



HAL
open science

Support immunologique pour biocapteur : caractérisations physico-chimiques et biologiques

Thi Phuong Ly Giang

► **To cite this version:**

Thi Phuong Ly Giang. Support immunologique pour biocapteur : caractérisations physico-chimiques et biologiques. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA112184 . tel-01294170

HAL Id: tel-01294170

<https://theses.hal.science/tel-01294170v1>

Submitted on 28 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE : CHIMIE DE PARIS – SUD

Laboratoire : Protéines et Nanotechnologies en Sciences Séparatives

DISCIPLINE : CHIMIE

THESE DE DOCTORAT

Soutenu le 27/09/2013

Par

Thi Phuong Ly GIANG

<p>SUPPORT IMMUNOLOGIQUE POUR BIOCAPTEUR : CARACTERISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES</p>

Directrice de thèse : Claire SMADJA Maître de conférences Paris-Sud

Composition du jury :

Président du jury : Anne VARENNE Professeur ENSCP

Rapporteurs : Vicent NOEL Maître de conférences Paris 7

Isabelle MABILLE Maître de conférences UPMC

Examineurs : Elisabeth DUFOUR-GERGAM Professeur Paris-Sud

Catherine COMBELLAS Directrice de recherches

Membre invité : Mehdi AMMAR Maître de conférences Paris-Sud

Remerciement

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Mme le professeur Myriam TAVERNA qui m'a accueillie dans son laboratoire tout au long de ces années et m'a fait bénéficier de ses qualités scientifiques. Qu'elle trouve ici le témoignage de mon plus profond respect.

Je suis aussi reconnaissante à Mme Elisabeth DUFOUR-GERGAM pour la collaboration et pour la gentillesse dont elle m'a entourée pendant mon travail effectué à l'IEF.

Je remercie vivement Mme Isabelle MABILLE et M. Vincent NOEL d'avoir accepté de rapporter et juger ce travail de thèse.

Je suis aussi reconnaissante à Mme Anne VARENNE et Mme Catherine COMBELLAS pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse Mme Claire SMADJA de m'avoir offert ses qualités scientifiques et humaines. Son amitié, son aide et ses encouragements m'ont beaucoup touché. Je la remercie pour le temps qu'elle a passé sur ma thèse et pour la grande liberté qu'elle m'a laissée. Je ne peux oublier l'attention et le soutien qu'elle m'a porté durant les moments difficiles, dans le travail et dans la vie quotidienne. Elle était ma mère en France, je ne sais pas comment la remercier pour tout ce qu'elle a fait pour moi.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude et mon profond respect à M. Mehdi AMMAR, il m'a beaucoup aidé dans la partie chimie-physique. Je ne peux pas oublier les nombreuses discussions que nous avons partagées.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à Mme Marie-Claude AMMELLA , Mme Thuy N. TRAN, Mme Isabelle LEPIOTIER, M. Antoine PALLANDRE, M. Alain BOSSEBOEUF qui ont été d'une gentillesse et d'un soutien qui m'ont aidé à avancer.

Je tiens à remercier les gens avec qui j'ai travaillé ensemble ces longues années :

Meriam AZZOUZ, Mohamed HIRAOU, Khaoula LABIDI, Pauline CHAUMONT, Pamela NGOH MELAME, Hong Ha CAO qui ont participé à ce projet de recherche.

Sonia KORCHANE et Romain VERPILLOT avec qui j'ai partagé pas seulement le bureau mais aussi des moments de bonne humeur et de franche camaraderie.

Kiarach MESBAH, Ludivine BOL, Dimitri BRINET, Ichraf AYED pour leur soutien et leur attention.

Puis il y a une grande famille qui compte beaucoup pour moi.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	5
CHAPITRE 1	7
LES BIO-CAPTEURS	7
1-1 INTRODUCTION	7
1-2 Bio-récepteurs d'affinités	9
1-3 Les modes de transductions	12
1-3-1 Biocapteurs électrochimiques.....	12
1-3-2 Biocapteurs à détection optique	14
1-3-3 Biocapteurs à détection mécanique	16
CHAPITRE 2	24
FONCTIONNALISATION CHIMIQUE DE SURFACE EN VUE D'UN GREFFAGE BIOLOGIQUE	24
2-1 Mécanismes réactionnels de silanisation et protocoles	24
2-1-1 Définition des organosilanes	24
2-1-2 Les différents greffages possibles.....	25
2-1-3 Quelques caractéristiques des différents silanes	25
2-2 Mécanisme de la silanisation	27
2-2-1 Fonctionnalisation par octenytrichlorsilane.....	30
2-2-2 Silanisation par aminosilane.....	32
2-3 Techniques de Caractérisation physico-chimique de la silanisation	32
2-3-1 Angle de contact.....	32
2-3-2 Microscopie à force atomique (AFM).....	34
2-3-3 Spectroscopie Photo-émissive des Rayons X (XPS).....	37
2-3-4 Spectroscopie Infra-rouges à transformée Fourier (FTIR).....	38
CHAPITRE 3	41
IMMOBILISATION DES PROTEINES SUR DES SUPPORTS FONCTIONNALISES	41
3-1 Introduction	41
3-2 Immobilisation non-covalente	41
3-2-1 Immobilisation par physisorption	41
3-2-2 Immobilisation par bio-affinité	42
3-3 Immobilisation covalente	46
3-3-1 Immobilisation aléatoire	46

3-3-2 Immobilisation site spécifique.....	50
CHAPITRE 4	56
DEVELOPPEMENT D'IMMUNO-SUPPORT UTILISANT LE 7- OCTENYLTRICHLOROSILANE	56
4-1 Introduction	56
4-2 Fonctionnalisation du support	58
4-3 Résultats-Discussion	71
CHAPITRE 5	78
ETUDE COMPARATIVE DES PLAQUES SILANISEES PAR LE 7- OCTENYLTRICHLORSILANE ET L'APTES	78
5-1 Introduction	78
5-2 Résultats-discussion	97
CHAPITRE 6	100
ETUDE DE LA STABILITE DES PLAQUES SILANISES PAR L'APTES	100
6-1 Introduction	100
6-2 Résultats-discussion	100
6-2-1 Caractérisation des amino-silanes.....	100
6-2-2 Etude de la stabilité de ces échantillons par FTIR.....	102
6-2-3 Etude de la stabilité de ces échantillons par immuno-essai.....	104
CONCLUSION GENERALE- PERSPECTIVES	109

Introduction générale

Les biocapteurs ont pris ces dernières années un essor considérable, notamment dans le domaine du diagnostic bio-médical. Ces capteurs sont pour la plupart constitués d'une base de silicium préparée chimiquement par des monocouches auto-assemblées, sur laquelle sont immobilisées les bio-récepteurs dédiés à la reconnaissance biologique. La capacité de la biomolécule ainsi immobilisée à reconnaître la cible d'intérêt avec une haute affinité et une haute sélectivité est primordiale pour le capteur en termes de sensibilité. Aussi, l'immobilisation de la biomolécule constitue une étape-clé pour le développement du biocapteur. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à l'influence du substrat sur l'immobilisation de la biomolécule

L'objectif de mon doctorat, réalisé dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire des protéines et nanotechnologies en sciences séparatives (institut Galien Paris-Sud) et le groupe Micro et Nano Système (institut d'électronique fondamentale) était d'étudier l'influence des monocouches autoassemblées, sur l'activité biologique du biorécepteur. Dans ce projet, nous avons choisi les organo-silanes qui peuvent se lier de manière covalente sur le silicium. Deux silanes (7-octenyl trichlorosilanes et le (3 aminopropyl)triéthoxysilane) ont été étudiés, leur impact en termes de nature et de stabilité sur la fonctionnalité du bio-récepteur, les anticorps modèles de souris ont été évalués. Durant mon doctorat, j'ai bénéficié des compétences présentes à l'IEF dans le domaine de la fonctionnalisation des surfaces de silicium et des méthodes de caractérisation microscopique (AFM) et spectroscopiques telle que l'infra-rouge à transformé de Fourier et la spectroscopie de photons X (XPS). L'institut Galien Paris-Sud m'a apporté son expérience dans l'analyse des protéines et l'étude de l'activité biologique des anticorps immobilisés.

Ce manuscrit comporte deux parties; une partie bibliographique et une partie expérimentale. **La partie bibliographique** de cette thèse sera dédiée dans un premier temps à une introduction sur les biocapteurs. Les différents types de biocapteurs seront différenciés en fonction de leur mode de transduction. Ensuite, une présentation sur les procédés de fonctionnalisation, suivie dans le troisième chapitre d'un rappel sur les différents modes d'immobilisation des entités biologiques sur les surfaces fonctionnalisées.

Dans la partie expérimentale de ma thèse, je me suis intéressée à la caractérisation physico-chimique des supports en silicium fonctionnalisés en m'appuyant sur des méthodes spectroscopiques telles que la spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X, ou l'infrarouge à transformée de Fourier et microscopique comme l'AFM. J'ai également souhaité évaluer l'activité biologique des anticorps après leur immobilisation sur ces supports. Nous avons donc étudié la capacité de capture de ces anticorps immobilisés, ainsi que leur orientation par microscopie à fluorescence et à l'aide de méthode immunoenzymatique qui ont fait la preuve de leur grande sensibilité.

La première partie a porté sur le 7-octenyltrichlorosilane qui est souvent utilisé pour fonctionnaliser du silicium. Compte -tenu de l'importance de la préparation chimique de la surface pour y greffer ultérieurement l'anticorps, une caractérisation rigoureuse a été menée afin de procéder : (i) à une vérification des étapes de silanisation et d'oxydation, (ii) et de s'assurer que la surface restait homogène sans formation d'amas pouvant gêner le greffage des anticorps. Ensuite, les anticorps d'intérêts ont été immobilisés et leur orientation et leur capacité de capture ont été évaluées. La sensibilité du capteur est liée à une densité de greffage de l'anticorps optimale ainsi qu'à une orientation garantissant l'accessibilité des sites impliqués dans la reconnaissance biologique. Mon travail a donc consisté à évaluer qu'elles étaient les conditions assurant un greffage le plus adaptée des anticorps sur ces supports fonctionnalisés par le 7-octenyltrichlorosilane. Cet objectif a constitué la ligne directrice de la suite des travaux de mon doctorat. Ainsi, nous avons donc cherché à corrélérer, les analyses spectroscopiques permettant de caractériser les supports fonctionnalisés et l'activité biologique des anticorps. Différents paramètres ont ainsi été étudiés, notamment l'influence du pH sur le greffage de l'anticorps. Pour fonctionnaliser des plaques de silicium, une grande variété de silanes est à notre disposition. Compte-tenu de nos mode de greffages nous avons comparé deux types de silanes l'un comportant des groupements carboxyliques (7-octenyltrichlorosilane), l'autre présentant des groupements aminés (3-Aminopropyl) triéthoxysilane). Ainsi, nous avons pu étudier l'influence de la nature du silane. Dans la dernière partie de nos travaux, notre intérêt s'est porté sur la stabilité du revêtement chimique, qui a été caractérisé par spectroscopie infra-rouge à transformé de Fourier. L'influence de cette stabilité sur les bio-récepteurs d'affinités a également été évaluée, ceci ayant à terme des conséquences sur le temps d'utilisation du biocapteur.

