauporte et D. Lincot, « Microbalance à cristal de quartz », *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation*, 2006, TA2, P2220.
- <sup>47</sup> Y. Okahata, M. Kawase, K. Niikura, F. Ohtake, H. Furusawa, et Y. Ebara, « Kinetic measurements of DNA hybridization on an oligonucleotide-immobilized 27-MHz quartz crystal microbalance », *Anal. Chem.*, 1998, 70, 7, 1288-1296.
- <sup>48</sup> K. Ramanathan et B. Danielsson, « Principles and applications of thermal biosensors », *Biosens Bioelectron*, 2001, 16, 6, 417-423.
- <sup>49</sup> M. Pohanka et P. Skladal, « Electrochemical biosensors—principles and applications », *J Appl Biomed*, 2008, 6, 2, 57–64.
- <sup>50</sup> D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, et E. Reimhult, « Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures », *Sensors*, 2008, 8, 3, 1400-1458.
- <sup>51</sup> N. J. Ronkainen, H. B. Halsall, et W. R. Heineman, « Electrochemical biosensors », *Chem Soc Rev*, 2010, 39, 5, 1747-1763.
- <sup>52</sup> C.-S. Lee, S. K. Kim, et M. Kim, « Ion-Sensitive Field-Effect Transistor for Biological Sensing », *Sensors*, 2009, 9, 9, 7111-7131.
- <sup>53</sup> W. Sant, « Développement des micro-capteurs chimiques CHEMFETs pour des applications à l'hémodialyse », Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2004.
- <sup>54</sup> Y. Cui, Q. Wei, H. Park, et C. M. Lieber, « Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species », *Science*, 2001, 293, 5533, 1289-1292.
- <sup>55</sup> T. Wagner, T. Yoshinobu, et M. J. Schöning, « Light-addressable potentiometric sensor as semiconductor-based sensor platform for (bio-) chemical sensing », *Armenian Journal of Physics*, 2008, 1, 1, 99-103.
- <sup>56</sup> T. Yoshinobu, H. Iwasaki, Y. Ui, K. Furuichi, Y. Ermolenko, Y. Mourzina, T. Wagner, N. Näther, et M. J. Schöning, « The light-addressable potentiometric sensor for multi-ion sensing and imaging », *Methods*, 2005, 37, 1, 94-102.
- <sup>57</sup> A. Heller, « Amperometric biosensors », *Current Opinion in Biotechnology*, 1996, 7, 1, 50-54.
- <sup>58</sup> S. Marinesco et P. Pernot, « Biocapteurs implantables », 2008.
- <sup>59</sup> W. K. Ward, L. B. Jansen, E. Anderson, G. Reach, J.-C. Klein, et G. S. Wilson, « A new amperometric glucose microsensor: in vitro and short-term in vivo evaluation », *Biosens Bioelectron*, 2002, 17, 3, 181-189.
- <sup>60</sup> P. D'Orazio, « Biosensors in clinical chemistry », *Clin. Chim. Acta*, 2003, 334, 1-2, 41-69.
- <sup>61</sup> M. I. Prodromidis, « Impedimetric Biosensors and Immunosensors », *Pakistan Journal of Analytical and Environmental Chemistry*, 2007, 8.
- <sup>62</sup> C. Gouvea, « Biosensors for health applications », in *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity*, P. A. Serra, Éd. InTech, 2011.
- <sup>63</sup> J. H. T. Luong, K. B. Male, et J. D. Glennon, « Biosensor technology: technology push versus market pull », *Biotechnol. Adv.*, 2008, 26, 5, 492-500.
- <sup>64</sup> « OMS | Diabète », WHO, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/fr/index.html>.
- <sup>65</sup> A. Barraud, « Molecular selective interface for an implantable glucose sensor based on the viscosity variation of a sensitive fluid containing dextran and Concanavalin A », EPFL, Lausanne, 2008.
- <sup>66</sup> P. Drouin, J. F. Blickle, B. Charbonnel, E. Eschwège, P. J. Guillausseau, P. F. Plouin, J. M. Daninos, N. Balarac, et J. P. Sauvanet, « Diagnostic et classification du diabète sucré les nouveaux critères », *Diabetes & Metabolism*, 1999, 25, 1, 72-83.
- <sup>67</sup> J. D. Newman et A. P. F. Turner, « Home blood glucose biosensors: a commercial perspective », *Biosens Bioelectron*, 2005, 20, 12, 2435-2453.
- <sup>68</sup> S. F. Clarke et J. R. Foster, « A history of blood glucose meters and their role in self-monitoring of diabetes mellitus », *Br. J. Biomed. Sci.*, 2012, 69, 2, 83-93.

- <sup>69</sup> J. Wang, « Electrochemical Glucose Biosensors », *Chemical Reviews*, 2008, 108, 2, 814-825.
- <sup>70</sup> J. Wang, « Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges », *Electroanalysis*, 2001, 13, 12, 983.
- <sup>71</sup> A. H. Free, E. C. Adams, M. L. Kercher, H. M. Free, et M. H. Cook, « Simple Specific Test for Urine Glucose », *Clinical Chemistry*, 1957, 3, 3, 163-168.
- <sup>72</sup> « Surveillance biologique du diabète », *EM-Consulte*, <http://www.em-consulte.com/article/193629/article/surveillance-biologique-du-diabete>.
- <sup>73</sup> J. Kohn, « A rapid method of estimating blood glucose ranges », *The Lancet*, 1957, 270, 6986, 119-121.
- <sup>74</sup> « Roche - Diabetes », <http://www.roche.com/products/product-list.htm?type=diseases&id=8>.
- <sup>75</sup> C. Choleau et G. Reach, « Mesure en continu de la glycémie : différents sites, différentes ambitions », *Diabetes & Metabolism*, 2003, 29, 2, Part 2, 2S15-2S20.
- <sup>76</sup> Christopher, D. Heath, et P. Connolly, « Minimally Invasive Sensing », in *Biosensors - Emerging Materials and Applications*, P. A. Serra, Éd. InTech, 2011.
- <sup>77</sup> B. Guerci, P. Böhme, C. Halter, et C. Bourgeois, « Capteurs de glucose et mesure continue du glucose », *Médecine des Maladies Métaboliques*, 2010, 4, 2, 157-168.
- <sup>78</sup> D. K. Bishop, J. T. La Belle, S. R. Vossler, D. R. Patel, et C. B. Cook, « A disposable tear glucose biosensor-part 1: design and concept testing », *J Diabetes Sci Technol*, 2010, 4, 2, 299-306.
- <sup>79</sup> K. Yamakoshi et Y. Yamakoshi, « Pulse glucometry: a new approach for noninvasive blood glucose measurement using instantaneous differential near-infrared spectrophotometry », *J. Biomed. Opt.*, 2006, 11, 5, 054028-054028.
- <sup>80</sup> E. A. Moschou, B. V. Sharma, S. K. Deo, et S. Daunert, « Fluorescence glucose detection: advances toward the ideal in vivo biosensor », *J Fluoresc*, 2004, 14, 5, 535-547.
- <sup>81</sup> K. V. Larin, M. S. Eledrisi, M. Motamedi, et R. O. Esenaliev, « Noninvasive Blood Glucose Monitoring With Optical Coherence Tomography: A pilot study in human subjects », *Diabetes Care*, 2002, 25, 12, 2263-2267.
- <sup>82</sup> S. Lee, V. Nayak, J. Dodds, M. Pishko, et N. B. Smith, « Glucose measurements with sensors and ultrasound », *Ultrasound in Medicine & Biology*, 2005, 31, 7, 971-977.
- <sup>83</sup> C. D. Malchoff, K. Shoukri, J. I. Landau, et J. M. Buchert, « A Novel Noninvasive Blood Glucose Monitor », *Diabetes Care*, 2002, 25, 12, 2268-2275.
- <sup>84</sup> A. Caduff, F. Dewarrat, M. Talary, G. Stalder, L. Heinemann, et Y. Feldman, « Non-invasive glucose monitoring in patients with diabetes: A novel system based on impedance spectroscopy », *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 22, 5, 598-604.
- <sup>85</sup> S. K. Vashist, « Non-invasive glucose monitoring technology in diabetes management: A review », *Analytica Chimica Acta*, 2012, In Press.
- <sup>86</sup> M. A. Arnold, « Non-invasive glucose monitoring », *Current Opinion in Biotechnology*, 1996, 7, 1, 46-49.
- <sup>87</sup> D. C. Klonoff, « Noninvasive Blood Glucose Monitoring », *Dia Care*, 1997, 20, 3, 433-437.
- <sup>88</sup> A. Tura, A. Maran, et G. Pacini, « Non-invasive glucose monitoring: Assessment of technologies and devices according to quantitative criteria », *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2007, 77, 1, 16-40.
- <sup>89</sup> C. E. Ferrante do Amaral et B. Wolf, « Current development in non-invasive glucose monitoring », *Medical Engineering & Physics*, 2008, 30, 5, 541-549.
- <sup>90</sup> « Welcome to freedommedicals.com », [https://tsaohio.org/tech\\_diasensor.html](https://tsaohio.org/tech_diasensor.html).
- <sup>91</sup> M. Schoemaker, E. Andreis, J. Röper, R. Kotulla, V. Ludwig, K. Obermaier, P. Stephan, W. Reuschling, M. Rutschmann, R. Schwaninger, U. Wittmann, H. Rinne, H. Kontschieder, et W. Strohmeier, « The SCGM1 System: subcutaneous continuous glucose monitoring based on microdialysis technique », *Diabetes Technol. Ther.*, 2003, 5, 4, 599-608.
- <sup>92</sup> M. Raoux, G. Bontorin, Y. Bornat, J. Lang, et S. Renaud, « Bioelectronic Sensing of Insulin Demand », in *Biohybrid Systems*, R. Jung, Éd. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011, 191-202.

- <sup>93</sup> D. Dupont, « Applications des Biocapteurs: du Contrôle des Aliments à la Recherche de vie sur Mars », *Techniques de l'ingénieur. Agroalimentaire*, 2009, BIO 7 100.
- <sup>94</sup> S. K. Deo, E. A. Moschou, S. F. Peteu, L. G. Bachas, S. Daunert, P. E. Eisenhardt, et M. J. Madou, « Peer Reviewed: Responsive Drug Delivery Systems », *Analytical chemistry*, 2003, 75, 9, 206–213.
- <sup>95</sup> B. W. Bode, B. R. Irvin, J. A. Pierce, M. Allen, et A. L. Clark, « Advances in hemoglobin A1c point of care technology », *J Diabetes Sci Technol*, 2007, 1, 3, 405-411.
- <sup>96</sup> A. Plüddemann, C. P. Price, M. Thompson, J. Wolstenholme, et C. Heneghan, « Primary care diagnostic technology update: point-of-care testing for glycosylated haemoglobin », *British Journal of General Practice*, 2011, 61, 583, 139-140.
- <sup>97</sup> « OMS | Maladies cardio-vasculaires », WHO, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/fr/index.html>.
- <sup>98</sup> L. Anderson, « Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease », *The Journal of Physiology*, 2005, 563, 1, 23–60.
- <sup>99</sup> A. Qureshi, Y. Gurbuz, et J. H. Niazi, « Biosensors for cardiac biomarkers detection: A review », *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012, 171-172, 62-76.
- <sup>100</sup> B. McDonnell, S. Hearty, P. Leonard, et R. O'Kennedy, « Cardiac biomarkers and the case for point-of-care testing », *Clinical Biochemistry*, 2009, 42, 7-8, 549-561.
- <sup>101</sup> Z. Yang et D. Min Zhou, « Cardiac markers and their point-of-care testing for diagnosis of acute myocardial infarction », *Clin. Biochem.*, 2006, 39, 8, 771-780.
- <sup>102</sup> M.-I. Mohammed et M. P. Y. Desmulliez, « Lab-on-a-chip based immunosensor principles and technologies for the detection of cardiac biomarkers: a review », *Lab on a Chip*, 2011, 11, 4, 569.
- <sup>103</sup> M. H. F. Meyer, M. Hartmann, H.-J. Krause, G. Blankenstein, B. Mueller-Chorus, J. Oster, P. Miethe, et M. Keusgen, « CRP determination based on a novel magnetic biosensor », *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22, 6, 973-979.
- <sup>104</sup> T. M. Ambrose, D. Knight, et J. Neher, « The Cardiac Reader: A Platform for Quantitative Point-of-Care Cardiac Marker Determinations From Roche Diagnostics », *Point of Care*, 2002, 1, 1.
- <sup>105</sup> « Point of Care », [https://www.poc.roche.com/poc/rewrite/generalContent/en\\_US/article/POC\\_general\\_article\\_103.htm](https://www.poc.roche.com/poc/rewrite/generalContent/en_US/article/POC_general_article_103.htm).
- <sup>106</sup> « cobas-roche | Cobas h232 product info », <https://www.cobas-roche.co.uk/site/cobash232productinfo.aspx>.
- <sup>107</sup> R. H. Christenson et H. M. E. Azzazy, « Cardiac point of care testing: A focused review of current National Academy of Clinical Biochemistry guidelines and measurement platforms », *Clinical Biochemistry*, 2009, 42, 3, 150-157.
- <sup>108</sup> D. A. Adams et M. Buus-Frank, « Point-of-care technology: The i-STAT system for bedside blood analysis », *Journal of Pediatric Nursing*, 1995, 10, 3, 194-198.
- <sup>109</sup> E. Vassiliadis, N. Barascuk, A. Didangelos, et M. A. Karsdal, « Novel cardiac-specific biomarkers and the cardiovascular continuum », *Biomark Insights*, 2012, 7, 45-57.
- <sup>110</sup> S. Lin, H. Yokoyama, V. E. Rac, et S. C. Brooks, « Novel biomarkers in diagnosing cardiac ischemia in the emergency department: A systematic review », *Resuscitation*, 2012, 83, 6, 684-691.
- <sup>111</sup> K. Mitsakakis et E. Gizeli, « Detection of multiple cardiac markers with an integrated acoustic platform for cardiovascular risk assessment », *Anal. Chim. Acta*, 2011, 699, 1, 1-5.
- <sup>112</sup> G.-J. Zhang, K. T. C. Chai, H. Z. H. Luo, J. M. Huang, I. G. K. Tay, A. E.-J. Lim, et M. Je, « Multiplexed detection of cardiac biomarkers in serum with nanowire arrays using readout ASIC », *Biosens Bioelectron*, 2012, 35, 1, 218-223.
- <sup>113</sup> L. Tang, Y. Ren, B. Hong, et K. A. Kang, « Fluorophore-mediated, fiber-optic, multi-analyte, immunosensing system for rapid diagnosis and prognosis of cardiovascular diseases », *J. Biomed. Opt.*, 2006, 11, 2, 021011-021011.
- <sup>114</sup> « WHO | Neurological Disorders: Public Health Challenges », WHO, [http://www.who.int/mental\\_health/neurology/neurodiso/en/index.html](http://www.who.int/mental_health/neurology/neurodiso/en/index.html).

- <sup>115</sup> S. Lado, « Biologie des maladies neuro-dégénératives », *Médecine Nucléaire-Imagerie fonctionnelle et métabolique*, 2005, 29, 4, 221.
- <sup>116</sup> M. Di Carlo, D. Giacomazza, et P. L. San Biagio, « Alzheimer's disease: biological aspects, therapeutic perspectives and diagnostic tools », *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2012, 24, 24, 244102.
- <sup>117</sup> K. M. Bell et S. E. Kornguth, « Biosensors for Neurological Disease », in *Handbook of Biosensors and Biochips*, John Wiley & Sons, Ltd, 2008.
- <sup>118</sup> C. R. Lowe, « The future: biomarkers, biosensors, neuroinformatics, and e-neuropsychiatry », *Int. Rev. Neurobiol.*, 2011, 101, 375-400.
- <sup>119</sup> M. Otto, P. Lewczuk, et J. Wiltfang, « Neurochemical approaches of cerebrospinal fluid diagnostics in neurodegenerative diseases », *Methods*, 2008, 44, 4, 289-298.
- <sup>120</sup> D. G. Flood, G. J. Marek, et M. Williams, « Developing predictive CSF biomarkers—A challenge critical to success in Alzheimer's disease and neuropsychiatric translational medicine », *Biochemical Pharmacology*, 2011, 81, 12, 1422-1434.
- <sup>121</sup> P. Spitzer, H. W. Klafki, K. Blennow, L. Buée, H. Esselmann, S.-K. Herruka, C. Jimenez, P. Klivenyi, P. Lewczuk, J. M. Maler, K. Markus, H. E. Meyer, C. Morris, T. Müller, M. Otto, L. Parnetti, H. Soininen, S. Schraen, C. Teunissen, L. Vecsei, H. Zetterberg, et J. Wiltfang, « cNEUPRO: Novel Biomarkers for Neurodegenerative Diseases », *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2010, 2010, 1-12.
- <sup>122</sup> M. R. Sierks, G. Chatterjee, C. McGraw, S. Kasturirangan, P. Schulz, et S. Prasad, « CSF levels of oligomeric alpha-synuclein and beta-amyloid as biomarkers for neurodegenerative disease », *Integr Biol (Camb)*, 2011, 3, 12, 1188-1196.
- <sup>123</sup> E. S. McLamore, S. Mohanty, J. Shi, J. Claussen, S. S. Jedlicka, J. L. Rickus, et D. M. Porterfield, « A self-referencing glutamate biosensor for measuring real time neuronal glutamate flux », *J. Neurosci. Methods*, 2010, 189, 1, 14-22.
- <sup>124</sup> A. Nazem et G. A. Mansoori, « Nanotechnology for Alzheimer's disease detection and treatment », *Insciences Journal*, 2011, 1, 4, 169-193.
- <sup>125</sup> J. R. Kanwar, X. Sun, V. Punj, B. Sriramoju, R. R. Mohan, S.-F. Zhou, A. Chauhan, et R. K. Kanwar, « Nanoparticles in the treatment and diagnosis of neurological disorders: untamed dragon with fire power to heal », *Nanomedicine*, 2012, 8, 4, 399-414.
- <sup>126</sup> P. A. Broderick et E. H. Kolodny, « Real Time Imaging of Biomarkers in the Parkinson's Brain Using Mini-Implantable Biosensors. II. Pharmaceutical Therapy with Bromocriptine », *Pharmaceuticals*, 2009, 2, 3, 236-249.
- <sup>127</sup> M. Vestergaard, K. Kerman, D.-K. Kim, H. M. Hiep, et E. Tamiya, « Detection of Alzheimer's tau protein using localised surface plasmon resonance-based immunochip », *Talanta*, 2008, 74, 4, 1038-1042.
- <sup>128</sup> A. J. Haes, L. Chang, W. L. Klein, et R. P. Van Duyne, « Detection of a Biomarker for Alzheimer's Disease from Synthetic and Clinical Samples Using a Nanoscale Optical Biosensor », *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 7, 2264-2271.
- <sup>129</sup> A. Neely, C. Perry, B. Varisli, A. K. Singh, T. Arbneshi, D. Senapati, J. R. Kalluri, et P. C. Ray, « Ultrasensitive and highly selective detection of Alzheimer's disease biomarker using two-photon Rayleigh scattering properties of gold nanoparticle », *ACS Nano*, 2009, 3, 9, 2834-2840.
- <sup>130</sup> S. H. Taewook Kang, « Characterization of surface-confined alpha-synuclein by surface plasmon resonance measurements. », *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 2006, 22, 1, 13-7.
- <sup>131</sup> M. R. Mohamadi, Z. Svobodova, R. Verpillot, H. Esselmann, J. Wiltfang, M. Otto, M. Taverna, Z. Bilkova, et J.-L. Viovy, « Microchip electrophoresis profiling of A $\beta$  peptides in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease », *Anal. Chem.*, 2010, 82, 18, 7611-7617.
- <sup>132</sup> S. M. Catalano, E. C. Dodson, D. A. Henze, J. G. Joyce, G. A. Krafft, et G. G. Kinney, « The role of amyloid-beta derived diffusible ligands (ADDLs) in Alzheimer's disease », *Curr Top Med Chem*, 2006, 6, 6, 597-608.

- <sup>133</sup> P. Broderick, « Microelectrodes and Their Use in a Cathodic Electrochemical Current Arrangement with Telemetric Application », 1991.
- <sup>134</sup> A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, et D. Forman, « Global cancer statistics », *CA Cancer J Clin*, 2011, 61, 2, 69-90.
- <sup>135</sup> S. A. Soper, K. Brown, A. Ellington, B. Frazier, G. Garcia-Manero, V. Gau, S. I. Gutman, D. F. Hayes, B. Korte, J. L. Landers, D. Larson, F. Ligler, A. Majumdar, M. Mascini, D. Nolte, Z. Rosenzweig, J. Wang, et D. Wilson, « Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics », *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 21, 10, 1932-1942.
- <sup>136</sup> I. E. Tothill, « Biosensors for cancer markers diagnosis », *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2009, 20, 1, 55-62.
- <sup>137</sup> S. Mousa, « Biosensors: the new wave in cancer diagnosis », *Nanotechnology, Science and Applications*, 2010, 1.
- <sup>138</sup> A. van de Stolpe, K. Pantel, S. Sleijfer, L. W. Terstappen, et J. M. J. den Toonder, « Circulating Tumor Cell Isolation and Diagnostics: Toward Routine Clinical Use », *Cancer Res*, 2011, 71, 18, 5955-5960.
- <sup>139</sup> A. Rasooly et J. Jacobson, « Development of biosensors for cancer clinical testing », *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 21, 10, 1851-1858.
- <sup>140</sup> Z. Onur et M. Kemal, « Biosensors for Cancer Biomarkers », in *Biosensors - Emerging Materials and Applications*, P. A. Serra, Éd. InTech, 2011.
- <sup>141</sup> K. E. Herold et A. Rasooly, *Biosensors and Molecular Technologies for Cancer Diagnostics*. CRC Press, 2012.
- <sup>142</sup> B. Zhang, X. Zhang, H. Yan, S. Xu, D. Tang, et W. Fu, « A novel multi-array immunoassay device for tumor markers based on insert-plug model of piezoelectric immunosensor », *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 23, 1, 19-25.
- <sup>143</sup> M. Sanchez-Carbayo, « Antibody Arrays: Technical Considerations and Clinical Applications in Cancer », *Clinical Chemistry*, 2006, 52, 9, 1651-1659.
- <sup>144</sup> J. Lin et H. Ju, « Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers », *Biosens Bioelectron*, 2005, 20, 8, 1461-1470.
- <sup>145</sup> B. B. Haab, « Antibody Arrays in Cancer Research », *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4, 4, 377-383.
- <sup>146</sup> B. V. Chikkaveeraiah, A. A. Bhirde, N. Y. Morgan, H. S. Eden, et X. Chen, « Electrochemical Immunosensors for Detection of Cancer Protein Biomarkers », *ACS Nano*, 2012, 6, 8, 6546-6561.
- <sup>147</sup> J. Wang, « Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics », *Biosens Bioelectron*, 2006, 21, 10, 1887-1892.
- <sup>148</sup> « ETSAD - L'évaluation des Technologies de Santé pour l'Aide à la Décision », <http://www.etsad.fr/etsad/index.php?module=dmi&action=recap&p1=593#>.
- <sup>149</sup> T. Edgell, G. Martin-Roussety, G. Barker, D. J. Autelitano, D. Allen, P. Grant, et G. E. Rice, « Phase II biomarker trial of a multimarker diagnostic for ovarian cancer », *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2010, 136, 7, 1079-1088.
- <sup>150</sup> G. Liu, X. Mao, J. A. Phillips, H. Xu, W. Tan, et L. Zeng, « Aptamer-Nanoparticle Strip Biosensor for Sensitive Detection of Cancer Cells », *Anal. Chem.*, 2009, 81, 24, 10013-10018.
- <sup>151</sup> L. Baril, « Need for Biosensors in Infectious Disease Epidemiology », in *Handbook of Biosensors and Biochips*, John Wiley & Sons, Ltd, 2008.
- <sup>152</sup> A. S. Fauci et D. M. Morens, « The Perpetual Challenge of Infectious Diseases », *New England Journal of Medicine*, 2012, 366, 5, 454-461.
- <sup>153</sup> O. Lazcka, F. J. Del Campo, et F. X. Muñoz, « Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors », *Biosens Bioelectron*, 2007, 22, 7, 1205-1217.
- <sup>154</sup> R. L. Caygill, G. E. Blair, et P. A. Millner, « A review on viral biosensors to detect human pathogens », *Analytica Chimica Acta*, 2010, 681, 1-2, 8-15.
- <sup>155</sup> J. Lavigne, A. Jeandrot, et A. Sotto, « Les tests rapides de diagnostic des infections virales et parasitaires », *Spectra biologie*, 2006, 151, 34.

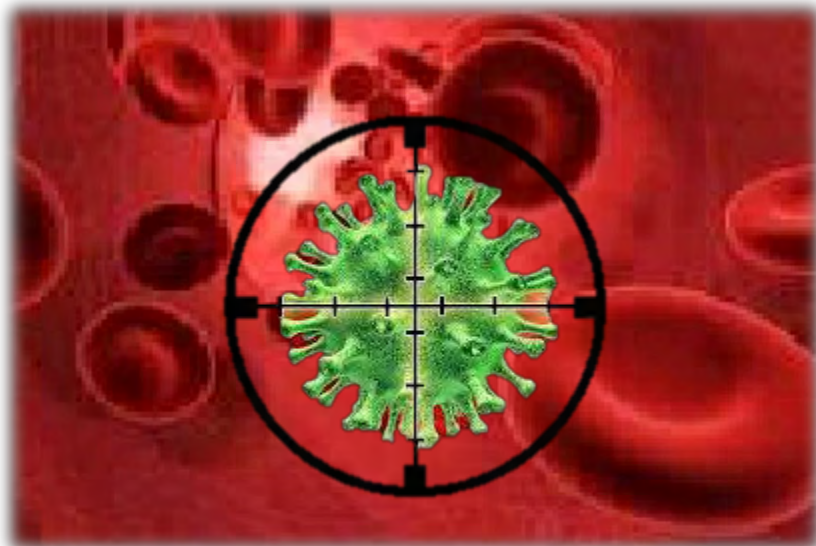


- <sup>156</sup> B. Pejcic, R. D. Marco, et G. Parkinson, « The role of biosensors in the detection of emerging infectious diseases », *The Analyst*, 2006, 131, 10, 1079.
- <sup>157</sup> W. R. Rodriguez, N. Christodoulides, P. N. Floriano, S. Graham, S. Mohanty, M. Dixon, M. Hsiang, T. Peter, S. Zavahir, I. Thior, D. Romanovicz, B. Bernard, A. P. Goodey, B. D. Walker, et J. T. McDevitt, « A Microchip CD4 Counting Method for HIV Monitoring in Resource-Poor Settings », *PLoS Medicine*, 2005, 2, 7, e182.
- <sup>158</sup> J. V. Jokerst, J. W. Jacobson, B. D. Bhagwandin, P. N. Floriano, N. Christodoulides, et J. T. McDevitt, « Programmable Nano-Bio-Chip Sensors: Analytical Meets Clinical », *Analytical Chemistry*, 2010, 82, 5, 1571-1579.
- <sup>159</sup> « Handheld Puts AIDS Fight in Field », *WIRED*,  
<http://www.wired.com/medtech/health/news/2005/11/69371>.
- <sup>160</sup> S. Moon, U. A. Gurkan, J. Blander, W. W. Fawzi, S. Aboud, F. Mugusi, D. R. Kuritzkes, et U. Demirci, « Enumeration of CD4+ T-Cells Using a Portable Microchip Count Platform in Tanzanian HIV-Infected Patients », *PLoS ONE*, 2011, 6, 7, e21409.
- <sup>161</sup> S. Moon, H. O. Keles, A. Ozcan, A. Khademhosseini, E. Hæggestrom, D. Kuritzkes, et U. Demirci, « Integrating microfluidics and lensless imaging for point-of-care testing », *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24, 11, 3208-3214.
- <sup>162</sup> X. Jiang et M. G. Spencer, « Electrochemical impedance biosensor with electrode pixels for precise counting of CD4+ cells: A microchip for quantitative diagnosis of HIV infection status of AIDS patients », *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25, 7, 1622-1628.

# Chapitre 2

---

Présentation du sujet de thèse :  
Un biocapteur pour le tri et le  
comptage d'une sous population  
cellulaire



**Présentation du sujet de thèse :**  
**Un biocapteur pour le tri et le comptage d'une sous population cellulaire**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Introduction.....</b>   | <b>67</b> |
| <b>I. Alternative au cytomètre de flux .....</b>                       | <b>67</b> |
| I.1. Contexte du projet .....  | 67        |
| I.2. Dispositif de tri et de comptage .....                            | 68        |
| <b>II. Application à la détection précoce des infections .....</b>     | <b>70</b> |
| II.1. Modèle des monocytes : un marqueur cellulaire précoce.....       | 71        |
| II.1.1. Choix de l'analyte.....  | 71        |
| II.1.2. Rôle des monocytes lors d'infections .....                     | 71        |
| II.2. Biocapteur impédimétrique pour la détection des infections ..... | 73        |
| II.2.1. Choix du biorécepteur.....                                     | 73        |
| II.2.2. Choix du transducteur.....                                     | 75        |
| II.2.3. Choix de la bio-fonctionnalisation .....                       | 80        |
| <b>Conclusion .....</b>  | <b>84</b> |
| <b>Bibliographie .....</b>   | <b>85</b> |

## Introduction

Les laboratoires sur puce constituent aujourd'hui un enjeu majeur aussi bien dans le monde des micro- et nanotechnologies que dans celui des sciences analytiques, du diagnostic ou de la recherche pharmaceutique. Ils permettent d'analyser en peu de temps de très petits volumes d'échantillons dans des dispositifs qui prennent en compte la complexité des échantillons biologiques. En effet, les techniques classiques d'analyse biologique impliquent l'enchaînement de plusieurs opérations, telles que le mélange, la filtration, l'extraction, l'amplification génique ou la concentration. La possibilité de les intégrer dans un dispositif unique de manière automatisée, offre d'intéressantes perspectives en termes de portabilité, de réduction des coûts et de fiabilisation de l'analyse. L'intérêt de ces microsystèmes appliqués au diagnostic précoce et en temps réel des états pathologiques a été démontré dans le chapitre précédent.

Le travail de thèse a pour objectif la conception d'un dispositif pour le tri et le comptage d'une sous population cellulaire. Il s'intègre dans un projet de recherche plus large, DIAGNOCELL, visant au développement d'un laboratoire sur puce pour l'isolement, le tri et le comptage de sous-populations cellulaires à des fins de diagnostic médical de type « *point-of-care* ». Ce projet est réalisé en partenariat avec le Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS) qui possède une grande expertise dans le domaine des micro- et nanosystèmes complexes et des technologies de fabrication associées. L'association de ses savoir-faires avec ceux du laboratoire de Pharmacochimie et Pharmacologie pour le Développement (PHARMA-DEV) qui possède entre autres des compétences en chimie des surfaces, en chimie analytique, en électrochimie et en biologie, devrait permettre à terme la réalisation d'un dispositif microfluidique pour la quantification de sous-populations cellulaires.

Ce chapitre consacré à la présentation du sujet de thèse présentera dans une première partie le contexte du projet dans lequel il s'intègre et ses enjeux, puis dans une deuxième partie les choix technologiques du dispositif au travers de son application de diagnostic des infections.

## I. Alternative au cytomètre de flux

### I.1. Contexte du projet

La cytométrie de flux est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de cellules dans un liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une cellule traversant un faisceau lumineux. Elle a été développée en

1934 pour le comptage des constituants cellulaires du sang, puis, associée à des méthodes électrostatiques et d'immunofluorescences, la cytométrie de flux a permis, en plus de l'analyse des cellules, le tri cellulaire. L'une de ses principales applications est le diagnostic de maladies. La détection repose alors soit sur la mesure du contenu anormal d'ADN dans le noyau de la cellule à caractère pathologique, soit sur l'identification des sous-populations cellulaires impliquées dans l'immunité par immunophénotypage.

La méthode la plus utilisée pour l'identification et le tri cellulaire est celle du « Fluorescence-Activated Cell Sorting » (FACS). Bien que cette technique soit très sensible et fiable, elle présente l'inconvénient d'utiliser des marqueurs fluorescents parfois onéreux, impliquant une étape de marquage assez longue qui peut altérer la cellule. De plus, elle est incompatible avec une utilisation délocalisée à cause des appareillages volumineux des cytomètres traditionnels. Le développement d'un dispositif portable pour le tri et le comptage de cellules apporterait une alternative majeure pour le diagnostic de premier niveau ou le diagnostic délocalisé.

Les laboratoires sur puce offrent la perspective d'intégrer les étapes de préparation et de purification de l'échantillon sur la même plateforme que le tri et le comptage des cellules, permettant ainsi de concevoir un dispositif miniature, automatique, flexible, avec de bons niveaux de performance et de fiabilité.

Récemment, des solutions miniaturisées ont été développées et proposées comme alternative à la cytométrie de flux. Ces dispositifs permettent l'analyse quantitative et qualitative des cellules en flux continu grâce à leurs propriétés diélectriques<sup>1-3</sup>. Parmi les travaux réalisés, Holmes *et al.*<sup>1</sup> présentent un dispositif miniature d'analyse sans marquage d'une population cellulaire. Cette plateforme associe un système microfluidique à une détection impédimétrique couplée à une détection optique. Les microélectrodes, placées dans la canalisation, mesurent l'impédance de chaque cellule, individuellement, à deux fréquences différentes de manière à différencier les cellules selon leurs propriétés diélectriques et leur taille. Cette caractérisation est confirmée par la mesure simultanée de la fluorescence des cellules marquées préalablement.

## I.2. Dispositif de tri et de comptage

Le laboratoire sur puce proposé dans le projet DIAGNOCELL combine deux systèmes de tri différents et complémentaires à un système de comptage. Le premier système de tri permet la séparation de cellules marquées par des billes magnétiques (module 1) et le deuxième système de tri est un tri immunologique, basé sur la différenciation des antigènes caractéristiques de la sous-population que l'on souhaite isoler et associé à une détection électrochimique quantitative (module 2).

Ce dispositif est versatile car il est facilement déclinable pour le diagnostic précoce de nombreuses maladies grâce à la détection de cellules présentant un antigène surexprimé lors de l'état pathologique ou caractéristique de la pathologie telles que les cellules tumorales circulantes<sup>4</sup>.

Le tri de cellules à partir de suspensions cellulaires hétérogènes est un élément essentiel de la recherche clinique actuelle ainsi que de la recherche fondamentale. Les dispositifs miniatures de séparation cellulaire sont très développés car ils permettent, par rapport aux techniques de séparation conventionnelles, de séparer des cellules dans un petit volume tout en réduisant le temps du procédé et en limitant l'altération des cellules et la contamination du milieu<sup>5-7</sup>.

Les dispositifs de séparation microfluidique peuvent être classés en deux groupes, actifs ou passifs, suivant les paramètres physico-chimiques utilisés. Les dispositifs passifs dépendent des forces inhérentes au fluide d'inertie et de la géométrie de la canalisation qui peut être structurée de plots ou de micropiliers et/ou fonctionnalisée pour permettre l'adhésion<sup>8</sup>. Les dispositifs actifs comprennent les techniques optiques, acoustiques, diélectrophorétiques et magnétiques. Parmi les nombreux travaux réalisés, on peut citer la séparation hydrodynamique qui a été éprouvée avec succès pour la séparation de globules blancs du sang<sup>9</sup> et la séparation diélectrophorétique qui a permis de différencier et de séparer des globules rouges sains et infectés par le parasite protozoaire *Babesia bovis*, les propriétés diélectriques des globules rouges infectés étant modifiées<sup>10</sup>.

Le tri magnétique est l'une des techniques les plus utilisées pour la séparation cellulaire, et notamment pour l'isolement de cellules rares, dans la recherche et les tests de diagnostic clinique. Il présente l'avantage d'être facilement miniaturisable et peut être appliqué à toutes cellules différenciables par un antigène caractéristique. De plus, son principe de séparation en microfluidique a déjà été validé avec une spécificité élevée dans de nombreuses publications bien que les taux de séparation obtenus ne soient pas optimaux en terme de pureté<sup>7</sup>. Fulcrand *et al.*<sup>11</sup> ont développé au LAAS des systèmes microfluidiques intégrant des microsources magnétiques pour la séparation magnétique en flux continu.

Inokuchi *et al.*<sup>12</sup> ont montré la possibilité de réaliser un dispositif pour la séparation de cellules marquées par des microbilles magnétiques intégrant l'étape de marquage des cellules (Figure 1).

Le principe du module 1 est similaire à ce dispositif : l'échantillon sanguin et une solution tampon contenant des microbilles magnétiques dont la surface a été préalablement fonctionnalisée par des anticorps sont introduits puis mélangés dans le mixeur. Dans cette zone, les cellules cibles se fixent sur les billes par interaction antigène/anticorps. Puis, sous l'action d'un champ magnétique, elles sont séparées des autres constituants du sang et

dirigées vers le module 2, dans lequel la sous-population cellulaire d'intérêt est piégée sur une surface fonctionnalisée par des anticorps qui leur sont caractéristiques et comptée.

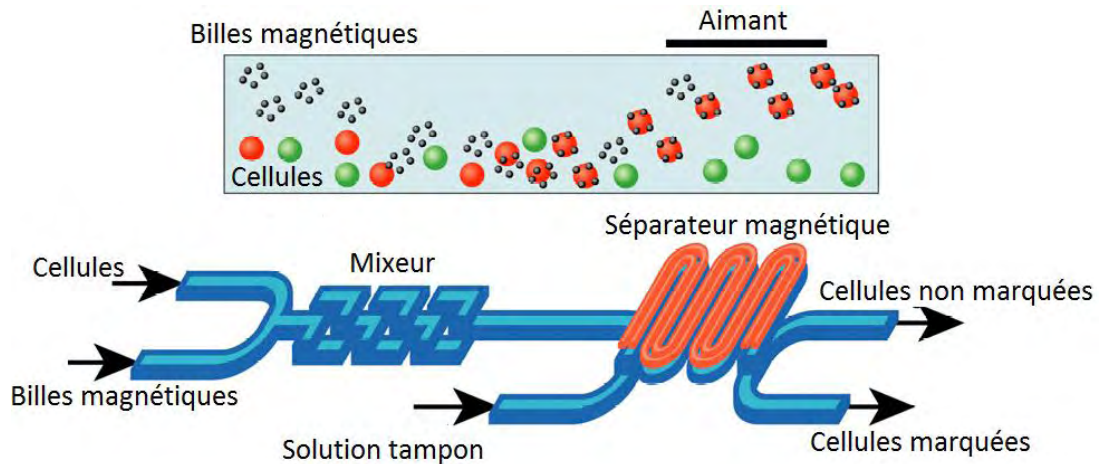


Figure 1 : Schéma du système de tri magnétique<sup>12</sup>

Le comptage est un élément fonctionnel souvent associé au tri. Généralement, le comptage et la détection se font par l'intermédiaire de techniques optiques qui nécessitent souvent le marquage fluorescent des cellules. Pour limiter la complexité du système, une méthode de détection sans marquage et facilement miniaturisable a été préférée : la spectroscopie d'impédance électrochimique. L'impédance a déjà fait ses preuves aussi bien pour le comptage des cellules en suspension à travers le compteur Microfluidic Coulter en 1950 que pour le comptage de cellules adhérentes<sup>13,14</sup>. Récemment, Ng *et al.*<sup>14</sup> ont développé un dispositif qui utilise la diélectrophorèse négative pour la séparation cellulaire, le comptage des cellules piégées sur une électrode fonctionnalisée par des anticorps spécifiques étant réalisé par impédance. La spectroscopie d'impédance a également été mise en oeuvre au laboratoire PHARMA-DEV pour différencier des cellules saines de cellules infectées ou activées<sup>15,16</sup>.

Le travail de thèse représente une brique technologique dans la réalisation de ce laboratoire sur puce pour le tri et le comptage de sous-population cellulaire. Ce mémoire est essentiellement consacré au module 2 qui consiste, après un premier tri, à détecter de manière quantitative une sous-population cellulaire par spectroscopie d'impédance.

## II. Application à la détection précoce des infections

Comme décrit dans le chapitre 1, il existe de nombreux tests rapides pour la détection des infections mais ces tests ne permettent pas un diagnostic dès les premiers stades de la maladie. L'application proposée dans ce travail vise le diagnostic précoce des infections

bactériennes, virales ou parasitaires *via* le tri et le comptage d'une sous-population cellulaire ciblée caractérisant le processus infectieux ou l'inflammation chronique.

## II.1. Modèle des monocytes : un marqueur cellulaire précoce

### II.1.1. Choix de l'analyte

Dès les premiers stades d'une infection, la réaction immunitaire innée et non spécifique se met en place, entre 0 et 96h, puis elle est complétée d'une réponse immunitaire adaptative au-delà de 96h.

La réponse immunitaire innée est ainsi la première ligne de défense immunitaire. Elle peut être immédiate grâce à l'action des cellules phagocytaires qui sont les neutrophiles, les éosinophiles et les monocytes qui se transforment ensuite en macrophages, et/ou induite par des activateurs appelés interférons. Ces activateurs stimulent la production de protéines antivirales et antibactériennes à visée antiproliférative, en inhibant la réplication virale dans les cellules, ou à effet sur la réponse immune, en activant les cellules tueuses naturelles (cellules NK) qui détruisent les cellules infectées.

L'immunité adaptative est constituée de la reconnaissance et de l'activation de la réponse par les lymphocytes grâce à la détection de récepteurs du pathogène à la surface des cellules phagocytaires et aux cellules présentatrices d'antigènes (APC). Cette réponse immunitaire peut être soit humorale, avec une production d'anticorps par les lymphocytes B pour détruire le pathogène, soit à médiation cellulaire, les cellules cytotoxiques tuant les cellules infectées.

La détection quantitative rapide et précoce de cellules intervenant dans la réponse immunitaire innée pourrait être une indication pour l'établissement d'un diagnostic des infections. A la différence des neutrophiles qui sont généralement responsables de la défense contre les infections bactériennes et des éosinophiles qui traitent en premier lieu les infections parasitaires, les monocytes sont impliqués dans tous les types d'infections. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux monocytes circulants du sang comme marqueur cellulaire précoce d'un processus infectieux ou inflammatoire.

### II.1.2. Rôle des monocytes lors d'infections

Les monocytes sont des leucocytes qui, après maturation cellulaire dans la moelle osseuse, se répartissent dans le sang en un secteur dit marginalisé au niveau des parois vasculaires et en un secteur circulant. Les monocytes du sang (MO) restent environ 24 heures dans le sang circulant puis quittent ce dernier pour les tissus où ils évoluent en macrophages ou en cellules dendritiques.



Les MO du sang font partie de la famille du système phagocytaire mononucléaire qui joue un rôle central dans l'immunorégulation et la défense immunitaire contre les organismes pathogènes<sup>17</sup>. Ces cellules, mesurant entre 15 et 20  $\mu\text{m}$ , interviennent dans les phénomènes inflammatoires et dans la synthèse de nombreux facteurs de croissance. Elles appartiennent à la première ligne de défense contre les infections bactériennes, fongiques, parasitaires ou virales et exercent des fonctions de phagocytose et des fonctions sécrétrices.