Chapitre 1

Les Bio-Capteurs

1-1 Introduction

Au cours de ces dernières années, le domaine des biocapteurs a suscité un intérêt croissant, lié aux avancées technologiques dans des champs disciplinaires différents tels que; la physique (notamment la microélectronique), la chimie (matériaux innovants) et la biologie. Ils présentent, de plus, l'avantage de pouvoir être intégré dans des dispositifs automatisables, miniaturisables, ne nécessitant que de très faibles volumes d'échantillon à analyser. Les perspectives, dans le futur sont très prometteuses, avec un champ d'application très large ; que ce soit dans le domaine du diagnostic biomédical, militaire, environnemental ou l'agro-alimentaire.

Un capteur est défini comme étant un dispositif incorporant un matériel biologique ou biomimétique ou dérivant d'une entité biologique, associé intimement avec un transducteur physicochimique ou un microsystème transducteur. Les biocapteurs peuvent incorporer différents agents biologiques tels que ; les enzymes, les récepteurs cellulaires, les acides nucléiques et dans le cas des capteurs immunologiques des anticorps ou des fragments d'anticorps (figure 1). Plusieurs méthodes existent pour « convertir » un signal généré par une interaction antigène/anticorps. La figure 1 montre le principe de fonctionnement d'un biocapteur après interaction de la molécule cible afin d'obtenir une information utile sous forme d'un signal électrique, optique et mécanique. A chacune de ces méthodes sont associées des avantages et des inconvénients, conduisant à une large recherche sur le développement de capteurs immunologiques. Les recherches les plus récentes ont porté sur le développement de laboratoires portatifs miniaturisés appelés « point of care ». Dans le cas idéal, ceux-ci doivent être réutilisables, portables, sensibles, facile d'utilisation et générant de très faible cout. Ils sont généralement constitués de plateforme et utilisent des entités biologiques permettant une reconnaissance spécifique des cibles d'intérêts.

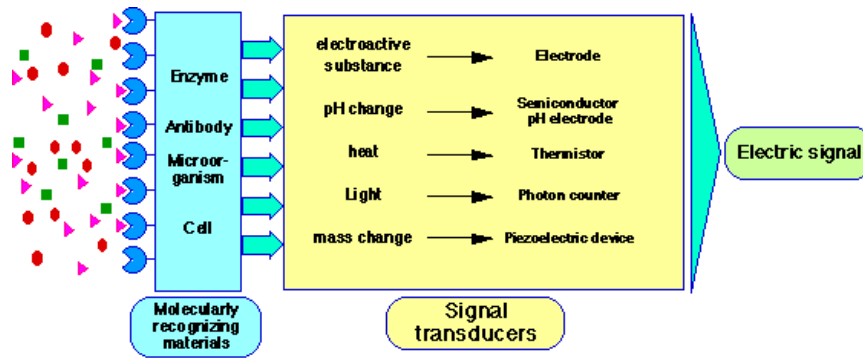


Figure 1 : Représentation schématique d'un biocapteur

(<http://www.jaist.ac.jp/~yokoyama/biosensor.html>)

Le premier biocapteur a été décrit en 1962 par Clark et Lyons. Celui-ci reposait sur l'utilisation d'une enzyme, la glucose oxydase couplée à une électrode. Ce capteur a ensuite été adaptée au dosage du glucose dans le sang [Upd67]. Actuellement, d'autres entités biologiques sont utilisées pour le développement des biocapteurs, notamment des macromolécules biologiques telles que l'ADN ou les anticorps. De fait de leur capacité à reconnaître une cible biologique avec une très grande affinité, l'utilisation des anticorps comme éléments de reconnaissance peut présenter un grand intérêt dans le développement d'un biocapteur. Historiquement, le premier dosage immunologique (Yalow et Berson en 1959) a porté sur la détection d'anticorps produits dans le sang de patients diabétiques, après administration d'insuline exogène. Ce dosage reposait sur l'exploitation de la grande affinité de l'anticorps envers l'antigène cible. Cela a conduit ultérieurement au développement du test immunologique de référence, le test elisa « enzyme linked immunosorbent assay » (Engvall et Perlmann, 1971). Depuis ce premier biocapteur, d'autres applications ont été développées telles que le diagnostic de pathologies et leur suivi, la découverte de médicaments, l'analyse alimentaire ainsi que l'environnement. Cependant, les applications les plus nombreuses restent à ce jour dans le domaine clinique, comme en témoigne les nombreuses références recueillies dans la littérature [Rap10]. De fait, les biocapteurs présentent l'avantage d'une mesure rapide, précise en temps réel, ce qui est primordial en situation d'urgence. Le meilleur exemple étant le capteur de glucose, qui permet un suivi par le patient de son taux de glucose. Dans ce contexte, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux capteurs ne nécessitant pas de marquage. En effet, ceux-ci représentent un grand avantage, car ils génèrent une réponse directe quand l'analyte se lie sur la surface sans l'intervention d'autres réactifs. Aussi, cela permet une plus grande simplicité sur le plan expérimental ainsi qu'une

réduction des coûts. Cependant, dans le cadre d'un diagnostic clinique, les analyses se réalisent dans des milieux biologiques complexes tels que le sang ce qui conduit à l'obtention de réponses non-spécifiques compte tenu du grand nombre d'analytes qui peuvent interagir avec la surface. C'est pourquoi, pour s'assurer que seul l'analyte d'intérêt interagit avec le biocapteur, il faut préalablement greffer un élément de reconnaissance biologique en mesure de reconnaître spécifiquement la cible biologique. Aussi, pour que la détection, deviennent spécifique d'une cible biologique d'intérêt, le détecteur doit avoir sur sa surface des entités permettant une reconnaissance biologique appelés également bio-récepteurs. Ceux-ci vous sont présentés dans le paragraphe suivant.

1-2 Bio-récepteurs d'affinités

Ces bio-récepteurs sont des molécules biologiques impliquées dans la reconnaissance spécifique d'une molécule cible avec une haute affinité. Typiquement, les biomolécules les plus utilisés sont des protéines, telles que les enzymes, les anticorps, des peptides ou des oligonucléotides comme l'ADN ou les aptamères [Ged08]. L'examen de la littérature dans ce domaine montre que les bio-récepteurs les plus utilisées sont les aptamères et les immunoglobulines appelées également anticorps, c'est pourquoi, nous avons choisi de présenter ces deux biomolécules ci-après.

1-2-1 Les aptamères

Les aptamères sont des acides nucléiques. Ce sont des ligands synthétiques qui présentent un fort potentiel pour des applications dans le domaine des bio-récepteurs. Les aptamères sont des acides nucléiques simple-brins qui ont été sélectionnés pour leur capacité à interagir avec une affinité et spécificité pour les molécules cibles comparables à celle des anticorps. Ces aptamères présentent de nombreux avantages tels que ; (i) une synthèse chimique aisée et reproductible, (ii) ils peuvent être sélectionnés dans des conditions physiologiques ou non physiologiques, (iii) ils présentent une grande stabilité, (iv) le complexe aptamère/ cible est réversible. Pour toutes ces raisons, les aptamères sont des biomolécules de choix pour le développement de biocapteurs [Zho10].

Des aptamères ont ainsi sélectionnés pour lier un large panel de molécules; des petites molécules comme le K^+ , Hg^{2+} , ATP, cocaïne etc..., des macromolécules biologiques comme les peptides ou les protéines, ou des microorganismes comme les bactéries ou les cellules.

1-2-2 Les anticorps

Un des éléments de reconnaissance biologique les plus employés est l'anticorps. Les anticorps sont produits par l'organisme en réponse à une exposition à un microorganisme étranger ou à des toxiques. Ceux-ci sont sécrétés par les lymphocytes B. Ce sont des immunoglobulines présentant des avantages tels que la sélectivité, l'affinité et la facilité de production [Zhe12]. La structure est généralement présentée sous forme de Y, qui peut se différencier en deux parties : le fragment Antigen Binding (Fab), et le Fragment Crystallisable (Fc). Chaque immunoglobuline est composée de deux Fab qui sont les sites de reconnaissance de l'antigène et d'un Fragment Fc communs à tous les anticorps d'un même mammifère. Ces anticorps comportent de nombreuses fonctions carboxyles et amines qui facilitent leur greffage sur la surface d'un transducteur. Chaque bras de l'anticorps contient une chaîne lourde et une chaîne légère reliées entre-elles par des ponts disulfures. Le fragment Fab, est une région variable située à l'extrémité des deux bras du Y et le Fragment Fc, constant, est situé à la base du Y. L'antigène cible va interagir au niveau de la région variable. Les acides aminés présents dans la région variable sont différents d'un anticorps à l'autre dirigés contre des antigènes différents, alors que la séquence primaire en acides aminés de la région constante reste similaire d'une classe d'anticorps à l'autre. On trouve des régions variables au niveau des chaînes lourdes et légères. Celles-ci contiennent chacune 3 régions complémentaires désignées comme étant des complementary determining regions (CDR). Les acides aminés présents au niveau de ces CDR vont interagir avec les acides aminés de l'antigène. A titre d'exemple, le CDR 3 présent au niveau de la chaîne lourde est responsable de la spécificité de la liaison antigène-anticorps, alors que le CDR 3 de la chaîne légère est impliqué dans l'affinité avec laquelle l'anticorps lie l'antigène. Ces régions CDR sont appelées également régions hypervariable car les acides aminés qui les composent varient d'anticorps à un autre selon l'antigène qui est reconnu. On trouve également dans la région variable de l'anticorps des zones peu variables appelées FW (framework). Quatre régions FW s'intercalent avec les CDR sur les chaînes lourdes et les chaînes légères.

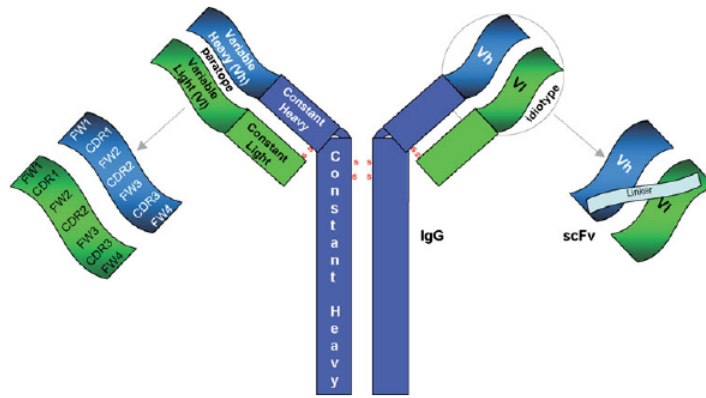


Figure 2 : Représentation schématique d'une immunoglobuline G [Zhe12]

Le site de l'anticorps qui lie l'antigène est le paratope, alors que le site de l'antigène reconnu par l'anticorps est l'épitope. Un anticorps lie l'antigène pour former un complexe immuns. Ce principe est la base de fonctionnement des capteurs immunologiques. Les anticorps de classe G sont les plus souvent utilisés en raison de leur grande affinité et spécificité pour l'antigène d'intérêt. Dans le contexte de développement des biocapteurs ou des autres immunoessais, la région constante de l'anticorps, contribue peu à la formation du complexe antigène/anticorps, et les autres molécules présentes dans les échantillons biologiques peuvent interagir avec de manière non-spécifique. Aussi, des anticorps simplifiés ont été récemment proposés ; fragments Fab, scFvs, minibodies, nanobodies..) (Figure 3).

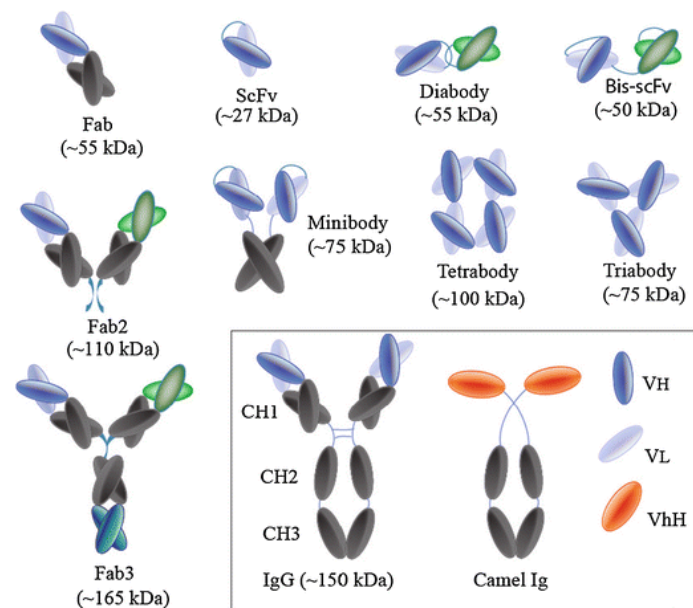


Figure 3: Représentation schématique d'anticorps et fragments d'anticorps [Zhe12]

Lorsque les immunoglobulines sont immobilisées sur des surfaces, elles sont susceptibles d'adopter différentes orientations, allongées « flat-on », une configuration en Y avec fragments Fab libres « End-on, Fab-up », ou les deux fragments Fab adsorbés sur la surface « End-on, Fab-down », et allongées avec un fragment Fab orienté à l'opposé de la surface « side-on » (figure 4)

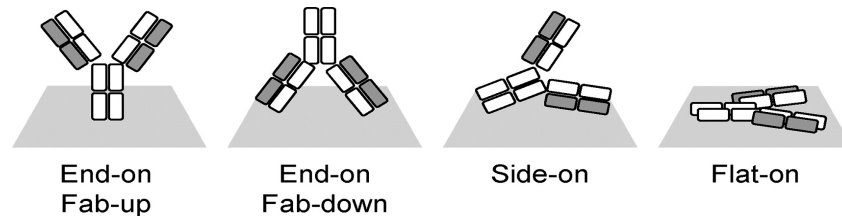


Figure 4: Représentation schématique des différentes orientations des anticorps [Wis11]

Ces différentes orientations ont un impact direct sur la sensibilité du biocapteurs. En effet, dans la configuration « End-on, Fab-up », les deux fragments Fab sont accessibles, et l'anticorps sera en mesure d'assurer sa fonction de bio-récepteur. En revanche, lorsque l'orientation est de type « End-on, Fab-down », il n'y aura pas de reconnaissance biologique, donc pas de détection de la cible. Pour les orientations « Side-on » et « Flat-on », la capacité de reconnaissance biologique ne sera pas optimale. C'est pourquoi, la problématique de l'orientation des anticorps après greffage sur la surface est primordiale, pour la sensibilité des récepteurs. Nous reviendrons sur ce point ultérieurement.

1-3 les modes de transductions

Lorsqu'au sein du biocapteur, la cible a interagit avec le bio-récepteur, il faut que ce signal biologique soit converti en un signal physique mesurable et exploitable, c'est ce qu'on appelle la transduction. Dans le cas des biocapteurs ne nécessitant pas de marquage, plusieurs types de transductions peuvent être employé. Nous pouvons distinguer trois catégories de transduction; électrochimiques, optiques et mécaniques. Dans l'exposé ci-dessous, nous avons choisi de présenter les biocapteurs immunologiques, selon une classification basée sur le transducteur associé.

1-3-1 Capteurs électrochimiques

Ces capteurs électrochimiques sont basés sur un mode de transduction, potentiométrique, ampérométrique ou conductométrique. Ceux-ci permettant une conversion de la reconnaissance biologique en un signal électrique mesurable. Ces immuno-capteurs sont également particulièrement adaptables à la miniaturisation. De plus, récemment de nombreux

nanomatériaux innovants se sont révélés très utiles pour augmenter la sensibilité de la détection [Mar10]. En effet, ceux-ci présentent des propriétés uniques avec un ratio surface/volume très favorable, et/ou la possibilité d'accélérer le transfert d'électron entre les électrodes et les biomolécules. Ce qui conduit à une amélioration des performances du capteur. Une grande variété de nanomatériaux a ainsi été utilisée ; des nanoparticules d'or, des nanotubes de carbone, ou du graphène [Wan13] (Figure 5).

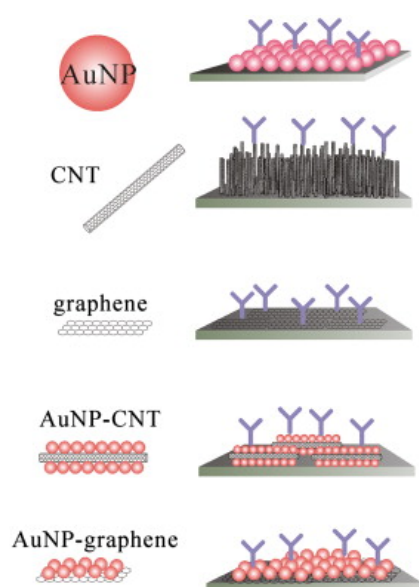


Figure 5 : Illustration des différents types de nanomatériaux utilisés pour le développement d'immunocapteurs électrochimiques [Wan13].

Ces méthodes électrochimiques peuvent être déclinées sous 3 modes :

Le mode potentiométrique

Celui-ci repose sur la mesure de la différence de potentiel entre l'électrode de mesure et l'électrode de référence. La détermination des potentiels des électrons permet de mesurer directement la concentration de l'analyte à quantifier.

Le mode ampérométrique

Il repose sur la détermination d'un courant traversant une cellule électrochimique à un potentiel imposé. Cette intensité est proportionnelle à la concentration d'espèces électroactives qui seront oxydées ou réduites au niveau de l'électrode indicatrice

Capteurs conductimétriques

La conductimétrie est une technique peu utilisée pour la bio-détection comparée à la potentiométrie ou l'ampérométrie. La détection repose sur la mesure du changement

d'impédance électrique ou "conductivité" qui peut se produire entre deux électrodes. Ces capteurs détectent toutes les espèces ioniques présentes dans la solution.

Ces méthodes sont particulièrement intéressantes, car elles peuvent s'intégrer de manière aisée dans un microsystème du type « laboratoire sur puce » (Figure 6). Cependant, elles requièrent l'intégration d'une électrode sur les substrats, ce qui constitue une étape supplémentaire pas toujours reproductible.

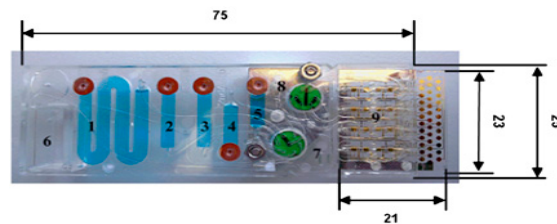


Figure 6: Laboratoire sur puce intégrant un module de détection ampérométrique [Kell11]

1-3-2 Biocapteurs à détection optique

Ces immuno-capteurs sont basés sur le principe d'une modification de la réponse à un faisceau de lumière polarisée suite à la formation d'un complexe antigène-anticorps. Ceux-ci ont suscité un grand intérêt ces dernières années, du fait que la plupart des méthodes ne nécessitaient pas de marquage et de leur facilité d'utilisation [Su98]. Pour ces capteurs, la mesure est liée aux modifications des propriétés optiques engendrées par la reconnaissance moléculaire antigène/anticorps. Parmi les capteurs optiques les plus couramment étudiés se trouve les capteurs à résonance de plasmon de surface (SPR). Récemment des appareils commerciaux utilisant cette technique ont été développés, notamment par la société Biacore.