Lors des infections, les MO contribuent directement à la défense immunitaire grâce à leur fonction phagocytaire mais aussi grâce à l'activation des MO par les organismes infectés ou des médiateurs inflammatoires et des facteurs chimiotactiques libérés par les autres cellules qui modulent le processus inflammatoire et déclenchent la réponse immunitaire adaptée. De nombreuses publications attribuent ces fonctions des MO au cours des infections et des états inflammatoires à l'hétérogénéité de ces cellules<sup>18-24</sup>.

Ziegler-Heitbrock *et al.*<sup>21</sup> ont démontré que ces sous-populations diffèrent par leurs phénotypes et leurs fonctions. Les MO se divisent en trois groupes suivant l'expression des molécules de surface CD 14, récepteur du lipopolysaccharide (LPS) et CD 16, récepteur du Fcy RIII de faible activité. Les MO CD 14<sup>++</sup> CD 16<sup>-</sup>, dits classiques représentent 85 % à 95 % du nombre total de MO chez un adulte sain. Les deux autres sous-groupes de MO possèdent différents niveaux d'expression du récepteur CD 14 : les MO CD 14<sup>+</sup> CD 16<sup>+</sup>, appelés MO intermédiaires ou anti-inflammatoires et les MO CD 14<sup>-</sup> CD 16<sup>++</sup> dits pro-inflammatoires. Les deux sous-groupes surexprimant le récepteur CD 16 contribuent au mécanisme de défense de nombreuses pathologies infectieuses et inflammatoires. En effet, une forte augmentation du nombre de MO CD 16<sup>+</sup>, pouvant atteindre environ 50 % des MO total, a été décrite pour de nombreuses maladies infectieuses telles que le paludisme<sup>25</sup>, les infections bactériennes<sup>26,27</sup>, le VIH<sup>28,29</sup> et les maladies inflammatoires, comme l'athérosclérose<sup>30,31</sup>. Le nombre de cellules CD 16<sup>+</sup> évolue d'environ 50 à plus de 500 cellules/ $\mu\text{L}$  dans le sang des patients atteints de septicémie grave<sup>26</sup>.

Bien que cette augmentation suggère un rôle potentiel de ces cellules dans le processus inflammatoire, elle peut simplement être la conséquence d'un état inflammatoire dans le corps et pourrait par conséquent n'être qu'un indicateur de l'étendue de l'inflammation ou de l'infection permettant le suivi de la réponse à un traitement par leur diminution. Fingerle *et al.*<sup>32</sup> ont montré que le nombre de MO CD 16<sup>+</sup> est réduit dans le sang après traitement par des glucocorticoïdes. Cependant, l'augmentation du nombre de cellules CD 14<sup>+</sup> CD 16<sup>+</sup> chez les patients hémodialysés sans signe d'infection démontre que les MO CD 16<sup>+</sup> sont également des acteurs dans le processus infectieux<sup>17</sup>.

Ainsi, la détection de la variation des MO CD16<sup>+</sup> peut être utilisée pour le diagnostic précoce mais également pour évaluer l'efficacité d'un traitement.

## II.2. Biocapteur impédimétrique pour la détection des infections

La fabrication d'un dispositif pour détecter le niveau de MO CD 16<sup>+</sup> circulants dans le sang présente un intérêt pour le diagnostic des maladies infectieuses. Comme présenté dans le premier chapitre, le développement d'un biocapteur implique de sélectionner le biorécepteur adéquate à la détection de l'analyte, le transducteur adapté à la reconnaissance de l'évènement et la méthode d'immobilisation des biomolécules.

### II.2.1. Choix du biorécepteur

La différenciation des MO CD 14<sup>++</sup> et des MO CD 16<sup>+</sup> repose sur la surexpression d'un antigène à la surface des cellules. Le biorécepteur doit par conséquent être capable de former une liaison immunologique très sensible avec une reproductibilité et une répétabilité élevée<sup>33</sup>. Les anticorps et les aptamères constituent les deux principales classes de molécules capables de se lier de manière covalente à un antigène.

Philips *et al.*<sup>34</sup> ont montré la possibilité de piéger des cellules eucaryotes et procaryotes à l'aide d'aptamères. Cependant, ils sont beaucoup plus utilisés pour la détection de petites molécules<sup>35-37</sup>, telles que les protéines, l'ADN, l'ARN, les virus, et peu de références liées à leur utilisation pour détecter des cellules existe.

Les anticorps<sup>38</sup> sont des glycoprotéines composées de deux chaînes lourdes d'environ 440 acides aminés chacune et de deux chaînes légères d'environ 220 acides aminés chacune, reliées entre elles par des ponts disulfures. La structure, généralement flexible sous la forme d'un Y, est composée d'un « fragment cristallisable » (Fc), commun à tous les anticorps d'un même mammifère et de deux fragments variables de liaison de l'antigène, appelés « fragment antigen binding » (Fab). Ces derniers contiennent les sites de reconnaissance de l'antigène, les paratopes (Figure 2).

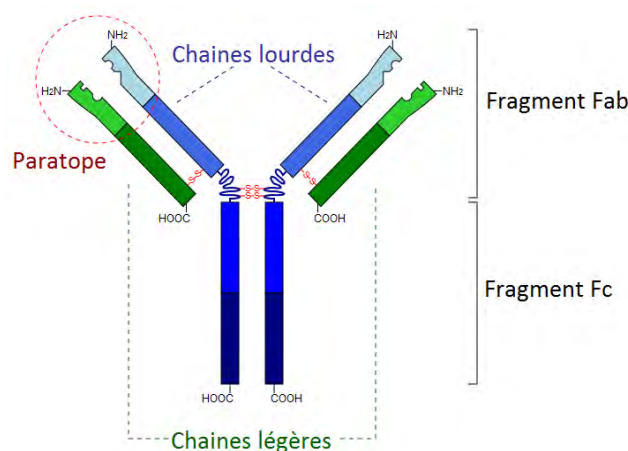


Figure 2: Schéma d'un anticorps

Il existe deux types d'anticorps, les anticorps monoclonaux spécifiques de la reconnaissance d'un épitope, molécule de l'antigène reconnue par l'anticorps et les anticorps polyclonaux qui peuvent reconnaître plusieurs épitopes d'un même antigène. Les anticorps polyclonaux sont obtenus par purification du sérum de l'animal sur l'antigène correspondant et sont constitués d'un mélange d'anticorps monoclonaux produits par plusieurs clones de plasmocytes, cellules productrices d'anticorps. Les anticorps monoclonaux spécifiques à un seul épitope sont obtenus *in vitro* par culture cellulaire à partir d'une cellule appelée hybridome provenant d'une fusion cellulaire entre un plasmocyte et une cellule tumorale, le myélome. Cette cellule hybride permet de produire des anticorps monoclonaux très purs en quantité importante.

Selon la structure des chaînes lourdes du fragment Fc, ces anticorps sont divisés en cinq classes d'immunoglobulines (Ig) appelées isotypes suivant leur fonction de reconnaissance et leur localisation dans le corps : les IgG, les IgA, les IgM, les IgE et les IgD. Les plus utilisés comme biorécepteurs sont les IgG car ils constituent 75 % des anticorps du sang.

Il est important de noter que les anticorps comportent de nombreuses fonctions carboxyles et amines qui facilitent leur immobilisation à la surface des transducteurs. Cependant, en raison de leur forte affinité avec l'antigène et de la stabilité du complexe anticorps-antigène, l'étape de dissociation est lente et les traitements de régénération diminuent la durée de vie du biorécepteur.

D'autres biorécepteurs capables de réaliser une liaison immunologique peuvent être utilisés, tels que les anticorps artificiels obtenus grâce aux polymères à empreinte moléculaire (MIP)<sup>39</sup> et les anticalines. Ces anticorps biomimétiques présentent une stabilité et une durée de vie supérieures aux anticorps traditionnels, cependant les procédés de synthèse ne sont pas complètement optimisés.

Le choix du biorécepteur dépend principalement de la spécificité de la réponse, de sa durée de vie et de sa stabilité opérationnelle et environnementale. La Figure 3 présente les avantages de chacun des biorécepteurs pouvant être utilisés.

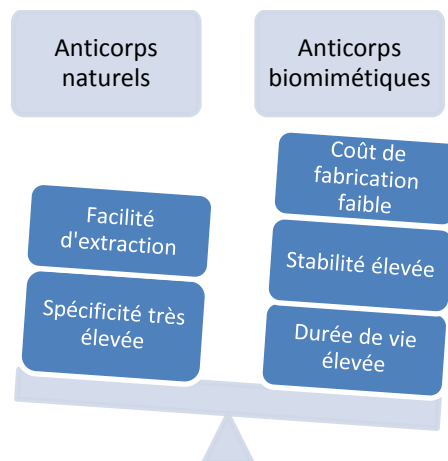


Figure 3 : Critères de choix du biorécepteur pour une liaison immunologique

Malgré une stabilité élevée et un coût de fabrication faible des anticorps biomimétiques, le biorécepteur choisi pour le dispositif est un anticorps monoclonal de type IgG car l'application nécessite une grande spécificité de détection pour un diagnostic précis et rapide.

### *II.2.2. Choix du transducteur*

Le type de biocapteur utilisé pour la détection des infections varie généralement selon les propriétés de l'analyte et la matrice dans laquelle il se trouve. Le choix du transducteur dépend alors<sup>33</sup>:

- du type de réaction et des substances libérées ou consommées : modification de charge, de pH, variation de la fluorescence,
- de l'application du biocapteur : un biocapteur pour l'usage biomédical peut être à usage unique tandis qu'un biocapteur pour le contrôle de l'environnement doit être robuste,
- des possibles interférences : dans les milieux troubles, la détection optique peut être perturbée.

Pour contrôler les réactions d'affinité et pour quantifier les espèces antigéniques ayant interagi, les immunocapteurs peuvent être associés à des transducteurs optiques, piézoélectriques et électrochimiques.

Les transducteurs optiques sont très utilisés pour le criblage simultané de plusieurs échantillons. Ils apparaissent comme étant les plus sensibles grâce à la SPR cependant le coût élevé des instruments optiques difficilement miniaturisables limite leur utilisation.

Tout comme les transducteurs optiques, les transducteurs piézoélectriques ne sont pas adaptés pour l'utilisation sur le terrain. De plus, malgré des sensibilités extrêmement élevées, de l'ordre du femtogramme, ils présentent une quantité importante de réactions croisées et d'adsorptions non spécifiques à la surface du cristal causant de nombreuses interférences. C'est pourquoi peu de biocapteurs piézoélectriques sont utilisés pour la détection de pathologies.

Les techniques électrochimiques sont très utilisées dans les immunocapteurs car ils permettent de développer des biocapteurs facilement miniaturisables, très sensibles, indépendants de la turbidité de la solution, à faible coût, avec des temps d'analyse courts et une instrumentation relativement simple. La transduction électrochimique peut être ampérométrique, potentiométrique ou impédimétrique. La formation du complexe antigène-anticorps n'étant pas électroactive, le suivi de cette réaction est alors réalisé soit

en utilisant un marqueur et/ou un traceur comme un fluorophore ou une enzyme, soit en mesurant les changements de propriétés électriques de la surface dus à la présence de l'analyte.

Les biocapteurs ampérométriques sont les plus populaires mais nécessitent généralement un marqueur. Bien que le marquage augmente la sélectivité et la sensibilité, les méthodes de transduction sans marquage sont préférées pour permettre une détection en temps réel.

Les biocapteurs impédimétriques s'appliquent avantageusement aux réactions mettant en jeu des phénomènes d'affinité moléculaire de type antigène-anticorps ou chémorécepteurs membranaires car de faibles variations de conductance, de capacitance et d'impédance peuvent être décelées à l'interface entre l'électrode et le substrat immobilisé. De plus, contrairement aux autres techniques électrochimiques qui sont des techniques stationnaires en courant continu et qui changent les conditions de l'électrode, l'impédance est une technique transitoire qui mesure un faible courant alternatif en réponse à une tension sinusoïdale de faible amplitude. L'amplitude est généralement comprise entre 5 et 10 mV de manière à minimiser la réponse non linéaire et à obtenir un rapport signal/bruit élevé, une trop petite amplitude de perturbation produisant un signal trop faible affecté par le bruit. Sous de telles conditions, la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) n'endommage pas la couche de biofonctionnalisation et ne modifie pas l'intégrité de la surface de l'électrode. C'est pourquoi cette technique est très utilisée pour la caractérisation et l'analyse des cellules vivantes biologiques.

Ainsi, la méthode de transduction choisie est l'impédance car cette technique non invasive présente l'avantage de réaliser des mesures en temps réel sans marquage avec une sensibilité élevée.

#### II.2.2.a. Principe des immunocapteurs impédimétriques<sup>40,41</sup>

Les biocapteurs impédimétriques sont classés en deux catégories suivant le processus ayant lieu à la surface de l'électrode.

Les biocapteurs sont dits non faradiques lorsque les réactions de transfert de charge sont thermodynamiquement ou cinétiquement défavorisées, comme c'est le cas en l'absence de couple redox. Dans le cas d'un immunocapteur, d'autres processus tels que l'adsorption et la désorption peuvent se produire et la structure de l'interface électrode/solution varie avec le potentiel de l'électrode et la composition de la solution. Lorsque la surface de l'électrode est complètement couverte par une couche diélectrique qui se comporte comme un isolant plus ou moins parfait, on parle alors d'immunocapteurs capacitifs. Ils exploitent les changements de propriétés diélectriques et/ou d'épaisseur de la couche du diélectrique dus à l'interaction antigène-anticorps<sup>42</sup>. La capacité électrolytique, définie par l'électrode de travail, le

diélectrique et l'électrolyte, permet la détection des interactions antigène-anticorps selon l'équation suivante :

$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon A}{d}$$

avec  $\epsilon_0$  la permittivité du vide,  $\epsilon$  la constante diélectrique du milieu entre les deux plaques,  $A$  l'aire des plaques en  $m^2$ , et  $d$  l'épaisseur de la couche isolante en m.

Lors de la liaison antigène-anticorps, il est généralement attendu une augmentation de la distance entre l'électrode et l'électrolyte, ce qui entraîne une diminution de la capacitance totale. Toutefois, la couche du diélectrique n'étant pas parfaite et sa surface comprenant généralement des défauts, les variations de la capacitance peuvent également être dues à une variation des propriétés diélectriques, de la distribution de la charge et à une modification de la conformation du biorécepteur lors de l'interaction avec l'analyte. On parle alors d'élément à phase constante, CPE (Constant Phase Element).

L'autre catégorie concerne les processus faradiques, c'est-à-dire les transferts d'électrons à travers l'interface électrode/électrolyte provoquant une oxydation ou une réduction d'une espèce redox à la surface de l'électrode. La surface de l'électrode peut être partiellement ou complètement couverte par une couche isolante, dans ce cas, le paramètre mesuré est la résistance au transfert de charge qui traduit la capacité de l'espèce redox à traverser la couche isolante pour s'oxyder ou se réduire sur l'électrode. Dans les immunocapteurs impédimétriques faradiques, il est généralement attendu que la liaison antigène-anticorps limite la réaction redox impliquant alors une augmentation de la résistance de transfert de charge. Ces immunocapteurs montrent une sensibilité plus élevée à l'interaction antigène-anticorps, cependant l'espèce redox peut avoir un effet sur la stabilité et l'activité de l'électrode assemblée. L'espèce redox la plus utilisée pour les mesures de spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) est le couple d'hexacyanoferrate  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ .

Les données de SIE sont représentées soit dans un diagramme de Nyquist qui représente l'opposé de l'impédance imaginaire en fonction de l'impédance réelle pour chacune des fréquences d'excitation, soit dans un diagramme de Bode qui représente le logarithme du module de l'impédance et le déphasage en fonction du logarithme de la fréquence d'excitation. Ces diagrammes d'impédance électrochimique sont analysées selon la théorie des circuits électriques, qui permet de modéliser l'interface par un circuit électrique équivalent (CEE) composé de résistances, de capacitances et d'inductances. L'interprétation des résultats grâce au modèle des circuits électriques équivalents suppose que le système électrochimique est pseudo-linéaire en imposant une perturbation très faible. Chaque élément du circuit est lié à une composante de l'interface mais il n'y a pas forcément de

correspondance une à une entre les éléments du circuit et les processus physiques du système électrochimique. En effet, l'interprétation des résultats est rarement simple en raison de la présence d'adsorbats d'intermédiaires, de l'hétérogénéité de la surface et de sa rugosité.

La Figure 4 représente des exemples de diagrammes obtenus par SIE en mode faradique et non faradique et les circuits électriques équivalents (CEE) qui peuvent leur être associés.

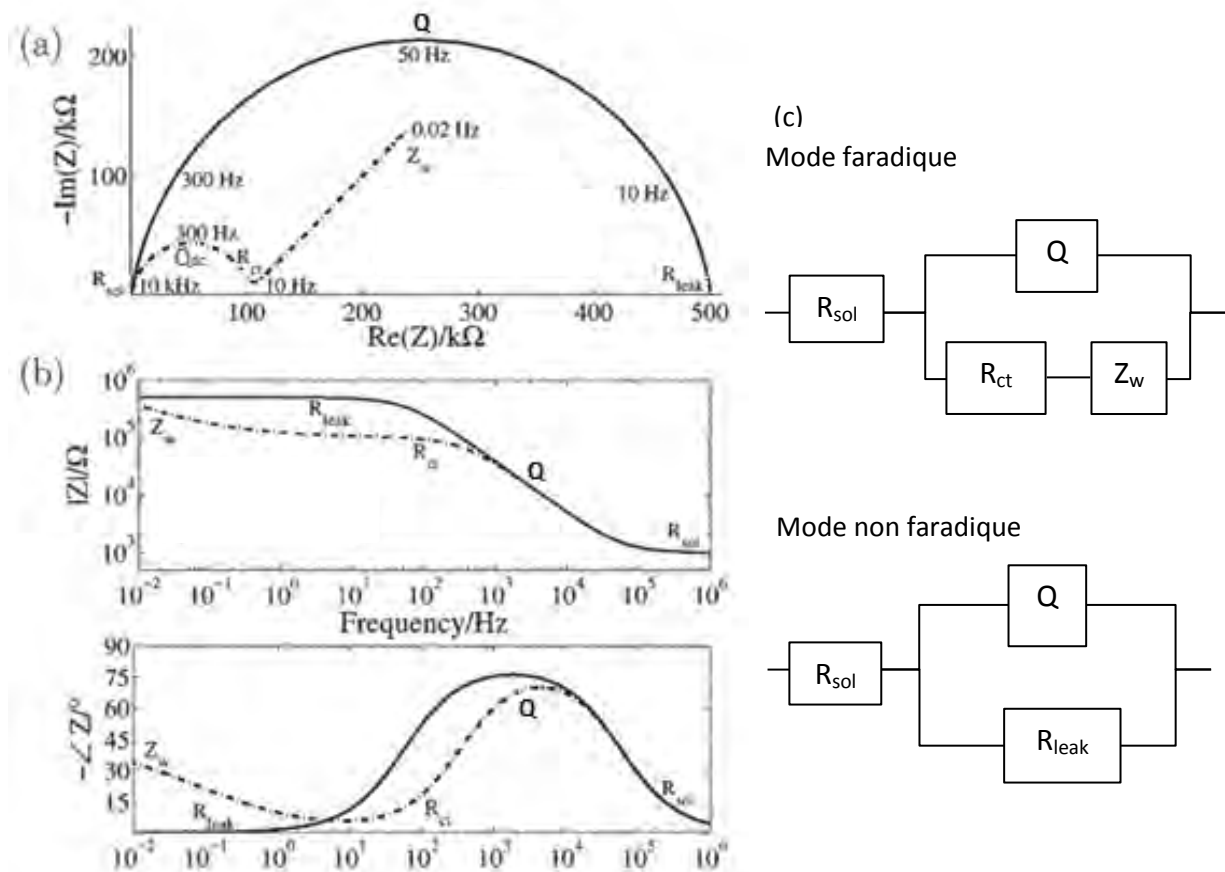


Figure 4: Exemples de mesures d'impédances en mode faradique (—) et non faradique (- - -) représentées dans un diagramme (a) de Nyquist, (b) de Bode, et (c) exemples de modèles de circuit équivalent associés<sup>41</sup>

Le système électrochimique en mode faradique de cette courbe peut être une électrode plongée dans une solution contenant un couple redox. Le diagramme de Nyquist montre un demi-cercle à hautes et moyennes fréquences, représentant le processus d'oxydo-réduction du couple redox, suivi d'une droite à basses fréquences, traduisant la diffusion des espèces en solution à travers l'impédance de Warburg  $Z_w$ , qui peut être calculée à l'aide du coefficient de Warburg  $\sigma$  grâce à l'équation suivante :

$$Z_w = \left(\frac{2}{\omega}\right)^{1/2} \sigma$$

et

$$\sigma = \frac{R T \sqrt{2}}{n^2 F^2 C A \sqrt{D}}$$

avec C la concentration de l'espèce redox, n le nombre d'électrons échangés, A la surface géométrique de l'électrode et D le coefficient de diffusion de l'espèce redox.

L'amplitude du demi-cercle correspond alors à la résistance de transfert de charges,  $R_{tc}$ , l'impédance réelle de la plus haute fréquence désigne la résistance de l'électrolyte  $R_{sol}$  et la capacité de double couche entre l'électrode et les ions en solution  $Q_{dc}$  peut être obtenue à partir de la fréquence du point le plus haut du demi-cercle,  $f_0$ , grâce à l'équation suivante :

$$f_0 = \frac{1}{(R_{tc} Q_{dc})^n}$$

En l'absence de couple redox, en mode non faradique, le système électrochimique est composé d'une électrode recouverte d'une couche isolante. Seul le demi-cercle apparaît sur le diagramme de Nyquist, mettant en exergue le caractère imparfait de la surface du diélectrique. Dans le cas d'un immunocapteur capacitif parfait, le diélectrique étant un isolant parfait, sa résistance serait alors infinie et le diagramme de Nyquist représenterait une droite parallèle à l'axe d'impédance imaginaire, définie par une impédance réelle à haute fréquence  $R_{sol}$  due à l'électrolyte et une capacité C définie par :

$$Z = \frac{1}{j \omega C}$$

Cependant, dans la réalité, le diélectrique présente des trous et/ou pores entraînant la présence d'ions et de molécules d'eau dans la couche isolante, la capacité est alors une CPE modélisée par une capacitance en parallèle à une résistance finie,  $R_{leak}$ , due aux mouvements des espèces en solution dans le diélectrique.

Ces éléments sont retrouvés sur les diagrammes de Bode. Leurs valeurs sont déterminées de manière précise par modélisation des données expérimentales dans un CEE. Les circuits les plus utilisés pour décrire les systèmes électrochimiques en mode faradique, circuit de Randles, et en mode non faradique sont présentés Figure 4c. Il est important de noter qu'un modèle équivalent n'est pas unique et que le meilleur des modèles peut ne pas modéliser parfaitement les résultats expérimentaux en raison de la complexité des processus, des interactions subtiles non prises en compte et des signaux parasites. Elle résulte souvent plus de l'art que de la science<sup>43</sup>.



### II.2.2.b. Choix des électrodes<sup>33,44</sup>

L'impédance peut être mesurée par au minimum deux électrodes, mais trois électrodes sont généralement utilisées. L'électrode de travail sur laquelle sont immobilisés les anticorps mesure le courant, l'électrode de référence impose une tension entre l'électrode de travail et la solution et la contre électrode fournit du courant à la solution de manière à maintenir constante la tension imposée dans la cellule électrochimique.

L'électrode de travail étant le support des transducteurs pour l'immobilisation des anticorps, leur nature influe sur le procédé de biofonctionnalisation et les performances du biocapteur. Différents types d'électrodes peuvent être utilisés dans la fabrication des immunocapteurs impédimétriques tels que les électrodes conventionnelles en or, platine, argent ou graphite, les électrodes en carbone vitreux, les électrodes imprimées par sérigraphie en carbone ou en or, les électrodes à pâte de carbone ou de graphite, les nanotubes de carbone.

Grâce au développement des technologies des semiconducteurs et de la sérigraphie, les électrodes par sérigraphie se sont rapidement développées. Leur fabrication reproductible rend l'étape de calibration du biocapteur inutile. Cependant, il est important de noter que ces électrodes doivent être conservées dans un emballage fermé en aluminium ou dans une boîte spéciale de manière à les protéger de l'atmosphère et de toute contamination. De plus, la reproductibilité des biocapteurs à base d'électrodes sérigraphiées n'est assurée que pour les électrodes appartenant au même lot de fabrication.

L'utilisation d'électrodes à base de pâte de carbone ou de graphite est également très attractive de par leur simplicité. La modification de l'électrode peut se faire par le mélange contrôlé des différents composants, l'homogénéisation de la pâte garantissant la reproductibilité des essais. Cependant, le volume de la pâte servant de réservoir à protéines et la surface de l'électrode se régénérant par polissage, ces électrodes ne conviennent pas à notre application de piégeage des cellules.

Les électrodes conventionnelles sont souvent utilisées dans la fabrication des biocapteurs pour leur facilité de nettoyage, de fonctionnalisation et de conservation. Les surfaces en or présentent en particulier la propriété d'être inoxydables dans les conditions ambiantes et biocompatibles. C'est pourquoi des surfaces en or ont été choisies comme électrodes pour notre application.

### *II.2.3. Choix de la bio-fonctionnalisation*

La sensibilité du biocapteur étant directement dépendante de la préparation de la surface, la fonctionnalisation doit permettre de créer une liaison stable entre la surface du

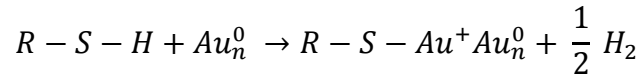
transducteur et le biorécepteur sans interférer sur son activité biologique. La bio-fonctionnalisation et le contrôle de la surface du transducteur constituent alors une étape critique du développement de l'immunocapteur, les interactions antigènes-anticorps étant complexes. De nombreux travaux<sup>45</sup> ont rapporté une perte de la sensibilité de détection liée à l'immobilisation des anticorps sur une surface solide. Les raisons de cette perte d'activité sont l'orientation aléatoire des anticorps sur la surface, la gêne stérique et les interactions non spécifiques.

Il n'y a pas de méthode de référence d'immobilisation des anticorps. Le choix de la technique d'immobilisation dépend de l'élément biologique, du transducteur, de l'environnement dans lequel le biocapteur va évoluer, de la stabilité mécanique et chimique de la matrice et de son coût. Les techniques d'immobilisation des anticorps sur une surface solide en or sont nombreuses. Elles peuvent être spontanées ou induites et incluent l'adsorption physique, l'impression par microcontact, l'électropolymérisation, le piégeage dans un polymère conducteur tel que le polypyrrole et le couplage covalent.

Les techniques de fonctionnalisations spontanées sont préférées. Parmi ces méthodes, l'adsorption physique est très utilisée car elle permet de conserver l'activité biologique du biorécepteur. L'utilisation des polymères conducteurs capables de s'adsorber sur les surfaces chargées est très répandue dans la fabrication des immunocapteurs de par leurs propriétés électroniques et leur potentiel d'immobilisation des biomolécules aussi bien par piégeage dans la matrice polymérique que par liaisons électrostatiques. La couche de polyélectrolytes permet ainsi l'adsorption des anticorps à la surface du film mais les forces impliquées produisent des interactions faibles et peuvent souffrir de désorption. De plus, bien que ces matrices soient économiques et permettent une bonne régénération du biorécepteur, leur préparation doit être optimisée de manière à obtenir des couches reproductibles et à contrôler la concentration de biomolécules dans le polymère. En effet, une quantité trop importante d'anticorps réduit la conductivité de la matrice et la stabilité de l'électrode.

Le couplage covalent des anticorps sur une surface organique ou non organique permet l'immobilisation quasi irréversible du biorécepteur à la surface du transducteur, ce qui favorise sa réutilisation après régénération<sup>44</sup>. Les monocouches auto-assemblées, SAMs (Self Assembled Monolayers), composées d'un groupement thiol à une extrémité et d'un groupement fonctionnel capable de réagir avec une biomolécule à l'autre extrémité, constituent la technique de fonctionnalisation la plus répandue dans la fabrication des biocapteurs impédimétriques car elles présentent l'avantage de s'adsorber spontanément à la surface des métaux, tels que l'or, l'argent, le platine et le mercure, pour former des monocouches organisées et stables.

Le mécanisme simplifié de formation des SAMs est organisé en deux principales phases<sup>46</sup>. La première est la chimisorption, elle a lieu dès la première minute du dépôt entre les groupements sulfhydriles des alcanethiols et l'électrode d'or. Il y a alors formation d'une liaison covalente selon l'équation suivante<sup>47</sup> :



Durant cette première phase, les molécules thiolées s'adsorbent ponctuellement de manière désordonnée sur la surface d'or et le film atteint 90 % de son épaisseur finale.

La deuxième phase plus lente permet après plusieurs heures d'obtenir un film ordonné, stable et compact, comprenant de nombreuses interactions de Van der Waals entre les chaînes. En raison de ces interactions, les propriétés des monocouches de thiols dépendent aussi de la longueur des chaînes des alcanethiols, les chaînes longues, c'est-à-dire contenant plus de 8 carbones, procurant une meilleure organisation du film. Une cinétique de stabilité des SAMs en fonction du temps montre que les alcanethiols ayant des chaînes de plus de 12 carbones nécessitent un temps de dépôt de 40 h avant d'être complètement stables, alors qu'en deçà de 12 carbones un film stable est obtenu au bout de quelques heures<sup>46</sup>.

L'autre extrémité des SAMs comporte généralement un groupement fonctionnel terminal, carboxylique ou amine, capable de réagir avec une biomolécule. Le greffage des anticorps peut alors être réalisé soit par couplage covalent soit par adsorption grâce aux interactions électrostatiques. L'immobilisation par couplage covalent la plus courante repose sur la formation d'une liaison amide entre les groupements terminaux carboxyliques ou amines des anticorps et des SAMs activés par de l'éthyldiméthylaminopropylcarbodiimide (EDC) et du *N*-hydroxysuccinimide (NHS).

Enfin, la limitation des encombrements stériques et l'accessibilité des groupements fonctionnels terminaux des SAMs favorisent l'immobilisation des anticorps. Il a été démontré que l'utilisation de thiols mixtes, c'est-à-dire de thiols présentant différents groupements terminaux et/ou ayant des longueurs de chaîne différentes, permet la formation d'une monocouche plus stable avec des groupements terminaux plus accessibles et donc plus réactifs<sup>48</sup>. Les thiols mixtes constitués de deux groupements terminaux différents permettent de limiter la dénaturation de la biomolécule immobilisée. Généralement, le mélange est composé d'un thiol présentant une fonction terminale capable d'immobiliser la biomolécule à faible concentration molaire et d'un autre thiol à forte concentration qui sert de diluant. En effet, le second thiol réduit la concentration surfacique des groupements fonctionnels pour le greffage de la biomolécule et limite ainsi l'encombrement stérique et les adsorptions non spécifiques<sup>49,50</sup>.

Ainsi, l'utilisation de thiols mixtes à chaînes longues et un temps de dépôt long diminuent la densité de défaut des SAMs formés sur un support solide et permet l'obtention d'une surface organique dense, homogène et organisée. Les SAMs mixtes sont préférées car elles permettent la détection sélective de l'analyte cible grâce à la modification du groupe fonctionnel par le biorécepteur approprié. Par conséquent le procédé de biofonctionnalisation étudié dans ce manuscrit repose sur l'utilisation des SAMs mixtes.

Pour résumer, le dispositif développé, dans ce manuscrit, est un immunocapteur qui piège de manière spécifique une sous-population cellulaire de monocytes sur des électrodes d'or grâce à une liaison antigène-anticorps. Le greffage des anticorps est réalisé *via* des monocouches auto-assemblées de manière à obtenir un couplage covalent spontané et à conserver l'activité des anticorps. La détection et le comptage des cellules piégées sont réalisés par spectroscopie d'impédance électrochimique (Figure 5).

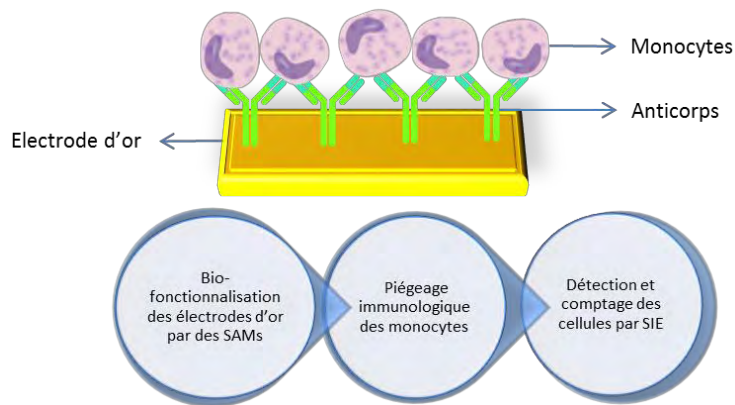


Figure 5 : Choix technologiques des différentes étapes du développement du biocapteur

## Conclusion

L'objectif de ce mémoire est de développer un biocapteur pour le tri et le comptage d'une sous-population cellulaire. Il s'intègre dans un projet de recherche plus vaste visant à la conception d'un laboratoire sur puce pour le tri et le comptage de cellules pour le diagnostic de premier niveau ou le diagnostic délocalisé. Le dispositif proposé dans ce projet combine un système de tri magnétique à un système de tri et de comptage sur électrodes fonctionnalisées. Il est tout d'abord appliqué au diagnostic précoce des maladies infectieuses à travers la détection des monocytes anti-inflammatoires et pro-inflammatoires. En effet, les monocytes de sang, qui appartiennent majoritairement à la sous population  $CD\ 14^+ CD\ 16^-$ , surexpriment dès les premiers stades du processus infectieux l'antigène CD 16.

Le travail réalisé dans ce mémoire concerne essentiellement le système de piégeage quantitatif des monocytes suivant l'expression des antigènes caractéristiques de la sous-population que l'on souhaite isoler. La détection cellulaire étant basée sur la reconnaissance antigène-anticorps, le biocapteur développé est un immunocapteur impédimétrique. Il associe la spécificité des interactions des anticorps aux performances de la transduction électrochimique, qui, comparée aux autres techniques, est facilement miniaturisable, très sensible et à faible coût.

## Bibliographie

- <sup>1</sup> D. Holmes, D. Pettigrew, C. H. Reccius, J. D. Gwyer, C. van Berkel, J. Holloway, D. E. Davies, et H. Morgan, « Leukocyte analysis and differentiation using high speed microfluidic single cell impedance cytometry », *Lab Chip*, 2009, 9, 20, 2881-2889.
- <sup>2</sup> D. M. Vykoukal, P. R. C. Gascoyne, et J. Vykoukal, « Dielectric characterization of complete mononuclear and polymorphonuclear blood cell subpopulations for label-free discrimination », *Integr Biol (Camb)*, 2009, 1, 7, 477-484.
- <sup>3</sup> K. C. Cheung, M. Di Berardino, G. Schade-Kampmann, M. Hebeisen, A. Pierzchalski, J. Bocsi, A. Mittag, et A. Tárnok, « Microfluidic impedance-based flow cytometry », *Cytometry A*, 2010, 77, 7, 648-666.
- <sup>4</sup> W. Xu, L. Cao, L. Chen, J. Li, X.-F. Zhang, H.-H. Qian, X.-Y. Kang, Y. Zhang, J. Liao, L.-H. Shi, Y.-F. Yang, M.-C. Wu, et Z.-F. Yin, « Isolation of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma using a novel cell separation strategy », *Clin. Cancer Res.*, 2011, 17, 11, 3783-3793.
- <sup>5</sup> A. Lenshof et T. Laurell, « Continuous separation of cells and particles in microfluidic systems », *Chem Soc Rev*, 2010, 39, 3, 1203-1217.
- <sup>6</sup> D. R. Gossett, W. M. Weaver, A. J. Mach, S. C. Hur, H. T. K. Tse, W. Lee, H. Amini, et D. Di Carlo, « Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems », *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397, 8, 3249-3267.
- <sup>7</sup> M. Radisic, R. K. Iyer, et S. K. Murthy, « Micro- and nanotechnology in cell separation », *Int J Nanomedicine*, 2006, 1, 1, 3-14.
- <sup>8</sup> T. F. Didar et M. Tabrizian, « Adhesion based detection, sorting and enrichment of cells in microfluidic Lab-on-Chip devices », *Lab Chip*, 2010, 10, 22, 3043-3053.
- <sup>9</sup> M. Yamada et M. Seki, « Hydrodynamic filtration for on-chip particle concentration and classification utilizing microfluidics », *Lab on a Chip*, 2005, 5, 11, 1233.
- <sup>10</sup> E. M. Nascimento, N. Nogueira, T. Silva, T. Braschler, N. Demierre, P. Renaud, et A. G. Oliva, « Dielectrophoretic sorting on a microfabricated flow cytometer: Label free separation of Babesia bovis infected erythrocytes », *Bioelectrochemistry*, 2008, 73, 2, 123-128.
- <sup>11</sup> R. Fulcrand, D. Jugieu, C. Escriba, A. Bancaud, D. Bourrier, A. Boukabache, et A. M. Gué, « Development of a flexible microfluidic system integrating magnetic micro-actuators for trapping biological species », *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2009, 19, 10, 105019.
- <sup>12</sup> H. Inokuchi, Y. Suzuki, et N. Kasagi, « Development of micro immuno-magnetic cell sorting system with lamination mixer and magnetic separator », in *Proc. 25th Sensor Symp.(Okinawa, Japan, 2008)*, 2008, 851-2.
- <sup>13</sup> M. Graham, « The Coulter principle: foundation of an industry », *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 2003, 8, 6, 72-81.
- <sup>14</sup> S. Y. Ng, J. Reboud, K. Y. P. Wang, K. C. Tang, L. Zhang, P. Wong, K. T. Moe, W. Shim, et Y. Chen, « Label-free impedance detection of low levels of circulating endothelial progenitor cells for point-of care diagnosis », *Biosensors & bioelectronics*, 2010, 25, 5, 1095-1101.
- <sup>15</sup> K. Reybier, C. Ribaut, A. Coste, J. Launay, P. L. Fabre, et F. Nepveu, « Characterization of oxidative stress in Leishmaniasis-infected or LPS-stimulated macrophages using electrochemical impedance spectroscopy », *Biosensors & bioelectronics*, 2010, 25, 12, 2566-2572.
- <sup>16</sup> C. Ribaut, K. Reybier, O. Reynes, J. Launay, A. Valentin, P. L. Fabre, et F. Nepveu, « Electrochemical impedance spectroscopy to study physiological changes affecting the red blood cell after invasion by malaria parasites », *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24, 8, 2721-2725.
- <sup>17</sup> W. A. Nockher et J. E. Scherberich, « Expanded CD14+ CD16+ Monocyte Subpopulation in Patients with Acute and Chronic Infections Undergoing Hemodialysis », *Infect Immun*, 1998, 66, 6, 2782-2790.

- <sup>18</sup> C. Auffray, M. H. Sieweke, et F. Geissmann, « Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells », *Annual Review of Immunology*, 2009, 27, 1, 669-692.
- <sup>19</sup> J. Cros, N. Cagnard, K. Woollard, N. Patey, S.-Y. Zhang, B. Senechal, A. Puel, S. K. Biswas, D. Moshous, C. Picard, J.-P. Jais, D. D'Cruz, J.-L. Casanova, C. Trouillet, et F. Geissmann, « Human CD14dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors », *Immunity*, 2010, 33, 3, 375-386.
- <sup>20</sup> D. Strauss-Ayali, S. M. Conrad, et D. M. Mosser, « Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection », *Journal of Leukocyte Biology*, 2007, 82, 2, 244-252.
- <sup>21</sup> L. Ziegler-Heitbrock, « The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation », *Journal of Leukocyte Biology*, 2006, 81, 3, 584-592.
- <sup>22</sup> A. M. Zawada, K. S. Rogacev, B. Rotter, P. Winter, R.-R. Marell, D. Fliser, et G. H. Heine, « SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset », *Blood*, 2011, 118, 12, e50-e61.
- <sup>23</sup> J. E. Scherberich et W. A. Nockher, « CD14++ monocytes, CD14+/CD16+ subset and soluble CD14 as biological markers of inflammatory systemic diseases and monitoring immunosuppressive therapy », *Clin. Chem. Lab. Med.*, 1999, 37, 3, 209-213.
- <sup>24</sup> W.-K. Kim, Y. Sun, H. Do, P. Autissier, E. F. Halpern, M. Piatak, J. D. Lifson, T. H. Burdo, M. S. McGrath, et K. Williams, « Monocyte heterogeneity underlying phenotypic changes in monocytes according to SIV disease stage », *J Leukoc Biol*, 2010, 87, 4, 557-567.
- <sup>25</sup> P. Chimma, C. Roussillon, P. Sratongno, R. Ruangveerayuth, K. Pattanapanyasat, J.-L. Pérignon, D. J. Roberts, et P. Druilhe, « A Distinct Peripheral Blood Monocyte Phenotype Is Associated with Parasite Inhibitory Activity in Acute Uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria », *PLoS Pathogens*, 2009, 5, 10, e1000631.
- <sup>26</sup> G. Fingerle, A. Pforte, B. Passlick, M. Blumenstein, M. Ströbel, et H. W. Ziegler-Heitbrock, « The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients », *Blood*, 1993, 82, 10, 3170-3176.
- <sup>27</sup> C. M. Herra, C. T. Keane, et A. Whelan, « Increased expression of Fc gamma receptors on neutrophils and monocytes may reflect ongoing bacterial infection », *J. Med. Microbiol.*, 1996, 44, 2, 135-140.
- <sup>28</sup> N. Thieblemont, L. Weiss, H. M. Sadeghi, C. Estcourt, et N. Haeffner-Cavaillon, « CD14lowCD16high: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection », *Eur. J. Immunol.*, 1995, 25, 12, 3418-3424.
- <sup>29</sup> C. Locher, G. Vanham, L. Kestens, M. Kruger, J. L. Ceuppens, J. Vingerhoets, et P. Gigase, « Expression patterns of Fc gamma receptors, HLA-DR and selected adhesion molecules on monocytes from normal and HIV-infected individuals », *Clin. Exp. Immunol.*, 1994, 98, 1, 115-122.
- <sup>30</sup> A. Schlitt, G. H. Heine, S. Blankenberg, C. Espinola-Klein, J. F. Dopheide, C. Bickel, K. J. Lackner, M. Iz, J. Meyer, H. Darius, et H. J. Rupprecht, « CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF- $\alpha$  levels », *Thrombosis and haemostasis*, 2004, 92, 2, 419-424.
- <sup>31</sup> M. Wildgruber, H. Lee, A. Chudnovskiy, T.-J. Yoon, M. Etzrodt, M. J. Pittet, M. Nahrendorf, K. Croce, P. Libby, R. Weissleder, et F. K. Swirski, « Monocyte Subset Dynamics in Human Atherosclerosis Can Be Profiled with Magnetic Nano-Sensors », *PLoS ONE*, 2009, 4, 5, e5663.
- <sup>32</sup> G. Fingerle-Rowson, J. Auers, E. Kreuzer, P. Fraunberger, M. Blumenstein, et L. H. Ziegler-Heitbrock, « Expansion of CD14+CD16+ monocytes in critically ill cardiac surgery patients », *Inflammation*, 1998, 22, 4, 367-379.
- <sup>33</sup> A. A. Pupim Ferreira, C. Sadao, H. Yamanaka, et A. Vicente, « Preparation and Characterization of Immunosensors for Disease Diagnosis », in *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity*, P. A. Serra, Éd. InTech, 2011.
- <sup>34</sup> J. A. Phillips, Y. Xu, Z. Xia, Z. H. Fan, et W. Tan, « Enrichment of Cancer Cells Using Aptamers Immobilized on a Microfluidic Channel », *Anal. Chem.*, 2009, 81, 3, 1033-1039.