Les capteurs à résonance de plasmon de surface sont associés à une onde électromagnétique évanescente générée à la surface d'une fine couche de métal après excitation par un faisceau de lumière polarisée incident à une longueur d'onde appropriée suivant un angle défini. L'onde évanescente générée est plus importante à la surface. C'est pourquoi, celle-ci est employée pour des interactions se produisant à la surface du capteur. Ce type de capteur comporte plusieurs composants tels que une source lumineuse, une surface de transduction, un prisme, des biomolécules ainsi qu'un système fluidique. La surface de verre est généralement recouverte d'un film d'or (50 à 100 nm). D'autres métaux tels que le cuivre, l'argent ou l'aluminium peuvent également être employés. Cependant, l'or est souvent préféré du fait de sa stabilité chimique. Le faisceau de lumière polarisée est dirigé à travers un prisme

sur une interface or/solution et l'intensité résultante de l'onde lumineuse réfléchie est mesurée en fonction d'un angle incident à l'aide d'une barette de diodes. Les conditions de résonance sont influencées par les biomolécules immobilisées sur la surface d'or. Ainsi, quand un antigène se lie sur l'anticorps immobilisé, cela entraîne un changement local de l'indice de réfraction qui modifie l'angle de résonance comme le montre la figure 7. L'intensité de l'onde réfléchie est directement corrélée à l'indice de réfraction qui est lui même proportionnelle à la quantité d'analytes. Cette méthode présente plusieurs avantages tels que ; (i) permettre l'analyse en temps réel des biomolécules, (ii) l'absence de marquage, (iii) la possibilité de déterminer un constante d'affinité.

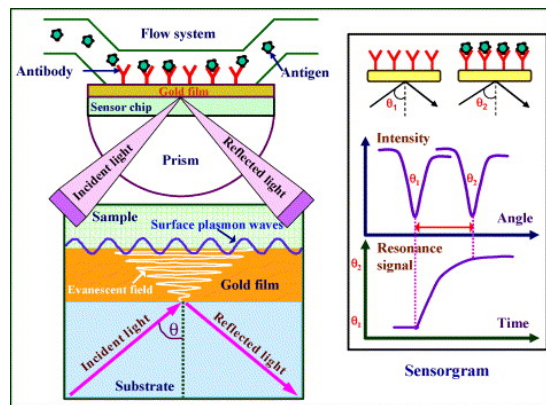


Figure 7: Représentation schématique d'un capteur SPR [Sha07].

Un grand nombre de travaux font état de l'utilisation de la SPR pour détecter la présence de marqueurs de pathologie dans les fluides biologiques. Ainsi, il a été possible avec ce type de biocapteur de détecter dans le sérum « la prostate specific antigen » (PSA), marqueur du cancer de la prostate, à un taux très faible (5 ng.mL^{-1}) [Kyp13]. Les peptides amyloïdes $A\beta$ 1-40 et 1-42 ont été détectés à un taux très faible dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (20 pM), par SPR. [Xia10]. Pour augmenter la sensibilité de la méthode, des auteurs ont eu recours à des traitements de surface innovants afin de réduire l'adsorption non spécifique en utilisant par exemple l'oxyde de graphène [Zha13] ou le disulfide de carbone [Niu12].

En conclusion, les avantages de ces capteurs sont les suivants ; ils ne nécessitent pas de marquage, l'analyse est très rapide et ce système peut s'adapter à la détection de différents types d'analytes.

Récemment, des auteurs ont comparé, dans la littérature les sensibilités de détection atteintes par les différents types de biocapteurs. La synthèse bibliographique résumée dans la figure 8 montre que les biocapteurs les plus sensibles sont des microstructures vibrantes.

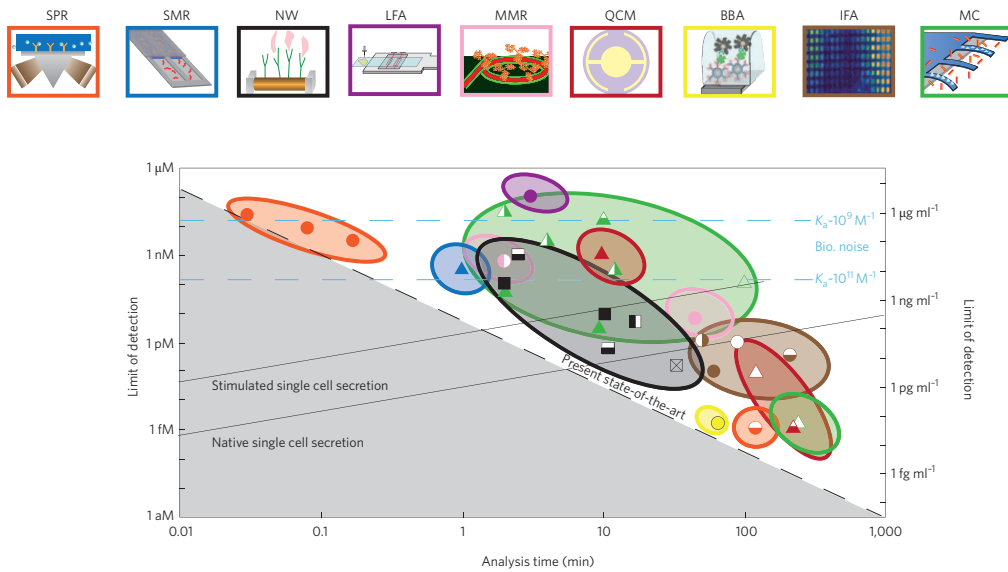


Figure 8 : Limites de détection des protéines pour les différents types de biocapteurs [Arl11].

Mon doctorat s'inscrivant dans un projet de recherche visant au développement de biocapteurs dédiés à la détection ultrasensible de protéines, je me suis tout particulièrement intéressée à ce type de détecteur mécanique appelés également micro/nanorésonateurs. C'est pourquoi, j'ai choisi de présenter de manière plus approfondie ces micro-structures vibrantes.

1-3-3 Biocapteurs à détection mécanique

Plus récemment, les progrès réalisés dans le domaine de la micro ou nano fabrication a permis le développement de microsystème à détection mécaniques. De plus, ceux-ci sont fabriqués à l'aide de matériaux semi-conducteur, tel que le silicium possédant le degré de rigidité idéal pour ce type de capteur et permettant une production « en masse » de ce type de capteur. Les capteurs ainsi développés ont présenté dans l'ultra-vide, une très haute sensibilité, de l'ordre du zeptogramme alors qu'une résolution de masse à l'échelle du nanogramme était obtenue en milieu liquide [Bra09]. De plus, la compliance mécanique du dispositif, sa capacité à être déformé, augmente raisonnablement lorsque sa taille est réduite, ce qui est en faveur d'une miniaturisation. Ceci potentialise la capacité de réponse du dispositif, ce qui lui permet de détecter des interactions de l'ordre d'une 10 pN. Le troisième avantage, que représente ce type de dispositif est que dans le cas d'une intégration dans un microsystème fluide, il permet une détection dans un milieu biologique et permet d'obtenir une réponse extrêmement rapide (ms).

Les microrésonateurs

Les microsystèmes électromécaniques sont des microstructures combinant des éléments mécaniques avec des circuits électroniques de commande. Ils comprennent une fonction d'actionnement, permettant la conversion d'une énergie électrique en énergie mécanique et la fonction de capteur qui détecte les variations d'amplitude de vibration [Wag07]. Ces microsystèmes sont très utilisés dans le domaine de la détection biologique appliquée aux virus, aux bactéries, ADN et les protéines. Le matériau utilisé le plus fréquemment est le silicium. Lorsque des entités biologiques interagissent avec la surface de la poutre cela conduit à une modification de l'amplitude de la poutre ou de sa fréquence de résonance. Ces micro-leviers opèrent en mode statique ou dynamique. En mode statique la liaison d'une entité biologique va entraîner une augmentation de la masse conduisant à une déflexion qui sera mesurable. En mode dynamique, une variation de la fréquence de résonance sera observée, lorsque la masse de la micro-poutre sera augmentée par l'adsorption d'une protéine à sa surface.

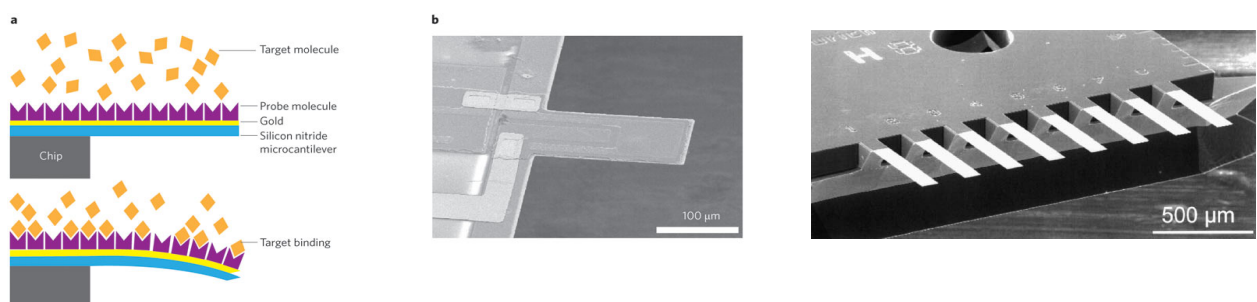


Figure 9: (A) Représentation schématique d'une micro-poutre en déflexion (mode statique), (B) Image de microscopie électronique à balayage sur un dispositif en mode dynamique, (C) Micro-poutres en réseau.

Détection en mode statique

Ces dispositifs mesurent la déflexion quasi-statique d'une micro-poutre liée à la l'interaction de biomolécules avec des groupes fonctionnels présents à la surface du dispositif (figure 9). Quand la biomolécule d'intérêt interagit sur la surface, cela entraîne un stress lié à la répulsion ou l'attraction électrostatique, à l'encombrement stérique, l'hydratation ou les effets d'entropie. Ceci va entraîner la déflexion du microlevier. Une détection en mode statique a été appliqué sur des standard de PSA et ont montré une limite de détection de 0.2 ng/mL [Wu01]. Cependant, d'autres auteurs ont montré qu'il pouvait y avoir une déflexion après interaction de la surface avec des molécules d'ADN, ARNm ou même un changement de conformation de la protéine [Arl11]. L'intensité de la défection peut être mesurée par une variation de l'angle de réflexion d'un faisceau laser, par détection piezoélectrique.