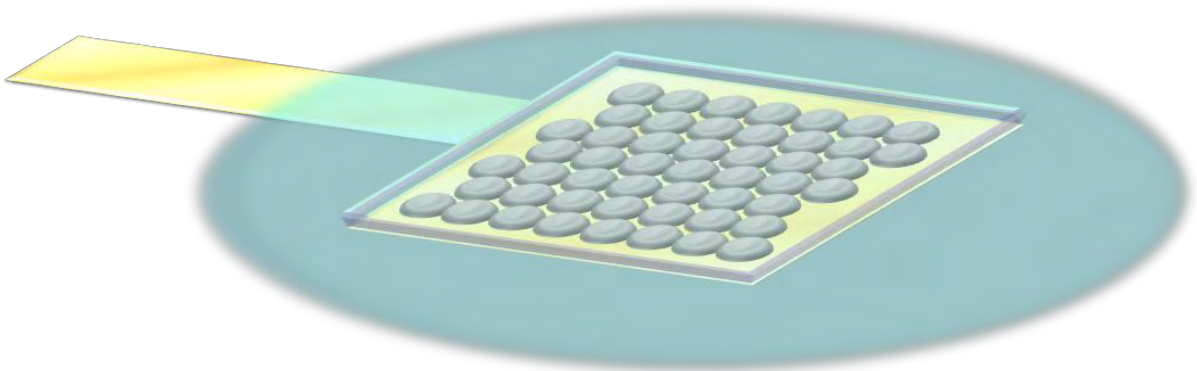
- <sup>35</sup> C. L. A. Hamula, H. Zhang, F. Li, Z. Wang, X. Chris Le, et X.-F. Li, « Selection and analytical applications of aptamers binding microbial pathogens », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2011, 30, 10, 1587-1597.
- <sup>36</sup> M. Labib, A. S. Zamay, O. S. Kolovskaya, I. T. Reshetneva, G. S. Zamay, R. J. Kibbee, S. A. Sattar, T. N. Zamay, et M. V. Berezovski, « Aptamer-based Impedimetric Sensor for Bacterial Typing », *arXiv:1208.0613*, 2012.
- <sup>37</sup> A. Meir, R. S. Marks, et M. N. Stojanovic, « Aptameric Biosensors », in *Handbook of Biosensors and Biochips*, John Wiley & Sons, Ltd, 2008.
- <sup>38</sup> P. J. Conroy, S. Hearty, P. Leonard, et R. J. O'Kennedy, « Antibody production, design and use for biosensor-based applications », *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2009, 20, 1, 10-26.
- <sup>39</sup> P.-C. Liao, Y.-C. Tyan, C.-Y. Wang, J.-F. Hsu, T.-C. Chou, et H.-Y. Lin, « Assessing the binding selectivity of molecularly imprinted polymer artificial antibodies by mass spectrometry-based profiling system », *J Biomed Mater Res A*, 2009, 91, 2, 597-604.
- <sup>40</sup> M. I. Prodromidis, « Impedimetric immunosensors—A review », *Electrochimica Acta*, 2010, 55, 14, 4227-4233.
- <sup>41</sup> J. S. Daniels et N. Pourmand, « Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges », *Electroanalysis*, 2007, 19, 12, 1239-1257.
- <sup>42</sup> V. Tsouti, C. Boutopoulos, I. Zergioti, et S. Chatzandroulis, « Capacitive microsystems for biological sensing », *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 27, 1, 1-11.
- <sup>43</sup> B. Lindholm-Sethson, J. Nyström, M. Malmsten, L. Ringstad, A. Nelson, et P. Geladi, « Electrochemical impedance spectroscopy in label-free biosensor applications: multivariate data analysis for an objective interpretation », *Anal Bioanal Chem*, 2010, 398, 6, 2341-2349.
- <sup>44</sup> N. Bojorge Ramirez, A. M. Salgado, et B. Valdman, « The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: problems and perspectives », *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2009, 26, 2, 227-249.
- <sup>45</sup> D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, et E. Reimhult, « Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures », *Sensors*, 2008, 8, 3, 1400-1458.
- <sup>46</sup> D. K. Schwartz, « Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation », *Annu Rev Phys Chem*, 2001, 52, 107-137.
- <sup>47</sup> J. M. Fowler, D. K. Y. Wong, H. Brian Halsall, et W. R. Heineman, « Chapter 5 - Recent developments in electrochemical immunoassays and immunosensors », in *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications*, San Diego: Academic Press, 2008, 115-143.
- <sup>48</sup> N. Patel, M. C. Davies, M. Hartshorne, R. J. Heaton, C. J. Roberts, S. J. B. Tendler, et P. M. Williams, « Immobilization of Protein Molecules onto Homogeneous and Mixed Carboxylate-Terminated Self-Assembled Monolayers », *Langmuir*, 1997, 13, 24, 6485-6490.
- <sup>49</sup> F. Frederix, K. Bonroy, W. Laureyn, G. Reekmans, A. Campitelli, W. Dehaen, et G. Maes, « Enhanced Performance of an Affinity Biosensor Interface Based on Mixed Self-Assembled Monolayers of Thiols on Gold », *Langmuir*, 2003, 19, 10, 4351-4357.
- <sup>50</sup> E. Briand, M. Salmain, J.-M. Herry, H. Perrot, C. Compère, et C.-M. Pradier, « Building of an immunosensor: How can the composition and structure of the thiol attachment layer affect the immunosensor efficiency? », *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 22, 3, 440-448.



# Chapitre 3

---

Modification et caractérisation  
d'un immunocapteur pour la  
détection cellulaire



## ***Modification et caractérisation de l'immunocapteur pour la détection cellulaire***

|   |            |
|---|------------|
| <b><i>Introduction</i></b> .....  | <b>90</b>  |
| <b>I. Biofonctionnalisation des électrodes d'or</b> .....                               | <b>90</b>  |
| I.1. Fabrication des électrodes d'or .....  | 90         |
| I.2. Procédé de modification des électrodes .....                                       | 91         |
| I.2.1. Nettoyage des électrodes .....   | 91         |
| I.2.2. Protocole de fonctionnalisation .....  | 91         |
| I.3. Caractérisation de la bio-fonctionnalisation .....                                 | 93         |
| I.3.1. Caractérisation électrochimique de l'immunocapteur .....                         | 93         |
| I.3.2. Caractérisation piézoélectrique .....  | 98         |
| I.3.3. Caractérisation optique .....  | 102        |
| I.4. Optimisation du protocole de fonctionnalisation .....                              | 107        |
| I.4.1. Utilisation des aminothiols .....  | 107        |
| I.4.2. Réduction du temps de dépôt des SAMs mixtes avec une fonction carboxylique ..... | 111        |
| I.4.3. Réduction du temps de dépôt de la PG .....                                       | 113        |
| <b>II. Piégeage immunologique de la sous population cellulaire cible</b> .....          | <b>115</b> |
| II.1. Caractérisation du piégeage cellulaire .....                                      | 115        |
| II.1.1. Détection des monocytes par spectroscopie d'impédance électrochimique .....     | 115        |
| II.1.2. Caractérisation optique du piégeage .....                                       | 120        |
| II.2. Optimisation de la détection cellulaire .....                                     | 121        |
| II.2.1. Influence de la conductivité .....  | 121        |
| II.2.2. Influence de la taille des électrodes.....                                      | 122        |
| II.3. Caractérisation des performances de l'immunocapteur impédimétrique .....          | 125        |
| II.3.1. Piégeage sélectif et spécifique des monocytes.....                              | 125        |
| II.3.2. Calibration de l'immunocapteur .....  | 126        |
| <b><i>Conclusion</i></b> .....  | <b>132</b> |
| <b><i>Bibliographie</i></b> .....   | <b>133</b> |

## Introduction

L'objectif du travail de thèse est la mise au point d'un dispositif permettant la détection et le comptage des monocytes par spectroscopie d'impédance *via* l'utilisation d'électrodes fonctionnalisées par des anticorps spécifiques. Ce chapitre est consacré au développement et à la caractérisation d'un immunocapteur électrochimique pour la détection cellulaire quantitative. La conception d'un biocapteur d'affinité est composée de deux étapes : l'étape d'affinité durant laquelle a lieu la liaison spécifique entre l'anticorps et l'analyte cible et celle de lecture qui consiste à détecter un changement électrique dû à l'interaction immunologique.

Les performances des immunocapteurs étant souvent limitées par l'étape d'affinité, il est essentiel de contrôler l'immobilisation des anticorps et de minimiser les liaisons non-spécifiques. Le procédé de fonctionnalisation étudié repose sur l'adsorption spontanée des thiols sur l'or, très utilisée dans les biocapteurs impédimétriques. La réactivité, la stabilité, l'accessibilité des sites actifs et la minimisation des liaisons non-spécifiques peuvent être suivies et contrôlées par SIE, qui permet aussi bien la détection des interactions antigène-anticorps que la caractérisation de la bio-fonctionnalisation de la surface des électrodes et l'analyse des changements de propriétés des interfaces. D'autres techniques complémentaires, telles que la voltammétrie cyclique, la microbalance à quartz, la microscopie optique et la microscopie à force atomique, ont été utilisées pour caractériser les étapes de fabrication du biocapteur.

Le principe de détection a tout d'abord été validé sur des électrodes d'or macroscopiques. Dans une première partie sera présentée la bio-fonctionnalisation des électrodes et leur caractérisation. Les différentes méthodes de caractérisation utilisées seront abordées ainsi que les résultats obtenus pour les principales étapes du greffage des anticorps. La seconde partie sera consacrée à la détection cellulaire et étudiera les performances de l'immunocapteur.

## I. Biofonctionnalisation des électrodes d'or

### I.1. Fabrication des électrodes d'or

Différentes surfaces d'électrodes ont été fabriquées : 1 cm<sup>2</sup>, 0,5 cm<sup>2</sup> et 0,04 cm<sup>2</sup>. Pour les électrodes de 1 et 0,5 cm<sup>2</sup>, des dépôts de titane de 100 nm et d'or de 800 nm ont été réalisés sur un substrat en silicium de type P (8-12 Ω/cm) par pulvérisation sous vide. Le substrat recouvert d'or est ensuite découpé pour obtenir des électrodes planes.

Les électrodes de 0,04 cm<sup>2</sup> sont les mêmes que celles utilisées par notre laboratoire dans des travaux antérieurs<sup>1</sup>. Ces électrodes sous forme de microcuvettes sont fabriquées sur des substrats en pyrex transparents d'épaisseur 1 mm en utilisant les procédés de la microélectronique. Le procédé de fabrication de ces microélectrodes a été mis au point et optimisé au LAAS pour des applications électrochimiques en phase liquide<sup>2</sup>. La surface active de l'électrode est définie par une couche de polymère hydrophobe, le polysiloxane<sup>3</sup>.

## I.2. Procédé de modification des électrodes

### I.2.1. Nettoyage des électrodes

La préparation des électrodes et leur nettoyage est une étape très importante pour le développement des immunocapteurs, car elle influe sur la stabilité et la densité des SAMs et des autres couches de la fonctionnalisation. Différentes procédures de prétraitements des électrodes pour une surface d'or conventionnelle peuvent être utilisées : mécanique, chimique et électrochimique. Un nettoyage chimique par simples immersions et rinçages des électrodes a été préférée.

Avant la modification, les électrodes d'or sont lavées dans une solution de piranha composée de 70 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et de 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 3 min, rincées à l'eau déionisée (DI) et séchées sous un flux d'azote. Les électrodes de 0,04 cm<sup>2</sup>, plus sensibles en raison du polymère, sont rincées avec de l'acétone et de l'éthanol, puis avec de l'eau DI avant d'être séchées sous un flux d'azote.

### I.2.2. Protocole de fonctionnalisation

Après prétraitement, les électrodes d'or sont fonctionnalisées suivant le protocole de modification de Ribaut *et al.*<sup>4</sup> avec quelques modifications (Figure 1). Ce protocole, mis au point pour l'immobilisation de globules rouges sur des anticorps, permet le greffage des anticorps sur l'électrode d'or par l'intermédiaire d'un système multicouche comprenant des SAMs mixtes. La solution de thiols mixtes est un mélange de 11-mercaptoundecanoïque (MUA) à 1 mM et de 6-mercaptohexanol (MH) à 10 mM dans de l'éthanol absolu. La monocouche mixte auto-assemblée résultante est alors composée d'un thiol possédant une fonction carboxylique capable de fixer une biomolécule pour dix thiols ayant une fonction terminale hydroxyle servant de diluant.

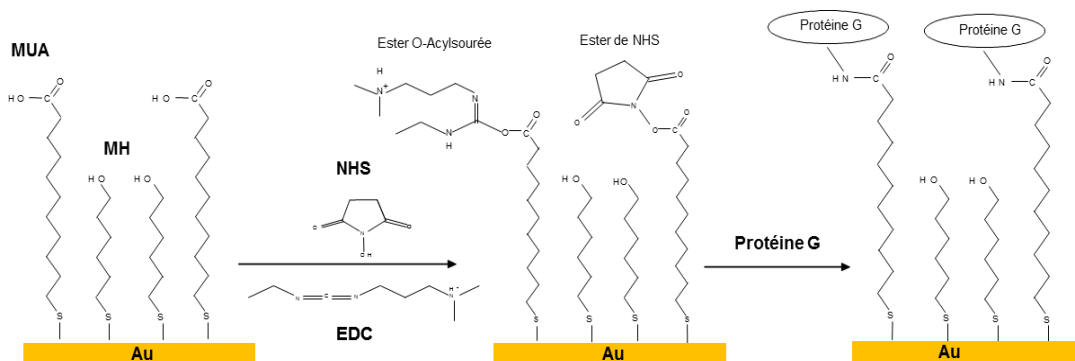
Une goutte de 200 µL de solution de thiols mixtes est déposée sur la surface des électrodes d'or pendant 18 h à 4 °C. Les électrodes sont ensuite rincées dans de l'éthanol absolu et séchées sous un flux d'azote. La deuxième étape consiste à activer les groupements carboxyliques des SAMs pour permettre l'accroche d'une biomolécule. Les électrodes sont alors recouvertes de 200 µL d'un mélange de NHS (15 mM) et d'EDC (75 mM) préparé dans

de l'eau DI pendant 30 minutes à température ambiante. Les électrodes sont ensuite rincées dans de l'eau DI et séchées sous un flux d'azote. Il y a alors formation d'esters succinimidyle et d'urée sur les SAMs<sup>5</sup> (Figure 1).

Une des raisons de la réduction d'activité des anticorps étant attribuée à leur orientation aléatoire sur la surface, le greffage des anticorps sur la monocouche autoassemblée n'est pas réalisé directement sur les SAMs mais par l'intermédiaire d'une protéine d'adhésion, la protéine G (PG). Cette protéine se lie spécifiquement aux anticorps par la région Fc sans interagir avec le site actif et permet ainsi d'obtenir une orientation donnée de l'anticorps<sup>6</sup>. L'immobilisation de la PG est réalisée par couplage covalent grâce à la formation d'une liaison peptidique entre les groupements carboxyliques activés des SAMs et les groupements amines de la PG. Une goutte de 100  $\mu$ L de PG à 100  $\mu$ g/mL préparée dans une solution tampon phosphate salin (PBS) à pH = 7,4 est déposée sur la surface des électrodes pendant 18 h à température ambiante. Les électrodes sont ensuite rincées au PBS et séchées sous un flux d'azote.

La PG utilisée est une protéine recombinante dans laquelle la région permettant la liaison à l'albumine a été retirée. Le sérum d'albumine bovine (BSA) peut alors être utilisé pour limiter les interactions non spécifiques. Une goutte de BSA concentrée à 143 g/L de PBS est déposée pendant 30 min afin de saturer la surface dans les zones exemptes de PG sans nuire à sa réactivité<sup>7</sup>. Les électrodes sont soigneusement rincées au PBS avant d'être séchées à l'azote.

Le greffage des anticorps n'est pas réalisé de manière covalente mais la liaison mise en jeu est suffisamment forte en raison de la grande affinité entre la PG et les anticorps de type IgG. La dernière étape consiste alors à déposer une goutte de 40  $\mu$ L d'anticorps du commerce CD 14 ou CD 16, tous deux fluorescents de types IgG2a, sur les électrodes d'or modifiées pendant 18 h à 4 °C. Les électrodes ainsi fonctionnalisées après rinçage au PBS sont prêtes pour le piégeage des monocytes.



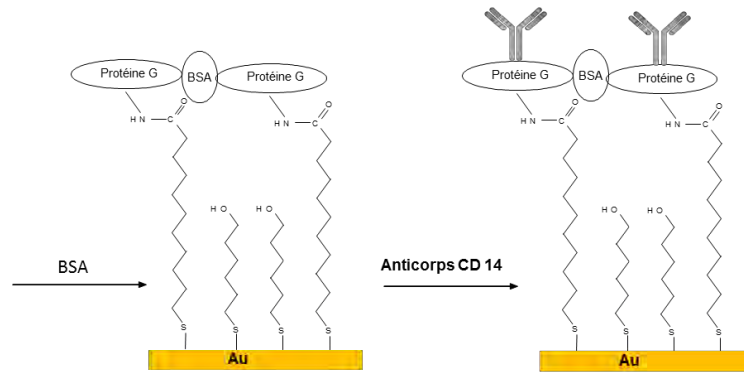


Figure 1: Schéma récapitulatif des différentes étapes du procédé de fonctionnalisation

### I.3. Caractérisation de la bio-fonctionnalisation

Chaque étape du protocole de fonctionnalisation a été caractérisée grâce à des techniques électrochimiques, gravimétriques et d'imagerie. Cette évaluation détaillée du développement de l'immunocapteur permet de comprendre la contribution de chaque couche dans la réponse du capteur.

#### I.3.1. Caractérisation électrochimique de l'immunocapteur

La caractérisation électrochimique a été réalisée en milieu faradique par spectroscopie d'impédance électrochimique et par voltammétrie cyclique. Ces deux techniques sont très utilisées car elles apportent des informations sur l'intégrité et la qualité de la surface modifiée. En milieu faradique, elles permettent en plus d'étudier les propriétés à l'interface de l'électrode et de comprendre les transferts d'électrons impliqués dans chaque couche.

##### I.3.1.a. Matériels et méthodes électrochimiques

Les mesures électrochimiques sont réalisées dans une cellule électrochimique en téflon à trois électrodes comprenant une électrode au calomel saturé (ECS) comme électrode de référence, une électrode d'or en tant que contre-électrode et l'électrode en or fonctionnalisée en tant qu'électrode de travail (Figure 2). La solution de mesure est une solution de PBS à pH = 7,4 contenant 5 mM de ferri/ferrocyanure ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  (1: 1)).

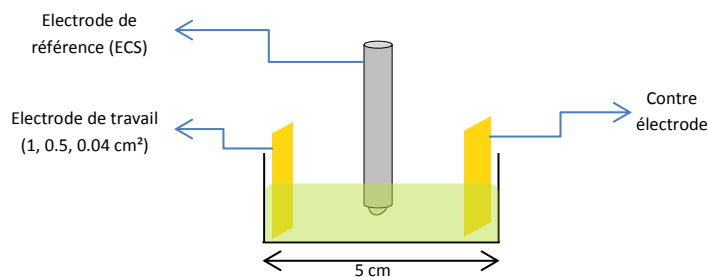


Figure 2: Schéma de la cellule de mesure électrochimique

Toutes les expériences sont effectuées dans une cage de Faraday pour limiter le bruit avec un VoltaLab 80 PGZ 402 et le logiciel VoltaMaster 4.

### La voltammétrie cyclique

La voltammétrie cyclique est une des techniques électrochimiques les plus utilisées pour sa simplicité et la richesse des informations apportées sur la nature de la surface de l'électrode telles que la pureté, la stabilité, la reproductibilité et la répétabilité<sup>8</sup>. Cette technique consiste à faire varier le potentiel de travail linéairement avec le temps entre deux bornes de potentiel et de mesurer le courant qui en résulte, le balayage du potentiel se faisant dans les deux sens.

En l'absence d'agitation et à la surface d'une électrode immobile dans une solution électrolytique contenant une espèce redox, le balayage de potentiel entraîne la réduction et l'oxydation de l'espèce. Le voltammogramme enregistré est alors une courbe intensité-potential qui représente un pic en oxydation et en réduction décrivant la capacité de l'espèce à s'oxyder et à se réduire à la surface de l'électrode. La différence des potentiels des pics d'oxydation et de réduction ( $\Delta E_p$ ) traduit le caractère réversible du système électrochimique.

Les voltammogrammes cycliques ont été réalisés de -200 mV à 600 mV avec une vitesse de balayage de 100 mV/s pour chaque couche de la fonctionnalisation.

### La spectroscopie d'impédance électrochimique

L'étude de la réponse de chaque étape de la fonctionnalisation par SIE permet, en les reliant à la nature des différentes surfaces générées, d'accéder à des informations sur les processus physicochimiques ayant lieu à la surface de l'électrode, tels que le transfert de charge et le taux de recouvrement de l'électrode.

Les courbes d'impédance sont enregistrées de 100 mHz à 50 kHz au potentiel d'équilibre de l'électrolyte après chaque étape de la fonctionnalisation. L'amplitude de la tension alternative imposée est de 10 mV. On considère que le film formé est stable et n'évolue pas pendant la mesure.

Les diagrammes de Nyquist de l'électrode modifiée peuvent ensuite être modélisés dans un circuit de Randles modifié qui prend en compte la présence du film formé par la fonctionnalisation (Figure 3). Ce circuit électrique est composé de la résistance de la solution  $R_{sol}$ , la résistance de transfert de charges  $R_{tc}$ , la capacité non parfaite de double couche entre l'électrode et les ions en solution  $Q_{dc}$ , l'impédance de Warburg, la résistance du film  $R_f$ , et la CPE du film  $Q_f$ . La détermination des différents éléments du circuit électrique équivalent (CEE) est réalisée à l'aide du logiciel FRA pour chaque diagramme de Nyquist enregistrée.

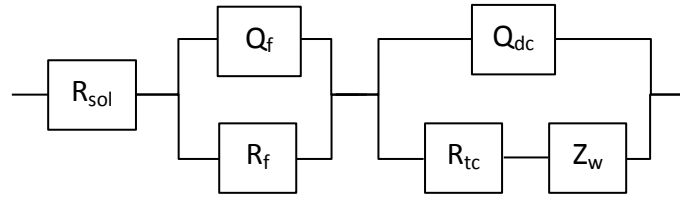


Figure 3: Circuit électrique équivalent pour la modélisation de l'électrode fonctionnalisée

Les mesures d'impédance donnent également accès au taux de recouvrement en évaluant la présence de pores et de trous dans le film. Ce taux de recouvrement est calculé grâce à la résistance de transfert de charge de l'électrode d'or nu et de l'électrode fonctionnalisée par la relation suivante :

$$1 - \theta = \frac{R_{tc}^{or\ nu}}{R_{tc}^{or\ modifié}}$$

Rappelons que les imperfections de la surface de l'électrode qui peuvent être dues à la rugosité, l'inhomogénéité des couches immobilisées et à la présence de trous ou de pores dans le film sont aussi traduites par la valeur de  $n$  des CPE, avec  $n$  compris entre 0,5 et 1 ( $n=1$  pour une surface lisse).

### I.3.1.b. Résultats de la caractérisation électrochimique de la biofonctionnalisation

Les courbes des mesures électrochimiques de chaque étape de la modification de surface de l'électrode en mode faradique sont représentées sur les figures Figure 4 et Figure 5. Les voltammogrammes obtenus (Figure 4) présentent comme attendu des pics d'oxydation et de réduction dont l'intensité varie suivant la capacité des ions ferri/ferrocyanure à s'oxyder et à se réduire à la surface de l'électrode.

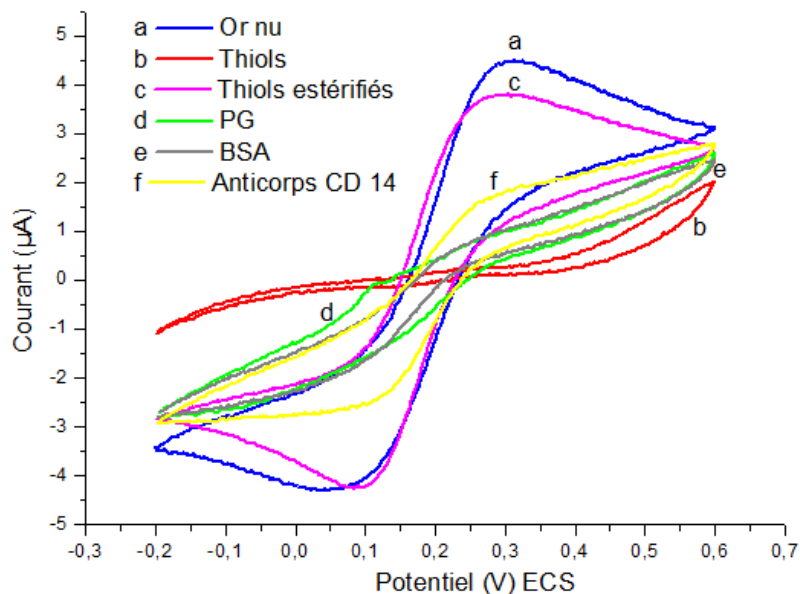


Figure 4 : Voltammogrammes réalisés dans une solution de PBS à pH 7,4 contenant 5 mM de  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  pour une électrode d'or nu (a) ; recouverte de SAMs mixtes (b) ; après activation des SAMs (c) ; après immobilisation de la PG (d) ; puis saturation par la BSA (e) ; et après greffage des anticorps CD14 (f).



Le caractère isolant ou conducteur des couches immobilisées concorde avec les spectres de Nyquist (Figure 5).

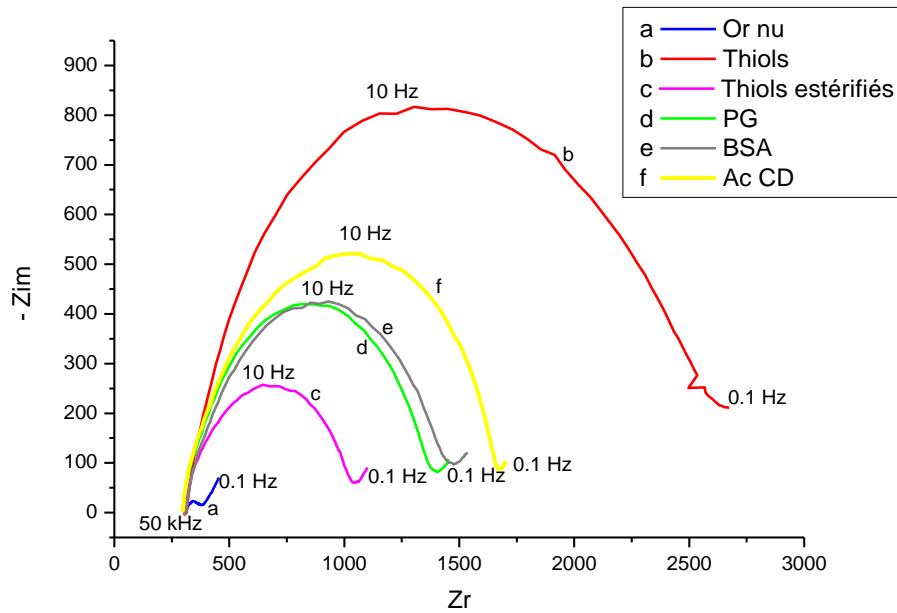


Figure 5 : Diagrammes de Nyquist obtenus dans une solution de PBS à pH 7,4 contenant 5 mM de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  pour une électrode d'or nu ( $1 \text{ cm}^2$ ) (a) ; recouverte de SAMs mixtes (b) ; après activation des SAMs (c) ; après immobilisation de la PG (d) ; puis saturation par la BSA (e) ; après greffage des anticorps CD14 (f).

Chaque diagramme de Nyquist a été modélisé dans le circuit de Randles pour l'électrode d'or nu et dans le circuit de Randles modifié pour chaque étape de la modification de la surface. Les valeurs correspondant aux différents composants électriques des CEE sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Valeurs des paramètres issus de la modélisation des CEE pour chaque étape du procédé de fonctionnalisation avec  $R_{\text{SOL}}$  : résistance de la solution,  $Q_f$  : capacité du film,  $R_f$  : résistance du film,  $R_{\text{tc}}$  : résistance de transfert de charge,  $Q_{\text{dc}}$  : capacité de double couche,  $W$  : constante de Warburg,  $\theta$  : taux de recouvrement de l'électrode.

|                | $R_{\text{SOL}}$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ ) | $Q_f$ ( $\mu\text{F} \cdot \text{s}^{n-1}$ )<br>n | $R_f$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ ) | $R_{\text{tc}}$ ( $\Omega$ ) | $Q_{\text{dc}}$ ( $\mu\text{F} \cdot \text{s}^{n-1}$ )<br>n | W      | $\theta$ |
|----------------|--|---|---------------------------------|------------------------------|---|--------|----------|
| Or nu          | 305.5                                      | -   | -                               | 78.1                         | 1.719<br>0.636  | 0.0125 |          |
| SAMs           | 311.2                                      | 1.755<br>0.739                                    | 1320                            | 939                          | 6.558<br>0.924  | 0.0059 | 94.6     |
| SAMs activés   | 307.4                                      | 7.270<br>0.909                                    | 86.5                            | 627                          | 2.579<br>0.834  | 0.0107 | 87.5     |
| PG             | 296.6                                      | 1.829<br>0.765                                    | 316.1                           | 745                          | 5.280<br>0.904  | 0.0087 | 89.5     |
| BSA            | 308.7                                      | 1.340<br>0.742                                    | 347                             | 764                          | 5.260<br>0.89   | 0.0076 | 89.7     |
| Anticorps CD14 | 295  | 1.767<br>0.811                                    | 433                             | 914                          | 7.936<br>0.926  | 0.0107 | 91.4     |

Le voltammogramme de l'électrode d'or nu (Figure 4, a) présente un pic quasi-réversible caractéristique de l'oxydo-réduction du couple redox à la surface de l'électrode. Le diagramme de Nyquist correspondant présente comme attendu un demi-cercle suivi d'une droite (Figure 5, a). La résistance de transfert de charge correspondante est faible mais la modélisation fait apparaître la forte rugosité de l'électrode d'or nu avec  $n = 0,64$ .

La modification des électrodes par les SAMs se traduit d'une part par la disparition des pics d'oxydation et de réduction du voltammogramme qui présente alors une forme capacitive (Figure 4, b) et d'autre part, par une augmentation de l'impédance (Figure 5, b). Cette augmentation se traduit dans la modélisation par l'apparition au niveau du CEE d'une résistance et d'une capacité de film ( $R_f$ ,  $Q_f$ ), et par une forte augmentation des valeurs de la résistance de transfert de charge et de la capacité de double couche ainsi que par une diminution de la constante de Warburg (Tableau 1). Les SAMs mixtes forment un film suffisamment homogène et compact pour masquer les imperfections de l'électrode d'or nu ( $n$  de  $Q_f = 0,74$ ) et passiver l'électrode d'or, empêchant ainsi le transfert d'électrons (augmentation de  $R_{tc}$ ). L'augmentation de la capacité de double couche s'explique par la présence de charges négatives sur les fonctions carboxyliques des thiols en milieu aqueux. Ces charges négatives exercent une force électrostatique répulsive sur les ions ferri/ferrocyanure de l'électrolyte et limitent leur diffusion à l'électrode (diminution de  $W$ ).

L'activation des SAMs par NHS/ EDC se traduit au niveau du voltampérogramme par la réapparition des pics d'oxydation et de réduction (Figure 4, c) et par une diminution du rayon du demi-cercle du diagramme de Nyquist comparativement à la couche de SAMs (Figure 5, c). L'activation permet en effet de remplacer les groupements terminaux carboxyliques chargés négativement par des esters de NHS et d'urée de charge neutre ou positive et ainsi de rétablir la diffusion des ions à l'électrode (augmentation de  $W$ ) et leur oxydoréduction (diminution de  $R_{tc}$  et augmentation des courants d'oxydation et de réduction). La suppression de la répulsion des charges engendre également une augmentation de la conductivité du film à l'origine d'une augmentation de la capacité du film  $Q_f$ , d'une diminution de la résistance du film  $R_f$  et de la capacité de double couche  $Q_{dc}$  (Tableau 1).

L'immobilisation de la PG entraîne une forte diminution de l'intensité du voltammogramme qui présente une forme en « s » indiquant que la couche bloque partiellement le transfert d'électrons (Figure 4, d). Le caractère isolant de la couche se traduit par une augmentation du diamètre du demi-cercle du diagramme de Nyquist (Figure 5, d) et par conséquent une augmentation des résistances de transfert de charge et du film. L'augmentation de la capacité de double couche et la diminution de la constante de Warburg, comme dans le cas des SAMs, peuvent s'expliquer par le fait que la PG soit chargée négativement au pH de la solution, avec un point isoélectrique (pI) de 4,8. La diminution de la capacité du film est due, quant à elle, à l'augmentation de l'épaisseur du film (Tableau 1).

L'ajout de la BSA, dont le rôle est de limiter les interactions non spécifiques dans les zones exemptes de PG, n'entraîne pas de modification majeure des diagrammes (Figure 4 et Figure 5, e) si ce n'est en limitant un peu plus la diffusion des ions de l'électrolyte (diminution de  $W$ ) (Tableau 1).

Le greffage des anticorps CD 14 entraîne une augmentation de l'intensité du courant des pics d'oxydation et réduction indiquant de manière surprenante un transfert électronique plus important (Figure 4, f). Cependant, le diagramme de Nyquist montre une augmentation de l'impédance (Figure 5, f) qui se traduit dans la modélisation par une augmentation des résistances de transfert de charge ( $R_{tc}$ ) et de film ( $R_f$ ), la capacité du film restant du même ordre de grandeur que pour la couche de PG (Tableau 1). L'augmentation de la capacité de double couche est probablement due à la charge négative des anticorps ( $pI = 6,1$ ). Enfin, malgré la présence de charges négatives qui devrait limiter la diffusion, la constante de Warburg augmente, confirmant l'augmentation de la diffusion des ions suggérée par le voltammogramme.

Le taux de recouvrement de l'électrode, calculé à partir des résistances de transfert de charge de la modélisation, varie de 95 % pour la couche de SAMs à 92 % pour la couche d'anticorps. Ces valeurs ont été obtenues de manière reproductible et ont été utilisées pour valider la biofonctionnalisation des électrodes d'or.

### *1.3.2. Caractérisation piézoélectrique*

La caractérisation piézoélectrique de la fonctionnalisation a été réalisée grâce à la microbalance à cristal de quartz (MCQ). Cette méthode très sensible permet de mesurer les faibles prises ou pertes de masse sur une surface d'or pour chaque couche du procédé de fonctionnalisation.

#### *1.3.2.a. Microbalance à quartz<sup>10</sup>*

La MCQ est utilisée sur une large gamme de mesure et permet, à la limite inférieure, de détecter des recouvrements monocouches de petites molécules ou de films polymères de l'ordre du nanogramme/cm<sup>2</sup>. La MCQ est constituée d'un cristal piézoélectrique métallisé sur chacune de ses faces qui subit une oscillation suite à l'application d'une tension alternative entre chaque face. L'une des faces sert de contact électrique et l'autre à l'immobilisation du biorécepteur (Figure 6).

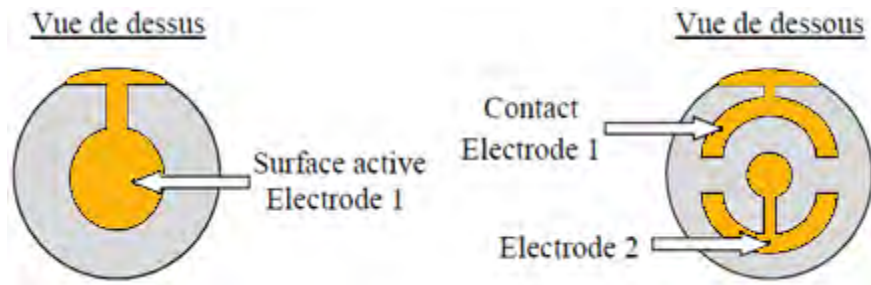


Figure 6 : Représentation schématique d'une microbalance à cristal de quartz

Selon Sauerbrey, tout dépôt d'espèce chimique à la surface de l'électrode provoque alors une diminution de la fréquence de résonance du cristal qui est corrélée à la masse grâce à la relation :

$$\Delta f = \frac{-2 f_0^2}{A \sqrt{\rho_Q \mu_Q}} \times \Delta m = -C_f \times \Delta m$$

avec  $f_0$  fréquence de résonance intrinsèque du cristal (5 MHz dans notre cas),  $A$  surface active du cristal,  $\rho_Q$  densité du cristal ( $2,648 \text{ g/cm}^3$ ) et  $\mu_Q$  module de cisaillement du cristal ( $2,947 \times 10^{11} \text{ g/cm/sec}^2$ ). Le terme  $C_f$ , ne dépendant que des paramètres du cristal, représente la sensibilité intégrée de la MCQ, d'une valeur de  $0,057 \text{ Hz/ng/cm}^2$  à  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Cette relation repose sur certaines hypothèses dont le fait que la masse ajoutée est uniformément répartie sur la surface active et que le dépôt constitue un assemblage mince et rigide ayant les mêmes propriétés acousto-élastiques que le quartz, ce qui permet une distribution continue de l'onde dans le film.

Les cristaux de quartz utilisés (Maxtek RQCM, Beaverton, USA) sont recouverts d'électrodes d'or de surface active de  $1,37 \text{ cm}^2$ , ont une fréquence de résonance de 5 MHz et une orientation de type AT, c'est-à-dire inclinés de  $35^\circ 15'$  par rapport à l'axe longitudinal.

Les mesures piézoélectriques sont effectuées à sec dans l'air après chaque étape du protocole de modification de l'électrode d'or, la fonctionnalisation étant réalisée suivant le même protocole que précédemment. Avant la modification, les cristaux de quartz recouverts d'or sont nettoyés dans une solution de piranha pendant 10 minutes, rincés à l'eau DI, puis dans de l'éthanol sous ultrasons pendant 10 min avant d'être rincés à l'eau DI et séchés sous un flux d'azote.

### I.3.2.b. Résultats de la caractérisation piézoélectrique

La mesure de la fréquence du cristal piézoélectrique propre permet d'avoir la fréquence de résonance exacte du cristal et permet de vérifier la reproductibilité et la justesse des mesures. Pour les mesures dans l'air, la valeur de la fréquence doit être comprise entre

4,976 et 5,020 MHz et la résistance égale à environ 10 ohms. Dans notre cas, les cristaux de quartz présentent une fréquence de résonance moyenne de 5,003 MHz et une résistance moyenne de 11 ohms.

Les variations de fréquences sont enregistrées après dépôt de chaque couche du système de biofonctionnalisation et ont permis de calculer, grâce à la relation de Sauerbrey, la variation de masse et la concentration surfacique correspondante (Tableau 2). De manière à simplifier l'interprétation des mesures, en plus des hypothèses de Sauerbrey, nous avons considéré que chaque couche est indépendante et que les couches n'interfèrent pas entre elles, ce qui n'est pas le cas dans le système multicouche obtenu.

**Tableau 2 : Variations de masse et de concentration surfacique calculées pour chaque étape de la modification des électrodes.**

|  | SAMs     | SAMs activés | PG       | BSA      | Ac CD    |
|--|----------|--------------|----------|----------|----------|
| $\Delta m$ moyen (ng/cm <sup>2</sup> ) | 310      | 589          | 457      | 570      | 530      |
| $\Gamma$ (mol/cm <sup>2</sup> )        | 2.18E-09 | -            | 2.11E-11 | 8.77E-12 | 9.63E-12 |

La variation de masse enregistrée après l'immobilisation de la couche de SAMs sur le cristal de quartz est la plus reproductible et significative. Elle a permis de calculer une concentration surfacique de  $2,2 \times 10^{-9}$  mol.cm<sup>-2</sup> pour la couche de SAMs mixtes, ce qui représente  $10^{15}$  molécules par cm<sup>2</sup> conformément à la littérature<sup>11</sup>. L'épaisseur du film peut également être déduite de la variation de masse grâce à la densité du matériel du film selon Lu et Lewis<sup>12</sup>. Toutefois, étant donné toutes les hypothèses posées, cette valeur a peu de consistance et n'a par conséquent pas été calculée pour toutes les couches. Cette approximation nous a tout de même permis d'estimer l'épaisseur des SAMs mixtes immobilisés sur nos quartz à 1,17 nm. Cette valeur est du même ordre de grandeur que les 1,6 nm d'épaisseur maximum obtenue pour des monocouches de thiols composés de MUA (1 mM) absorbées sur une surface d'or<sup>13</sup>.

L'activation des groupements carboxyliques entraîne une augmentation de masse de 589 ng.cm<sup>-2</sup> compte tenu du nombre de sites ayant une fonction terminale carboxylique. En effet, la concentration surfacique des thiols mixtes déposés étant de  $2,2 \times 10^{-9}$  mol.cm<sup>-2</sup>, le film devrait comprendre  $2,2 \times 10^{-10}$  mol.cm<sup>-2</sup> de thiols ayant une fonction terminale carboxylique pouvant être activée (1/10) ce qui correspondrait à une augmentation de 20 ng.cm<sup>2</sup>. La forte augmentation massique s'explique alors par la formation de produits secondaires lors de la réaction d'activation tels que le N-acylurée ou des espèces anhydres (Figure 7).

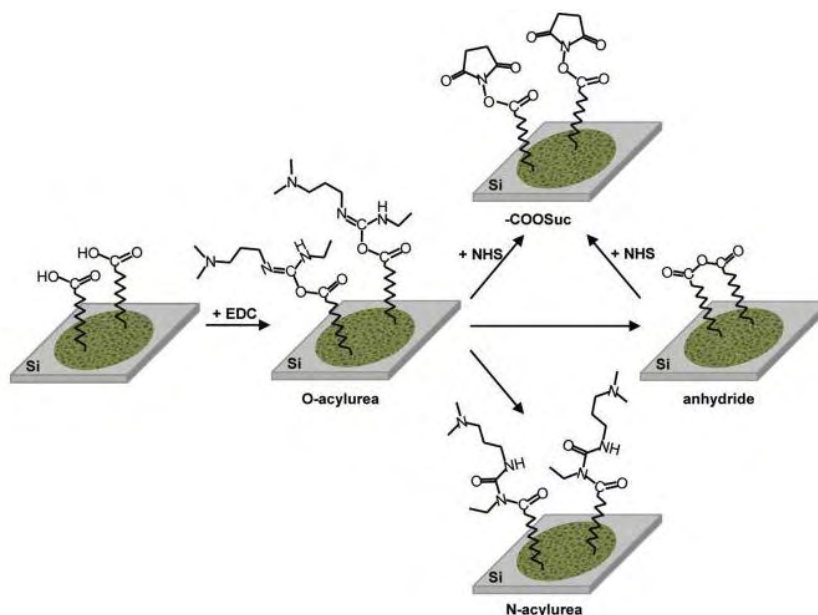


Figure 7 : Schéma du mécanisme de réaction de l'activation de groupements terminaux carboxyliques<sup>5</sup>

La première étape de la réaction consiste en la formation d'O-acylurée suite à la réaction de l'EDC avec les groupements carboxyliques. Puis, il peut y avoir soit directement une attaque nucléophile et compétitive du NHS, soit la formation d'un ester d'anhydride qui est ensuite attaqué par le NHS. Ces deux réactions forment un ester succinimidyle sur les SAMs et s'accompagnent de la libération d'urée correspondant au carbodiimide initial. Dans le cas où le NHS ne réagit pas, un réarrangement intramoléculaire de l'O-acylurée a lieu pour former du N-acylurée non réactif<sup>5</sup>. Le NHS est utilisé pour réagir de manière compétitive avec cette dernière réaction. Les deux produits pouvant alors se former sur l'électrode sont l'ester succinimidyle et le N-acylurée. La concentration surfacique des SAMs activés n'a pas été calculée directement car on ignore la proportion d'esters succinimidydes formés par rapport à l'urée.

L'addition de la PG produit une augmentation de  $457 \text{ ng.cm}^{-2}$ , ce qui correspond à une concentration surfacique de  $2,1 \times 10^{-11} \text{ mol.cm}^{-2}$ . Si on considère que tous les thiols pouvant se lier avec la PG sont activés et réactifs, il y a alors un ester succinimidyle sur dix impliqué dans la formation de la liaison peptidique avec la PG.

La masse enregistrée après le dépôt de BSA correspond à la masse nécessaire pour saturer la surface en l'absence de PG.

Le greffage des anticorps CD 14 entraîne une augmentation de  $530 \text{ ng.cm}^{-2}$ , soit une concentration surfacique de  $9,6 \times 10^{-12} \text{ mol.cm}^{-2}$ . Sachant que les anticorps ne peuvent se lier au BSA, ce greffage révèle ainsi que les anticorps sont liés à une PG sur deux.

La caractérisation piézoélectrique a ainsi permis de valider la prise de masse après chaque étape de la fonctionnalisation. Cependant, cette prise de masse n'est pas spécifique au seul dépôt du système multicouche, ce qui limite l'interprétation des résultats obtenus.

### 1.3.3. Caractérisation optique

La caractérisation optique de la fonctionnalisation des électrodes a essentiellement été réalisée grâce au microscope à force atomique (AFM pour Atomic Force Microscope). Il permet d'analyser la présence de la couche biologique sur les électrodes et d'obtenir des informations sur la surface du biocapteur.

#### 1.3.3.a. Microscopie à force atomique<sup>14</sup>

Le microscope à force atomique fait partie de la famille des microscopes à champ proche. Le principe de l'AFM consiste à balayer la surface pour obtenir une image en trois dimensions avec une résolution spatiale allant de quelques dizaines de microns à quelques Angströms. Il permet ainsi de visualiser la topographie d'une surface posée sur un piézoélectrique grâce à la mesure du champ de forces présent entre la surface de l'échantillon et la sonde constituée d'une pointe fine, généralement en nitrure de silicium de dimensions nanométriques. Cette pointe se situe à l'extrémité d'un microlevier flexible, le cantilever, sur l'extrémité duquel est dirigé un faisceau laser réfléchi vers une photodiode à deux ou quatre cadrans (Figure 8). Les déplacements du faisceau sur la photodiode permettent de détecter les mouvements du cantilever dans les trois plans de l'espace (x, y, z). Le signal de déflexion est injecté dans une boucle de rétroaction qui compense la déflexion.

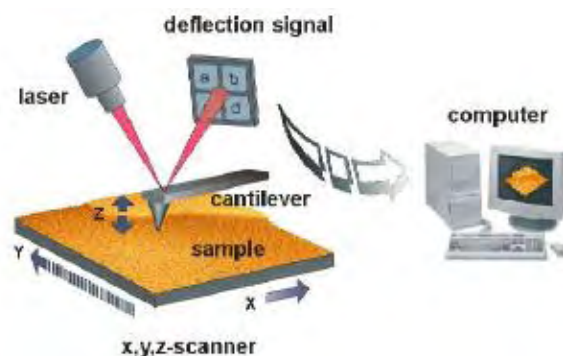


Figure 8: Schéma de principe d'un microscope à force atomique<sup>15</sup>

Les différents modes de fonctionnement de l'AFM (Figure 9) sont :

- le mode contact durant lequel la pointe est en contact avec la surface de l'échantillon pendant le balayage. Lorsque la pointe se rapproche de la surface, les nuages électroniques des atomes de la pointe appuient progressivement sur les nuages électroniques des atomes situés à la surface de la zone analysée créant une force

répulsive. Les variations des forces de répulsion imposées par le relief sont exploitées pour enregistrer des images. Ce mode d'imagerie peut fonctionner soit en balayant la surface à hauteur constante, soit en maintenant une force constante au cours du balayage. Le mode contact permet d'obtenir trois types d'images à haute résolution de la surface de l'échantillon. Il donne ainsi accès à la topographie de la surface, à sa rugosité et éventuellement à sa structure moléculaire. De plus, il permet d'étudier les propriétés physiques du contact pointe-surface telles que les forces de décollement et d'adhésion grâce aux courbes de force obtenues en modulant la position verticale de l'échantillon et en enregistrant la déflexion du microlevier. Enfin, des images de friction résultant de la torsion du cantilever peuvent être collectées.

- le mode contact intermittent ou tapping, pendant lequel le cantilever oscille près de sa fréquence de résonance et permet à la pointe de se rapprocher et de s'éloigner de la surface périodiquement. La variation de l'amplitude d'oscillation est utilisée comme signal d'asservissement afin de corriger le déplacement en z pour conserver l'amplitude constante et ainsi suivre la morphologie de surface. Un déphasage est également enregistré quand la pointe rencontre des régions de propriétés de surface différentes. Le mode tapping est approprié à l'analyse des polymères et à des échantillons biologiques car les forces exercées par la pointe sont les plus faibles possibles afin de ne pas déformer la structure des films. Au-delà des informations topographiques, l'enregistrement du déphasage donne un contraste caractéristique de l'adhésion et/ou de l'élasticité, ce qui permet d'apprécier de manière qualitative les propriétés viscoélastiques de l'échantillon.
- le mode non contact durant lequel la pointe n'est pas en contact avec la surface. Le microlevier oscille à sa fréquence de résonance avec une petite amplitude d'oscillation relativement loin de la surface où des forces attractives de Van der Waals sont exercées. Un gradient de forces est alors enregistré pour imager la surface, les forces attractives étant plus faibles que les forces répulsives. Ce mode pourrait être utilisé pour étudier les interfaces de biomatériaux mous mais la fréquence de résonance du microlevier n'est pas stable dans ces conditions.

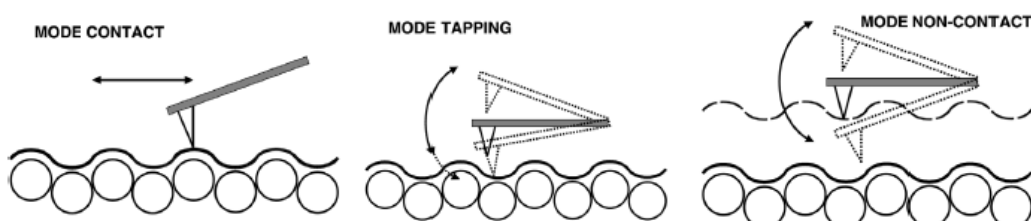


Figure 9 : Les différents modes de fonctionnement de l'AFM <sup>14</sup>

Le mode tapping à force quantitative nanomécanique, appelé peak force Quantitative NanoMechanical (QNM), a été préféré car il permet d'obtenir, en plus de la topographie et



des propriétés mécaniques qualitatives, des informations sur les propriétés nanomécaniques de la surface des échantillons telles que la force d'adhésion grâce aux courbes force-distance (Figure 10).

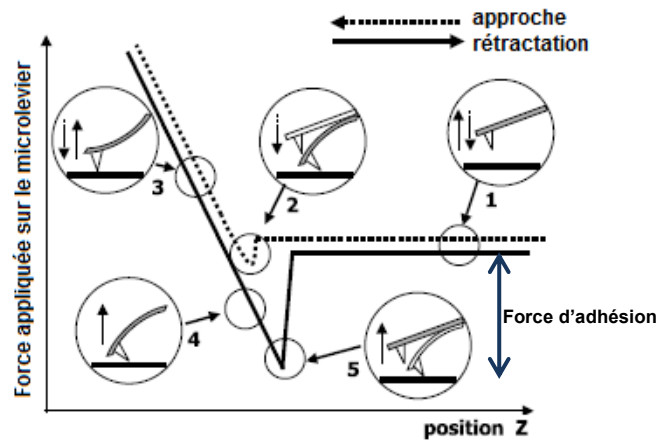


Figure 10 : Exemple de courbe force-distance<sup>14</sup>

La courbe force-distance se décompose en cinq phases : la phase d'approche pendant laquelle il n'y a pas de contact entre la pointe et la surface (1), le contact de la pointe avec l'échantillon entraîne un saut dû aux forces attractives électrostatiques et de van der Waals (2), puis une augmentation de la force du microlevier est observée avec l'approche de la pointe (3). Lorsque la pointe se rétracte, la force diminue et les forces adhésives entre la pointe et l'échantillon maintiennent le contact au-delà de la valeur de la force de contact obtenue lors de l'approche (4). Enfin, la pointe s'éloigne de la surface (5) et retourne à sa position initiale.

Les mesures de caractérisation ont été effectuées à l'aide d'un AFM Nanoscope 3000 de ICON® dans l'air avec une humidité de 50 % à 20 °C grâce à des cantilevers SCANASYST-AIR, de forme triangulaire et d'épaisseur 0,70  $\mu\text{m}$ . La constante de raideur moyenne du levier est de 0,4 N/m et la fréquence moyenne de résonance de la pointe est de 80 kHz. La pointe a été calibrée avant chaque mesure de force. Les images topographiques et d'adhésion avec contrastes de phase sont enregistrées pour chaque étape de la fonctionnalisation en scannant une surface sèche de 2 x 1  $\mu\text{m}^2$  avec une amplitude de 200 nm.

### I.3.3.b. Résultats de la caractérisation optique

Les images topographiques et d'adhésion de l'or nu et de chaque étape de la fonctionnalisation des électrodes d'or sont analysées avec le logiciel NanoScope Analysis de Veeco Instruments Inc. La rugosité a ensuite été estimée en faisant une moyenne de la rugosité  $R_a$  calculée grâce aux images topographiques pour chaque surface (Tableau 3).

La topographie de l'électrode d'or nu nettoyée révèle l'ensemble des joints de grains de l'or mesurant environ 55 nm de diamètre et une rugosité de la surface de  $1,78 \pm 0,15$  nm. La

rugosité du film d'or est principalement due au dépôt du film d'or par pulvérisation sous vide qui génère un phénomène de nucléation pendant la croissance cristallographique. Les défauts cristallins détectés comme des joints de grains sont des agglomérats de grains cristallographiques<sup>16</sup>. Comme attendu, l'image d'adhésion montre que toute la surface d'or nu a les mêmes propriétés viscoélastiques et qu'il n'y a quasiment pas d'adhésion puisqu'elle vaut environ 1 nN.

L'immobilisation de SAMs sur l'électrode d'or ne modifie pas la rugosité de la surface puisque l'on ajoute des SAMs de longueurs différentes et la topographie de l'électrode reste très proche de celle de l'or nu avec des grains de 60 nm de diamètre. Delamarche *et al.*<sup>11</sup> ont montré par microscopie à effet tunnel que bien que les SAMs adsorbés sur une surface d'or forment un film compact et ordonné, les monocouches dépendent du profil de la surface d'or et que les zones où la couverture et la densité du film ne sont pas optimales correspondent généralement aux limites de domaines de l'or. L'image d'adhésion révèle quant à elle la présence d'un matériau différent de l'or délimité par les domaines de l'électrode et une forte augmentation de l'adhésion. La courbe force-distance enregistrée pour la couche de SAMs (Figure 11) confirme la modification de la surface d'or avec une force d'adhésion d'environ 14 nN.

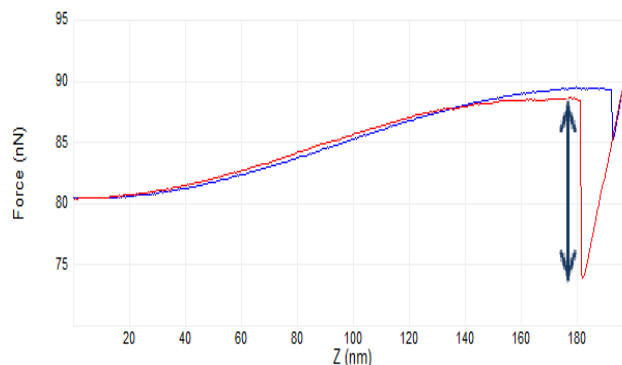


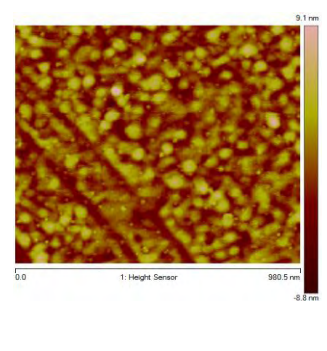
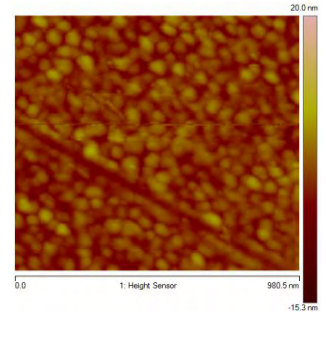
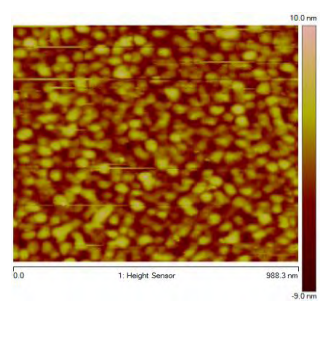
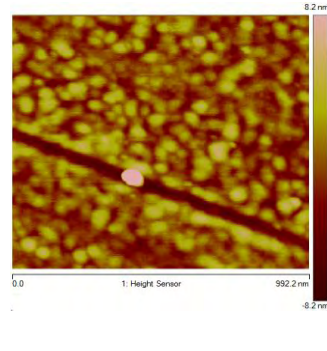
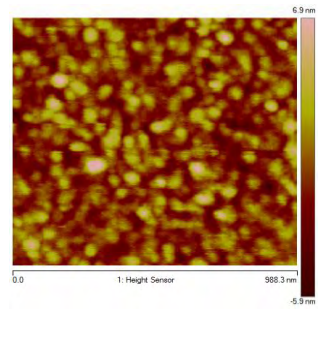
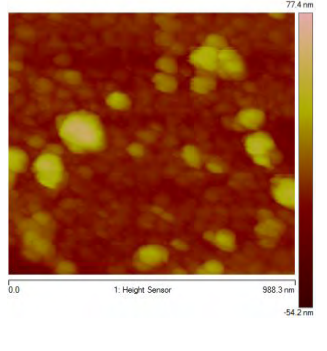
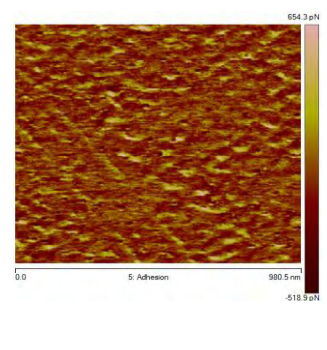
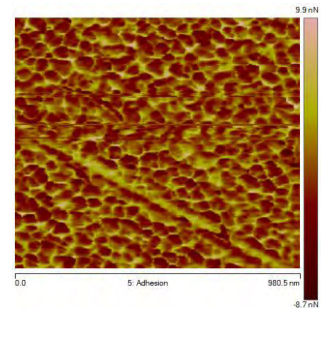
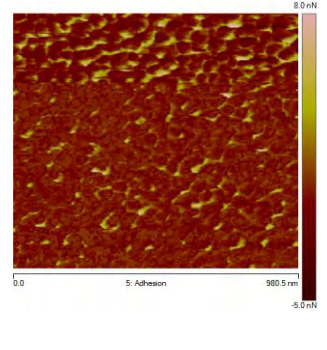
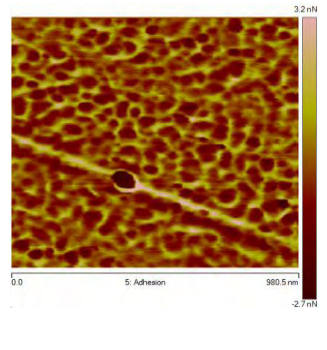
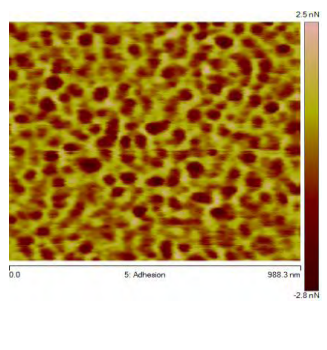
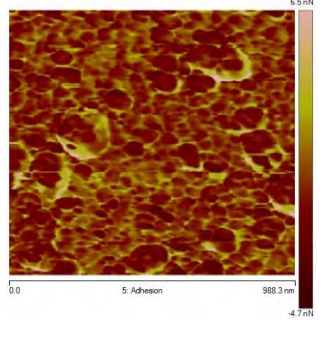
Figure 11 : Courbe force-distance pour une électrode d'or recouverte de SAMs : phase d'approche en bleu et phase de rétractation en rouge

L'activation des SAMs ne modifie pas le diamètre des joints de grains par rapport aux SAMs (59 nm) et la rugosité de la surface sur les images topographiques est de  $1,83 \pm 0,03$  nm. En revanche, l'image d'adhésion présente une surface dont les propriétés viscoélastiques diffèrent de celles des SAMs et la force d'adhésion diminue à 9 nN.

Après l'immobilisation de la PG, la rugosité de la surface ( $1,71 \pm 0,06$  nm) est encore proche de celles obtenues pour les couches précédentes et le diamètre des joints de grains est de 80 nm. L'image d'adhésion montre une surface délimitée par les domaines de l'or présentant des propriétés viscoélastiques différentes et une force d'adhésion de 4 nN.

Comme on peut le voir dans le Tableau 3, l'activation des SAMs et le greffage de la PG entraînent une faible variation de la topologie des électrodes recouvertes de SAMs. Ces modifications dépendent du profil de la surface d'or nu, leurs valeurs de rugosité sont proches de l'or nu. Bae *et al.*<sup>6</sup> ont d'ailleurs montré que les valeurs de  $R_a$  calculées pour une surface d'or nu, recouverte de MUA ou d'une couche de PG thiolée sont similaires.

Tableau 3 : Récapitulatif des résultats AFM pour chaque étape du protocole de fonctionnalisation : image de la topographie, image du contraste de phase et rugosité calculée

| Or nu  | SAMs   | SAMs estérifiées  | PG   | BSA  | Anticorps  |
|--|--|---|--|--|--|
|   |   |   |   |   |   |
|  |  |  |  |  |  |
| $1.78 \pm 0.15 \text{ nm}$   | $1.75 \pm 0.30 \text{ nm}$   | $1.83 \pm 0.03 \text{ nm}$  | $1.71 \pm 0.06 \text{ nm}$   | $1.49 \pm 0.05$  | $7.18 \pm 0.5 \text{ nm}$  |

La couche de BSA entraîne une légère augmentation du diamètre des grains et une légère réduction de la rugosité à  $1,49 \pm 0,05$  nm suite à la saturation de l'électrode dans les zones exemptes de PG. L'image d'adhésion présente comme précédemment plusieurs propriétés viscoélastiques et la force d'adhésion est la même que pour la PG, environ 3,5 nN.

Enfin, suite au greffage des anticorps, les limites des domaines de l'or ne sont plus visibles et l'image topographique montre des nodules d'environ 150 nm de diamètre et révèle une rugosité de  $7,18 \pm 0,5$  nm. La surface est recouverte de différents matériaux avec une force d'adhésion de 9 nN.

Ainsi, la caractérisation microscopique a permis de mettre en évidence les modifications de surface des électrodes après chaque étape du protocole de fonctionnalisation et permet de confirmer le greffage des anticorps.

## I.4. Optimisation du protocole de fonctionnalisation

L'immobilisation des anticorps sur la surface de l'électrode est une étape cruciale dans le développement des immunocapteurs. En effet, le rendement du biocapteur dépend de la disponibilité et de l'activité des molécules de reconnaissance sur la surface de l'électrode. Le procédé présenté précédemment a été optimisé d'une part pour réduire le temps de fonctionnalisation qui s'étale sur quatre jours et d'autre part pour obtenir un greffage reproductible.

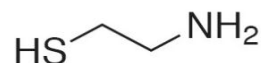
### I.4.1. Utilisation des aminothiols

La modification des électrodes par des thiols possédant une fonction terminale amine (SAMs -NH<sub>2</sub>) permettrait de réduire fortement le temps de fonctionnalisation des électrodes. En effet, les anticorps peuvent se greffer directement de manière covalente sur les aminothiols, après activation préalable de leurs propres groupements carboxyliques.

Le protocole de fonctionnalisation ne serait alors composé que de deux étapes sur deux jours : la formation d'une monocouche de thiols aminés et le couplage covalent des anticorps.

Différents thiols ayant une fonction amine ont été testés et comparés :

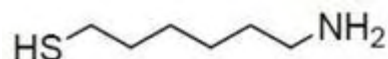
- la cystéamine,



- le 4-aminobenzèthiol,



- le 6-amino-1-hexanethiol,



- et le 11-amino-1-undecanethiol. HS(CH2)10NH2

Des dépôts de 200  $\mu\text{L}$  d'aminothiols (1 mM) ont été réalisés sur des électrodes d'or de 1  $\text{cm}^2$  pendant 18 h à 4 °C. Les fonctions carboxyliques des anticorps sont ensuite activées dans un mélange EDC (75 mM) / NHS (15 mM) pendant 20 minutes et la solution d'anticorps activés (200  $\mu\text{L}$ ) est déposée sur les surfaces d'aminothiols pendant 18 h.

Comme précédemment, chaque étape de la fonctionnalisation a été caractérisée par voltammétrie cyclique et spectroscopie d'impédance électrochimique en milieu faradique. La Figure 12 représente les courbes obtenues pour le 11-amino-1-undecanethiol.

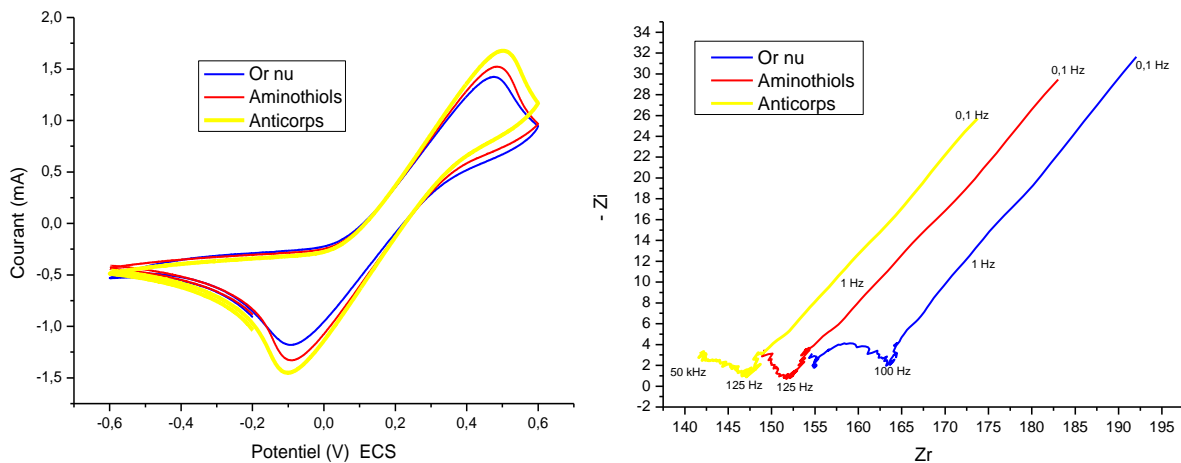


Figure 12 : Voltammogrammes et diagrammes de Nyquist réalisés dans une solution de PBS à pH 7,4 contenant 5 mM de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  pour une électrode d'or nu (1  $\text{cm}^2$ ); recouverte de SAMs- $\text{NH}_2$  ; et après greffage des anticorps CD14.

La modélisation des diagrammes de Nyquist a été réalisée pour l'électrode d'or nu et pour les électrodes fonctionnalisées dans le circuit de Randles (Tableau 4). Bien que ce circuit ne représente pas le système électrochimique de manière optimale, il permet de mieux appréhender les variations électriques dues à la fonctionnalisation de l'électrode.

Tableau 4 : Valeurs des paramètres issus de la modélisation dans le circuit de Randles pour chaque étape du procédé de fonctionnalisation avec  $R_{\text{SOL}}$  : résistance de la solution,  $R_{\text{tc}}$  : résistance de transfert de charge,  $Q_{\text{dc}}$  : capacité de double couche,  $W$ : constante de Warburg

|                 | $R_{\text{SOL}}$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ ) | $Q_{\text{dc}}$ ( $\mu\text{F} \cdot \text{s}^{n-1}$ )<br>n | $R_{\text{tc}}$ ( $\Omega$ ) | W     |
|-----------------|--|---|------------------------------|-------|
| Or nu           | 154  | 28.4<br>0.92  | 7.52                         | 0.028 |
| Aminothiols     | 143  | 4.7<br>0.77   | 8.88                         | 0.028 |
| Anticorps CD 14 | 137  | 124<br>0.51   | 9.69                         | 0.033 |

Les voltammogrammes obtenus montrent une très légère augmentation de l'intensité du courant des pics d'oxydation et de réduction de la sonde suite à la formation de la couche d'aminothiols et au greffage des anticorps. Cette augmentation, indiquant que la couche formée est plus conductrice que l'or nu, peut s'expliquer en partie par la présence de charges positives sur les fonctions terminales des aminothiols en milieu aqueux. Ces charges exercent alors une force électrostatique attractive sur les ions ferri/ferrocyanure de l'électrolyte et facilitent les échanges électroniques. Les diagrammes de Nyquist et la modélisation confirment l'effet des charges sur les variations de résistances et de capacitances suivant la couche. En effet, la fonctionnalisation modifie essentiellement la capacitance qui diminue fortement en présence du 11-amino-1-undecanethiol.

Le greffage des anticorps chargés négativement ( $pI = 6,1$ ) entraîne une augmentation de la capacitance et des défauts de surface ( $n = 0,51$ ). La résistance de transfert de charge est du même ordre de grandeur pour chacune des couches et une légère augmentation de la diffusion des ions est observée pour les anticorps confirmant ainsi un transfert électronique plus important.

Des résultats similaires ont été obtenus pour les autres aminothiols. Les potentiels et les courants des pics d'oxydation et de réduction des voltammogrammes sont plus ou moins affectés selon l'aminothiol immobilisé à la surface de l'électrode. Ces variations sont plus visibles par spectroscopie d'impédance électrochimique. Les résultats de la modélisation des diagrammes de Nyquist obtenus pour chaque aminothiol sont présentés dans le Tableau 5.

**Tableau 5 : Valeurs des paramètres issus de la modélisation dans le circuit de Randles pour chaque aminothiol**

| Aminothiols              | $R_{SOL}$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ ) | $Q_{dc}$ ( $\mu\text{F. sn-1}$ )<br>n | $R_{tc}$ ( $\Omega$ ) | W     |
|--------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|-------|
| Cystéamine               | 195                                 | 0.19<br>0.97                          | 8.67                  | 0.031 |
| 4-aminobenzèthiol        | 194.3                               | 0.55<br>0.99                          | 6.09                  | 0.025 |
| 6-amino-1-hexanethiol    | 147                                 | 1.88<br>0.82                          | 8.12                  | 0.028 |
| 11-amino-1-undecanethiol | 143                                 | 4.7<br>0.77                           | 8.88                  | 0.028 |

Les aminothiols favorisent le transfert électronique de la sonde jusqu'à l'électrode. La cystéamine, composée de deux carbones, forme le dépôt ayant la capacité de double couche la plus faible et cette valeur augmente avec la longueur de la chaîne carbonée de l'aminothiol. Dans le cas du 4-aminobenzèthiol, on observe en plus une diminution de la résistance de transfert de charge qui s'explique par la conjugaison des électrons de la fonction amine à l'atome de soufre<sup>17</sup>. Ainsi, la modélisation a permis de mettre en évidence les différences de transfert électronique suivant l'aminothiol utilisé.

La couche d'anticorps fluorescents immobilisée sur les électrodes fonctionnalisées par les différents aminothiols a ensuite été observée au microscope à fluorescence. La Figure 13 présente les images obtenues après greffage des anticorps sur une électrode modifiée par du 11-amino-1-undecanethiol.

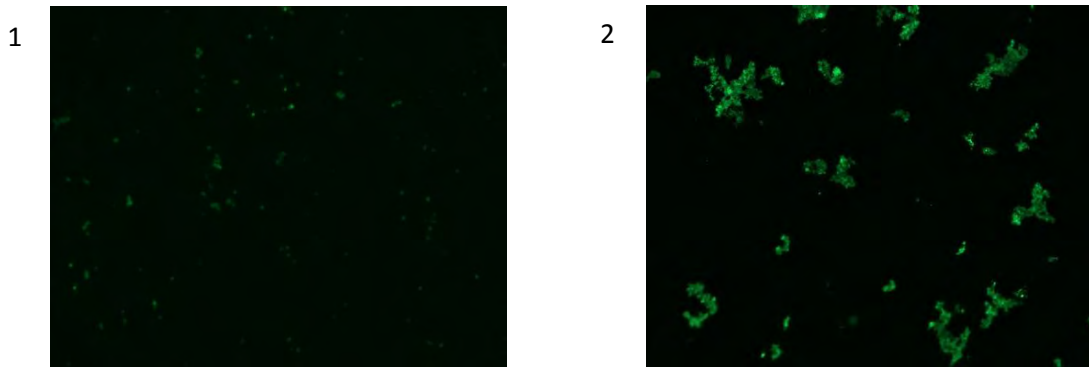


Figure 13 : Observation microscopique des anticorps CD 14 fluorescents greffés sur des électrodes fonctionnalisées par du 11-amino-1-undecanethiol : (1) grossissement x10, (2) grossissement x20

Les images obtenues mettent en évidence l'immobilisation des anticorps. Cependant, quel que soit l'aminothiol utilisé, les anticorps ne forment pas une monocouche homogène mais sont agglomérés entre eux de manière aléatoire sur certaines zones de l'électrode. L'agglomération peut s'expliquer par le fait que les anticorps possèdent aussi bien des fonctions carboxyliques, deux au niveau des chaînes lourdes et deux sur les chaînes légères, que des fonctions amines, présentes sur l'extrémité des paratopes, sites actifs des anticorps. Les fonctions amines et carboxyliques des anticorps réagissent alors entre elles après activation et forment des amas, ce qui limite la reproductibilité du greffage (Figure 14). De plus, les anticorps peuvent se fixer de manière aléatoire sur les SAMs soit en position debout, par la chaîne lourde, soit en position allongée, par la chaîne légère, diminuant alors l'activité des anticorps<sup>18</sup>.

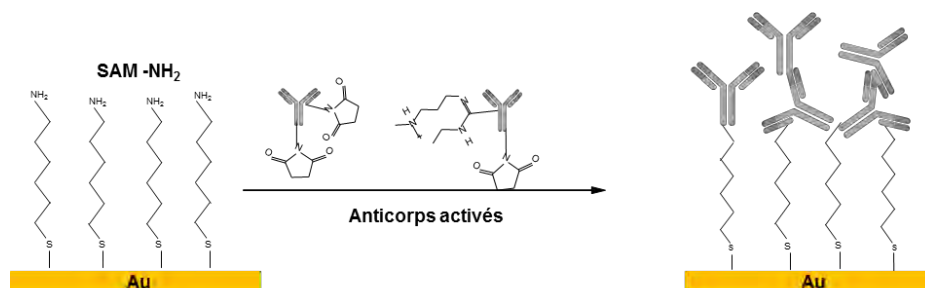


Figure 14: Schéma du procédé de fonctionnalisation avec des SAMs -NH<sub>2</sub>

En vue de diminuer ce phénomène de formation d'agglomérats, l'utilisation de SAMs mixtes comprenant 1 mM de 11-amino-1-undecanethiol et 10 mM de MH (SAMs mixtes -NH<sub>2</sub>) a été mise en œuvre et comparée aux SAMs mixtes composés de 1 mM de MUA et de 10 mM de MH (SAMs mixtes -COOH). La caractérisation électrochimique des SAMs mixtes -NH<sub>2</sub> montre des diagrammes semblables à ceux de la Figure 12 indiquant que le caractère

conducteur des aminothiols est conservé en dépit de la dilution. Rappelons que les SAMs mixtes  $-COOH$  forment une couche isolante qui passive l'électrode, ce qui entraîne la disparition des pics d'oxydo-réduction et l'augmentation de la résistance de transfert de charges. Les anticorps CD 14 fluorescents ont ensuite été greffés selon le protocole approprié à chaque type de SAMs et observés au microscope à fluorescence (Figure 15).

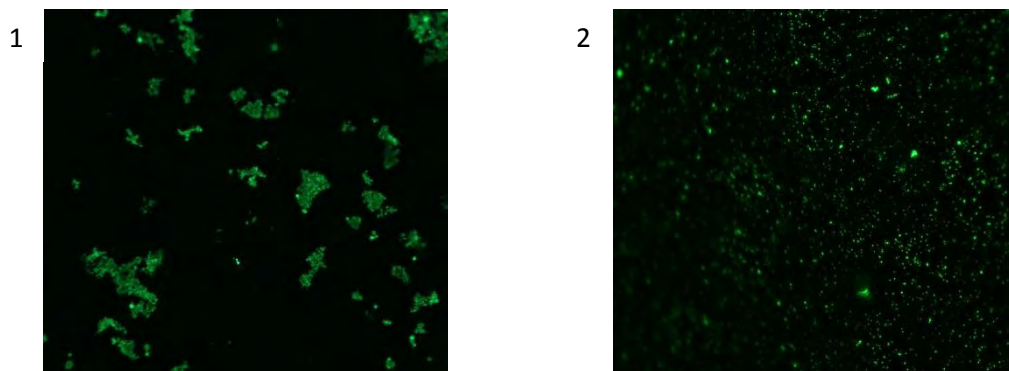


Figure 15 : Observation microscopique des anticorps CD 14 fluorescents greffés sur des électrodes fonctionnalisées par des SAMs mixtes (1/10) : (1) 11-amino-1-undecanethiol/MH, (2) MUA/MH (grossissement x20)

La comparaison des couches d'anticorps pour les deux types de SAMs mixtes permet de mettre en évidence des différences dans l'homogénéité de la couche d'anticorps.

Ainsi, l'utilisation d'aminothiols mixtes n'a pas permis de diminuer le greffage aléatoire et non uniforme d'agglomérats d'anticorps alors que les SAMs mixtes ayant une fonction carboxylique permettent d'obtenir une monocouche homogène et reproductible d'anticorps. Par conséquent, les aminothiols n'ont pas été retenus pour la suite de l'étude.

#### ***1.4.2. Réduction du temps de dépôt des SAMs mixtes avec une fonction carboxylique***

Schwartz *et al.*<sup>19</sup> ont montré qu'une monocouche stable de SAMs peut être obtenue au bout de quelques heures. La durée du protocole de fonctionnalisation pourrait alors être réduite par la diminution du temps de dépôt des SAMs mixtes.

Des dépôts des SAMs ont alors été réalisés pendant différents temps de fonctionnalisation (6 h, 8 h et 18 h) et les monocouches obtenues ont été caractérisées par spectroscopie d'impédance électrochimique de manière à étudier l'influence du temps de dépôt. Des exemples de diagrammes de Nyquist obtenus sur différentes électrodes d'or après 6 h et 18 h de dépôt sont représentés sur la Figure 16.



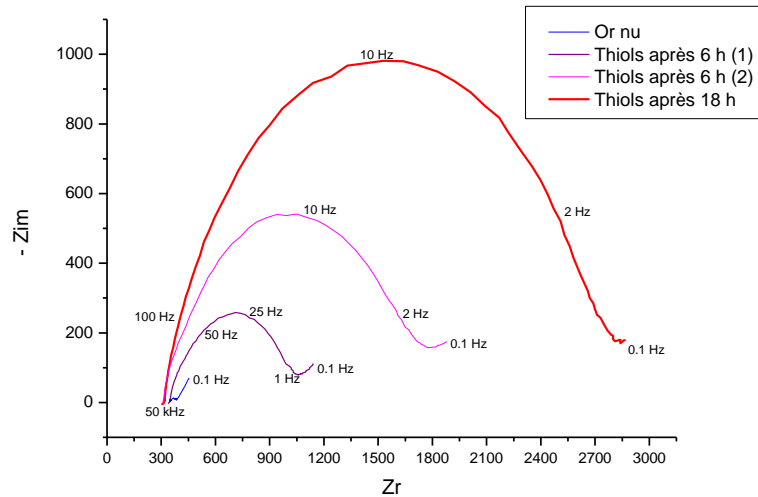


Figure 16 : Diagrammes de Nyquist réalisés dans une solution de PBS à pH 7,4 contenant 5 mM de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  pour une électrode d'or nu ( $1 \text{ cm}^2$ ) et des électrodes recouvertes de SAMs mixtes après 6 h et 18 h de dépôt

Comme nous pouvons le constater sur les courbes, une couche de SAMs mixtes est formée au bout de 6 h mais pour un même temps de dépôt l'impédance varie beaucoup d'une électrode à l'autre. Cette variation est due d'une part au fait que les mesures soient réalisées sur des électrodes différentes mais aussi à la cinétique de formation des SAMs sur les électrodes.

La modélisation de ces courbes de Nyquist a ensuite été réalisée en utilisant le circuit de Randles modifié, le film représentant la couche de thiols (Tableau 6).

Tableau 6 : Modélisation des électrodes recouvertes de thiols mixtes après 6h et 18h de dépôt

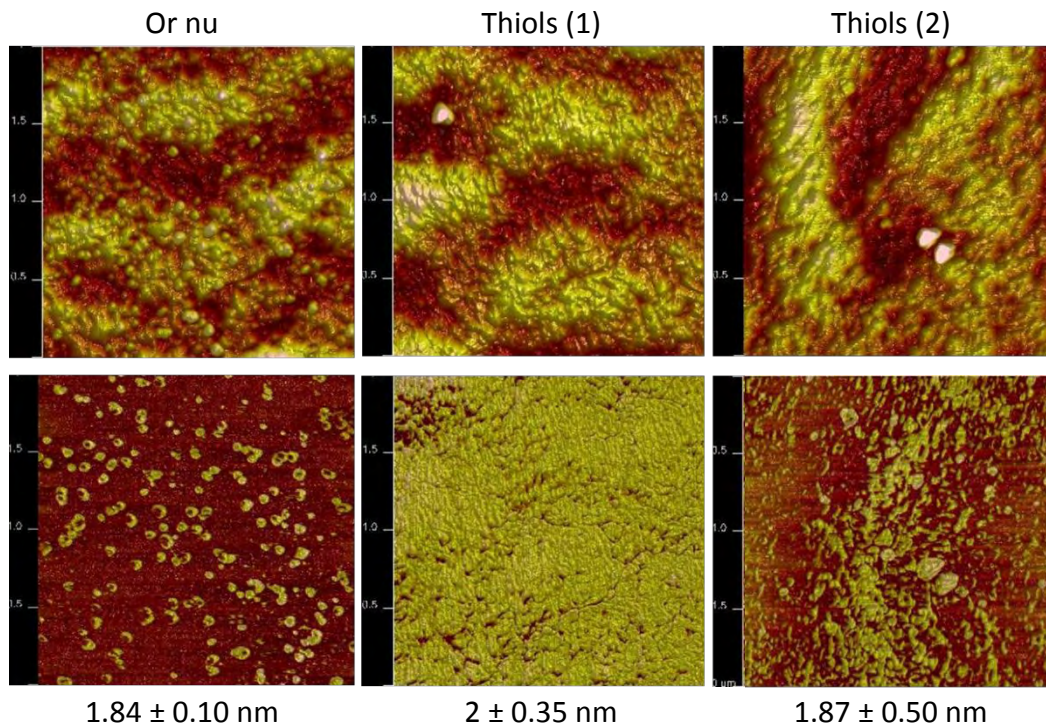
|             | $R_{\text{SOL}} (\Omega \text{ cm}^2)$ | $Q_f (\mu\text{F} \cdot \text{s}^{n-1})$<br>n | $R_f (\Omega \text{ cm}^2)$ | $R_{\text{tc}} (\Omega)$ | $Q_{\text{dc}} (\mu\text{F} \cdot \text{s}^{n-1})$<br>n | W      | $\Theta$ |
|-------------|--|---|-----------------------------|--------------------------|---|--------|----------|
| Or nu       | 340                                    | —   | —                           | 35                       | 96.6<br>0.71  | 0.0125 | —        |
| SAMs 6h (1) | 346                                    | 39<br>0.86                                    | 64                          | 614                      | 28<br>0.853   | 0.0080 | 94.2     |
| SAMs 6h (2) | 308                                    | 37.28<br>1                                    | 382                         | 1020                     | 36.1<br>0.75  | 0.0055 | 96.4     |
| SAMs 18h    | 314                                    | 9.7<br>1                                      | 1661                        | 2432                     | 13.4<br>0.85  | 0.0076 | 98.1     |

Le taux de couverture des thiols sur les électrodes est supérieur à 90 % pour les deux temps d'incubation. Cependant les caractéristiques électriques du film obtenu varient beaucoup d'une électrode à l'autre. Ces variations peuvent être expliquées par l'état de surface des électrodes. En effet, malgré leur nettoyage, la présence de contamination ou de défaut de microstructures à la surface des électrodes d'or ralentit la formation de la monocouche et la déstabilise. Schreiber<sup>20</sup> a reporté que la présence de contamination dans la solution ou sur la surface entraîne un retard sur le début de la formation des SAMs qui poussent les contaminants de la surface. La cinétique de croissance des SAMs est alors modifiée, ce qui limite la comparaison des différents résultats.

De plus, la variation de la taille et de la densité des défauts de la surface d'or influent sur la croissance des SAMs. Une observation au microscope à force atomique a permis de mettre en évidence les différences de structures des SAMs mixtes d'une électrode à l'autre après un dépôt de 6 h. Les mesures ont été réalisées en mode tapping en scannant une surface sèche de  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$  (Tableau 7).

Les joints de grains de l'or nu et leur organisation en réseau sont visibles sur l'image topographique. Après un dépôt de SAMs mixtes pendant 6h, les images topographiques montrent que les dépôts s'organisent suivant les domaines des joints de grains de l'or et les images de contraste de phase laissent paraître les zones de l'électrode ayant des propriétés viscoélastiques différentes. Ainsi la couche de thiols obtenue sur l'électrode (1) est plus compacte et homogène que la couche de thiols sur l'électrode (2).