Détection en mode dynamique

Contrairement au dispositif décrit précédemment celui-ci n'est pas quasi-statique. Ils oscillent à une certaine fréquence et celle-ci change lorsque la molécule se fixe sur la micropoutre. Ces microrésonateurs fonctionnent de la manière suivante ;

un résonateur est composé d'une partie mobile dont les propriétés mécaniques sont liées aux différents modes de vibrations. Le paramètre de détection utilisé est la fréquence de résonance f_0 du résonateur. Cette fréquence de résonance dépend de sa constante de raideur k et de sa masse effective m [Var08]:

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad \text{Equation 1}$$

L'absorption d'espèces chimiques ou biologiques modifie la constante de raideur, l'épaisseur et la masse effective du résonateur, les variations de largeur ou longueur de la micropoutre étant négligeables. Ceci va entraîner une modification de la fréquence de résonance. En mesurant la différence de fréquence Δf , il est possible de retrouver la différence de masse Δm correspondant à la quantité de particules fixées. En approximant au première $\Delta f = f - f_0$, Il est possible de définir la relation suivante pour les poutres rectangulaires :

$$\Delta f = \frac{1}{2} f_0 \left(\frac{\Delta E}{E} + 3 \frac{\Delta t}{t} - \frac{\Delta m}{m} \right) \quad \text{Equation 2}$$

Dans cette équation, E représente la rigidité du matériau et t l'épaisseur de la micro-poutre.

En mode dynamique, une détection de la protéine du prion (PrP) à 2 ng/mL a été décrite [Var08]. Pour augmenter la sensibilité de détection, ces auteurs ont greffés l'anticorps de reconnaissance à une particule magnétique. Ceci va entraîner un incrément de masse qui va augmenter la variation de la fréquence de résonance. Cependant, ces expériences ont été menées dans une chambre à vide, peu compatible avec des essais réalisés avec des biomolécules présentes dans les fluides biologiques. Aussi, une autre approche a été proposée, consistant à placer le biocapteur dans la solution le temps que la molécule cible ait interagit avec le biocapteur. Ensuite, celui est retiré du milieu liquide, séché, puis la variation de

fréquence due à l'incrément de masse est mesurée. Les premières expériences menées dans cette direction ont permis la détection de virus (virions T5) avec une sensibilité de l'ordre du pM [Gup04], [Ili04]. Cependant, ce type de dispositifs a conduit à la liaison de molécules parasites présentes également dans le milieu biologique faussant ainsi la mesure. L'autre désavantage est qu'elle ne permet pas un suivi en mode continu.

Par ailleurs, il est important de noter que l'obtention d'une variation de fréquence basée sur une variation de masse requiert un résonateur avec un facteur de qualité (Q) vibrationnelle élevé. Or, ce facteur Q est compromis dans les fluides par la viscosité. On peut néanmoins considérer qu'une fréquence élevée, augmente le nombre de Reynolds et permet ainsi une valeur élevée du facteur Q . Cette augmentation de la fréquence peut être atteinte en réduisant les dimensions du microsysteme ou en appliquant un mode vibrationnel élevé [Bra05], [Gha07]. Cependant, ceci reste encore en discussion dans la communauté scientifique. En effet, on peut supposer que les analytes adsorbés sur la surface peuvent potentiellement induire une variation de la fréquence de résonance par changement de l'élasticité du biocapteur. Cette variation de l'élasticité pourrait être prépondérante par rapport à l'incrément de masse dans le phénomène de changement de la fréquence de résonance, même si l'entité adsorbée a une taille plus faible que la micropoutre [Arl11].

C'est pourquoi, le concept de micro-résonateur suspendu, intégré dans un dispositif microfluidique, proposé par l'équipe de Manalis constitue une grande avancée [Bur07]. Ce dispositif est constitué de micro-poutres comportant des canaux enterrés dans lesquels peuvent circuler les fluides. La micro-poutre est elle-même située dans une chambre à vide. Ce microsysteme combine ainsi deux avantages ; la possibilité de réaliser des expériences en respectant les équilibres biologiques et la grande sensibilité liée à la résonance dans le vide. Les mesures réalisées ont montré un facteur Q supérieur à 15000. Cependant, il est à noter que les mesures effectuées tendent à montrer qu'une dégradation de ce facteur de qualité pourrait se produire lors du remplissage des nano-canaux au cours de l'expérience. De fait, ces résultats ne sont pas encore compris sur le plan théorique [Arl11]. Néanmoins, la preuve de concept de ces dispositifs fluidiques a été réalisée en montrant qu'il y avait une variation de la fréquence de résonance lors d'une interaction anticorps/anticorps. Il a été possible de détecter une protéine marqueur de cancer, « activated leukocyte cell adhesion molecules » à une concentration de 300 pM en quelques minutes [Von10]. Il a également été démontré que ces dispositifs permettent un suivi de la croissance cellulaire et bactérienne, ce qui a permis d'évaluer la résistance aux antibiotiques de certaines souches bactériennes [God10], [Knu09].

Cependant, il a été également observé dans ces études une baisse de la sensibilité espérée du fait de problème d'adsorption non spécifique. En conclusion, nous pouvons constater, que ce type de dispositif intégrant la microfluidique est très prometteur mais des améliorations peuvent être apportées.

D'autres, types de capteurs basés sur des variations de fréquence de résonance sont très étudiés à l'heure actuelle ; i.e., les microbalances à cristal de quartz (QCM) ou les micro-résonateurs optiques en anaux.

Micro-balance à cristal de quartz

La détection dans ce type de biocapteur mécanique repose sur les propriétés mécaniques du quartz qui est un matériau piezoélectrique. Lorsqu'une déformation mécanique est appliquée sur le cristal de quartz, il y a création de dipôles électriques qui se traduit par une différence de potentiel lorsque les déformations mécaniques apparaissent. Par l'application d'un champ électrique, la détection est alors possible grâce à la variation de la fréquence de résonance d'un cristal piezoélectrique lors de l'incrémentement d'une masse Δm . Ainsi, il est possible de détecter une variation de masse, lorsque l'antigène interagit avec des anticorps préalablement immobilisés sur le cristal de quartz. Récemment, un capteur à microbalance de quartz à plusieurs canaux, a été proposé par Ogi en 2010 (Fig 10). Dans ce dispositif, des anticorps modèles, dirigés contre des IgG humaines, murines et de lapins ainsi que la protéine A issus du staphylococcus aureus ont été immobilisés à la surface de chaque canal et leur capacité à reconnaître les anticorps dédiés a été évaluée [Ogi10].

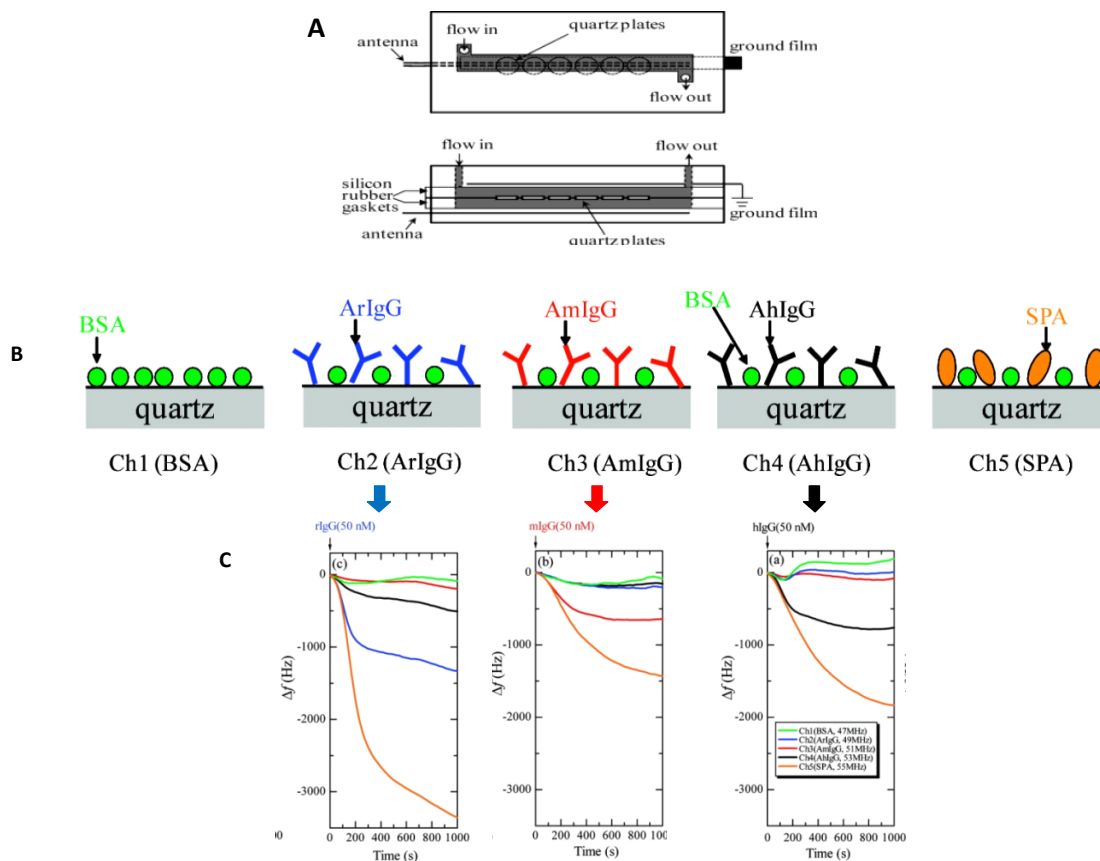


Figure 10: Microbalance à cristal de quartz pour une détection multiplexe ; (A) représentation schématique du dispositif, (B) Surfaces bioactives, (C) changement de fréquence de résonance après injection des anticorps humains, murins et de lapins [Ogi10].

Les résultats obtenus montrent que la variation de la fréquence de résonance est d'autant plus importante quand l'anticorps correspondant est injecté dans le dispositif. Alors que dans les autres canaux, le changement de fréquence est très faible. La seule exception concerne le canal au niveau duquel est immobilisé la SPA qui est un bio-récepteur qui lie tous les anticorps avec une très haute affinité. Ainsi, il est possible par cette méthode d'évaluer l'affinité et de suivre en temps réel la reconnaissance biologique.

Micro-résonateurs optiques en anneaux

Ces micro-résonateurs optiques sont couplés à une fibre optique évanescente. L'adsorption d'analytes à sa surface altère ces propriétés. C'est cette altération qui est mesurée.