**Tableau 7 : Images AFM obtenues en mode tapping pour l'or nu et les SAMs après un dépôt de 6 h : image de la topographie, image du contraste de phase et rugosité calculée**



Ces résultats confirment alors que les retards de formation des SAMs sont beaucoup plus visibles pour des temps de dépôt courts. C'est pourquoi les SAMs mixtes seront déposés pendant 18h pour le greffage des anticorps.

#### 1.4.3. Réduction du temps de dépôt de la PG

Une autre étape du protocole de fonctionnalisation pouvant être raccourcie est le dépôt de la protéine G. Comme dans le cas des SAMs, des mesures d'impédances ont été réalisées pour différents temps de dépôts de la PG : 1 h, 2 h, 4 h et 18 h (Figure 17).

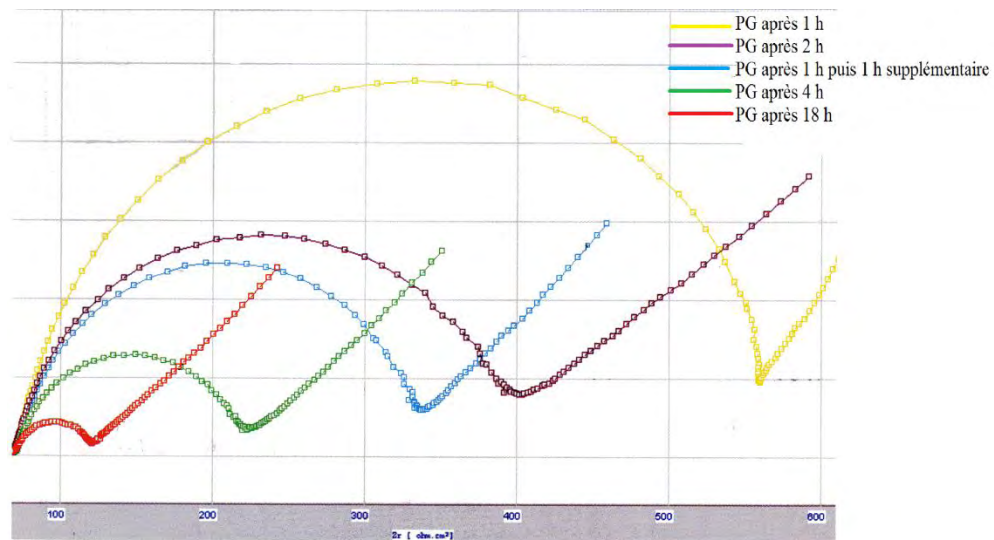


Figure 17 : Diagrammes de Nyquist réalisés dans une solution de PBS à pH 7,4 contenant 5 mM de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  pour des électrodes ( $1 \text{ cm}^2$ ) recouvertes de PG après 1 h (—) ; 2 h (—) ; 1 h de dépôt, rinçage puis 1 h de dépôt supplémentaire (—) ; 4 h (—) ; et 18 h (—) de dépôt.

Les diagrammes de Nyquist obtenus montrent une diminution du diamètre du demi-cercle en fonction du temps de dépôt. La diminution de l'impédance peut s'expliquer par le mécanisme de réaction de la protéine avec les SAMs activés. Lors du dépôt de la PG, l'ester de NHS, très réactif et conducteur, est le premier à réagir avec la biomolécule. L'autre ester présent qui interviendrait dans la formation des liaisons amides, l'*O*-acylurée, est instable et très électrophile ce qui pourrait expliquer la limitation du transfert d'électrons à la surface de l'électrode pour des temps de réactions courts. L'augmentation du temps de dépôt entraîne alors la formation d'une amide à la place de tous les sites estérifiés de manière reproductible au bout de 18h.

Les mesures d'impédance réalisées suite au greffage des anticorps sur les couches de PG obtenues pour différents temps de dépôt montrent une augmentation du diamètre du demi-cercle du diagramme de Nyquist des anticorps immobilisés avec l'augmentation du temps de dépôt de la PG. Ces mesures confirment ainsi qu'un temps de dépôt long de la PG augmente le nombre de PG disponibles pour l'accroche des anticorps.

Des temps de dépôt assez longs sont donc nécessaires pour obtenir un système multicouche constitué de couches suffisamment stables et reproductibles *via* plusieurs interactions covalentes et électrostatiques. Ce protocole devrait ainsi permettre le piégeage des cellules tout en limitant les interactions non spécifiques et le bruit de fond des mesures électrochimiques.

## II. Piégeage immunologique de la sous population cellulaire cible

Les électrodes ainsi fonctionnalisées peuvent alors être utilisées pour le piégeage immunologique des monocytes (MO) inflammatoires. Les expériences ont été réalisées à l'aide de MO de culture, les THP-1 (cf. Annexe I). Ces cellules possèdent des antigènes CD 14 dans leur état sain et leur caractère infectieux est induit en ajoutant du lipopolysaccharide (LPS) dans le milieu de culture pendant 48 h. Rappelons que les monocytes sont composés de 3 sous-populations cellulaires : les MO classiques CD 14<sup>++</sup> CD 16<sup>-</sup>, les MO anti-inflammatoires CD 14<sup>+</sup> CD 16<sup>+</sup> et pro-inflammatoires CD 14<sup>-</sup> CD 16<sup>++</sup> et que le piégeage repose sur la surexpression des antigènes CD 14<sup>+</sup> qui caractérisent un état sain ou CD 16<sup>+</sup> qui désignent un processus infectieux.

Les électrodes fonctionnalisées par des anticorps CD 14 ou CD 16 sont immergées pendant 2 heures dans une solution de PBS contenant des monocytes sains ou activés par du LPS à 37°C sous atmosphère humide avec 5 % de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Les monocytes étant en suspension dans les conditions de culture *in vitro*, l'incubation est réalisée sous agitation pour augmenter les interactions entre les cellules et les anticorps. Après incubation, les électrodes sont soigneusement rincées au PBS pour enlever les cellules qui ne sont pas immobilisées sur les anticorps.

### II.1. Caractérisation du piégeage cellulaire

#### II.1.1. Détection des monocytes par spectroscopie d'impédance électrochimique

La détection des monocytes immobilisés à la surface de l'électrode est réalisée par SIE dans une cellule électrochimique en téflon à trois électrodes. Comme précédemment, les courbes d'impédance sont enregistrées dans une cage de Faraday, à 25 °C, entre 100 mHz et 50 kHz pour une tension alternative de 10 mV d'amplitude.

##### II.1.1.a. En mode faradique

Les mesures ont dans un premier temps été réalisées en mode faradique dans une solution de PBS à pH = 7,4 contenant 5 mM de ferri/ferrocyanure (Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>) après incubation dans une suspension cellulaire contenant 1 million de cellules/mL. Afin de vérifier que la variation d'impédance est due à l'immobilisation des cellules sur l'électrode, les diagrammes de Nyquist ont également été enregistrés après incubation des électrodes dans du PBS en l'absence de cellules (Figure 18).

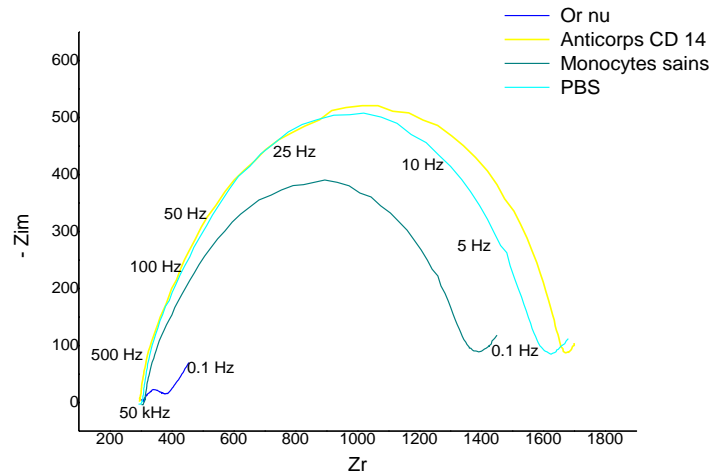


Figure 18 : Diagrammes de Nyquist réalisés dans une solution de PBS à pH 7,4 contenant 5mM de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  pour une électrode d'or nu ( $1 \text{ cm}^2$ ) (—) ; après greffage des anticorps CD 14 (—) ; après incubation dans du PBS en l'absence de cellules (—) ; et après piégeage des monocytes sains (—).

En l'absence de cellules, i.e. dans le PBS seul, le diagramme de Nyquist enregistré est proche de celui obtenu avec les anticorps et l'impédance diminue après piégeage des cellules. Les résultats de la modélisation de ces courbes dans le circuit de Randles modifié sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8: Valeurs des paramètres issus de la modélisation des CEE pour l'or nu, l'électrode fonctionnalisée par les anticorps CD 14 et après le piégeage cellulaire avec  $R_{\text{SOL}}$ ,  $Q_f$ ,  $R_f$ ,  $R_{\text{TC}}$ ,  $Q_{\text{dc}}$ ,  $W$  et  $\theta$ .

|                | $R_{\text{SOL}} (\Omega \text{ cm}^2)$ | $Q_f (\mu\text{F} \cdot \text{s}^{n-1})$<br>n | $R_f (\Omega \text{ cm}^2)$ | $R_{\text{TC}} (\Omega)$ | $Q_{\text{dc}} (\mu\text{F} \cdot \text{s}^{n-1})$<br>n | W      | $\theta$ |
|----------------|--|---|-----------------------------|--------------------------|---|--------|----------|
| Or nu          | 305.5                                  | -   | -                           | 78.1                     | 1.719<br>0.636  | 0.0125 |          |
| Anticorps CD14 | 295                                    | 1.767<br>0.811                                | 433                         | 914                      | 7.936<br>0.926  | 0.0107 | 91.4     |
| PBS            | 303.5                                  | 4.758<br>0.895                                | 423                         | 856                      | 7.068<br>0.95   | 0.0107 | 90.9     |
| Monocytes      | 311                                    | 4.762<br>0.883                                | 103.8                       | 931                      | 2.858<br>0.858  | 0.0084 | 91.6     |

Après incubation des électrodes fonctionnalisées à 37 °C dans une solution de PBS en l'absence de cellules, une augmentation de la capacité du film  $Q_f$  et une légère diminution des résistances de film et de transfert de charge sont observées par rapport aux anticorps, les autres paramètres restant constants. Ces variations peuvent s'expliquer par la présence d'ions et de molécules d'eau du PBS dans les pores et/ou les trous du film. En effet, pour permettre aux cellules de se déposer sur le film d'anticorps une période d'incubation de 2 h à 37 °C dans le PBS contenant les cellules est nécessaire. L'infiltration de ces molécules dans le film pendant l'incubation augmente fortement la permittivité du film et donc sa capacité<sup>21,22</sup>.

Suite au piégeage des monocytes sur l'électrode fonctionnalisée d'anticorps CD 14, la même augmentation que pour le PBS est observée pour la capacité du film  $Q_f$  alors que la résistance du film  $R_f$  et la capacité de double couche  $Q_{dc}$  diminuent. Ces diminutions semblent essentiellement liées au piégeage des monocytes. Elles peuvent être attribuées pour  $R_f$  à l'augmentation de la permittivité du film due à la présence des cellules et pour  $Q_{dc}$  à la disparition des charges négatives des anticorps recouverts par les monocytes. La résistance de transfert de charge et le taux de recouvrement après le dépôt des cellules restent constants (92 %) indiquant ainsi que les cellules sont positionnées sur les anticorps et qu'elles ne modifient pas la capacité de la sonde à se réduire et à s'oxyder sur l'électrode (Figure 19).

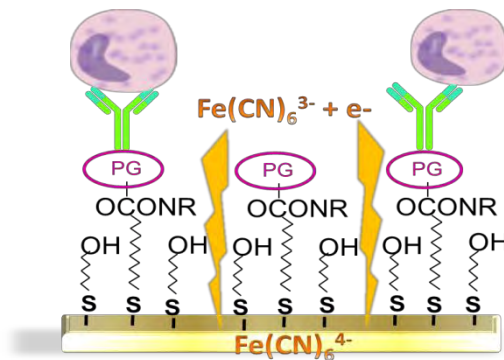


Figure 19 : Schéma de l'électrode fonctionnalisée après piégeage cellulaire montrant la capacité de la sonde à atteindre l'électrode à travers les trous du film

L'effet de l'éthanol et de la trypsine sur les cellules immobilisées sur les électrodes a également été étudié de manière à confirmer la présence des monocytes. Après immobilisation des cellules, les électrodes sont soit rincées à l'éthanol (EtOH) de manière à provoquer leur lyse, soit recouvertes de 200  $\mu$ L d'une solution de trypsine, enzyme qui catalyse l'hydrolyse des protéines, puis incubées 15 min à 37 °C pour détacher les cellules de l'électrode par clivage des protéines membranaires.

Les diagrammes obtenus après traitement à l'éthanol ne présentent pas de grandes différences avec celles des monocytes. En effet, après traitement, les cellules immobilisées restent attachées à la surface de l'électrode ce qui ne modifie pas la capacité de la sonde à atteindre l'électrode.

Dans le cas de la trypsine, le demi-cercle de la courbe de Nyquist augmente et a tendance à se rapprocher de celui des anticorps (Figure 20). Cependant, la variation d'impédance enregistrée après incubation de la trypsine n'est pas reproductible. Ce dernier point peut s'expliquer par le fait que la trypsine digère aussi bien les protéines membranaires du complexe anticorps-cellule que les protéines du système multicouche de la fonctionnalisation de manière aléatoire.

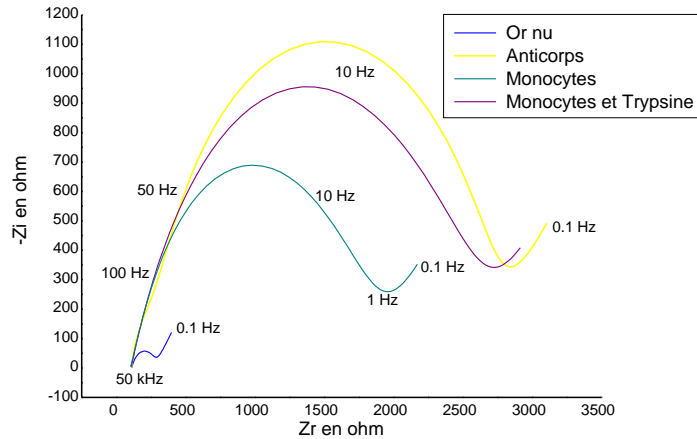


Figure 20 : Diagrammes de Nyquist réalisés pour une solution de PBS à pH 7,4 contenant 5mM de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  pour une électrode d'or nu ( $1 \text{ cm}^2$ ) (—) ; après greffage des anticorps CD 14 (—) ; après piégeage des monocytes sains (—) et après incubation en présence de trypsine (—).

Des mesures similaires ont été obtenues pour les électrodes fonctionnalisées par des anticorps CD 16 sur lesquelles des monocytes activés ont été piégés. Ainsi, la spectroscopie d'impédance en mode faradique permet de détecter la présence de cellules piégées sur l'électrode. Cependant, le taux de recouvrement reste inchangé en dépit de la présence des cellules en raison du fait que la présence de la sonde masque les informations concernant le film cellulaire proprement dit.

C'est pourquoi des mesures en mode non faradique ont été mises en œuvre dans le but d'accéder à des informations concernant la cellule et de quantifier les cellules piégées.

#### II.1.1.b. En mode non faradique

L'interaction des MO avec les anticorps greffés sur les électrodes a alors été étudiée par SIE dans le PBS en l'absence de sonde redox. Afin d'apprécier la variation d'impédance liée uniquement aux cellules piégées et donc de s'affranchir des variations d'impédance liées à la période d'incubation dans le PBS et de l'insertion des molécules d'eau et des ions du PBS dans la couche de biofonctionnalisation, l'électrode a dans un premier temps été immergée 2h dans une solution de PBS avant d'être plongée et incubée dans la suspension cellulaire.

Les différents diagrammes de Nyquist obtenus après chaque étape de la fonctionnalisation et après immobilisation de la couche cellulaire sont présentés sur la Figure 21 dans le cas d'anticorps CD16 pour le piégeage de monocytes infectés.

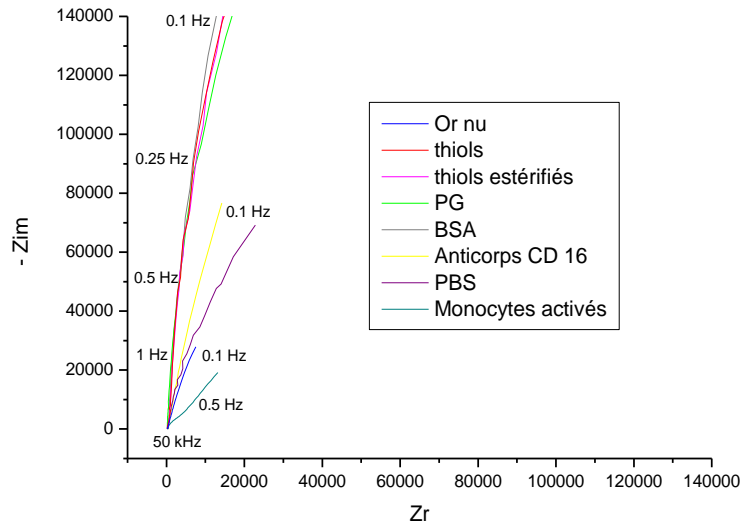


Figure 21 : Diagrammes de Nyquist obtenus dans une solution de PBS pour une électrode d'or nu ( $1 \text{ cm}^2$ ) (—); recouverte de SAMs mixtes (—); après activation des SAMs (—); après immobilisation de la PG (—); puis saturation de l'électrode modifiée par la BSA (—); après greffage des anticorps CD16 (—); après incubation dans le PBS (—); et après piégeage des monocytes activés par le LPS (—).

En l'absence de sonde, les diagrammes obtenus pour l'or nu et l'ensemble des couches de la fonctionnalisation correspondent à des droites traduisant le caractère capacitif du système d'accroche avec une résistance de transfert de charge très élevée. Rappelons que pour une couche parfaitement isolante, la courbe de Nyquist représenterait une droite parallèle à l'axe de l'impédance imaginaire.

L'incubation des électrodes fonctionnalisées par des anticorps CD 16 dans le PBS engendre une variation des capacitances et des résistances. Le piégeage successif des monocytes activés sur la même électrode entraîne à nouveau une forte diminution des résistances et des capacitances, laissant apparaître le début d'un demi-cercle suivi d'une droite. Il est probable que dans ce second cas la variation d'impédance ne soit due qu'au piégeage des cellules activées, les pores étant déjà saturés par le PBS.

La variation importante de l'impédance enregistrée pour le PBS provient sans doute, comme dans le cas des expériences menées en mode faradique, de l'infiltration pendant l'incubation (2h à  $37^\circ\text{C}$ ) des ions et des molécules d'eau du PBS dans les pores et/ou trous du film. Cependant la représentation de la variation d'impédance en diagramme de Bode ( $|Z| = f(\log F)$ ) permet de mieux différencier l'influence des cellules de celle du PBS. En effet comme le montre la Figure 22, aux faibles fréquences, seule prévaut l'influence des cellules.

La forte diminution d'impédance enregistrée pour les monocytes pourrait provenir de l'augmentation des échanges entre les cellules et le PBS due au relargage de vacuoles et de cytokines par les MO activés en réponse à l'agent infectieux (cf. Annexe II).



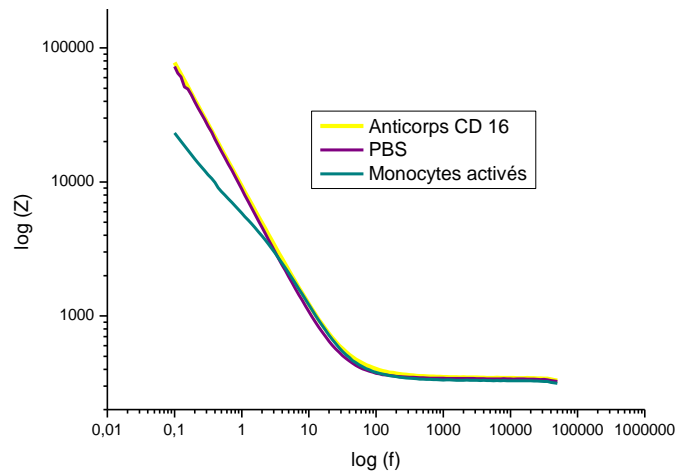


Figure 22 : Diagrammes de Bode correspondants pour une électrode d'or (1 cm<sup>2</sup>) fonctionnalisée par des anticorps CD 16 (—) ; après incubation dans le PBS (—) ; et après piégeage des monocytes activés par le LPS (—).

### II.1.2. Caractérisation optique du piégeage

L'observation des cellules immobilisées sur les électrodes fonctionnalisées par des anticorps CD 14 et CD 16 au microscope à fluorescence a permis de mettre en évidence les différences électro-optiques entre les monocytes sains et activés (Figure 23).

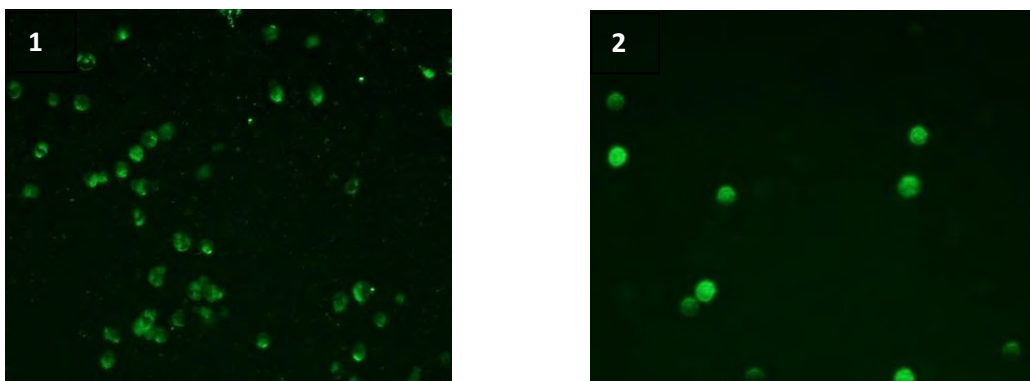


Figure 23: Observation microscopique des monocytes sains (1) et des monocytes infectés (2) piégés sur l'électrode (grossissement x20). (Concentration cellulaire : 240 000 monocytes sains/mL et 80 000 monocytes activés/mL)

On distingue sur la Figure 23 (1) les noyaux réniformes et les membranes des MO sains. Le cytoplasme, très vacuolisé et présentant de nombreuses granulations lysosomales, a un indice de réfraction élevé ce qui le rend translucide par rapport au noyau. Les monocytes THP-1 sains apparaissent très réfringents alors que les monocytes activés de la Figure 23 (2) sont circulaires, opaques et semblent contenir moins de cytoplasme. En effet, les monocytes activés sont plus petits et moins granulaires<sup>23</sup>.

Une rapide estimation du taux de piégeage des monocytes par rapport à la concentration de la suspension cellulaire a été réalisée grâce au logiciel de traitement d'images Image J. Le

faible taux obtenu, inférieur à 10 % aussi bien pour les monocytes sains que pour les MO activés, peut s'expliquer par le fait que les monocytes sont en suspension et atteignent difficilement la surface de l'électrode.

Enfin, des mesures d'AFM ont été réalisées mais elles n'ont pas permis la visualisation des cellules accrochées à la surface de l'électrode car ces dernières se décollent des anticorps à l'approche de la pointe du microlevier.

## II.2. Optimisation de la détection cellulaire

La caractérisation de la couche cellulaire a montré que les monocytes sont bien piégés sur l'électrode. Cependant, le taux d'accroche estimé étant faible, il est nécessaire d'optimiser leur détection et/ou le taux de piégeage. Afin d'augmenter les variations d'impédance enregistrées et donc la sensibilité du capteur, plusieurs paramètres ont été testés comme la conductivité du milieu et la surface des électrodes.

### II.2.1. Influence de la conductivité

Il semblerait d'après les travaux Yang et *al.*<sup>24</sup> que plus la conductivité de la solution est faible et plus il est possible d'accéder aux échanges électrochimiques des cellules avec la solution. Des mesures d'impédance électrochimique ont alors été réalisées dans une solution de conductivité très faible, l'eau milliQ de conductivité de 8,55  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Les diagrammes de Nyquist enregistrés font apparaître pour toutes les couches de modification, y compris la couche cellulaire, un demi-cercle contenant une boucle suivie d'une droite (Figure 24).

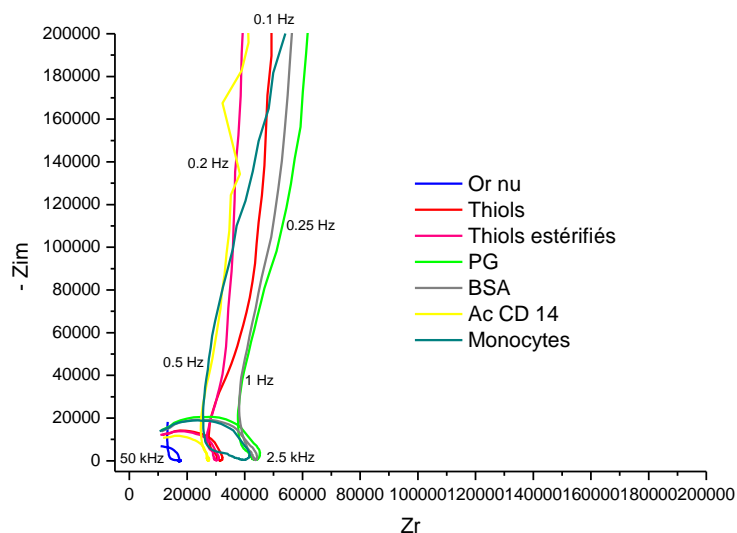


Figure 24 : Diagrammes de Nyquist réalisés dans une solution d'eau MilliQ pour une électrode d'or nu (1 cm<sup>2</sup>) (—) ; recouverte de SAMs mixtes (—) ; après activation des SAMs (—) ; après immobilisation de la PG (—) ; puis saturation de l'électrode modifiée par la BSA (—) ; après greffage des anticorps (—) ; et après piégeage des monocytes sains (—).

La présence de la boucle sur la courbe d'impédance traduit la présence d'une inductance dans le CEE. Cette boucle également présente pour l'or nu pourrait s'expliquer par une absorption compétitive d'espèces mobiles et chargées de l'oxygène sur l'électrode, ce qui entraîne des interférences entre l'électrode de référence et l'électrode de travail<sup>25</sup>. En effet, lors de la polarisation de l'électrode, la faible conductivité de l'électrolyte entraîne un gradient de concentration des espèces oxygénées et une fuite d'électrons vers l'électrode de référence.

Ainsi, la diminution de la conductivité de la solution de mesure ajoute un paramètre électrique qui parasite le signal et ne permet pas d'améliorer la détection des cellules. Les mesures ont par conséquent toutes été réalisées dans une solution de PBS, de conductivité proche du milieu osmotique des cellules.

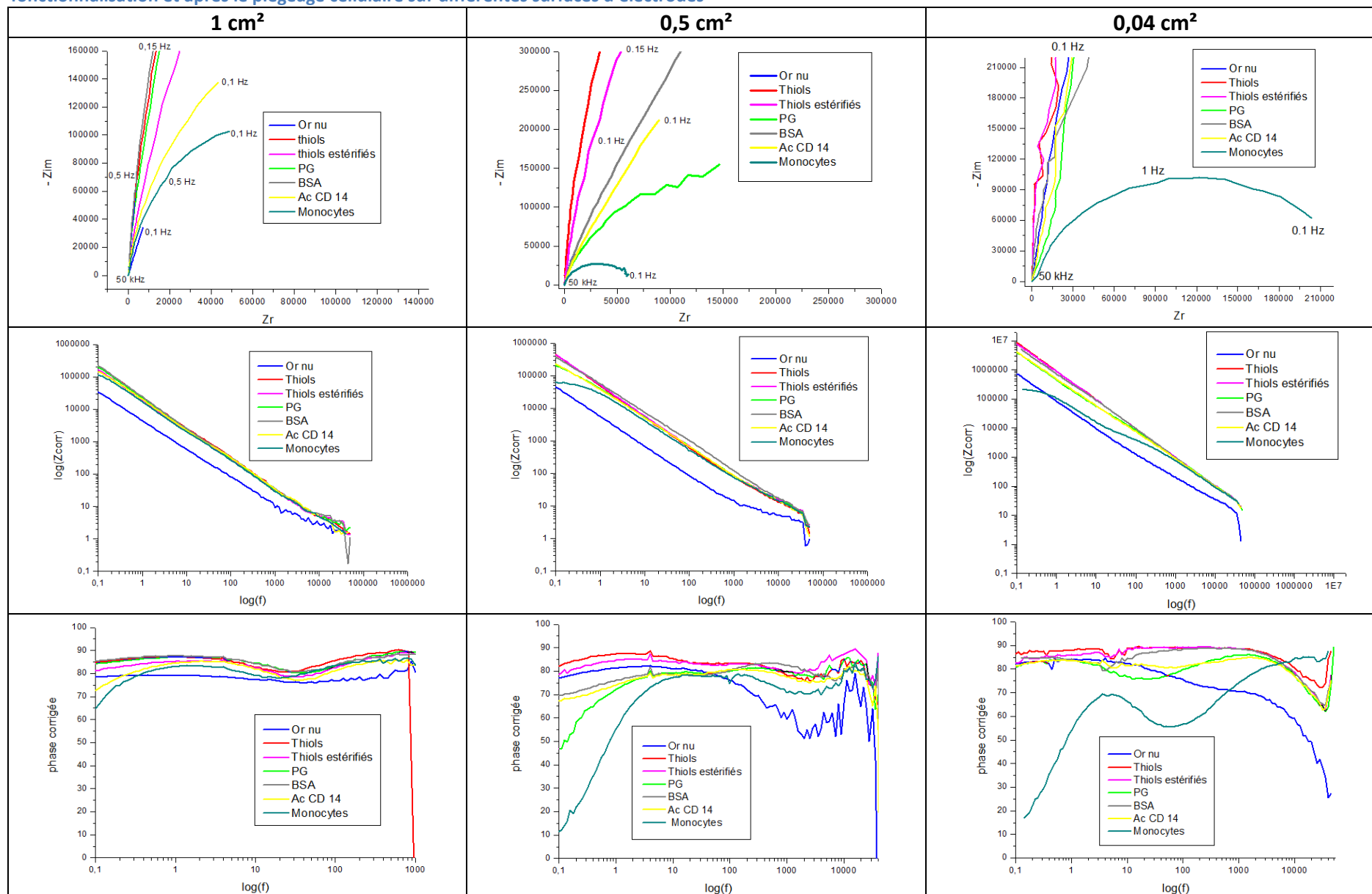
### *II.2.2. Influence de la taille des électrodes*

L'influence de la surface des électrodes a ensuite été étudiée grâce à la caractérisation électrochimique en mode non faradique d'électrodes de surfaces différentes : 1 cm<sup>2</sup>, 0,5 cm<sup>2</sup> et 0,04 cm<sup>2</sup>. Les diagrammes de Nyquist et de Bode obtenus pour chaque surface sont présentés dans le Tableau 9.

Comme nous pouvons le constater, les diagrammes correspondants aux couches de fonctionnalisation sont les mêmes quelle que soit la surface. En revanche, les diagrammes correspondants à la couche cellulaire montrent une forte augmentation de la variation d'impédance avec la diminution de la surface des électrodes. Cette augmentation s'explique entre autres par l'augmentation de la densité de recouvrement de la couche cellulaire avec la miniaturisation des électrodes. La sensibilité de détection des cellules est ainsi augmentée.

Comme le montre les diagrammes de Bode, il n'y a pas de variation du module de l'impédance pour les fréquences supérieures à 10 kHz. Ces résultats suggèrent qu'à hautes fréquences, l'impédance est dominée par la capacitance diélectrique de la solution de mesure et que la contribution des couches de la fonctionnalisation et des monocytes est minimale. Entre 1 kHz et 10 kHz, l'impédance est la combinaison de la capacité de la solution et de l'impédance des couches de modification et des cellules. Enfin, la variation de l'impédance essentiellement due aux monocytes apparaît à des fréquences inférieures à 100 Hz<sup>26</sup>.

Tableau 9 : Récapitulatif des courbes de nyquist et des diagrammes de bode réalisés dans une solution de PBS à pH = 7,4 pour chaque étape du procédé de fonctionnalisation et après le piégeage cellulaire sur différentes surfaces d'électrodes



Une analyse rapide des courbes a été réalisée en calculant la variation relative de l'impédance due au piégeage des cellules à partir du diagramme de Bode à une fréquence de 200 mHz à l'aide de la relation suivante :

$$\Delta Z = \frac{|Z(i) - Z(0)|}{Z(0)}$$

avec  $Z(0)$  le module de l'impédance de l'électrode modifiée par des anticorps avant le piégeage des monocytes et  $Z(i)$  le module de l'impédance après le piégeage cellulaire.

Les pourcentages de variations obtenus suite à l'incubation des électrodes dans une suspension cellulaire de 1 million de cellules/mL sont récapitulés sur la Figure 25 pour chaque surface d'électrode étudiée.

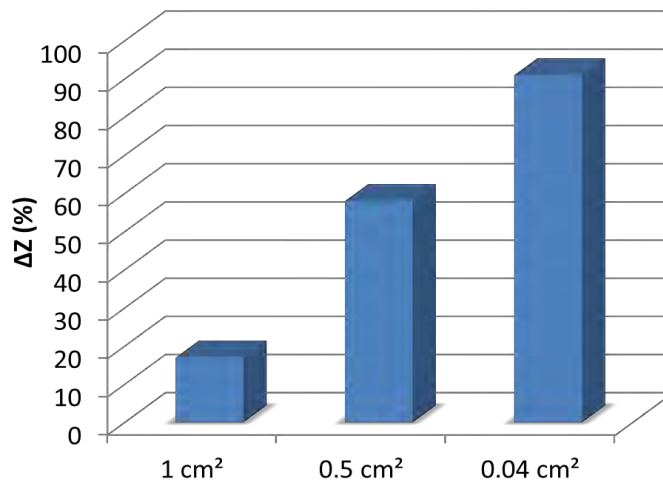


Figure 25 : Pourcentage de variation de l'impédance due au piégeage des monocytes sur différentes surfaces d'électrodes après incubation dans une suspension cellulaire de 1 million de cellules/mL.

Comme attendu, le pourcentage de variation de l'impédance augmente avec la diminution de la surface de l'électrode. Ces valeurs ont été obtenues de manière reproductible pour une concentration de 1 million de cellules par mL et ont alors été utilisées comme indicateur pour caractériser le piégeage des monocytes.

Cependant, la réduction de la taille des électrodes pourrait aussi réduire le ratio signal/bruit et ainsi diminuer les performances du capteur. McAdams *et al.*<sup>27</sup> ont montré que les électrodes ont, en plus du bruit thermique, un spectre de bruit de fonction  $1/f^\alpha$ , avec  $\alpha = 2n$ ,  $n$  étant le coefficient de la capacité imparfaite. Le bruit thermique, aussi appelé bruit de Nyquist ou de Johnson, provient des mouvements thermiques aléatoires des charges dans les matériaux conducteurs.

La densité spectrale de puissance du bruit thermique peut être évaluée à l'équilibre thermodynamique par l'équation suivante :

$$DSP_{thermique} = 4k_B T Z_r$$

avec  $k_B$  constante de Boltzmann,  $T$  température absolue,  $Z_r$  impédance réelle.

L'estimation du bruit pour chaque surface d'électrode a été calculée pour l'or nu et pour la couche cellulaire à 200 mHz (Tableau 10).

**Tableau 10 : Estimation du bruit suivant la surface de l'électrode pour une électrode d'or nu et une recouverte de cellules**

|                            | Or nu                     |                   | Couche cellulaire         |                   |
|----------------------------|---------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|
|                            | $1/f^\alpha$ ( $\alpha$ ) | DSP <sub>th</sub> | $1/f^\alpha$ ( $\alpha$ ) | DSP <sub>th</sub> |
| <b>1 cm<sup>2</sup></b>    | 17 (1.76)                 | 6.22E-17          | 12 (1.57)                 | 3.08E-16          |
| <b>0.5 cm<sup>2</sup></b>  | 16.7 (1.75)               | 8.09E-17          | 12.7 (1.58)               | 2.05E-17          |
| <b>0.04 cm<sup>2</sup></b> | 20.3 (1.87)               | 7.77E-16          | 15.4 (1.70)               | 2.9E-15           |

Le bruit thermique calculé est très faible et les fonctions partielles des spectres de bruit de coefficient  $1/f^\alpha$  sont proches quelle que soit la surface de l'électrode.

L'étude des conditions de mesures d'impédance a ainsi permis d'améliorer la sensibilité de détection du piégeage cellulaire grâce à la diminution de la surface des électrodes sans augmenter le bruit.

### II.3. Caractérisation des performances de l'immunocapteur impédimétrique

La caractérisation des performances de l'immunocapteur constitue un critère important dans sa conception et son application. Les paramètres caractéristiques du biocapteur impédimétrique, tels que la sélectivité, la spécificité et la calibration, ont alors été étudiés sur les électrodes de 0,04 cm<sup>2</sup>.

#### II.3.1. Piégeage sélectif et spécifique des monocytes

La sélectivité de l'immunocapteur a été confirmée grâce à l'étude du piégeage des monocytes sains ou activés sur des électrodes fonctionnalisées par des anticorps CD 14 et/ ou CD 16 (Figure 26).

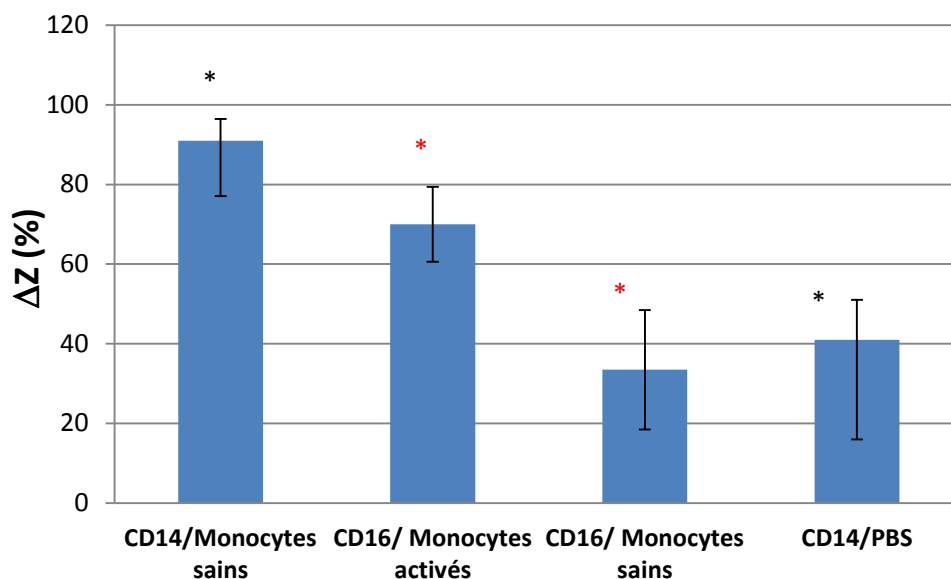


Figure 26 : Variation de l'impédance due au piégeage des monocytes sains ou infectés ( $\Delta Z$ ) en fonction de la nature des anticorps immobilisés sur des électrodes de  $0,04 \text{ cm}^2$  (1 million de cellules/mL) avec \* :  $p < 0,05$  entre deux groupes d'électrodes.

Les impédances enregistrées pour les différents immunocapteurs, après incubation dans une suspension contenant 1 millions de cellules/mL, montrent que le piégeage des monocytes sains sur les électrodes fonctionnalisées par des anticorps CD 14 entraîne une variation de 90 % alors que celle due aux monocytes activés sur les anticorps CD16 est de 70 %. La différence entre ces deux pourcentages pourrait provenir aussi bien des différences électriques que morphologiques observées entre les deux sous populations cellulaires, saines et activées.

Comme attendu, après incubation des électrodes fonctionnalisées par des anticorps CD 16 dans une suspension de monocytes sains, le pourcentage de variation de l'impédance est très faible (33 %). Cette variation peut être due au PBS ou à l'activation des monocytes sains stressés lors de la manipulation des cellules.

Enfin, l'incubation des électrodes fonctionnalisées par des anticorps CD 14 entraîne une variation de 40 % suite à l'infiltration des ions et des molécules d'eau du PBS dans le film.

Les pourcentages de variation obtenus ont été comparés par un test anova à l'aide du logiciel GraphPad Prism. La valeur de  $p$  calculée est faible ( $p < 0,05$ ) indiquant ainsi que ces différences sont significatives entre deux électrodes fonctionnalisées par des anticorps CD 14 et CD 16 et entre deux électrodes piégeant des monocytes sains. Ainsi, le piégeage des sous-populations cellulaires des monocytes est sélectif.

### II.3.2. Calibration de l'immunocapteur

La réponse de l'immunocapteur impédimétrique suite à l'incubation des électrodes dans des suspensions cellulaires de concentrations différentes, de 0 à 1 million de cellules/mL, a été

caractérisée sur une électrode fonctionnalisée par des anticorps CD 14. Les diagrammes de Nyquist obtenus pour chaque concentration sont présentés sur la Figure 27.

Les diagrammes de Nyquist montrent une augmentation des diamètres des demi-cercles avec l'augmentation de la concentration cellulaire. Afin de tracer la courbe de calibration pour un paramètre représentatif du piégeage des cellules, la modélisation des diagrammes a été réalisée.

Cheung et *al.*<sup>28</sup> ont démontré qu'à basses fréquences les membranes cellulaires constituent une barrière significative à la diffusion du courant et que l'amplitude de l'impédance donne accès à la taille de la cellule. Aux fréquences intermédiaires, la polarisation de la membrane est réduite et les mesures d'impédance apportent des informations sur les propriétés des membranes. Enfin, à hautes fréquences (> 1MHz), les membranes étant faiblement polarisées, l'impédance informe sur l'intérieur des cellules et les structures intracellulaires. Dans la gamme de fréquence des mesures d'impédances enregistrées, peu d'informations sont accessibles, en dehors de la résistance due à la membrane cellulaire. C'est pourquoi la variation de la résistance caractérisée par le diamètre du demi-cercle de Nyquist semble être un bon indicateur de la variation d'impédance en fonction du nombre de cellules piégées sur l'immunocapteur.

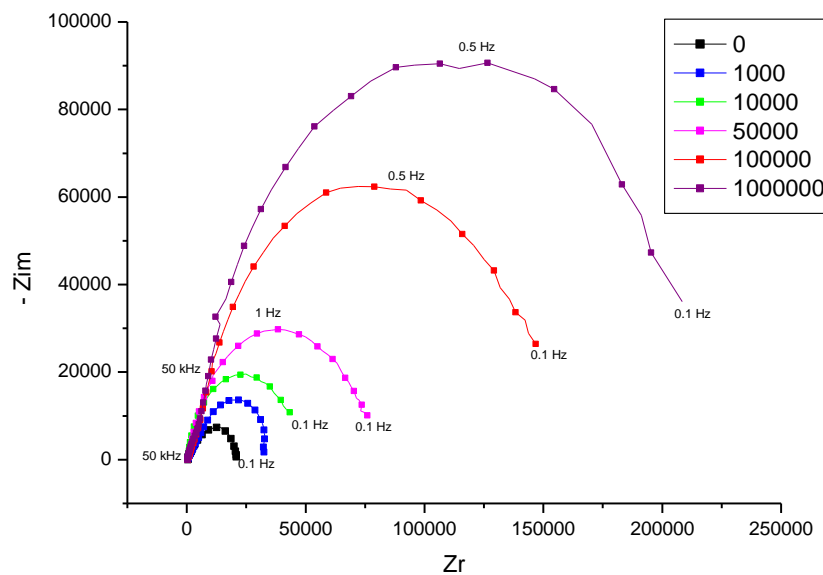


Figure 27 : Diagrammes de Nyquist réalisés dans une solution de PBS (pH = 7.4) pour une électrode (0,04 cm<sup>2</sup>) fonctionnalisée par des anticorps CD 14 après incubation dans une suspension cellulaire de concentration variant de 0 à 10<sup>6</sup> cellules /mL.

Différents circuits électriques équivalents ont été envisagés pour modéliser les couches cellulaires dans le système électrochimique en l'absence de sonde (Figure 28) :

- ✓ le circuit A, qui comprend la capacitance imparfaite du film en parallèle à la résistance du film et la capacité de double couche en parallèle à la résistance de



transfert de charge due aux mouvements des espèces en solution à l'électrode grâce aux pores et/ou trous du film,

- ✓ le circuit B, qui comprend la capacitance imparfaite du film et la capacité de double couche en parallèle à la résistance du film et de transfert de charge,
- ✓ le circuit C, qui comprend la capacitance imparfaite du film en parallèle à la résistance du film, qui est en série avec la capacité de double couche en parallèle à la résistance de transfert de charge.

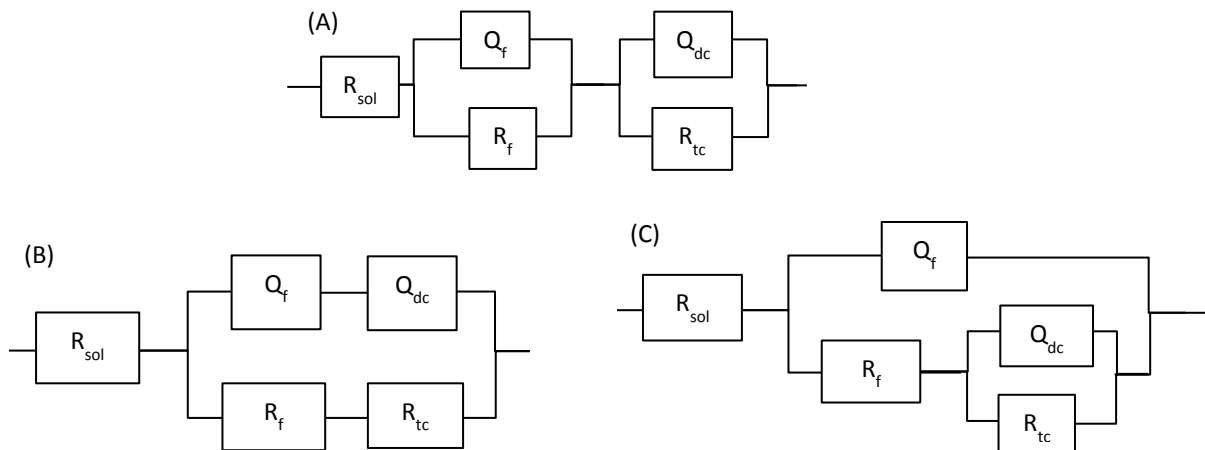


Figure 28 : Différents circuits électriques équivalents envisagés pour la modélisation des couches cellulaires

Ces circuits ne traduisent pas complètement tous les phénomènes ayant lieu dans la cellule électrochimique mais ils ont permis d'accéder aux résistances impliquées dans la variation de l'impédance en fonction de la concentration cellulaire. Les valeurs des paramètres électriques obtenues grâce au circuit C sont présentées dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Valeurs des paramètres issues de la modélisation du circuit C pour différentes concentrations cellulaires.

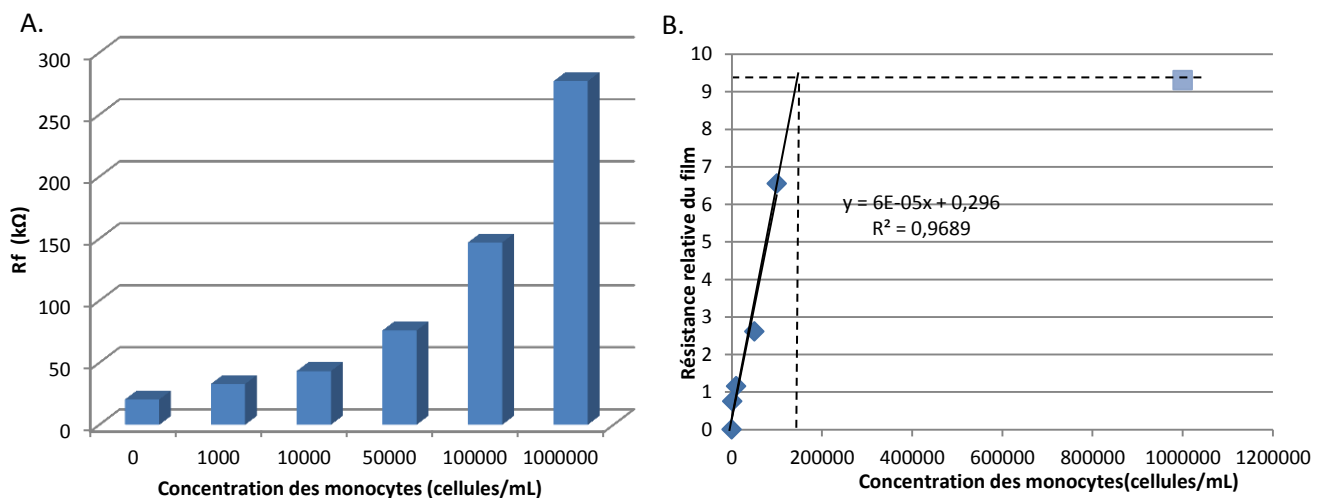
| Concentration (cellules/mL) | $R_{SOL}$ ( $\Omega$ cm <sup>2</sup> ) | $Q_f$ ( $\mu F \cdot s^{n-1}$ )<br>n | $R_f$ (k $\Omega$ ) | $R_{tc}$ (k $\Omega$ ) | $Q_{dc}$ ( $\mu F \cdot s^{n-1}$ )<br>n |
|-----------------------------|--|--------------------------------------|---------------------|------------------------|---|
| 0                           | 448                                    | 0.51<br>0.903                        | <b>21.05</b>        | 3.71                   | 1.88<br>0.778                           |
| 10 <sup>3</sup>             | 372                                    | 1.23<br>0.82                         | <b>36.8</b>         | 3.85                   | 3.59<br>0.772                           |
| 10 <sup>4</sup>             | 380                                    | 6.07<br>0.994                        | <b>45.8</b>         | 3.89                   | 5.13<br>0.785                           |
| 5 10 <sup>4</sup>           | 360                                    | 1.16<br>0.853                        | <b>76.2</b>         | 2.03                   | 1.32<br>0.871                           |
| 10 <sup>5</sup>             | 403                                    | 1.47<br>0.805                        | <b>159</b>          | 8.9                    | 0.89<br>0.919                           |
| 10 <sup>6</sup>             | 329                                    | 0.92<br>0.855                        | <b>216.3</b>        | 18.81                  | 0.49<br>0.983                           |

La résistance de la solution est bien quasiment constante pour toutes les mesures. Comme attendu la principale modification concerne la résistance du film qui augmente avec la quantité de cellules en solution et donc en fonction du nombre de cellules piégées.

La résistance de transfert de charge est quasiment constante jusqu'à 10 000 cellules (3,9 k $\Omega$ ) et augmente ensuite fortement jusqu'à 1 000 000 de cellules pour atteindre 18,8 k $\Omega$ . Cette évolution s'explique par le fait que la surface est saturée à partir de 50 000 cellules et le piégeage des cellules se fait alors par l'établissement de multicouches rendant la couche cellulaire très compacte (absence de trou). La capacité du film augmente jusqu'à 10 000 cellules puis diminue jusqu'à une valeur comparable à celle obtenue en l'absence de cellules. Cette variation pourrait, comme dans le cas de la résistance au transfert de charge, être liée à la formation de multicouches à la surface du capteur et pour la capacité du film, à l'augmentation de l'épaisseur du film.

La dépendance directe de la résistance du film avec le nombre de cellules de la suspension (Figure 29 A) a permis d'établir une courbe de calibration en traçant la résistance relative en fonction de la concentration des MO de la suspension cellulaire (Figure 29 B). La résistance relative varie linéairement ( $R^2 = 0.9689$ ) en fonction de la concentration cellulaire entre 1000-100 000 cellules/mL.

Cependant il apparait clairement que le comportement du capteur se différencie pour les basses et hautes concentrations cellulaires. Une analyse plus fine des résultats a été réalisée en traçant la variation de la résistance du film en fonction du logarithme de la concentration de cellules. La courbe obtenue (Figure 29 C) présente alors deux segments bien distincts. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par Wang et *al.*<sup>29</sup> pour le piégeage de cellules cancéreuses sur des particules d'or.



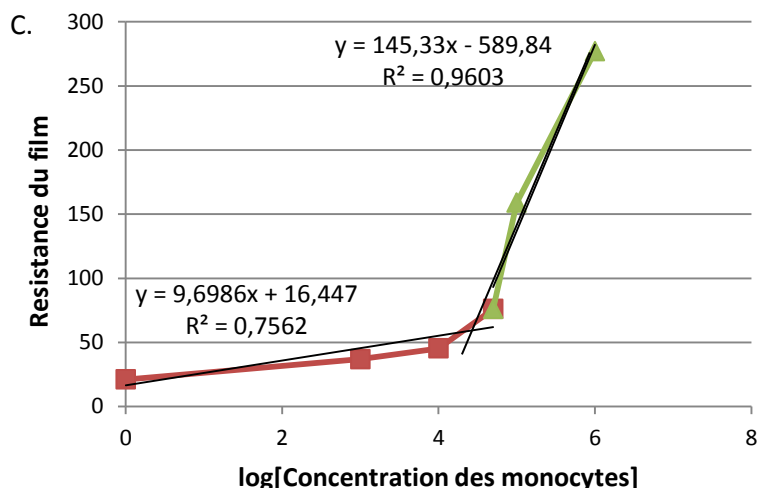


Figure 29 : A. Résistance de transfert de charge en fonction des différentes concentrations des monocytes ; B. Variation de la résistance relative du film en fonction de la concentration cellulaire ; C. Variation de la résistance du film en fonction du logarithme de la concentration des monocytes.

L'intersection entre les deux segments obtenus pourrait correspondre au nombre de cellules à partir duquel le piégeage se fait par l'intermédiaire d'empilement de couches et non de piégeage direct sur la surface. D'après la courbe, ce changement se produirait pour 30 000 cellules. Cette théorie expliquerait pourquoi il est possible d'obtenir une variation linéaire même pour de très fortes concentrations de l'ordre de 1 million de cellules. Les résultats sont également cohérents avec le nombre maximum de cellules pouvant se greffer sur l'électrode de 0,04 cm<sup>2</sup>.

En effet, si l'on considère que le diamètre moyen d'une cellule est de 17,5 µm (entre 15 et 20 µm), et que la surface de l'électrode modifiée comporte suffisamment de groupements anticorps pour greffer autant de cellules, une monocouche de cellules serait atteinte à partir de 16 500 cellules. En supposant que le taux de piégeage soit au maximum de 50 % et compte tenu des erreurs sur le comptage du nombre de cellules en suspension, la valeur limite de 30 000 cellules à partir duquel le greffage ne se ferait plus de la même manière est tout à fait plausible.

D'autre part, la déviation relative standard due au piégeage des cellules sur l'immunocapteur est calculée en mesurant les réponses de cinq électrodes après incubation dans une suspension cellulaire de 100 000 cellules/mL. Ce taux de déviation de 24% reste raisonnable étant donné l'hétérogénéité de la morphologie des cellules piégées.

Ainsi, les résultats obtenus sont très encourageants pour envisager l'utilisation d'un tel capteur pour le diagnostic précoce compte tenu de sa capacité de l'immunocapteur impédimétrique à piéger de manière quantitative les cellules, de 1000 à 30 000 monocytes dans une suspension cellulaire homogène. En effet, le nombre de monocytes inflammatoires

peut atteindre, chez une personne atteinte d'une maladie infectieuse, environ 50 % des MO total soit entre 50 000 et 500 000 par millilitre de sang total. Compte tenu du taux de piégeage et des dilutions que subira l'échantillon avant d'être analysé sur l'électrode, la gamme d'analyse de l'immunocapteur est cohérente avec l'utilisation escomptée.

## Conclusion

Cette étude a permis de valider, par l'intermédiaire de techniques électrochimiques, piézoélectrique et microscopique, un protocole de bio-fonctionnalisation d'électrodes d'or par des anticorps *via* l'utilisation de couches autoassemblées associée à une protéine d'adhésion (Figure 30).

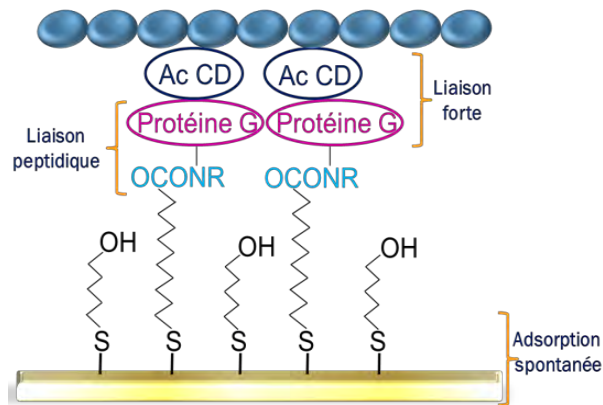


Figure 30 : Schéma du protocole de fonctionnalisation des électrodes d'or.

La modification par des anticorps capables de se lier spécifiquement à l'antigène correspondant de la membrane de la cellule a permis le piégeage immuno-sélectif et quantitatif de monocytes (sains ou infectés).

Les mesures d'impédance ainsi que les modélisations correspondantes ont permis de définir la variation de la résistance du film en mode non faradique comme un bon indicateur du piégeage. Une relation linéaire entre la résistance du film et le logarithme du nombre de cellules en solution a été obtenue entre 1000 et 30 000 cellules pour des électrodes de 0,04 cm<sup>2</sup>. Cette gamme de détection est cohérente avec le nombre de monocytes dans le sang total et par conséquent avec l'application envisagée. En effet, l'utilisation d'un tel capteur pour le diagnostic précoce des infections est tout à fait plausible compte tenu de sa possibilité de descendre très bas en nombre de cellules détectées.

En vue de l'intégration du système de piégeage dans un dispositif microfluidique, le protocole ainsi mis au point doit maintenant être transposé à un système de microélectrodes contenues dans une canalisation.

## Bibliographie

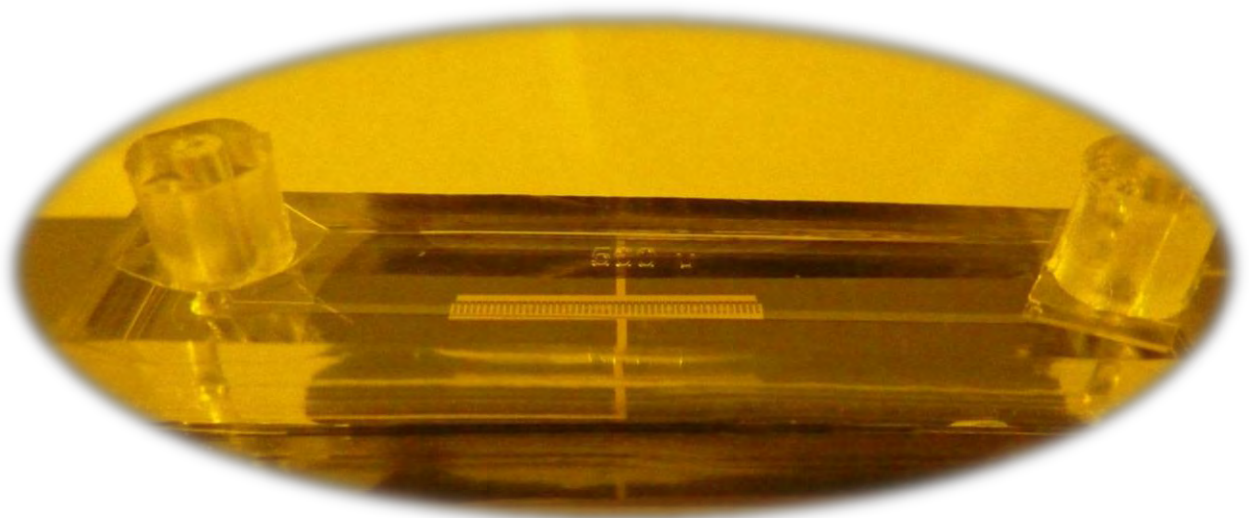
- <sup>1</sup> C. Ribaut, K. Reybier, O. Reynes, J. Launay, A. Valentin, P. L. Fabre, et F. Nepveu, « Electrochemical impedance spectroscopy to study physiological changes affecting the red blood cell after invasion by malaria parasites », *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24, 8, 2721-2725.
- <sup>2</sup> B. Torbiero, « Développement de microcapteurs électrochimiques pour l'analyse en phase liquide », INSA de Toulouse, 2006.
- <sup>3</sup> B. Torbiéro, M. L. Pourciel-Gouzy, I. Humenyuk, J. B. Doucet, A. Martinez, et P. Temple-Boyer, « Mass patterning of polysiloxane layers using spin coating and photolithography techniques », *Microelectronics Journal*, 2006, 37, 2, 133-136.
- <sup>4</sup> C. Ribaut, K. Reybier, B. Torbiero, J. Launay, A. Valentin, O. Reynes, P.-L. Fabre, et F. Nepveu, « Strategy of red blood cells immobilisation onto a gold electrode: Characterization by electrochemical impedance spectroscopy and quartz crystal microbalance », *IRBM*, 2008, 29, 2-3, 141-148.
- <sup>5</sup> S. Sam, L. Touahir, J. Salvador Andresa, P. Allongue, J.-N. Chazalviel, A. C. Gouget-Laemmel, C. Henry de Villeneuve, A. Moraillon, F. Ozanam, N. Gabouze, et S. Djebbar, « Semiquantitative Study of the EDC/NHS Activation of Acid Terminal Groups at Modified Porous Silicon Surfaces », *Langmuir*, 2010, 26, 2, 809-814.
- <sup>6</sup> Y. M. Bae, B.-K. Oh, W. Lee, W. H. Lee, et J.-W. Choi, « Study on orientation of immunoglobulin G on protein G layer », *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 21, 1, 103-110.
- <sup>7</sup> E. Briand, M. Salmain, J.-M. Herry, H. Perrot, C. Compère, et C.-M. Pradier, « Building of an immunosensor: How can the composition and structure of the thiol attachment layer affect the immunosensor efficiency? », *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 22, 3, 440-448.
- <sup>8</sup> A. A. Pupim Ferreira, C. Sadao, H. Yamanaka, et A. Vicente, « Preparation and Characterization of Immunosenors for Disease Diagnosis », in *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity*, P. A. Serra, Éd. InTech, 2011.
- <sup>9</sup> B. Trémillon, *Electrochimie analytique et réactions en solution: manuel d'enseignement niveau 2e et 3e cycles et formation d'ingénieur*. Masson, 1993.
- <sup>10</sup> D. Lincot et T. Pauporte, *Microbalance a Cristal de Quartz*. Ed. Techniques Ingénieur, 2006.
- <sup>11</sup> E. Delamarche, B. Michel, H. A. Biebuyck, et C. Gerber, « Golden interfaces: The Surface of Self-Assembled Monolayers », *Advanced Materials*, 1996, 8, 9, 719-729.
- <sup>12</sup> C.-S. Lu et O. Lewis, « Investigation of film-thickness determination by oscillating quartz resonators with large mass load », *Journal of Applied Physics*, 1972, 43, 11, 4385-4390.
- <sup>13</sup> F. S. Damos, R. C. S. Luz, et L. T. Kubota, « Determination of Thickness, Dielectric Constant of Thiol Films, and Kinetics of Adsorption Using Surface Plasmon Resonance », *Langmuir*, 2005, 21, 2, 602-609.
- <sup>14</sup> K. D. Jandt, « Atomic force microscopy of biomaterials surfaces and interfaces », *Surface Science*, 2001, 491, 3, 303-332.
- <sup>15</sup> S. Helali, « Conception et réalisation de matériaux biofonctionnels pour des dispositifs capteurs impédimétriques », Ecole centrale de Lyon, 2005.
- <sup>16</sup> M. C. Salvadori, L. L. Melo, A. R. Vaz, R. S. Wiederkehr, F. S. Teixeira, et M. Cattani, « Platinum and gold thin films deposited by filtered vacuum arc: morphological and crystallographic grain sizes », *Surface and Coatings Technology*, 2006, 200, 9, 2965-2969.
- <sup>17</sup> S. H. Cho, D. Kim, et S.-M. Park, « Electrochemistry of conductive polymers », *Electrochimica Acta*, 2008, 53, 11, 3820-3827.
- <sup>18</sup> S. Chen, L. Liu, J. Zhou, et S. Jiang, « Controlling Antibody Orientation on Charged Self-Assembled Monolayers », *Langmuir*, 2003, 19, 7, 2859-2864.
- <sup>19</sup> D. K. Schwartz, « Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation », *Annual Review of Physical Chemistry*, 2001, 52, 107-137.

- <sup>20</sup> F. Schreiber, « Structure and growth of self-assembling monolayers », *Progress in Surface Science*, 2000, 65, 5-8, 151-257.
- <sup>21</sup> V. Tsouti, C. Boutopoulos, I. Zergioti, et S. Chatzandroulis, « Capacitive microsystems for biological sensing », *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 27, 1, 1-11.
- <sup>22</sup> M. I. Prodromidis, « Impedimetric immunosensors—A review », *Electrochimica Acta*, 2010, 55, 14, 4227-4233.
- <sup>23</sup> D. Strauss-Ayali, S. M. Conrad, et D. M. Mosser, « Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection », *Journal of Leukocyte Biology*, 2007, 82, 2, 244-252.
- <sup>24</sup> L. Yang, « Electrical impedance spectroscopy for detection of bacterial cells in suspensions using interdigitated microelectrodes », *Talanta*, 2008, 74, 5, 1621-1629.
- <sup>25</sup> B. A. Boukamp, « Interpretation of an 'inductive loop' in the impedance of an oxygen ion conducting electrolyte/metal electrode system », *Solid State Ionics*, 2001, 143, 1, 47-55.
- <sup>26</sup> V. Lvovich, S. Srikanthan, et R. L. Silverstein, « A novel broadband impedance method for detection of cell-derived microparticles », *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 26, 2, 444-451.
- <sup>27</sup> E. T. McAdams, J. Jossinet, R. Subramanian, et R. G. E. McCauley, « Characterization of gold electrodes in phosphate buffered saline solution by impedance and noise measurements for biological applications », in *28th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2006. EMBS '06*, 2006, 4594 -4597.
- <sup>28</sup> K. C. Cheung, M. Di Berardino, G. Schade-Kampmann, M. Hebeisen, A. Pierzchalski, J. Bocsi, A. Mittag, et A. Tárnok, « Microfluidic impedance-based flow cytometry », *Cytometry A*, 2010, 77, 7, 648-666.
- <sup>29</sup> R. Wang, J. Di, J. Ma, et Z. Ma, « Highly sensitive detection of cancer cells by electrochemical impedance spectroscopy », *Electrochimica Acta*, 2012, 61, 179-184.

# Chapitre 4

---

## Intégration de l'immunocapteur dans un dispositif microfluidique





## ***Intégration de l'immunocapteur dans un dispositif microfluidique***

|   |            |
|---|------------|
| <b><i>Introduction</i></b> .....  | <b>137</b> |
| <b>I. Miniaturisation des électrodes d'or</b> .....                                 | <b>137</b> |
| I.1. Méthodes générales de fabrication des microélectrodes <sup>1</sup> .....       | 137        |
| I.1.1. La définition des motifs.....  | 138        |
| I.1.2. La métallisation .....   | 138        |
| I.1.3. La structuration des électrodes .....  | 140        |
| I.1.4. La passivation.....  | 141        |
| I.2. Fabrication des microélectrodes d'or du système électrochimique .....          | 142        |
| I.2.1. Choix du design des microélectrodes .....                                    | 142        |
| I.2.2. Choix du procédé technologique .....   | 144        |
| I.2.3. Procédés de fabrication réalisés .....                                       | 145        |
| <b>II. Validation de la miniaturisation de l'immunocapteur impédimétrique</b> ..... | <b>149</b> |
| II.1. Caractérisation des microélectrodes du procédé 1.....                         | 149        |
| II.2. Caractérisation des microélectrodes du procédé 2.....                         | 151        |
| II.2.1. En mode faradique.....  | 151        |
| II.2.2. En mode non faradique.....  | 151        |
| <b>III. Fabrication du dispositif microfluidique</b> .....                          | <b>153</b> |
| III.1. Fabrication de la canalisation microfluidique .....                          | 153        |
| III.1.1. Fabrication du moule en SU-8 par photolithographie .....                   | 154        |
| III.1.2. Moulage du dispositif microfluidique .....                                 | 155        |
| III.2. Assemblage des microélectrodes et de la canalisation .....                   | 155        |
| III.3. Perspectives de l'intégration des microélectrodes .....                      | 156        |
| <b><i>Conclusion</i></b> .....  | <b>158</b> |
| <b><i>Bibliographie</i></b> .....   | <b>159</b> |

## Introduction

Le travail de thèse s'intègre dans un projet plus large qui consiste à réaliser un laboratoire sur puce pour le tri et le comptage de sous population cellulaire composé de deux modules : le module 1 qui permet le tri magnétique des cellules marquées par des billes magnétiques (cf. Annexe III) et le module 2 qui permet un tri immunologique et quantitatif d'une sous population cellulaire des cellules marquées. Ces deux modules complémentaires sont développés séparément de manière à valider leur principe et leur faisabilité.

Le principe de détection sélective et quantitative d'une sous-population cellulaire a été validé par spectroscopie d'impédance sur des électrodes macroscopiques dans le chapitre précédent. Afin d'une part de pouvoir combiner l'immunocapteur impédimétrique au module de tri magnétique dans un dispositif intégré et d'autre part d'améliorer les taux de piégeage, le système de détection impédimétrique doit dans un premier temps être miniaturisé, puis intégré dans une canalisation microfluidique.

Ce chapitre, dédié à la miniaturisation de l'immunocapteur, présentera dans une première partie les différentes technologies utilisées pour la fabrication des microélectrodes, puis détaillera le design et le procédé de fabrication des microélectrodes du système électrochimique pour l'application visée. La seconde partie sera consacrée à la caractérisation par spectroscopie d'impédance électrochimique des étapes de modification et du piégeage cellulaire de ces microélectrodes. Enfin, l'intégration des microélectrodes dans une canalisation microfluidique sera présentée dans une troisième partie.

### I. Miniaturisation des électrodes d'or

L'intégration de l'immunocapteur dans un dispositif microfluidique suppose la miniaturisation de l'ensemble des électrodes du système électrochimique. Les microélectrodes ont été fabriquées dans la salle blanche du LAAS. Le choix du système d'électrodes et du procédé de fabrication des microélectrodes pouvant influencer les mesures électrochimiques.

#### I.1. Méthodes générales de fabrication des microélectrodes<sup>1</sup>

Les technologies de la microélectronique se sont développées et adaptées à l'électrochimie pour permettre la fabrication d'électrodes avec des matériaux classiques tels que les métaux nobles et le carbone. Les étapes générales de fabrication des électrodes sont la définition des motifs, la métallisation, la structuration des électrodes et la passivation.

### ***1.1.1. La définition des motifs***

La définition des motifs est réalisée par photolithographie. Cette technique est la base de toute conception de système d'électrodes et permet de transférer les motifs des électrodes d'un masque sur le substrat. Le masque est une plaque de verre ou de quartz métallisée au chrome sur lequel est dessiné le motif des éléments à réaliser dans les dimensions réelles. En fonction de la nature de l'étape, élimination ou dépôt d'un matériau, et de la polarité de la résine, les motifs sont soit transparents soit métallisés.

La photolithographie consiste à recouvrir le substrat avec une résine photosensible puis, après insolation de la résine à travers le masque contenant les motifs, à transférer ce motif sur ce dernier. La composition chimique et la solubilité de la résine dans les solvants, appelés développeurs ou révélateurs, varient suivant la polarité de la résine.

Pour une résine positive, les parties insolées sont dégradées et dissoutes dans le révélateur. Dans le cas d'une résine négative, la résine polymérise et réticule à la lumière et les parties insolées sont insolubles dans le révélateur. Enfin, il existe des résines réversibles qui, sous l'action de la lumière, se comportent soit comme une résine positive soit comme une résine négative. Après élimination de la résine grâce aux développeurs et/ou révélateurs, les motifs de l'électrode sont créés sur le substrat.

La photolithographie peut être réalisée aussi bien pour la définition des motifs de l'électrode que pour la définition de la couche la passivation qui définit les zones actives de l'électrode.

### ***1.1.2. La métallisation***

Lorsque les matériaux des électrodes sont des matériaux massifs, leur intégration par les techniques de la microélectronique implique les technologies de type couches minces. Les technologies « films minces » sont des dépôts d'épaisseur comprise entre quelques nanomètres et 10  $\mu\text{m}$ . Leur dépôt peut se faire soit en phase vapeur par voie physique ou chimique, soit en phase liquide.

#### ***1.1.2.a. Les dépôts physiques à phase vapeur***

Les dépôts physiques à phase vapeur, appelé Physical Vapor Deposition (PVD), représentent la méthode la plus répandue pour réaliser les matériaux d'électrodes. Les deux principales techniques sont l'évaporation et la pulvérisation cathodique.

L'évaporation consiste à porter dans une enceinte sous vide le matériau à déposer à haute température afin d'obtenir sa condensation sur le substrat. Le chauffage du matériau à déposer peut être réalisé par effet Joules ou par canon à électrons. Ce procédé est très utilisé pour déposer des métaux et alliages métalliques.

La pulvérisation cathodique opère à plus basse température : les atomes du matériau à déposer sont arrachés par le bombardement des ions du plasma généré dans l'enceinte sous vide, puis se condensent sur le substrat. Différents matériaux d'électrodes comme le platine, l'or et l'argent sont généralement réalisés par ce type de procédé.

#### I.1.2.b. Les dépôts chimiques à phase vapeur

Ces procédés chimiques à phase vapeur, dits Chemical Vapor Deposition (CVD), se distinguent des procédés de dépôt physique par la présence de réactions chimiques. Le substrat est placé dans un réacteur dans lequel des molécules sous forme gazeuse réagissent. Ces réactions peuvent avoir lieu à la surface du substrat ou en phase gazeuse ; dans ce dernier cas, les produits issus de la réaction se condensent à la surface du substrat.

La CVD se décline sous différentes catégories en fonction des paramètres de pression, de température ou d'énergies mises en œuvre pour réaliser le dépôt : citons par exemple le dépôt à basse pression, appelé Low Pressure Chemical Vapor Deposition (LPVD) ou assisté par plasma, dit Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition (PECVD).

Les techniques CVD permettent de déposer une grande variété de matériaux qui peuvent être des conducteurs ou des isolants, des métaux ou des alliages. Cependant, les réactifs et les produits de réaction pouvant être dangereux ou toxiques, la CVD est moins utilisée car elle présente plus de risques et est plus onéreuse.

#### I.1.2.c. Les dépôts en phase liquide

D'autres procédés chimiques et électrochimiques permettent de déposer des couches minces à partir d'une phase liquide. Dans les deux cas, une ou plusieurs réactions chimiques spontanées ou contrôlées par électrodéposition ont lieu à la surface du substrat plongé dans un électrolyte et entraînent la croissance d'une couche du matériau à déposer sur les zones dépourvues de résine.

Contrairement aux dépôts chimiques, l'électrodéposition est limitée aux matériaux conducteurs d'électrons et nécessite au préalable une structure permettant le contact électrique entre le substrat et la source de tension ou de courant. Cette technique permet de former des films uniformes de métaux tels que l'or et le nickel, avec une épaisseur contrôlée variant de 1 à 100  $\mu\text{m}$ .

A la différence des dépôts en phase vapeur, la métallisation n'a pas lieu sur toute la surface de la plaquette et ne nécessite pas d'étape de structuration des électrodes.

### 1.1.3. La structuration des électrodes

La structuration des électrodes est nécessaire suite au dépôt du matériau de l'électrode en phase vapeur sur tout le substrat. Deux procédés principaux sont utilisés : la gravure et le lift-off.

#### 1.1.3.a. La gravure

L'étape de gravure peut être réalisée par gravure sèche ou par gravure humide.

La gravure sèche repose sur les effets d'un bombardement d'ions dans un plasma sur le matériau. La technique la plus utilisée est la gravure à ions réactifs, appelée Reactive Ion Etching (RIE), qui combine une gravure plasma et une réaction chimique entre des radicaux et le matériau à graver. Elle permet de graver le silicium, ses oxydes, ses nitrures, des polymères et d'autres matériaux tels que le diamant.

La gravure par voie humide utilise des réactifs en milieu liquide pour éliminer le matériau. Ce procédé permet, après métallisation de toute la surface du substrat, de créer les motifs de l'électrode par masquage sélectif du matériau *via* une photolithographie et par élimination des parties du matériau dépourvues de protection (Figure 1). Les parties du matériau non protégées sont éliminées grâce à des réactions d'oxydo-réduction pour les métaux et des réactions acido- basiques pour les oxydes inorganiques, les produits de réactions étant des sels solubles ou des complexes. La résine restante est ensuite retirée et les électrodes sont ainsi structurées.

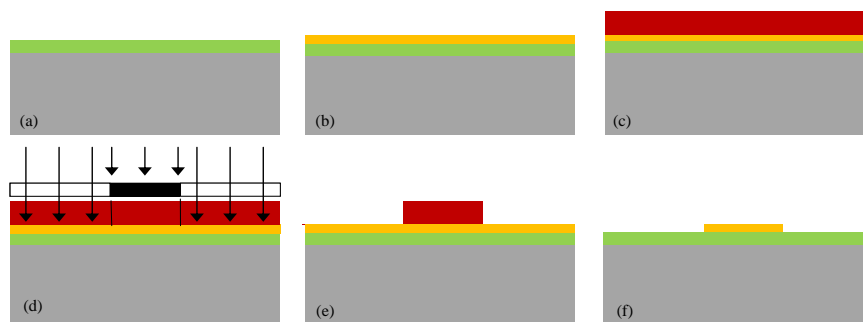


Figure 1 : Etapes technologiques du procédé de gravure humide : (a) Substrat recouvert d'une couche d'oxyde ; (b) métallisation ; (c) dépôt puis recuit d'une résine photosensible positive; (d) insolation de la résine photosensible et impression du motif ; (e) développement de la résine et apparition du profil du motif ; (f) gravure humide du matériau et enlèvement de la résine restante.

#### 1.1.3.b. Le lift-off

Ce procédé est l'un des plus cités pour la fabrication de microélectrodes. Il se décompose en trois phases : la définition des motifs des électrodes sur la résine par photolithographie, la métallisation du matériau sur tout le substrat et la libération de l'électrode par élimination

de la résine sous-jacente au métal. La disparition du métal sur les zones où la résine est présente sur le substrat permet ainsi la structuration des électrodes (Figure 2).

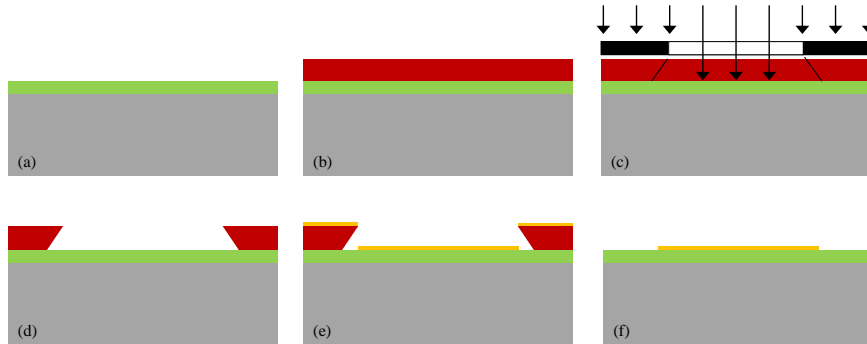


Figure 2 : Etapes technologiques du procédé de lift-off : (a) Substrat recouvert d'une couche d'oxyde ; (b) dépôt puis recuit d'une résine photosensible positive; (c) insolation de la résine photosensible et impression du motif ; (d) révélation de la résine et apparition du profil du motif ; (e) métallisation ; (f) enlèvement de la résine et obtention du motif désiré.

#### 1.1.4. La passivation

La couche de passivation permet d'isoler les couches conductrices et de définir les surfaces actives des électrodes et les plots de contact. Elle doit avoir de bonnes propriétés d'isolation électrique, d'adhérence sur les matériaux sous-jacents et être chimiquement inerte. Les principaux matériaux d'isolation utilisés peuvent être inorganiques ou organiques.

##### 1.1.4.a. Les matériaux inorganiques

Les matériaux diélectriques ou isolants inorganiques les plus utilisés sont l'oxyde de silicium ( $\text{SiO}_2$ ) et le nitrure de silicium ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ). Ces matériaux, considérés biocompatibles, se déposent généralement par PECVD suivi d'une étape de gravure pour permettre l'élimination de la couche de passivation des zones insolées, correspondant aux surfaces actives et aux plots de contact des électrodes.

Le nitrure de silicium tend de plus en plus à supplanter l'oxyde de silicium car il constitue une barrière de diffusion plus efficace avec une faible densité de défauts et un recouvrement correct.

##### 1.1.4.b. Les matériaux organiques

Des matériaux polymères, présentant de bonnes propriétés diélectriques, peuvent également être utilisés. Les plus utilisés sont les époxydes, et plus particulièrement la résine photosensible négative, la SU-8 dont la fonction de base est l'Ether Glycidyle du Bisphénol A. Ce polymère a l'avantage de présenter une excellente résistance aux produits chimiques et est facilement déposé sur le substrat à l'aide d'une tournette. De plus, la définition des surfaces actives de l'électrode et des plots de contact est réalisée par simple

insolation des zones à passiver. La résine polymérise et réticule sur les zones insolées et disparaît des surfaces actives et des plots de contact des électrodes.

## I.2. Fabrication des microélectrodes d'or du système électrochimique

### I.2.1. Choix du design des microélectrodes

L'impédance peut être mesurée au minimum par deux électrodes : l'électrode de travail et la contre électrode. Des dispositifs de détection dans des systèmes à deux microélectrodes, avec l'électrode de travail en or et la contre électrode en platine, sont d'ailleurs commercialisés par Ayanda Biosystems. Cependant, à la différence des systèmes électrochimiques à trois électrodes avec une référence, la polarisation de l'électrode de travail entraîne la présence d'un potentiel indéterminé et peut conduire à des déviations de mesures (cf. Annexe IV). Les électrodes jouant un rôle prépondérant dans les mesures d'impédance, ces déviations peuvent être limitées en optimisant le design et la géométrie des microélectrodes<sup>2</sup>.

L'influence de la géométrie des électrodes sur les distributions de courant et sur la mesure de l'impédance de cellule unique a été démontrée par Wang *et al.*<sup>2</sup>. En effet, la simulation de quatre formes d'électrodes, parallèles, elliptiques, sous forme de fleurs et de tonnelles, a permis de mettre en évidence le fait que les électrodes parallèles induisent un champ électrique plus uniforme que les autres électrodes avec un maximum localisé près des angles des électrodes. De plus, la comparaison des mesures d'impédances révèlent que les électrodes parallèles présentent la meilleure sensibilité de détection des cellules. Iliescu *et al.*<sup>3</sup> ont confirmé l'uniformité de la distribution électrique des électrodes parallèles par rapport aux électrodes interdigitées et circulaires. Les résultats des mesures d'impédance obtenus dans un dispositif microfluidique avec les électrodes circulaires sont très différents de ceux des électrodes interdigitées et parallèles. C'est pourquoi nous avons choisi de réaliser dans un premier temps des électrodes parallèles et interdigitées.

Une configuration coplanaire des électrodes est préférée compte tenu de leur fabrication plus facile et plus précise par rapport aux électrodes placées en amont et en aval de la canalisation et à celles au-dessous et au-dessus de la canalisation<sup>4</sup>. Toutefois, le positionnement des électrodes sous la canalisation implique une distribution du courant non uniforme dans la canalisation.

Comme présenté dans le cas des macroélectrodes, la surface des électrodes joue un rôle prépondérant sur les mesures d'impédance. En effet, une polarisation interfaciale est observée à la surface de l'électrode entraînant des effets capacitifs proportionnels à la surface de l'électrode. L'impédance des microélectrodes est d'autant plus élevée s'il existe

un défaut à la surface de l'électrode<sup>5</sup>. Le bruit mesuré augmentant avec la diminution de l'électrode, il est important que la contre-électrode soit plus grande que l'électrode de travail car deux électrodes équivalentes modifient le signal.

Enfin, la couche de passivation peut entraîner la présence de capacités parasites à hautes fréquences. De manière à s'affranchir de ces phénomènes, l'épaisseur de la couche de passivation ou la surface des électrodes peuvent être augmentées<sup>5,6</sup>.

Comme le montre la Figure 3 A, représentant le masque des dispositifs réalisés pour cette étude, plusieurs formes d'électrodes planes ont été choisies :

- des électrodes simples (Figure 3 B1),
- des électrodes multiples unitaires, comparables aux électrodes simples, ou couplées pour augmenter la surface active (Figure 3 B2),
- des électrodes interdigitées (Figure 3 B3).

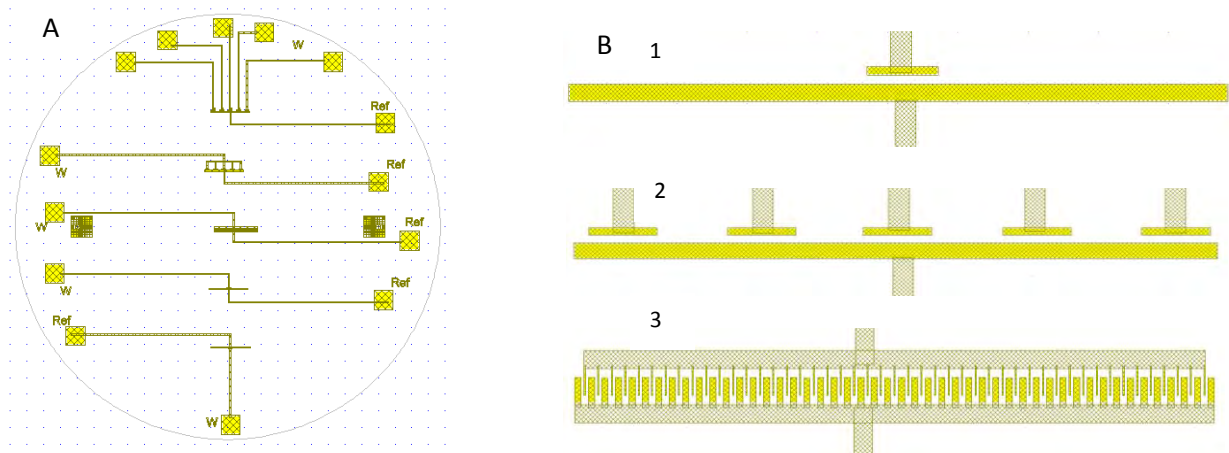


Figure 3 : A/ Masque des motifs des systèmes de microélectrodes comprenant les vias électriques et les plots de connexion ; B/ Représentations des différentes configurations d'électrodes réalisées.