Récemment, des micro-résonateurs en anneaux, à base de silicium, intégrant la microfluidique, ont été récemment proposés pour la détection d'un mélange complexe de 5 protéines [Was09]. Un capteur appliqué à la détection d'un unique bio-marqueur du cancer, le carcino embryonic antigen (CEA) a été proposé par Washburn et al, en 2009. Ce microsystème a ensuite été adapté à une détection multiplexe capable de détecter

simultanément plusieurs bio-marqueurs (PSA, α -fetoprotéine, CEA, TNF α et IL-8) [Was09], dans des gammes de concentrations allant de 10 à 150 ng/mL [Was10] (Figure 11).

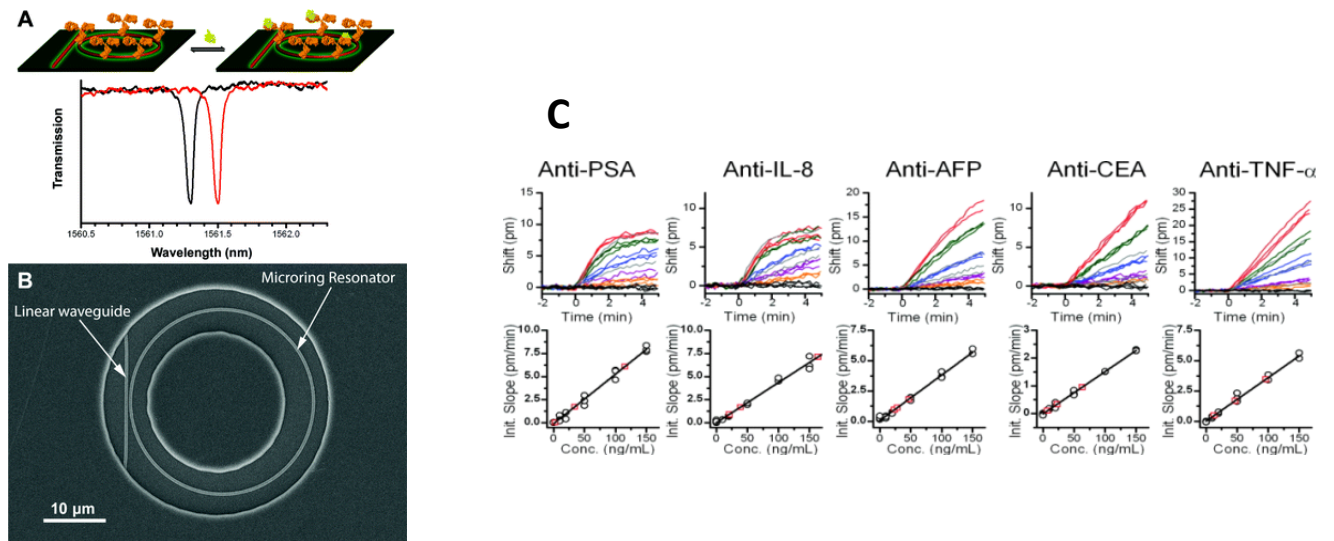


Figure 11 : (A) diagramme schématique illustrant le principe du micro-résonateur en anneaux, (B) image du micro-résonateur en anneaux, (C) courbe dose-réponse en temps réel après ajout des anticorps.

Ces travaux montrent qu'il est possible de réaliser une plate-forme de multiplexage en intégrant des microrésonateurs en anneaux dans un dispositif microfluidique. Cependant, les auteurs décrivent, là encore, des problèmes d'adsorptions non spécifiques, lorsque des expériences ont été menées sur du serum humain, d'autres analytes se sont adsorbés sur la surface du biocapteurs, ce qui entraîne une diminution de la sensibilité de détection.

Conclusion

Ce chapitre met en évidence les enjeux liés au développement des biocapteurs, qui sont dans le contexte du diagnostic ; une haute sensibilité ainsi qu'une spécificité pour une cible d'intérêt. Aussi, lorsqu'un biocapteur est développé, il doit être en mesure de détecter la présence d'un marqueur d'intérêt, présent à très faible taux, au sein d'un milieu biologique complexe tel que le sang, les urines ou le liquide céphalo-rachidien. Le choix du mode de détection est donc primordial. C'est pourquoi, les micro-résonateurs à base de silicium, présentant une sensibilité de détection de l'ordre du pM, sont dans ce contexte d'un grand intérêt. Cependant, comme nous l'avons exposé dans ce chapitre, d'autres paramètres sont importants pour améliorer la sensibilité de détection des biocapteurs. En premier lieu, la réduction de l'adsorption non spécifique d'autres biomolécules, également présentes dans les milieux biologiques, sur les surfaces conduira à une amélioration significative de la détection. De même, un bio-récepteur présentant une haute affinité pour la cible biologique conduira également à une haute sensibilité. Pour développer un nano/micro-résonateur à base de silicium, une préparation chimique préalable permettrait de limiter considérablement les phénomènes d'adsorption non spécifique. Pour cela, les silanes qui forment sur la surface des mono-couches auto-assemblées sont de bons candidats. De plus, il est possible de choisir le type de silanes en fonction des groupements chimiques que l'on souhaite obtenir en surface, pour immobiliser ensuite sur ces surfaces les biorécepteurs. C'est pourquoi, au cours de cette thèse, j'ai focalisé mes recherches sur l'étude de ces revêtements biocompatibles, les silanes, afin d'évaluer leur influence dans le greffage des bio-récepteurs.

Chapitre 2

Fonctionnalisation chimique de surface en vue d'un greffage biologique

Come nous l'avons exposé dans le chapitre précédent, pour développer un biocapteur en silicium, une des étapes consiste à préparer chimiquement la surface de détection. Ceci pour immobiliser des entités biologiques sur un matériau sans les dénaturer. Pour cela, nous nous avons choisi de greffer un composé organique à la surface du matériau, appelé une couche auto-assemblée [Sch00]. Cette alternative intéressante repose sur l'utilisation d'organosilanes : ils peuvent se lier de manière covalente sur le support solide constituant les bio-capteurs. Ceux-ci sont formés de longues chaînes hydrocarbonées susceptibles de former des monocouches dont l'épaisseur dépend de la longueur de la chaîne aliphatique [Gov94] ainsi que de son orientation [Clo08]. Ces silanes ont la capacité de s'auto-assembler en formant une monocouche présentant une grande stabilité. Cette auto-organisation permet une meilleure stabilité des protéines greffées sur des surfaces solides. De plus, ces monocouches ont l'avantage d'être de préparation aisée et requièrent une faible quantité de matériel chimique.

2-1 Mécanismes réactionnels de silanisation et protocoles

2-1-1 Définition des organosilanes

Ce sont des composés organiques contenant un atome de silicium. On distingue les silanes monofonctionnels, difonctionnels et trifonctionnels qui sont respectivement de type R_3SiX , R_2SiX_2 et $RSiX_3$, où R est une chaîne carbonée de longueur et de terminaison très variables et les X sont des groupements d'accroche facilement hydrolysables tel que Cl, OR ou NMe_2 . Ces groupements favorisent la formation des liaisons intermoléculaires entre la surface et le silane ($Si_{\text{coeur}}-O-Si_{\text{silane}}$). Plus il y aura de liaisons intermoléculaires silane/substrat et plus celles-ci seront fortes plus le greffage sera résistant. Ces silanes sont souvent utilisés pour immobiliser des bio-récepteurs sur des surfaces. En effet, ceux-ci

forment des mono-couches auto-assemblées biocompatibles permettant un greffage efficace de protéines sans altérer leur conformation spatiale.

2-1-2 Les différents greffages possibles

La réaction de silanisation a été mise au point il y a plus de 40 ans pour des applications chromatographiques [Big46]. Elle est aujourd'hui un procédé important, grandement utilisé, en recherche comme en industrie, pour la modification des propriétés de surface des matériaux inorganiques. Ses domaines d'applications sont très vastes, ils vont de la chromatographie jusqu'aux lubrifiants pour MEMS en passant par le greffage biochimique [Mab98][Fau04][Jon87]. Selon les conditions de réaction, la nature de l'organosilane et l'état de surface, des structures différentes peuvent être produites sur la surface. La complexité de cette chimie est décrite en figure 12.

2-1-3 Quelques caractéristiques des différents silanes

Les organosilanes monofonctionnels, comme leur nom l'indique, ne possèdent qu'un seul groupe hydrolysable. Ils sont donc très attractifs en termes de reproductibilité de structures de surface parce que seul un lien covalent (Si–O–Si) est possible avec la surface. Cependant, la réaction devient très lente dans les derniers stades. De longs temps de réaction – jusqu'à plusieurs jours – sont à prévoir pour obtenir une densité maximale de liens [Fad99].

Les silanes trifonctionnels sont les plus réactifs. En présence d'eau, ils sont capables de polymériser, ce qui accroît le nombre de structures possibles : le lien covalent, la polycondensation 2D et 3D sont possibles (figure 12). Les alkyltrichlorosilanes ont été les plus étudiés, notamment leur phénomène d'auto-assemblage.

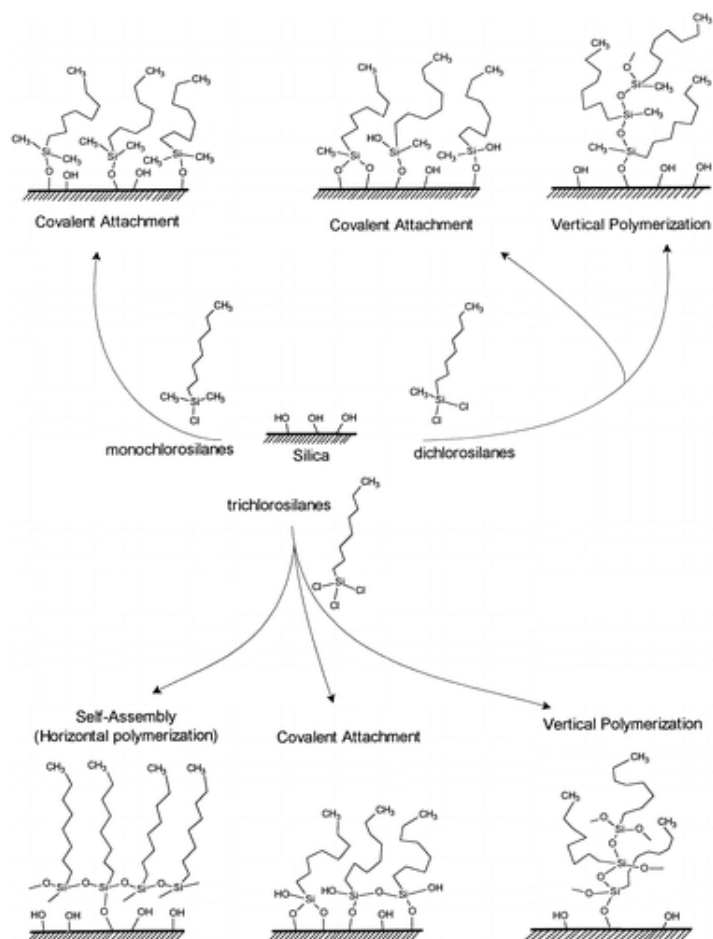


Figure 12 : produits possibles de la réaction d'alkylchlorosilanes avec des surfaces de silice [Fad99]

Ce système a tendance à former un grand nombre de liaisons fortes entre les molécules de silanes (polymérisation horizontale) tandis que peu de silanols se condensent sur la surface (chaque silane n'est pas lié à la surface, voir « Self-Assembly » figure 15). Ceci permet la préparation de monocouches de même qualité sur différentes surfaces, comme le silicium ou le verre. Evidemment, l'auto-assemblage n'est pas la seule réaction possible des alkyltrichlorosilanes avec la surface. Ils peuvent réagir également avec les groupements silanols de la surface pour former des liens covalents (« covalent attachement » figure 15). Les structures où les silanes sont triplement liés à la surface n'existent pas pour des raisons stériques. Les silanes difonctionnels sont les moins utilisés et étudiés. Peu de données sont disponibles à leur sujet.

2-2 Mécanisme de la silanisation

Le mécanisme le plus crédible aujourd'hui pour l'adsorption des alkylchlorosilanes sur la silice a lieu en trois étapes (figure 13) [Saj80][Sil91]:

- Le silane est attiré vers la surface de la silice par sa tête polaire, cette dernière est physisorbée par une couche d'eau adsorbée à la surface de la silice
- Les liaisons Si-Cl sont hydrolysées pour donner des liaisons Si-OH, des liaisons hydrogènes peuvent être créées entre le silane et la surface
- Une dernière étape met en jeu la condensation du silane avec les groupements silanols (Si-OH) présents sur la surface pour former des liens covalents Si-O-Si

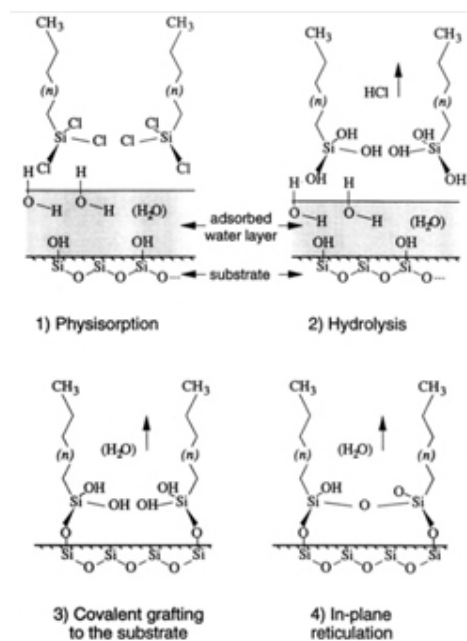


Figure 13 : mécanisme général proposé pour la réaction de silanisation. Noter la présence d'une couche d'eau sur la silice [Brz94].

En règle générale, l'étape d'hydrolyse est l'étape lente d'un tel procédé, la condensation se produisant immédiatement après la formation des groupements Si-OH [Nol68]. Mais Tripp et Hair, dans leur étude infrarouge sur la réaction des alkylchlorosilanes

avec la silice, ont montré qu'ici l'étape d'hydrolyse était réalisée plus rapidement que la condensation des silanols [Tri92].

Le mécanisme (figure 13) montre qu'une couche d'eau est nécessaire pour que la réaction ait lieu. Tripp et Hair l'ont confirmé, ils mettent en évidence qu'en absence d'eau il n'y a aucune réaction entre l'octadécyltrichlorosilane et une surface de silice [Tri95]. Ils ont également souligné que lors de la réaction entre l'octadécyltrichlorosilane, solubilisé dans le CCl_4 , et des surfaces de silice, une couche d'eau d'épaisseur supérieure à une molécule doit être présente sur la silice pour que la réaction ait lieu correctement. Si seule une monocouche d'eau est présente sur la surface de silice, l'adsorption de l'octadécyltrichlorosilane est très mauvaise parce que le trisilanol n'est pas adsorbé par la surface, il reste en solution dans le CCl_4 . Au contraire, lors de la même silanisation par le trichlorométhylsilane, ce dernier est rapidement hydrolysé, quelle que soit la quantité d'eau adsorbée sur la silice puis condensé. Wasserman et al. ont étudié le temps nécessaire à l'obtention d'une couche entièrement silanisée. Quand la silanisation était préparée dans une atmosphère sèche, par immersion, l'obtention d'une couche complète de silane sur le wafer était obtenue au bout de 5 heures alors qu'en travaillant sous 30% d'humidité cette même couche était obtenue au bout d'1 heure seulement. Cette différence de vitesse est, d'après eux, principalement due à différence de la quantité d'eau adsorbée sur les surfaces [Was89].

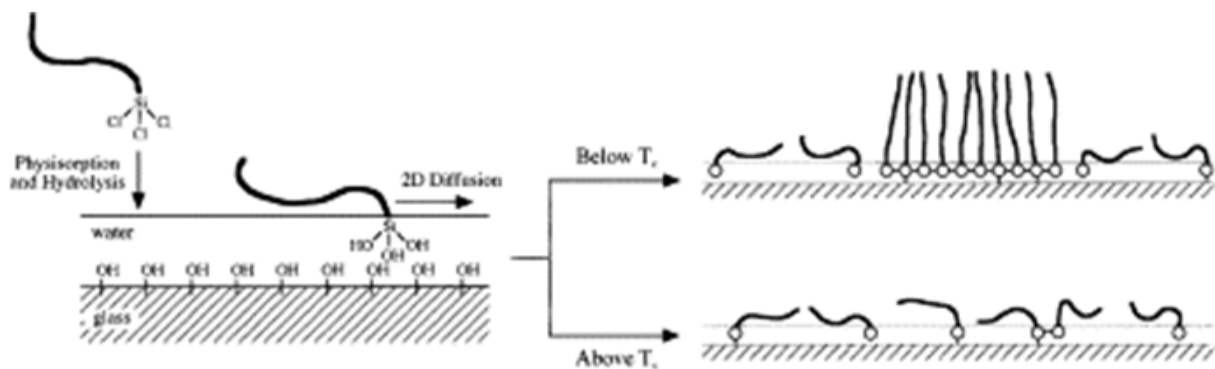


Figure 14 : illustration schématique du résultat de la silanisation en fonction de la température de travail. Le mécanisme est identique à celui décrit dans le paragraphe précédent [Iim00].

Un autre point très important dans la réaction de la silanisation est l'existence d'une température de transition T_c révélée par l'équipe de Brzoska et al. Ils ont étudié l'influence de la température de la réaction durant le procédé de silanisation pour des alkyltrichlorosilanes

ayant des chaînes carbonée de longueur différentes. Les tensions critiques de surface γ_c de wafers de silice silanisés ont été calculées à partir de mesures d'angle de contact. A partir de ces résultats, Brzoska et al ont déterminé une température de transition T_c pour des silanes dont la chaîne varie entre C_8 et C_{22} . Cette température varie de 0°C pour un C_8 à 38°C pour un C_{22} avec un pas de $3,5^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$. En dessous de T_c – c'est-à-dire quand les valeurs de tension de surface sont les plus faibles et sont indépendantes de la longueur des chaînes – les chaînes alkyles des silanes greffés sont plus beaucoup plus ordonnées et également plus denses que celles obtenues au-dessus de T_c . (figure 14) Pour obtenir des surfaces fonctionnalisées de bonne qualité il est donc important de travailler en dessous de la température de transition T_c [Brz94]. K. Iimura et al. sont arrivés aux mêmes conclusions en menant une étude infrarouge sur des substrats de verre [Iim00].

2-2-1 Fonctionnalisation par alkylsilane

Il existe principalement trois façons de « silaniser » : en phase vapeur, en solution ou par impression par contact dont nous allons décrire plus en détails les modes opératoires. Le procédé en phase liquide est aujourd'hui le plus utilisé. Il ne donne pas les meilleurs résultats mais c'est le plus facile à mettre en œuvre. Wasserman et al. réalisent une réaction en phase liquide. Ils utilisent plusieurs alkyltrichlorosilanes en solution dans de l'hexadécane ou du bicyclohexyl. La concentration du silane dans le solvant varie entre 0,1 et 0,5% en masse. Le système est maintenu sous atmosphère d'azote ou dans un dessiccateur tout le temps de la réaction. Le temps de réaction varie d'une à 24 heures pour étudier son influence. A la fin de la réaction les wafers sont lavés dans un bain de CHCl_3 deux fois, puis une fois dans un bain d'éthanol [Was89]. L'équipe de Harada et al, quant à elle, utilise un procédé d'impression par contact. Les silanes utilisés étaient l'octadecyltrichlorosilane et le 7-octenyltrichlorosilane. Ils étaient solubilisés dans le toluène juste avant utilisation à une concentration de 5 à 100 mM. Les wafers de Si qui devaient être silanisés étaient nettoyés dans une solution piranha (3 :1 $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$) pendant 2 min, rincés avec de l'eau déionisée et séchés sous flux d'azote. Ils étaient ensuite placés dans une chambre à UV/ozone pendant au moins 15 minutes, puis à nouveau rincés et séchés. L'impression par contact était réalisée en utilisant un timbre de poly-(diméthylsiloxane) recouvert d'un des silanes. Les solutions de silanisation étaient chargées sur les timbres par dépôt à la pipette puis rotation à 300 tr/min pendant 30s pour une répartition uniforme et en fine couche. Les timbres étaient placés manuellement sur les wafers propres. La température au cours de la réaction était maintenue constante. Après réaction les

wafers étaient lavés avec de l'hexane, du 2-propanol et de l'eau déionisée et séchés à l'azote [Har04]. Une dernière équipe a silanisé des surfaces de silice avec l'octadecyltriméthoxysilane. Le silane est déposé en phase vapeur sur l'échantillon en utilisant de l'Hélium comme gaz vecteur. Les températures du silane et de l'échantillon étaient contrôlées par des bains thermostatés. La réaction avait lieu à pression atmosphérique. La durée de la silanisation était de 30 min [Mar05].