Les électrodes de travail simples mesurent  $125\ \mu\text{m}$  de large et  $1\ \text{mm}$  de long et les contre-électrodes  $250\ \mu\text{m}$  de large et  $1\ \text{cm}$  de long. La surface de l'électrode de travail est alors de  $0,125\ \text{mm}^2$  avec un rapport de surface avec la contre électrode égal à 20. Les électrodes multiples correspondent soit à cinq électrodes simples avec une contre-électrode commune, soit à une électrode ayant une surface cinq fois plus grande que les électrodes simples. Dans ce cas, la surface active totale des électrodes de travail est de  $0,625\ \text{mm}^2$ . Enfin, les électrodes interdigitées représentent une surface de travail de  $0,376\ \text{mm}^2$  pour une contre-électrode de  $1,92\ \text{mm}^2$ , soit un rapport de surfaces égal à 4. Elles sont composées d'une alternance d'électrodes de travail de  $20\ \mu\text{m}$  de large et  $400\ \mu\text{m}$  de long et de contre-électrodes de même longueur et de  $100\ \mu\text{m}$  de large espacées de  $50\ \mu\text{m}$ .



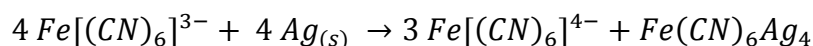
Ces dimensions ont été choisies de manière à pouvoir intégrer les systèmes de microélectrodes dans une canalisation microfluidique de 500 µm de large et 3 cm de long.

### 1.2.2. Choix du procédé technologique

L'objectif est de réaliser un système électrochimique à deux électrodes comprenant une microélectrode de travail et une contre électrode. Ces microélectrodes doivent présenter des réactivités comparables au dispositif électrochimique macroscopique.

De manière à conserver le protocole de biofonctionnalisation, l'électrode de travail est réalisée en or. Ce même métal est aussi utilisé pour la fabrication des pistes de courant. En revanche, en l'absence d'électrode de référence, la contre électrode peut être en argent, en platine ou en or.

Le platine s'oxydant très rapidement en milieu aqueux, l'argent a été choisi dans un premier temps pour limiter l'adhésion des thiols et la fonctionnalisation de la contre électrode par création d'une pseudo-référence en Ag/AgCl. L'électrode d'argent est alors oxydée en chlorure d'argent. Cependant, les systèmes de microélectrodes réalisés en or pour l'électrode de travail et en argent pour la contre électrode ont montré que l'argent déposée sur le substrat réagit avec la solution de mesure de ferri/ferrocyanure. Cette réaction entraîne la disparition et la dissolution de la couche d'argent selon l'équation suivante :



C'est pourquoi l'ensemble des électrodes du dispositif électrochimique est réalisée en or.

Il est important de noter que les métaux nobles n'ont pas de bonnes propriétés d'adhérence avec le matériau en silicium sur lequel ils sont déposés. Il est donc nécessaire de déposer une couche d'accroche en chrome (Cr) ou en titane (Ti). Dans notre cas, une couche d'accroche en Ti de 100 nm d'épaisseur a été déposée sur un substrat de silicium préalablement recouvert d'une couche de nitrure de silicium. La couche d'or de 800 nm d'épaisseur est ensuite déposée par évaporation, procédé très utilisé pour la métallisation en or.

La structuration des électrodes par un procédé lift off est préférée à la gravure qui peut altérer la surface si l'ensemble des solutions d'attaque pour graver les matériaux ne sont pas compatibles avec les différentes technologies employées.

Le matériau d'isolation a été sélectionné en fonction des propriétés attendues, notamment de biocompatibilité et de stabilité. Les matériaux d'isolation les plus utilisés tels que l'oxyde et le nitrure de silicium ou la résine SU-8 sont dits biocompatibles et peuvent tous les trois être utilisés.

La définition des surfaces actives des microélectrodes après dépôt de l'oxyde et du nitrure de silicium nécessite des étapes supplémentaires de gravure pouvant entraîner des modifications et/ou des pollutions de surface, contrairement à la résine SU-8. De plus, les isolations à base de silicium peuvent présenter une fonction barrière insuffisante lorsque les dispositifs sont utilisés dans des solutions : il est possible de détecter des courants de fuite qui peuvent être reliés aux contraintes mécaniques du film et/ou à des défauts ponctuels de la structure.

Les matériaux polymères photosensibles présentent l'avantage de n'impliquer qu'une seule étape de photolithographie, toutefois la passivation avec la résine SU-8 peut présenter des défauts structurels dans le volume de la couche et entraîner une diffusion des sous-couches avec le milieu d'étude<sup>1</sup>.

### *1.2.3. Procédés de fabrication réalisés*

Différents procédés de fabrication ont été réalisés sur substrat de silicium de type P (8-12  $\Omega/\text{cm}$ ) afin d'optimiser les mesures du système de microélectrodes. Le principe du procédé de fabrication restant le même pour les 3 procédés réalisés (Tableau 1) est décrit ci-dessous.

La première étape commune consiste à nettoyer le substrat dans un bain d'acide sulfurique et d'eau oxygénée pour éliminer toute trace organique en surface du silicium. Une fine couche d'oxyde est alors créée pour piéger ces impuretés. Le wafer de silicium est ensuite rincé à l'eau déionisée (EDI) et séché à l'azote avant de subir une attaque chimique pour enlever la couche d'oxyde dans une solution d'acide fluorhydrique (HF) à 10 % pendant 30 secondes. Après rinçage et séchage à l'azote, une couche de nitrure de silicium de 80 nm est déposée à haute température par LPCVD pour isoler électriquement la surface du substrat, le silicium étant un semi-conducteur.

Le wafer recouvert d'une couche de nitrure est nettoyé et soigneusement déshydraté pour l'étape de photolithographie du procédé lift-off, la résine étant sensible à l'humidité. Le substrat subit ensuite un traitement de surface à l'HexaMéthylDiSiloxane (HMDS) afin d'améliorer l'adhérence de la résine photosensible.

La structuration des électrodes en or est faite suivant le procédé de photolithographie « lift off ». Le dépôt de la résine photosensible pour le lift-off, la AZ Nlof 2035, est réalisée à la tournette à une vitesse et un temps définie pour obtenir un film parfaitement adhérent au substrat et d'une épaisseur uniforme de 2,5  $\mu\text{m}$ . L'ensemble est pré-recuit afin d'éliminer les solvants résiduels, d'améliorer l'adhérence et de supprimer les contraintes. Le masque, définissant les motifs des systèmes d'électrodes, est aligné sur le substrat et la structure est insolée par des radiations ultraviolettes. Cette insolation permet de créer une image latente du masque dans la résine (Figure 4 A : 1<sup>er</sup> niveau du masque). Le substrat est à nouveau

recuit et la résine est développée à l'aide d'une solution de révélation qui permet d'éliminer les parties solubles correspondant aux zones non insolées à métalliser. Après rinçage et séchage à l'azote, une autre étape de recuit, le post-recuit, permet d'éliminer les solvants résiduels, d'augmenter l'adhérence et d'accroître la résistance de la résine aux agents chimiques.

Le substrat contenant les motifs du masque est ensuite entièrement recouvert soit dans le cas du process 1 d'une couche de Titane-Or (100/800 nm) soit d'une couche de Titane-Platine-Or (50/50/800 nm) pour les deux autres procédés. Comme précisé précédemment, la couche de titane permet d'augmenter l'adhérence de l'or sur le nitrure de silicium. La couche de platine permet quant à elle de minimiser les phénomènes d'interdiffusion du titane dans la couche d'or qui dégraderaient la surface de l'électrode à hautes températures<sup>7,8</sup>.

Le dépôt métallique présente des discontinuités au niveau des ouvertures de la résine, ce qui facilite l'étape de libération en permettant à l'acétone d'être en contact avec une grande surface de résine.

Une couche de passivation est ensuite réalisée pour isoler les lignes de contact et les flancs des électrodes. La couche d'isolation est composée suivant le procédé soit de l'oxyde de silicium (process 1) soit de nitrure de silicium déposé à basse température (process 2 et 3).

Dans le cas de l'oxyde de silicium, un dépôt d'épaisseur 500 nm est réalisé pour passiver l'ensemble du wafer. Le dépôt PECVD est suivi d'une étape de photolithographie pour permettre la gravure chimique des électrodes dans une solution d'acide fluorhydrique tamponné (Buffered HydroFluoric acid : BHF). La résine est présente sur tout le wafer sauf sur les zones actives et les zones de contact des électrodes (Figure 4 B : 2<sup>ème</sup> niveau de masque) qui sont libérées par attaque chimique.

Dans le cas du nitrure de silicium, un procédé lift off est réalisé. Pour cela, une première résine photosensible est déposée à l'aide d'une tournette puis l'ensemble est recuit avant l'induction de la seconde résine photosensible. Le substrat est ensuite recuit et insolé à travers le 2<sup>ème</sup> niveau de masque (Figure 4 B). Après développement des deux résines, les zones actives et de contact des électrodes sont protégées et les résines sont éliminées des zones devant être passivées. Un dépôt de 200 nm (process 2) ou 80 nm (process 3) de nitrure de silicium est réalisé en phase vapeur couplée inductivement au plasma (appelé Inductivity Coupled Plasma Chemical Vapor Deposition : ICP-CVD) à 90 °C. Cette technique de dépôt à basse température présente l'avantage de limiter la diffusion des atomes des différents métaux constituant la couche métallique. De plus, il n'y a pas de gravure chimique susceptible d'altérer la surface des électrodes, puisqu'une étape d'élimination de la résine dans différents solvants permet d'enlever la couche de nitrure des zones actives et de

contact. Cette étape de libération est très longue et est répétée jusqu'à ce que toute la résine ait disparue des ouvertures. Les systèmes d'électrodes obtenus après libération de la résine sont présentés sur la Figure 4 C. Enfin, le wafer est coupé à l'aide d'un stylo diamant de manière à individualiser chaque système d'électrodes.

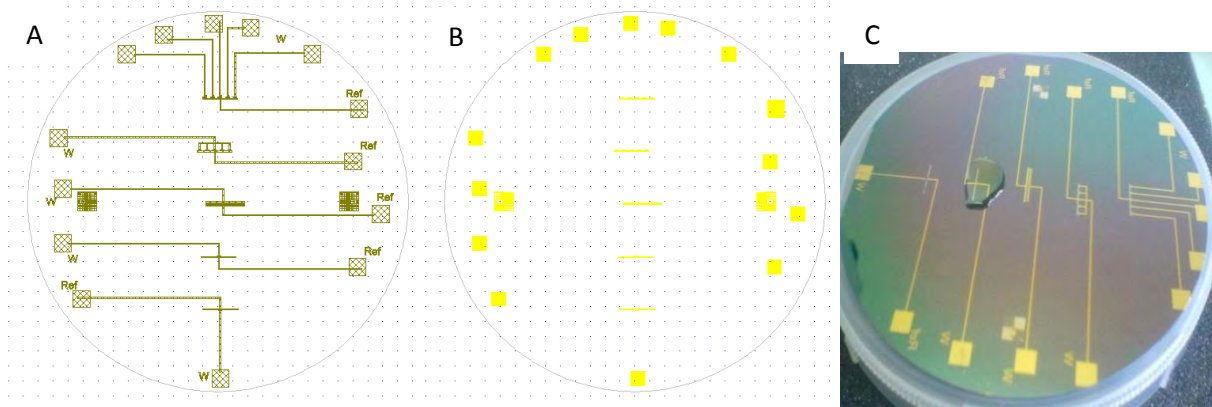
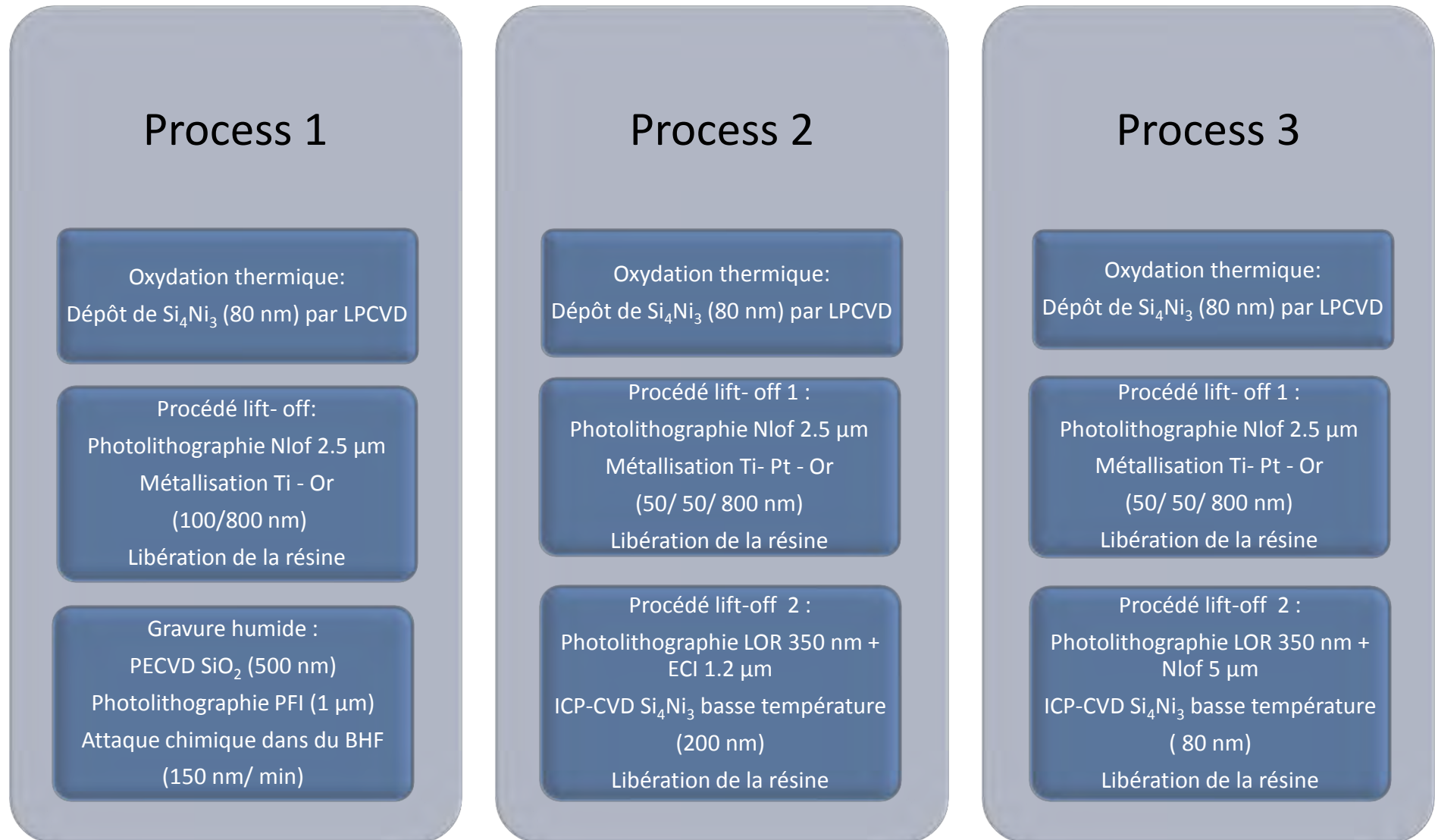


Figure 4 : A/ Motifs des microélectrodes et des pistes de contact sur le 1<sup>er</sup> niveau de masque ; B/ Ouverture des zones actives et des pads de contact sur le 2<sup>ème</sup> niveau de masque ; C/ Photographie du substrat sur lequel les systèmes d'électrodes ont été structurés.

Précisons que le process 3 est équivalent au process 2 et qu'il a été développé suite à un changement du réacteur de dépôt du nitrure de silicium. Le nouveau réacteur déposant des couches de nitrures beaucoup plus compactes que le précédent, la libération des électrodes est devenue très difficile et incomplète. C'est pourquoi un nouveau process utilisant des résines adaptées au lift-off et une couche de nitrure moins épaisse a été réalisé.

Tableau 1 : Récapitulatif des principales étapes des procédés de fabrication des microélectrodes réalisées



## II. Validation de la miniaturisation de l'immunocapteur impédimétrique

Suite à leur fabrication, les systèmes d'électrodes ont ensuite été caractérisés et fonctionnalisés de manière à démontrer leur capacité à piéger et à détecter les cellules par impédancemétrie avant de les intégrer dans un dispositif microfluidique. Des mesures préliminaires de spectroscopie d'impédance électrochimique ont alors été réalisées sur un microsystème ouvert, c'est à dire dépourvu de la canalisation en PDMS.

Avant toute caractérisation, les microélectrodes sont soigneusement nettoyées à l'acétone et à l'éthanol, puis rincées à l'eau déionisée avant d'être séchées sous un flux d'azote. Les mesures électrochimiques sont réalisées dans une goutte de 200  $\mu\text{L}$  comprenant un système à trois électrodes, le système de microélectrodes en or composé d'une électrode de travail et d'une contre-électrode et une électrode de référence au calomel saturé (ECS) plongée dans la solution de mesure (Figure 5).

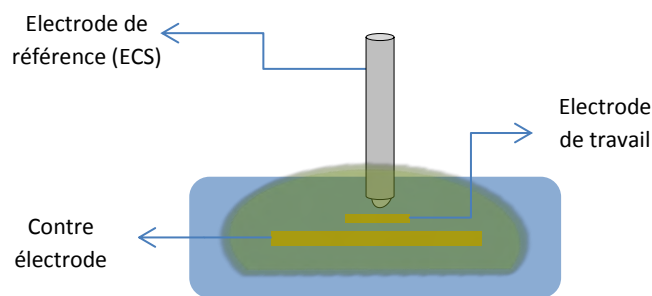


Figure 5: Schéma de mesure électrochimique

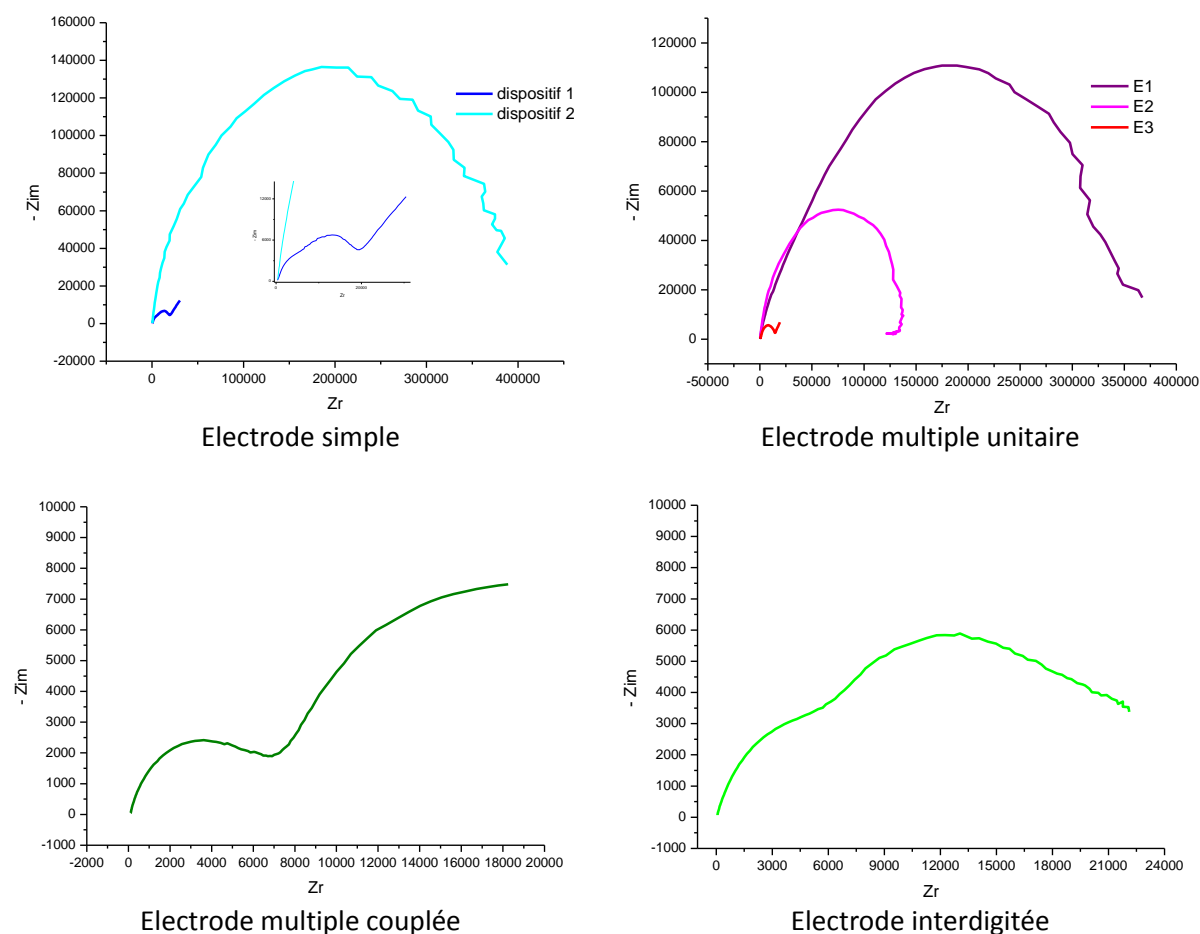
La fonctionnalisation des microélectrodes des dispositifs dépourvus de canalisation se fait, comme précédemment, par dépôt de microgouttes de 40  $\mu\text{L}$ . Cependant, les deux microélectrodes d'or (travail et contre-électrode) du système électrochimique sont fonctionnalisées simultanément. Des mesures d'impédance sur des macroélectrodes après modification à la fois de l'électrode de travail et de la contre électrode ont permis de montrer qu'en présence d'une électrode de référence la modification de la contre électrode n'avait pas d'influence sur les résultats (cf. Annexe V).

### II.1. Caractérisation des microélectrodes du procédé 1

Les microélectrodes réalisées suivant le procédé 1 ont été caractérisées dans une solution de PBS à pH = 7,4 contenant 5 mM de ferri/ferrocyanure ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  (1: 1)).

Les diagrammes de Nyquist obtenus pour les électrodes d'or nu de chaque configuration de système d'électrodes appartenant à un même substrat sont présentés dans le Tableau 2.

**Tableau 2 : Diagrammes de Nyquist obtenus pour chaque système d'électrodes réalisé selon le process 1 dans une solution de PBS à pH = 7,4 contenant 5 mM de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ .**



Les courbes d'impédance de l'or nu des différentes configurations font apparaître des variations aléatoires de l'impédance traduisant des défauts de fabrication. En effet, les électrodes simples ou multiples unitaires montrent que l'or nu présente soit un diamètre de demi-cercle très grand, c'est-à-dire une résistance de transfert de charge élevée, soit un pseudo demi-cercle suivi d'une droite. De plus, deux demi-cercles sont clairement visibles pour les autres configurations montrant la présence de deux couches distinctes à la surface des microélectrodes. Le fait que deux électrodes de même configuration et de même surface positionnées sur différentes zones du substrat présentent des caractéristiques électriques différentes traduit une mauvaise libération des zones actives lors de l'étape de gravure chimique, certaines électrodes étant alors encore recouvertes d'oxyde de silicium. L'hétérogénéité de la surface d'or pourrait également provenir de la diffusion de la sous couche de titane dans la couche d'or lors de l'étape de passivation à hautes températures.

Les défauts des microélectrodes d'or peuvent être palliés en modifiant le procédé de fabrication de manière à optimiser la libération des surfaces actives et à limiter l'utilisation des hautes températures.

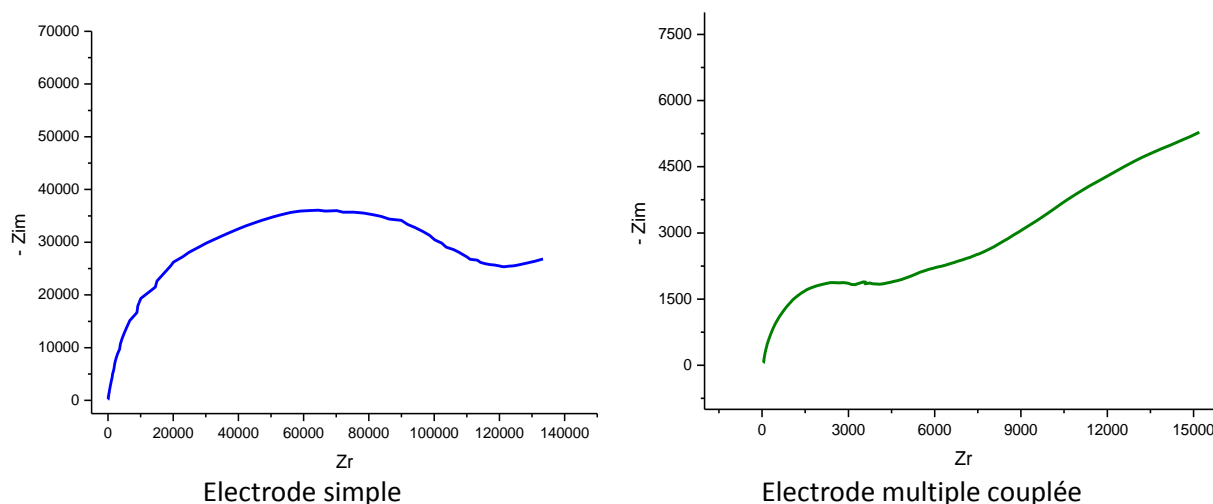
## II.2. Caractérisation des microélectrodes du procédé 2

Dans le procédé 2, une couche de platine est ajoutée pour limiter la diffusion du titane et les procédés à basses températures sont préférés. Le dépôt PECVD à 800 °C d'oxyde de silicium est alors remplacé par un dépôt ICP-CVD à 100 °C de nitrure de silicium utilisant une libération par lift – off des surfaces actives.

### II.2.1. En mode faradique

La caractérisation de l'or nu des microélectrodes réalisées suivant le procédé 2 a permis de valider le bon fonctionnement de ces dernières (Tableau 3).

Tableau 3 : Diagrammes de Nyquist obtenus pour les systèmes d'électrodes simples et multiples réalisés selon le process 2 dans une solution de PBS à pH = 7,4 contenant 5 mM de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ .



Dans les deux cas, les diagrammes de Nyquist présentent un demi-cercle suivi d'une droite, ce qui est conforme aux résultats obtenus pour une électrode plongée dans une solution contenant un couple redox.

### II.2.2. En mode non faradique

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'étude de l'interaction des monocytes (MO) avec les anticorps greffés sur les électrodes est réalisée par SIE dans le PBS en l'absence de sonde redox. Les diagrammes de Nyquist et de Bode obtenus dans ces mêmes conditions après chaque étape de la biofonctionnalisation et après immobilisation de la couche cellulaire sur un système de microélectrodes simples sont présentés Figure 6.

Tout comme les diagrammes de Nyquist enregistrés dans le PBS pour les électrodes macroscopiques, la couche cellulaire ci-dessous, correspondant au piégeage des monocytes



activés sur des anticorps CD 16, se différencie nettement du système multicouche de la fonctionnalisation.

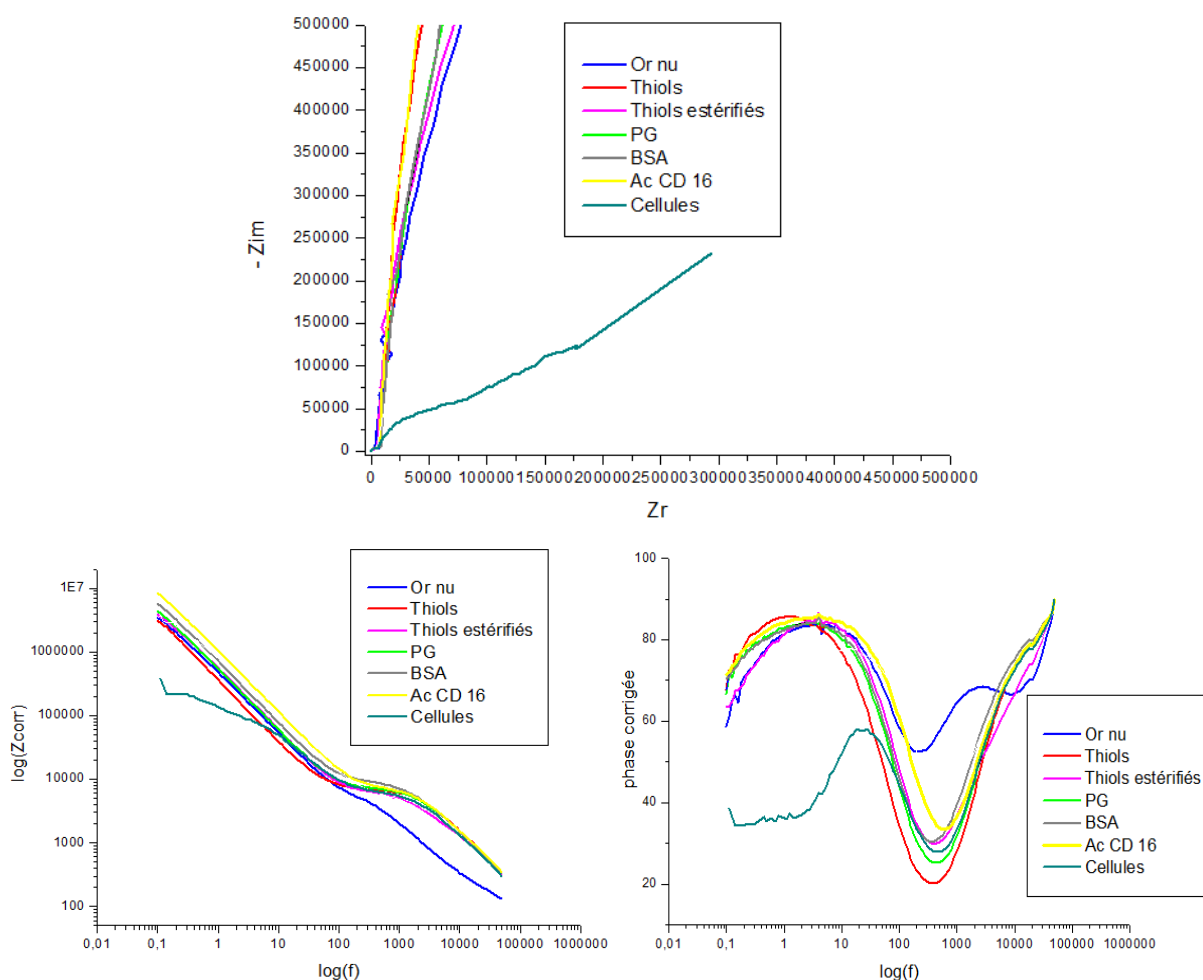


Figure 6 : Diagrammes de Nyquist et de Bode obtenus dans une solution de PBS à pH = 7,4 pour un système d'électrodes simples d'or nu (0.125 mm<sup>2</sup>) (—) ; recouverte de SAMs mixtes (—) ; après activation des SAMs (—) ; après immobilisation de la PG (—) ; puis saturation de l'électrode modifiée par la BSA (—) ; après greffage des anticorps CD14 (—) ; et après piégeage des monocytes (—).

Une analyse rapide des courbes en calculant la variation relative de l'impédance due au piégeage des cellules a ensuite été réalisée à une fréquence de 200 mHz sur le diagramme de Bode. Les pourcentages de variations obtenus suite à l'incubation des systèmes d'électrodes simples dans une suspension cellulaire de concentration 1 000 000 cellules/mL sont de 95,5 % dans le cas du piégeage des MO activés sur des anticorps CD 16 et de 99,3 % dans le cas du piégeage des MO sains sur des anticorps CD 14. Ces résultats sont très encourageants car la sensibilité de détection est, comme attendu, supérieure à celles obtenues pour des électrodes de plus grande taille et devrait permettre la détection de concentrations cellulaires plus faibles que dans le cas des électrodes de 0,04 cm<sup>2</sup>.

Ainsi, la détection du piégeage des monocytes est validée sur les systèmes de microélectrodes simples fabriqués suivant le procédé 2.

Les autres systèmes d'électrodes doivent encore être testés et comparés de manière à choisir la configuration d'électrodes la plus sensible et la moins bruitée. De plus, la calibration de l'immunocapteur miniaturisé et sa capacité à détecter les monocytes de manière spécifique et quantitative doivent également être redémontrées. Enfin, il est important de noter que toute modification d'une étape de la microfabrication peut altérer le comportement électrochimique de l'immunocapteur, c'est pourquoi les études devront être reproduites pour les systèmes d'électrodes obtenus suivant le procédé 3.

### III. Fabrication du dispositif microfluidique

La microfluidique désigne l'ensemble des sciences qui traite de l'écoulement des liquides dans des canaux où au moins l'une des dimensions est de l'ordre du micromètre. Elle désigne également les technologies de fabrication des dispositifs miniaturisés d'analyses chimiques ou biologiques. Le dispositif microfluidique réalisé dans ce travail est composé d'une part du système d'électrodes dont la fabrication et la caractérisation ont été présentées précédemment et d'autre part d'une canalisation microfluidique. La fabrication des canalisations microfluidiques et leur assemblage irréversible sur le système d'électrodes sont présentés ci-dessous.

#### III.1. Fabrication de la canalisation microfluidique <sup>9,10,11</sup>

La canalisation microfluidique est fabriquée en PolyDiMéthylSiloxane (PDMS). Ce polymère biocompatible à bas coût présente de nombreux avantages tels que la transparence optique, l'hydrophobie, l'élasticité et la conductivité électrique, ce qui explique sa forte utilisation dans la fabrication de microsystèmes<sup>12</sup>.

La canalisation est composée d'une entrée et d'une sortie et est délimitée par deux cadres. Le premier cadre sert de repère pour l'alignement à posteriori de la canalisation sur les électrodes et le second a pour but de faciliter la découpe manuelle des canalisations de 500 µm de large et 3 cm de long (Figure 7). Deux niveaux de masques ont été réalisés : l'un représentant les canalisations et le cadre de découpe et l'autre définissant le cadre d'alignement.

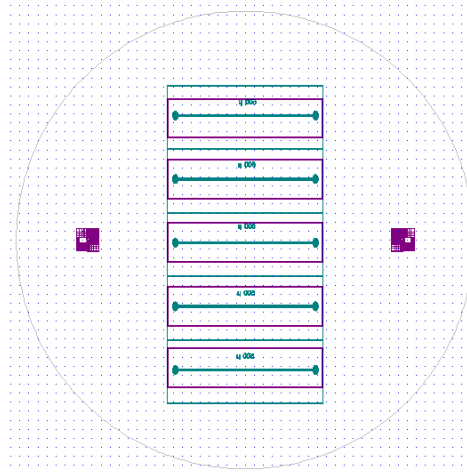


Figure 7: Motifs de la canalisation microfluidique.

La méthode générale de fabrication des microsystèmes en PDMS consiste à réaliser à partir du masque des canalisations un moule en SU-8 sur lequel le PDMS est versé et réticulé.

### III.1.1. Fabrication du moule en SU-8 par photolithographie

Après l'étape de nettoyage et de traitement de surface à l'HMDS, le substrat en silicium est enduit de SU-8 et précuré. L'étape de précuré est suivie du détourage, dont le but est d'enlever le surplus de résine au bord du substrat pour éviter la déformation du motif par diffraction lors de l'insolation. Après l'insolation de la résine à travers le masque (1<sup>er</sup> niveau de masque), le substrat est recuit et développé. Ainsi, la résine qui n'a pas été exposée aux ultraviolets, est éliminée et il ne reste sur le substrat de silicium que le motif des canalisations d'épaisseur 50  $\mu\text{m}$  (Figure 8). Le dépôt de la SU-8 et la photolithographie sont répétés pour la structuration du cadre d'alignement (2<sup>ème</sup> niveau de masque).

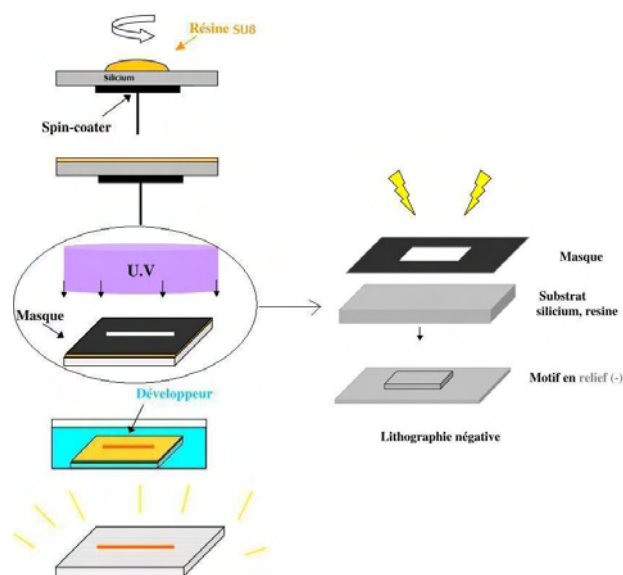


Figure 8 : Schéma du principe de fabrication du moule en SU-8.

Le moule en SU-8 obtenu subit un traitement à l'HMDS qui facilite le démoulage du PDMS. Le moule est réutilisable plusieurs fois et permet la fabrication d'un grand nombre de canalisations.

### III.1.2. Moulage du dispositif microfluidique

L'étape de moulage consiste dans un premier temps à préparer le PDMS qui est un fluide visqueux à température ambiante. Il est obtenu par mélange d'un élastomère de silicone, le PDMS Sylgard 184, avec un agent réticulant dans les proportions 10:1. Le mélange est dégazé avant d'être versé sur le moule en SU-8 et chauffé à 90 °C pendant 30 min. Le PDMS réticulé est ensuite démoulé, les canalisations découpées et les entrées et sorties des canalisations percées pour permettre l'injection des fluides lors des futures expériences (Figure 9).

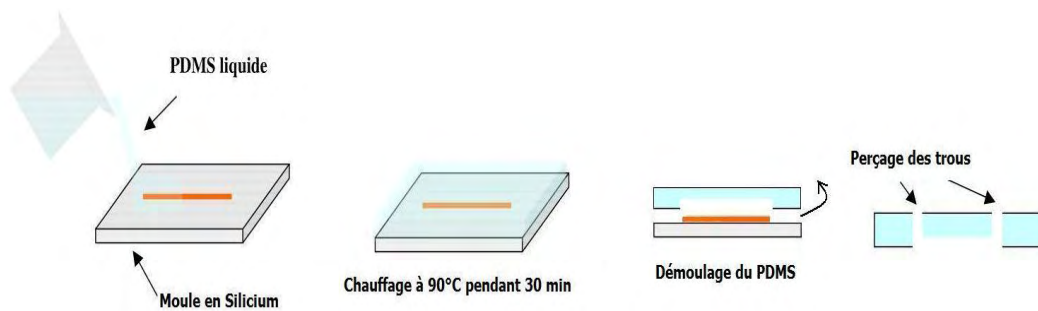


Figure 9 : Schéma de l'étape de moulage des canalisations en PDMS.

A ce stade, les deux parties constituant le dispositif microfluidique sont fabriquées et peuvent être assemblées.

### III.2. Assemblage des microélectrodes et de la canalisation

L'une des premières étapes de l'assemblage consiste à structurer le cadre facilitant l'alignement sur le substrat contenant les systèmes d'électrodes. Une photolithographie de la résine SU-8 d'épaisseur 50  $\mu\text{m}$ , telle que celle présentée dans la partie III.1.2., est réalisée à l'aide du 2<sup>ème</sup> niveau du masque des canalisations. Les électrodes étant sur le substrat, il ne peut être modifié par HMDS et l'adhérence de la résine sur le substrat n'est pas optimale. Le substrat des électrodes est ensuite découpé à l'aide d'un stylo diamant.

Après nettoyage des deux parties à l'isopropanol et séchage à l'azote, elles sont traitées au plasma  $\text{O}_2$  avec un débit de 1000 mL/min de  $\text{O}_2$  et une puissance de 200 W pendant 30 s et collées par simple contact suite à un alignement visuel dans le cadre d'alignement. Ce traitement de surface est très utilisé lors des assemblages du PDMS et de divers matériaux tels que le verre, le silicium et ses oxydes, le nitrure de silicium, le quartz, la carbone vitreux et polyéthylène<sup>9,10</sup>. Il consiste à oxyder les deux surfaces pour permettre la formation de

liaisons covalentes Si-O-Si. Les dispositifs sont ensuite placés dans une étuve à 100 °C pendant 15 minutes pour consolider les liaisons et rendre le collage irréversible. Des plots de connectique en PDMS sont réalisés indépendamment puis reportés sur les ouvertures d'entrées et de sorties du dispositif de manière à faciliter les connexions fluidiques.

Ainsi, des dispositifs microfluidiques contenant différents systèmes d'électrodes ont été obtenus (Figure 10).

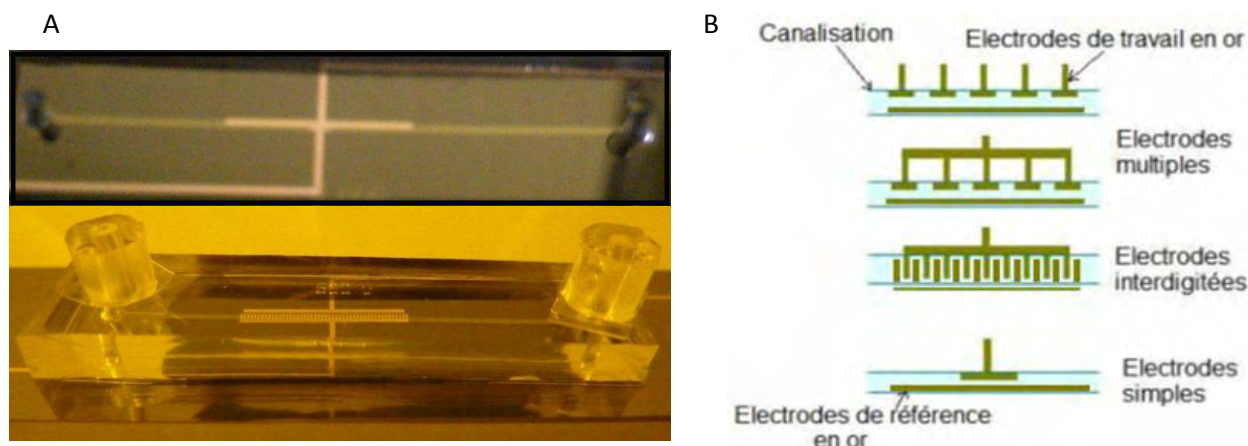


Figure 10 : A/ Photos des dispositifs microfluidiques réalisés contenant les systèmes d'électrodes ; B/ Schéma des électrodes intégrées dans la canalisation microfluidique.

Cependant, il est à noter que quelques problèmes d'alignement des électrodes sous la canalisation, due à la mauvaise adhérence de la SU-8 et du cadre d'alignement sur le nitrure de silicium, ont été rencontrés. Une étape d'optimisation de cet alignement est nécessaire de manière à ce que l'ensemble du système d'électrodes soit intégralement sous la canalisation du dispositif microfluidique.

### III.3. Perspectives d'intégration des microélectrodes

Les microélectrodes intégrées seront caractérisées par spectroscopie d'impédance électrochimique dans un flux microfluidique. L'écoulement sera réalisé grâce au FLUIGENT® (SA FLUIGENT), appareil permettant d'imposer une pression constante ou à un pousse-seringue, l'écoulement du fluide étant laminaire dans les microcanaux. Les conditions opératoires optimales de l'écoulement microfluidique devront être déterminées de manière à éviter les bulles pendant les mesures d'impédance.

Les électrodes seront modifiées par passages successifs de solutions dans la canalisation comme décrit par Fertier et *al.*<sup>13</sup> Le passage des cellules dans les canalisations devrait augmenter la reproductibilité du greffage et le taux de piégeage des cellules. De plus, la réalisation des immunoessais en microfluidique offre l'avantage par rapport aux essais

conventionnels d'accélérer les réactions antigène-anticorps en augmentant le ratio surface-volume.

Cependant, la réduction des dimensions des systèmes fluidiques conduit inévitablement à un accroissement de l'influence des propriétés de surfaces. Les interactions non spécifiques entre les protéines/ les cellules et les parois des canalisations conduisent alors à une perte importante de l'information. Afin de remédier à ce problème, les canalisations en PDMS pourront être modifiées soit par greffage moléculaire direct de brosse polymères soit par adsorption d'une couche polymère. Une alternative au PDMS pourra aussi être envisagée avec des canalisations en SU-8. Cependant, des adsorptions non spécifiques de protéines sont aussi possibles dans ce cas.

Enfin, l'immunocapteur intégré devra aussi être calibré à différentes concentrations cellulaires de manière à déterminer sa gamme de détection.

## Conclusion

Dans ce chapitre, les différents procédés de fabrication des microélectrodes ont été présentés de manière à choisir et à optimiser le procédé de miniaturisation des électrodes pour la détection des cellules.

Le choix du procédé et la géométrie des électrodes sont des critères importants dans la conception des microélectrodes utilisées en impédancemétrie. En effet, chaque étape de la fabrication peut influencer sur la surface des électrodes et par conséquent sur les performances de l'immunocapteur. De plus, la sensibilité des mesures varie suivant la configuration des électrodes. C'est pourquoi les techniques de fabrication par photolithographie lift off et à basse température ont été privilégiées pour concevoir différentes configurations de systèmes d'électrodes coplanaires.

Les premiers tests réalisés sur des électrodes parallèles ont permis de valider le piégeage des monocytes avec un taux de variation de l'impédance due aux cellules atteignant 99 %. Ces résultats valident la miniaturisation de l'immunocapteur impédimétrique et ouvrent des perspectives quant à la détection quantitative pour des suspensions de faible concentration cellulaire. Les microélectrodes ont ensuite été intégrées dans une canalisation microfluidique en vue d'amorcer la fabrication du module 2 du laboratoire sur puce. La validation et la caractérisation de cette intégration devront être réalisées et optimisées. De plus, la calibration de l'immunocapteur miniaturisé devra permettre la détection de cellules de faible concentration cellulaire.

## Bibliographie

- <sup>1</sup> C. Christophe, « Intégration de microcapteurs électrochimiques en technologies' Silicium et Polymères' pour l'étude du stress oxydant. Application à la biochimie cutanée », Université Paul Sabatier-Toulouse III, 2010.
- <sup>2</sup> J.-W. Wang, M.-H. Wang, et L.-S. Jang, « Effects of electrode geometry and cell location on single-cell impedance measurement », *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25, 6, 1271-1276.
- <sup>3</sup> C. Iliescu, D. P. Poenar, M. Carp, et F. C. Loe, « A microfluidic device for impedance spectroscopy analysis of biological samples », *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2007, 123, 1, 168-176.
- <sup>4</sup> S. Gawad, L. Schild, et P. Renaud, « Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing », *Lab Chip*, 2001, 1, 1, 76-82.
- <sup>5</sup> D. T. P. Abdur Rub Abdur Rahman, « Effect of electrode geometry on the impedance evaluation of tissue and cell culture », *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2007, 1, 89-96.
- <sup>6</sup> D. T. Price, A. R. A. Rahman, et S. Bhansali, « Design rule for optimization of microelectrodes used in electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) », *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24, 7, 2071-2076.
- <sup>7</sup> W. E. Martinez, G. Gregori, et T. Mates, « Titanium diffusion in gold thin films », *Thin Solid Films*, 2010, 518, 10, 2585-2591.
- <sup>8</sup> G. W. B. Ashwell et R. Heckingbottom, « Interdiffusion of Titanium and Gold: A Comparison of Thin Films Deposited in Technical Vacuum and Ultrahigh Vacuum », *Journal of Electrochemistry Society*, 1981, 128, 3, 649-654.
- <sup>9</sup> J. C. McDonald et G. M. Whitesides, « Poly (dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices », *Accounts of chemical research*, 2002, 35, 7, 491-499.
- <sup>10</sup> D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller, et G. M. Whitesides, « Rapid prototyping of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane) », *Analytical chemistry*, 1998, 70, 23, 4974-4984.
- <sup>11</sup> G. Velve-Casquillas, M. Le Berre, M. Piel, et P. T. Tran, « Microfluidic tools for cell biological research », *Nano Today*, 2010, 5, 1, 28-47.
- <sup>12</sup> S. K. Sia et G. M. Whitesides, « Microfluidic devices fabricated in Poly(dimethylsiloxane) for biological studies », *ELECTROPHORESIS*, 2003, 24, 21, 3563-3576.
- <sup>13</sup> L. Fertier, M. Cretin, M. Rolland, J.-O. Durand, L. Raehm, R. Desmet, O. Melnyk, C. Zimmermann, C. Déjous, et D. Rebière, « Love wave immunosensor for antibody recognition using an innovative semicarbazide surface functionalization », *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2009, 140, 2, 616-622.



# Conclusion générale

---

Ce mémoire a présenté les premières briques du développement d'un biocapteur pour le tri et le comptage d'une sous-population cellulaire. Ce dispositif devrait permettre à terme le diagnostic précoce des pathologies infectieuses à travers la détection des monocytes anti-inflammatoires et pro-inflammatoires. Ces monocytes, caractéristiques d'un processus infectieux, expriment l'antigène CD16 par opposition aux monocytes sains qui n'expriment que l'antigène CD14. Le dispositif repose alors sur une différenciation basée sur la surexpression d'antigènes caractéristiques de la sous population que l'on souhaite isoler.

Le biocapteur développé, dans ce mémoire, est un immunocapteur impédimétrique. Il associe la spécificité des interactions antigènes-anticorps aux performances de la transduction électrochimique. Les travaux réalisés ont, dans un premier temps, permis de valider le protocole de fonctionnalisation des anticorps sur des surfaces d'or, optimisé *via* des monocouches auto-assemblées et des protéines d'adhésion de manière à conserver l'activité des anticorps. Le greffage a permis de piéger sur une surface d'or de manière spécifique et quantitative une sous-population cellulaire de monocytes, sains et/ou infectés, suivant l'anticorps immobilisé. L'immunocapteur impédimétrique développé sur des électrodes de 0,04 cm<sup>2</sup> pourrait être utilisé pour le diagnostic précoce compte tenu de sa gamme d'analyse cohérente avec l'utilisation escomptée.

La sensibilité de détection augmentant avec la miniaturisation, plusieurs systèmes d'électrodes miniaturisés ont été développés grâce aux techniques de la microtechnologie puis intégrés dans un dispositif microfluidique en vue de la conception du laboratoire sur puce. Cette intégration devrait, entre autres, augmenter la reproductibilité des mesures et le taux de piégeage des cellules. Les premiers tests réalisés sur des électrodes de 0,125 mm<sup>2</sup> ont permis de valider le piégeage des monocytes avec un taux de variation de l'impédance due aux cellules atteignant 99 %. Ces résultats valident ainsi la miniaturisation de l'immunocapteur impédimétrique et ouvrent des perspectives pour la détection quantitative des cellules dans des suspensions de faible concentration.

La validation et la caractérisation de l'intégration microfluidique des microélectrodes sont en cours. L'étude réalisée avec les systèmes de microélectrodes est encourageante mais nécessite d'être finalisée. En effet, les autres systèmes d'électrodes doivent encore être testés et comparés de manière à choisir la configuration d'électrodes la plus sensible et la moins bruitée. De plus, la calibration de l'immunocapteur miniaturisé et sa capacité à détecter les monocytes de manière spécifique et quantitative doivent également être

démontrées, dans un premier temps, sur les microélectrodes dépourvues de canalisation, puis, dans un second temps, dans le dispositif microfluidique. Afin de limiter les interactions non spécifiques entre les cellules/protéines et les parois des canalisations, ces dernières pourront être modifiées soit par greffage moléculaire direct de brosses polymères soit par adsorption d'une couche polymère. Enfin, le procédé d'assemblage des systèmes d'électrodes et des canalisations devra être repensé de manière à pallier les problèmes d'alignement des électrodes sous la canalisation.

# Annexes

---

## **Annexes**

|   |                   |
|---|-------------------|
| <b><i>I. Culture cellulaire de la lignée des THP-1 .....</i></b>  | <b><i>164</i></b> |
| <b><i>II. Effet du LPS sur les monocytes.....</i></b>   | <b><i>166</i></b> |
| <b><i>III. Tri magnétique des monocytes .....</i></b>   | <b><i>167</i></b> |
| <b><i>A. Séparation magnétique dans un dispositif microfluidique .....</i></b>  | <b><i>167</i></b> |
| <b><i>B. Fonctionnalisation des billes magnétiques .....</i></b>  | <b><i>168</i></b> |
| <b><i>C. Marquage cellulaire.....</i></b>   | <b><i>170</i></b> |
| <b><i>IV. Caractérisation électrochimique des électrodes macroscopiques en l'absence d'électrode de référence .....</i></b> | <b><i>172</i></b> |
| <b><i>V. Caractérisation électrochimique avec modification de la contre-électrode .....</i></b>                             | <b><i>174</i></b> |

# Culture cellulaire de la lignée des THP-1

La lignée cellulaire THP-1 (American Type Culture Collection) est dérivée de monocytes leucémiques humains du sang périphérique d'un enfant âgé de 1 an atteint de leucémie aigüe. Elle est la lignée qui se rapproche le plus phénotypiquement et génétiquement des monocytes circulants. En effet, les THP-1 possèdent de nombreuses caractéristiques communes aux monocytes et aux macrophages, dont la capacité de phagocytose, la sécrétion de certaines cytokines et l'expression de récepteurs membranaires comme les CD 14, communs à tous les monocytes.

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de cultures de 25 ou 75 cm<sup>3</sup> dans un incubateur à 37 °C sous atmosphère humide avec 5 % de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). En l'absence de traitement de différenciation, ces cellules restent en suspension sous forme de grappes. Le temps de doublement des THP-1 étant court, environ 26 h, le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours. Pour cela, il est possible de réaliser soit une dilution du milieu soit une sous-culture (ou un passage cellulaire). Dans ce cas, la suspension est centrifugée pendant 5 minutes à 1600 tr/min, les cellules comptées sur une cellule de Malassez et remises en suspension dans une boîte de culture de manière à obtenir une concentration cellulaire de 5 10<sup>5</sup> cellules/mL. Au-delà de 100 passages, la culture se détériore.

## **Préparation du milieu de culture**

Le milieu de culture des THP-1 est composé de :

- 500 mL de milieu de Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640,
- 50 mL de sérum de veau fœtal décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30min,
- 5 mL de bicarbonate de sodium à 7,5% (1,5 g/L),
- 5 mL de L-Glutamine à 200 mM,
- 5 mL d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) à 1 M,
- 5 mL de pyruvate de sodium à 100 mM,
- 5 mL de D-(+)-Glucose à 4,5 g/L,
- 17,4 µL de 2-Mercapto-Ethanol à 0,05 mM

Toutes les solutions sont filtrées (0,22µm) avant d'être ajoutées au milieu RPMI.

## **Congélation-Décongélation des cellules THP-1**

La décongélation des cellules est réalisée en plaçant un cryotube contenant les cellules dans le bain marie à 37 °C pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite transférées dans 10 mL de milieu de culture.

Le milieu de congélation utilisé comprend 90% de sérum de veau fœtal (SVF) et 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) stérile et filtré. Les cellules à congeler sont d'abord centrifugées pendant 5 minutes à 1600 tr/min. Le culot est ensuite repris dans 1 mL de milieu de congélation et après numération cellulaire, les cellules sont réparties dans les cryotubes de manière à avoir environ  $10^7$  cellules par mL dans 1,5 mL du milieu de congélation. Les cryotubes sont ensuite conservés dans l'azote liquide à  $-192\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **Comptage des cellules sur une cellule de Malassez**

La cellule de Malassez est une lame de verre sur laquelle a été gravé un quadrillage de 25 rectangles composés de 20 carrés plus petits. Elle est utilisée pour compter le nombre de cellules en suspension.

Pour estimer la viabilité et la concentration des cellules, la suspension cellulaire est, après centrifugation, séparée du milieu de culture et resuspendue dans 1 mL de milieu. 10  $\mu\text{L}$  des cellules resuspendues sont alors mélangées à 90  $\mu\text{L}$  de bleu trypan. Après homogénéisation, un peu plus de 10  $\mu\text{l}$  du mélange sont injectés dans un montage lamelle-cellule de Malassez. Les cellules vivantes et mortes (colorées en bleu) sont alors comptées au microscope optique (grossissement x40) pour 5 grands carrés

# Effet du LPS sur les monocytes

Le récepteur de reconnaissance de forme CD 14 est une glycoprotéine de 55 kDA exprimée à la surface des monocytes et des macrophages. Il permet d'internaliser certains ligands provenant de pathogènes microbiens différents en se liant à ces molécules et est impliqué dans le processus de phagocytose des bactéries. La liaison des produits bactériens avec le CD 14 conduit à une réaction inflammatoire qui permet à l'organisme hôte de lutter rapidement contre les microbes et encore orienter la réponse immunitaire adaptative<sup>1</sup>. Les monocytes répondent par chimiotactisme à la présence de substances nécrotiques, aux micro-organismes envahisseurs et à l'inflammation. Ainsi, le récepteur CD 14 coordonne l'activation des cellules myéloïdes en libérant des cytokines et des chimiokines qui permettent d'informer les cellules environnantes de la présence d'un non-soi<sup>2,3</sup>.

L'endotoxine ou LPS (lipopolysaccharide) provenant de la membrane externe des bactéries Gram-négatif est l'un des activateurs cellulaires les plus puissants au travers du récepteur CD14. La molécule de LPS se compose principalement d'une chaîne polysaccharidique et d'une partie lipidique. La partie lipidique nommée « lipid A » correspond à la portion cytotoxique du LPS reconnue par le récepteur CD14<sup>4</sup>. Après la liaison du LPS au CD14, une réaction inflammatoire est initiée et deux mécanismes de réponse apparaissent. D'une part, le LPS est internalisé dans les monocytes *via* le CD 14 présent sur les membranes afin d'être détoxifié et éliminé et d'autre part, les cellules sont activées et libèrent des messagers dans l'environnement (cytokines, chimiokines) et une quantité croissante de CD 14 soluble pour augmenter le taux d'élimination du LPS<sup>1,5</sup>.

<sup>1</sup> J. E. Scherberich et W. A. Nockher, « CD14++ monocytes, CD14+/CD16+ subset and soluble CD14 as biological markers of inflammatory systemic diseases and monitoring immunosuppressive therapy », *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 1999, 37, 3, 209-213.

<sup>2</sup> D. Strauss-Ayali, S. M. Conrad, et D. M. Mosser, « Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection », *Journal of Leukocyte Biology*, 2007, 82, 2, 244-252.

<sup>3</sup> L. Ziegler-Heitbrock, « The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation », *Journal of Leukocyte Biology*, 2006, 81, 3, 584-592.

<sup>4</sup> D. B. Cowan, S. Noria, C. Stamm, L. M. Garcia, D. N. Poutias, P. J. del Nido, et F. X. McGowan, « Lipopolysaccharide Internalization Activates Endotoxin-Dependent Signal Transduction in Cardiomyocytes », *Circulation Research*, 2001, 88, 5, 491-498.

<sup>5</sup> C. Auffray, M. H. Sieweke, et F. Geissmann, « Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells », *Annual Review of Immunology*, 2009, 27, 1, 669-692.

# Tri magnétique des monocytes

Un dispositif de tri, réalisé séparément de celui de la mesure impédimétrique, a été fabriqué pour confirmer la déviation de cellules marquées par des billes magnétiques sous l'effet d'un champ magnétique. Ces travaux réalisés en collaboration avec le LAAS avec Marc Fouet (Stagiaire M2 LAAS) et Sébastien Cargou (Doctorant LAAS) ont permis de mettre en évidence les facteurs critiques limitant la séparation magnétique.

## A. Séparation magnétique dans un dispositif microfluidique

Un dispositif microfluidique prototype a été fabriqué en verre-PDMS pour valider le tri magnétique. Composé de deux entrées et deux sorties, il mesure environ 4 cm de long. Les canalisations d'arrivée et de sortie de fluides font 100  $\mu\text{m}$  de large contre 200  $\mu\text{m}$  pour la canalisation principale. La séparation magnétique est alors réalisée à l'aide d'un aimant permanent, en néodyme-fer-bore placé sur la canalisation, qui permet la déviation des cellules marquées magnétiquement (Figure 1).



Figure 1 : Dispositif microfluidique pour la séparation magnétique.

Le système a, dans un premier temps, été validé avec des billes magnétiques fluorescentes de 1 à 10  $\mu\text{m}$  par simple observation au microscope à fluorescence et d'une caméra haute sensibilité, ANDOR® (ANDOR TECHNOLOGY). Un taux de séparation proche de 100 % a été obtenu avec des billes magnétiques de diamètre supérieur à 5  $\mu\text{m}$  alors que ce taux diminue de moitié pour des billes de 1  $\mu\text{m}$  de diamètre.

Des essais d'observation de la déviation des cellules marquées sous l'action d'un champ magnétique ont ensuite été mis en œuvre.



Pour cela, le marquage des THP1 a été réalisé en mélangeant dans un eppendorf les cellules dans du PBS avec des billes magnétiques commerciales de 50 nm déjà fonctionnalisées par des anticorps CD 14 (Miltenyi MACS) pendant 20 minutes à 4 °C. Les cellules marquées magnétiquement sont ensuite rincées deux fois dans du PBS et séparées de la solution à l'aide d'un aimant permanent. Une fois les cellules non marquées éliminées, les cellules marquées sont resuspendues dans du PBS.

La déviation des monocytes marqués sous l'effet du champ magnétique est évaluée par observation microscopique des billes fluorescentes. Cependant, de nombreux problèmes parmi lesquels l'adhérence des cellules aux parois, la présence de turbulences dans la canalisation et un passage des cellules trop rapide pour être déviées, ont été observés.

Les problèmes d'adhérence des cellules aux parois ont été limités grâce à un pré-rinçage des canalisations avec du tween 20 (tensioactif). Toutefois, l'observation de la déviation magnétique reste difficile compte tenu de l'épaisseur du dispositif et du passage trop rapide des cellules. Les solutions envisagées pour pallier à ce problème sont d'une part l'utilisation de billes magnétiques de diamètres de l'ordre du micromètre de manière à obtenir des résultats comparables à ceux obtenus pour les billes seules. D'autre part, D'autres alternatives à l'utilisation d'aimants permanents sont envisagées au Laboratoire d'Analyse et d'Architecture Structurale (Thèse de Sébastien Cargou).

Bien que les billes magnétiques fonctionnalisées avec l'anticorps CD14 soient commercialisées, leur utilisation est limitée en raison de la taille des billes et de l'absence de fluorescence qui rend difficile la caractérisation du marquage. L'utilisation de billes magnétiques fluorescentes fonctionnalisées par des groupements carboxyles ou amines, sur lesquels l'anticorps peut être greffé, a été préférée.

## B. Fonctionnalisation des billes magnétiques

La fonctionnalisation des billes magnétiques consiste en la création d'une liaison peptidique suite à l'activation des groupements fonctionnels de type COOH par du N-ethyl-N'-(diméthylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) et de Nhydroxysuccinimide (NHS). Pour les billes fonctionnalisées par une fonction amine, la liaison se fait directement entre la fonction carboxyle de la partie Fc des anticorps et la fonction amine des billes, alors que les billes fonctionnalisées par une fonction carboxyle nécessitent l'accroche préalable de la protéine G, de manière à fixer les anticorps CD14 dans une orientation contrôlée.

L'efficacité de ce marquage étant un critère déterminant pour le tri des monocytes, la fonctionnalisation des billes par les anticorps CD14 a été caractérisée par la mesure des variations du potentiel de surface ( $\zeta$ ) liées aux modifications de la surface des microbilles. L'accroche d'une protéine G ou d'un anticorps qui sont chargés négativement devraient modifier la valeur du potentiel de surface des billes sur lesquelles ils se fixent.

Dans le cas des microbilles recouvertes des fonctions amines

**Protocole de marquage:**

20  $\mu\text{L}$  de billes sont dans un premier temps lavés 3 fois dans 1 mL de solution tampon d'acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonique (MES). 250  $\mu\text{L}$  d'une solution d'EDC (8 mg/mL) dans du MES puis 20  $\mu\text{L}$  d'anticorps sont ensuite ajoutés à la solution contenant les billes. La solution est agitée pendant 2 h à température ambiante. Puis, les billes sont lavées 3 fois dans 1 mL de PBS et resuspendues dans une solution de stockage (PBS, 0,1% BSA et 0,05% d'Azoture de Sodium) si elles ne sont pas utilisées.

**Détermination du potentiel de surface**

- $\zeta$  billes nues: -15mV
- $\zeta$  billes fonctionnalisées par des anticorps : -30.8mV

Cette valeur de potentiel de surface après fonctionnalisation n'est pas toujours atteinte laissant supposer une plus ou moins bonnes fonctionnalisations des billes.

Dans le cas des microbilles recouvertes des fonctions carboxyles

**Protocole de marquage:**

20  $\mu\text{L}$  de billes sont dans un premier temps lavées 3 fois dans 1 mL de solution tampon d'acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonique (MES). 250  $\mu\text{L}$  d'une solution d'EDC (8 mg/250  $\mu\text{L}$ ) dans du MES sont ajoutés à la solution de bille. La solution est mélangée 15 minutes à température ambiante. Les billes sont ensuite rincées 2 fois dans 1 mL de MES puis resuspendues dans 250  $\mu\text{L}$  de MES. La protéine G est alors ajoutée pour obtenir une concentration finale de 0,1 mg/mL. Après 2 heures d'agitation à température ambiante les billes sont à nouveau lavées 3 fois avec 1 mL de solution tampon MES. 20  $\mu\text{L}$  d'anticorps sont ensuite ajoutés au mélange billes-PG. La solution est à nouveau agitée 15 min à 4 °C. Les billes sont ensuite lavées 3 fois dans 1 mL de PBS et resuspendues dans une solution de stockage (PBS, 0,1% BSA et 0,05% d'Azoture de Sodium) si elles ne sont pas utilisées.

**Détermination du potentiel de surface**

La mesure du potentiel de surface n'a pu être déterminée car la valeur varie tout le temps.

La fonctionnalisation a alors été caractérisée grâce au marquage des monocytes par les billes.

### C. Marquage cellulaire

Le protocole de marquage cellulaire consiste à mettre en contact les billes magnétiques et les monocytes pendant 20 min à 4 °C sous agitation. Les monocytes marqués par les billes magnétiques sont ensuite rincés deux fois au PBS pour éliminer les cellules non marquées et sont resuspendus dans 1 mL de PBS.

Le taux de marquage des monocytes est déterminé par comptage du nombre de monocytes marqués après séparation magnétique par rapport au nombre de monocytes mis en solution (Figure 2).

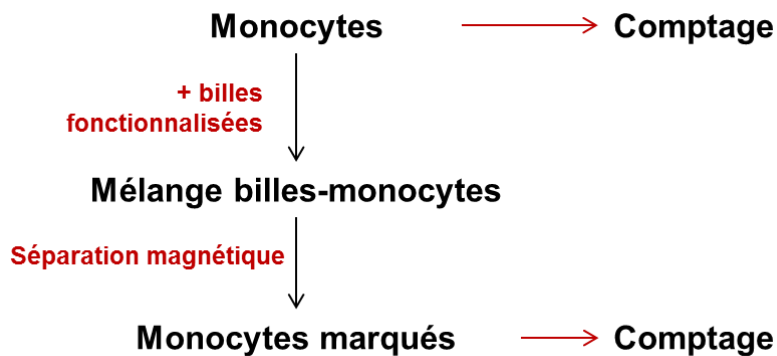


Figure 2 : Schéma récapitulatif des étapes de détermination du taux de marquage cellulaire.

Les cellules marquées par les billes magnétiques sont ensuite incubées 5 min dans 1  $\mu$ L/ mL de 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI), molécule fluorescente qui se lie aux bases adénines et thymine de l'ADN.

Ainsi, le marquage cellulaire peut être validé par observation microscopique de la fluorescence des billes marquées par la fluorescéine isothiocyanate (FITC) et de l'ADN des cellules marquées par du DAPI (Figure 3).

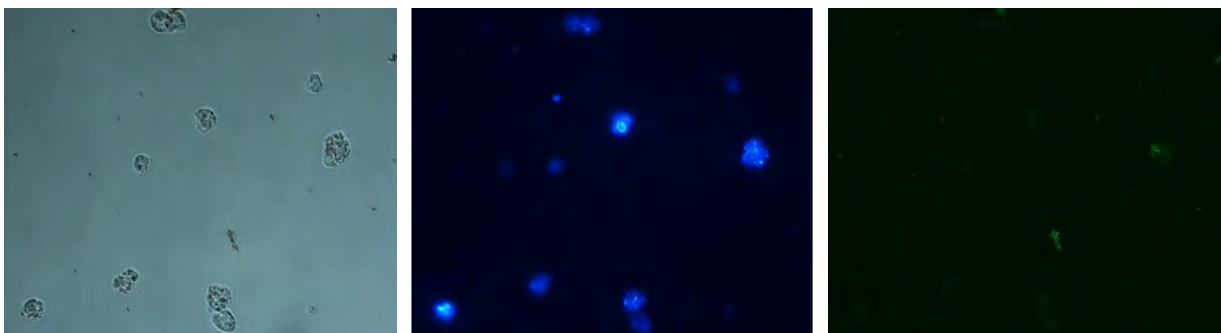
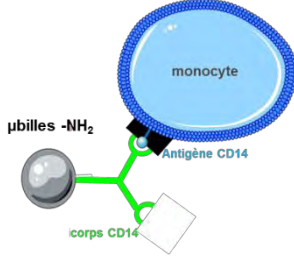
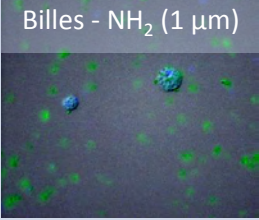
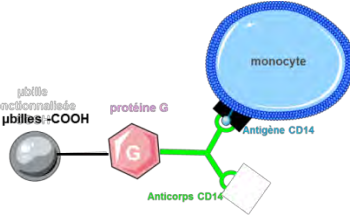
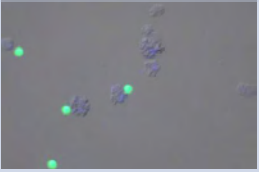
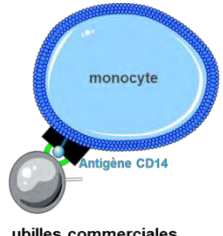
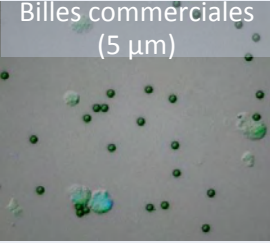


Figure 3 : Photos de l'observation du marquage cellulaire au microscope à fluorescence en lumière blanche (a), avec le filtre correspondant aux longueurs d'onde du DAPI (b) et du FITC (c).

Le marquage cellulaire a été réalisé sur des billes pré-fonctionnalisées par des fonctions amine, par des fonctions carboxyles et sur des billes commerciales déjà fonctionnalisées par des anticorps CD 14 (Tableau 1).

Tableau 1 : Récapitulatif du taux de piégeage cellulaire suivant le type de microbilles magnétiques.

|  | Type de $\mu$ billes fonctionnalisées  | Taux de marquage cellulaire |
|--|--|-----------------------------|
|  <p><math>\mu</math>billes -NH<sub>2</sub><br/>Antigène CD14<br/>corps CD14</p>   | <p>Billes - NH<sub>2</sub> (1 <math>\mu</math>m)</p>  | 53,5%                       |
|  <p><math>\mu</math>bille fonctionnalisée<br/><math>\mu</math>billes -COOH<br/>protéine G<br/>Antigène CD14<br/>Anticorps CD14</p> | <p>Billes - COOH (5 <math>\mu</math>m)</p>           | 27%                         |
|  <p>monocyte<br/>Antigène CD14<br/><math>\mu</math>billes commerciales</p>  | <p>Billes commerciales (5 <math>\mu</math>m)</p>    | 33%                         |

La plus grande proportion de billes fonctionnalisées a été obtenue pour des billes de 1,2  $\mu$ m possédant une fonction amine. Dans ce cas, le taux de cellules marquées atteint 50%. En revanche, dans le cas des billes pré-fonctionnalisées par des groupements carboxyles, les difficultés rencontrées lors du greffage préliminaire de la protéine G diminue considérablement ce taux. Étonnemment, un faible taux de marquage a également été obtenu lors du marquage des billes commerciales et est comparable à celui obtenu pour les billes recouvertes de fonction carboxyles de même diamètre.

La fonctionnalisation des billes magnétiques et le marquage cellulaire doivent encore être optimisés.

# Caractérisation électrochimique des électrodes macroscopiques en l'absence d'électrode de référence

L'impédance pouvant être mesurée dans un système à deux électrodes, la fonctionnalisation des électrodes macroscopiques (1 cm<sup>2</sup>) a été caractérisée dans une solution de PBS à pH = 7,4 contenant 5 mM de ferri/ferrocyanure (Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> (1: 1)) en l'absence d'électrode de référence. Les diagrammes de Nyquist obtenus pour chaque étape de la fonctionnalisation sont représentés sur la Figure 4.

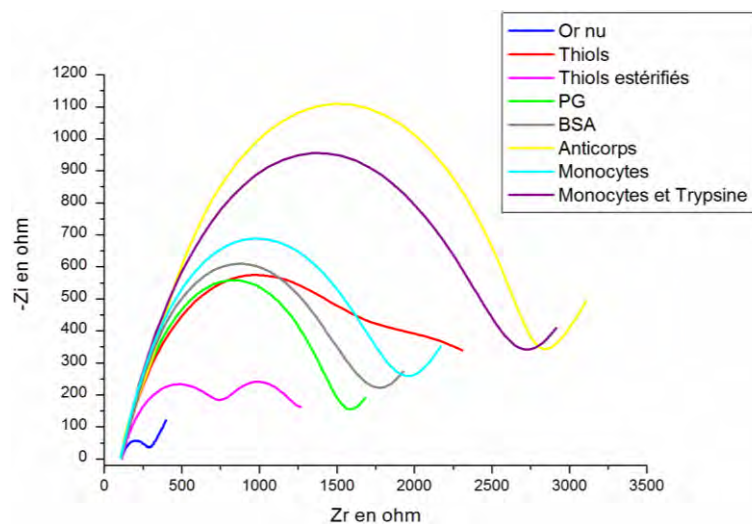


Figure 4 : Diagrammes de Nyquist obtenus dans une solution de PBS à pH 7,4 contenant 5mM de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> pour une électrode d'or nu (1 cm<sup>2</sup>) (—); recouverte de SAMs mixtes (—); après activation des SAMs (—); après immobilisation de la PG (—); puis saturation de l'électrode modifiée par la BSA (—); après greffage des anticorps CD14 (—); après piégeage des monocytes (—); et après incubation de la trypsine (—).

En l'absence de référence, les variations d'impédance traduisent les modifications électriques entre l'électrode de travail et la contre électrode. Le circuit électrique équivalent correspondant à ce système électrochimique est un circuit de Randles modifié auquel est ajouté en série à la résistance de la solution un autre circuit de Randles caractérisant les transferts de charge au niveau de la contre – électrode (Figure 5).

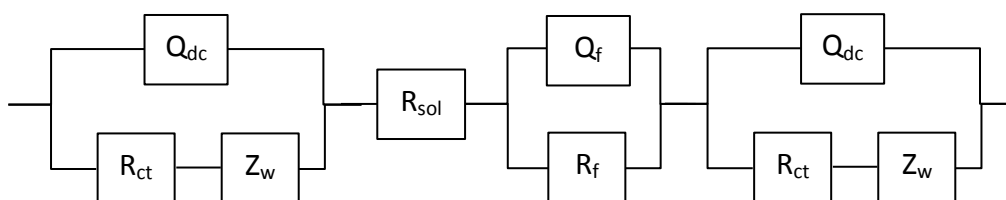


Figure 5 : Circuit électrique équivalent pour la modélisation du système électrochimique à deux électrodes.

La modélisation des diagrammes de Nyquist dans ce circuit ne permettant pas de déterminer les paramètres électriques, le circuit de Randles modifié a alors été utilisé (Tableau 2).

Tableau 2 : Valeurs des paramètres issus de la modélisation pour chaque étape du procédé de fonctionnalisation avec  $R_{sOL}$  : résistance de la solution,  $Q_f$  : capacité du film,  $R_f$  : résistance du film,  $R_{tc}$  : résistance de transfert de charge,  $Q_{dc}$  : capacité de double couche,  $W$ : la constante de Warburg,  $\theta$  : taux de recouvrement de l'électrode.

|                      | $R_s (\Omega)$ | $Q_f (\mu F \cdot s^{n-1})$<br>n | $R_f (\Omega)$ | $R_{tc} (\Omega)$ | $Q_{dc} (\mu F \cdot s^{n-1})$<br>n | W       | $\theta$ |
|----------------------|----------------|----------------------------------|----------------|-------------------|-------------------------------------|---------|----------|
| Or nu                | 111,4          | -                                | -              | <b>172</b>        | 1,54<br>0,724                       | 0,70e-2 | -        |
| Or thiols            | 104,9          | 1,54<br>0,799                    | 1212           | <b>1572</b>       | 0,25<br>0,503                       | 6,30e-2 | 0,89     |
| Or thiols estérifiés | 111,9          | 0,43<br>0,729                    | 688            | <b>424</b>        | 253<br>0,935                        | 0,94e-2 | 0,594    |
| Or PG                | 102,1          | 13,5<br>1                        | 671            | <b>785</b>        | 0,31<br>0,644                       | 0,53e-2 | 0,781    |
| Or BSA               | 102,9          | 10,3<br>1                        | 775            | <b>914</b>        | 0,18<br>0,595                       | 0,38e-2 | 0,812    |
| Or Ac CD             | 112,1          | 2,96<br>1                        | 128,3          | <b>2476</b>       | 2,20<br>0,903                       | 0,20e-2 | 0,930    |
| Or THP1              | 101,2          | 10,84<br>1                       | 756            | <b>1069</b>       | 0,32<br>0,664                       | 0,27e-2 | 0,839    |
| Or THP1 Trypsine     | 105,9          | 15,11<br>1                       | 820            | <b>1721</b>       | 0,37<br>0,706                       | 0,25e-2 | 0,900    |

L'évolution des valeurs de cette modélisation met en avant la variation de transfert de charge qui varie de la même façon qu'en présence de référence. Le taux de recouvrement a alors été calculé pour chaque couche. Cependant, ces paramètres ne sont pas représentatifs du système électrochimique puisque les variations électriques de la contre électrodes ne sont pas négligeables. En effet, dans les systèmes de mesures à deux électrodes, avec une électrode de travail et une contre électrode, la contre – électrode doit être beaucoup plus grande que l'électrode de travail pour ne pas modifier le signal, ce qui n'est pas le cas lors de ces mesures. De plus, la polarisation de l'électrode de travail entraîne un sur-potentiel indéterminé qui conduit à des déviations de mesures.

Les systèmes d'électrodes miniaturisés devraient présenter des déviations moins importantes dans le cas des électrodes simples car le rapport de surface de la contre électrode par rapport à l'électrode de référence est de 20.

# Caractérisation électrochimique avec modification de la contre-électrode

La fonctionnalisation sur le système de microélectrodes en or entraîne la modification simultanée de surface des deux microélectrodes du système électrochimique. La variation d'impédance a alors été étudiée sur des électrodes macroscopiques ( $1 \text{ cm}^2$ ) dans le cas où l'électrode de travail et la contre électrode sont modifiées en même temps pendant la fonctionnalisation. Les mesures sont réalisées dans une solution de PBS à  $\text{pH} = 7,4$  contenant  $5 \text{ mM}$  de ferri/ferrocyanure ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  (1: 1)) avec une électrode de référence à calomel saturé. Les diagrammes de Nyquist obtenus pour chaque étape de la fonctionnalisation sont représentés sur la Figure 4.

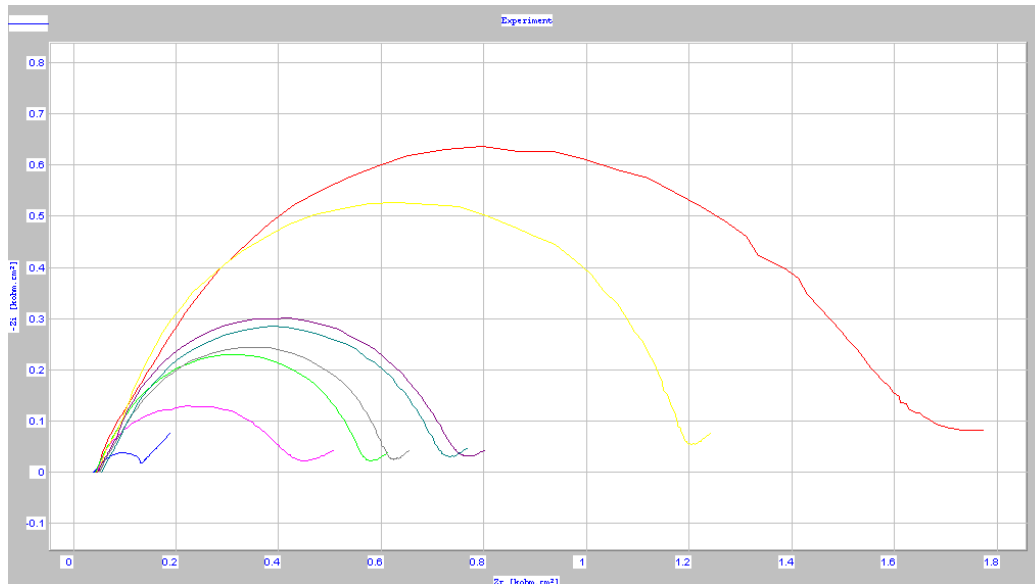


Figure 6 : Diagrammes de Nyquist obtenus dans une solution de PBS à  $\text{pH} 7,4$  contenant  $5\text{mM}$  de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  pour une électrode d'or nu ( $1 \text{ cm}^2$ ) (—) ; recouverte de SAMs mixtes (—) ; après activation des SAMs (—) ; après immobilisation de la PG (—) ; puis saturation de l'électrode modifiée par la BSA (—) ; après greffage des anticorps CD14 (—) ; après piégeage des monocytes (—) ; et après incubation de la trypsine (—).

Les diagrammes de Nyquist obtenus après modification simultanée de l'électrode de travail et de la contre-électrode sont identiques à ceux obtenus après modification de l'électrode de travail seule. Ce résultat confirme que les mesures d'impédance sont effectuées entre l'électrode de travail et l'électrode de référence au calomel saturé. Ainsi, dans ces conditions, la contre électrode n'a pas d'influence sur les mesures d'impédance.

Les mesures de caractérisation des microélectrodes dépourvues de canalisation en présence d'une électrode de référence au calomel saturé devraient alors permettre d'étudier les modifications de surface de la microélectrode de travail.

# Développement d'un immunocapteur impédimétrique pour la détection et la quantification d'une sous population cellulaire: Application au diagnostic précoce des infections

---

## Résumé

La technologie des biocapteurs et des dispositifs de type laboratoire sur puce est devenue un outil essentiel pour le diagnostic rapide et le suivi de traitement de maladies. Le travail de ce mémoire s'intègre dans un projet de recherche visant à la conception d'un laboratoire sur puce pour l'isolement, le tri et la quantification de sous populations cellulaires pour le diagnostic précoce et en temps réel des maladies infectieuses. L'objectif du travail de thèse est de développer un immunocapteur impédimétrique pour la détection des monocytes inflammatoires dont l'augmentation témoigne d'un processus infectieux. La fonctionnalisation permettant le piégeage des cellules *via* une liaison antigène/anticorps a dans un premier temps été optimisée sur des électrodes d'or fabriquées à partir des techniques issues des microtechnologies. Le greffage des anticorps repose sur un système multicouche comprenant des monocouches auto-assemblées et des protéines d'adhésion, chaque étape du protocole ayant été caractérisée par des méthodes électrochimiques et optiques pour différentes tailles d'électrodes. Les performances du biocapteur ont ensuite été étudiées par spectroscopie d'impédance électrochimique et ont mis en évidence une détection sélective suivant l'anticorps immobilisé et quantitative des monocytes piégés. Afin d'augmenter la sensibilité de détection, des systèmes de microélectrodes ont alors été développés. Après optimisation du procédé de fabrication et de modification des électrodes, la détection des monocytes a été validée par spectroscopie d'impédance. L'intégration des microélectrodes dans un dispositif microfluidique est en cours de validation.

**Mots-clés :** immunocapteur, spectroscopie d'impédance électrochimique, biofonctionnalisation, miniaturisation, infection, diagnostic



## Development of an impedimetric immunosensor for detection and counting of a cellular subpopulation : Application to early infection diagnosis

---

### Abstract

Biosensors and lab-on-chips are becoming important tools for diseases diagnosis and treatment monitoring. This work is a part of a research project which aims to design an integrated device for isolation, sorting and counting of cells subpopulations for early and real time diagnosis of infectious diseases. It consists in developing an impedimetric immunosensor to detect inflammatory monocytes found in larger number in the blood of patients with inflammation and infectious diseases. The functionalization for cells trapping *via* an immunochemical interaction has firstly been optimized on gold electrodes fabricated thanks to microtechnologies. The antibodies grafting lies on a multilayer system consisting of stacking self assembled monolayers and cells adhesion proteins and each assembly step have been characterized by optical and electrochemical techniques for different electrodes sizes. Then, the biosensor performances have been investigated by electrochemical impedance spectroscopy and we successfully demonstrated a selective and quantitative detection of trapped monocytes according to the immobilized antibody. Miniaturization enhancing the detection sensitivity, microelectrodes have been developed. After optimization of the fabrication process and functionalization of the microelectrodes, detection of monocytes has been validated by impedance. The integration of these microsystems in a microfluidic device is actually under development.

**Key-words** : immunosensor, electrochemical impedance spectroscopy, bio-functionalization, miniaturization, infection, diagnosis