La réaction d'oxydation du groupe vinylique terminal suscite également un grand intérêt grâce aux applications de greffage – notamment biologique – qu'elle permet. La procédure communément utilisée de nos jours par la plupart des équipes de recherche est l'oxydation du groupement vinyle par un mélange $\text{KMnO}_4/\text{NaIO}_4$ [Cai06][Fau94]. Par exemple, l'équipe de Fauchaux utilise un mélange composé de 0,5 mM de KMnO_4 , 19,5 mM de NaIO_4 et 1,8 mM de K_2CO_3 . La réaction dure 48 heures sous agitation. Le procédé utilisé par les autres équipes est semblable à celui-ci excepté quelques variations dans les quantités de chaque réactif ou le temps de réaction. L'autre réaction possible pour obtenir un groupe COOH terminal est de fonctionnaliser la surface avec un silane terminé par un groupement ester puis de l'hydrolyser. Wasserman et al. utilisent le $\text{Cl}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{CH}_3$ pour silaniser la surface. Ils hydrolysent ensuite la fonction ester avec une solution aqueuse concentrée d'acide chlorhydrique. L'angle de contact de la couche silanisée est de $\theta^{\text{H}_2\text{O}} = 70^\circ$, il passe alors à $\theta^{\text{H}_2\text{O}} = 40^\circ$ après hydrolyse de l'ester [Was89].

2-2-2 Fonctionnalisation par aminosilane

Lorsque le groupement terminal du silane est une fonction amine ($-\text{NH}_2$), l'organosilane est un amino-silane. Les amino-silanes sont utilisés pour les absorptions [Bal97] ou la création de liaisons covalentes des protéines [Bal06][Gha04]. L' amino-silane le plus utilisé est 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES).

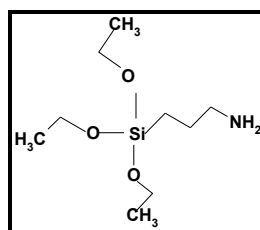


Figure 15: Structure du 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES).

L'APTES présente une fonction amine libre terminale. Le solvant de la réaction est généralement aqueux ou organique. Ces solvants sont justifiés par la nature chimique du groupement terminal, l'amine. En présence d'eau, un réseau tridimensionnel de polymères de silanes se forme à la surface du silicium :

Silanisation en milieux aqueux

S.Lenci [Len11] et R.Cabeça [Cab11] utilisent comme technique pour fonctionnaliser des surfaces de silicium oxydé un procédé de silanisation en milieu aqueux dans lequel ils utilisent l'eau comme solvant. Cependant les wafer de silicium sont nettoyés pendant 5 min dans une solution $\text{NH}_4\text{OH} : \text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{O}$, (1 : 1 : 4), puis ils sont rincés à l'eau déionisée et par la suite sont placés pendant 5 min dans une solution APTES/eau (0.05% v/v) [Len11]. D'autre ont placés les wafer pendant 1h dans une solution APTES /Eau (10% v/v) ensuite les wafer sont rincés deux fois à l'acétone ensuite à l'eau déionisée. Les analyses XPS ont montré qu'en se mettant dans un milieu basique on pourra obtenir meilleur rendement [Cab10].

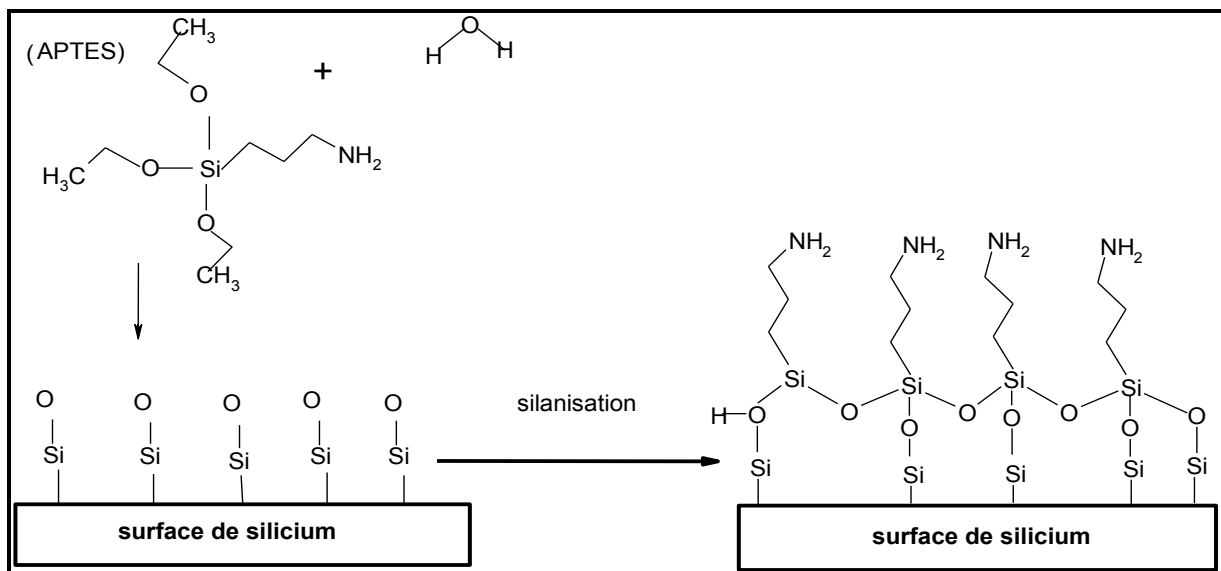


Figure 16 : Mécanisme général proposé pour la réaction de silanisation APTES.

Silanisation en milieu organique

Plusieurs équipes ont adopté le procédé de la silanisation organique, dans lequel ils utilisent un solvant organique (Acétone, éthanol ou toluène) à la place de l'eau.

Silanisation APTES/Acétone

Cabeça et al ont utilisé aussi cette technique, les wafer sont placés pendant 2h dans une solution APTES/Acétone (2% v/v), ils sont ensuite rincés deux fois à l'acétone et une fois à l'eau déionisée. Les analyses XPS ont montré qu'ils ont bien greffé de l'APTES sur la surface de silicium mais avec un rendement beaucoup plus moins qu'avec la silanisation aqueuse.

Silanisation APTES/ Toluène

Un autre procédé de silanisation a été retenu [How06][Jra10]. Le solvant organique utilisé est le Toluène, en modifiant chaque fois les proportions APTES/Toluène. Les wafers de silicium sont nettoyés pendant 1h dans une solution de Piranha H₂O₂ (30%):H₂SO₄ (98%), 3 :1. Puis ils sont rincés à l'eau déionisée et enfin séchés. Les wafer sont ensuite placés dans la solution APTES/Toluène (1% v/v) pendant 1h à 70°C, enfin ils sont rincés au Toluène et à l'éthanol [Jra10]. Les analyses FTIR montrent la présence des nouvelles bandes qui n'existaient pas sur le spectre de silicium pur. La première bande se trouve à 1561 cm⁻¹ qui correspond au groupement NH₂ et la seconde à 2923 qui correspond à la liaison C-H.

2-3 Techniques de Caractérisation physico-chimique de la silanisation

2-3-1 Angle de contact

La mesure de l'angle de contact, parce qu'elle est une méthode fiable et très rapide, est très utilisée pour la caractérisation de surfaces fonctionnalisées, notamment pour la silanisation [Cai06][Fad00][Lib08].

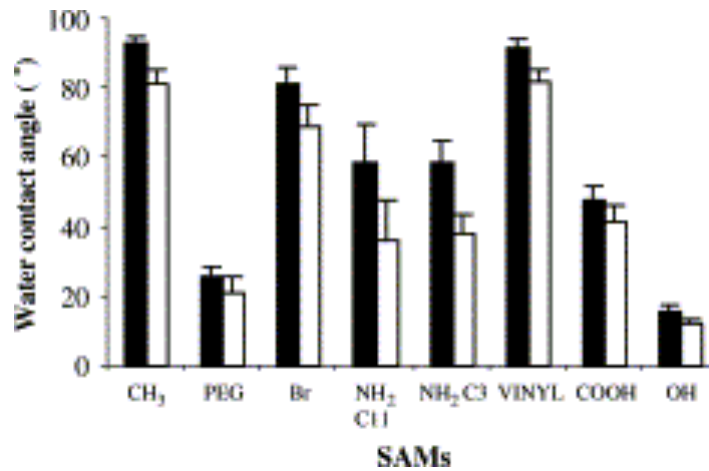


Figure 17 : Surface silanisées caractérisées en mesurant le plus grand (en noir) et le plus faible (en blanc) angles de contact d'une goutte d'eau déposée sur les surfaces.

Faucheux et al ont passé en revue les angles de contact de surfaces silanisées avec différents silanes (figure 17). Les couches terminées par $-\text{CH}_3$, $-\text{Br}$, $\text{CH}=\text{CH}_2$ produisent des surfaces hydrophobes ($\theta_a > 80^\circ$), tandis que celles terminées par $-\text{NH}_2$ et $-\text{COOH}$ forment des surfaces modérément mouillables ($\theta_a = 48-62^\circ\text{C}$), et celles terminées par $-\text{PEG}$ et $-\text{OH}$ donnent des surfaces hydrophiles ($\theta_a < 35^\circ$) [Fau04]. Wasserman et al. ont étudié la cinétique de la réaction d'oxydation par mesure de l'angle de contact (figure 18). Le silane utilisé était le 16-heptadecenyltrichlorosilane (abréviation HTS). Pour comparaison, ils ont également fait réagir un silane ayant un méthyle comme groupe terminal. Comme attendu la surface de l'HTS devient bien plus hydrophile qu'avec les groupements vinyles. La valeur limite d'angle de contact est $\approx 30^\circ$ à l'équilibre de la goutte. La mouillabilité de la couche préparée avec le silane ayant un méthyle comme groupe terminal est restée inchangée. Ils ont également démontré que l'épaisseur de la couche ne change pas lors de la réaction. Cette dernière remplace le groupement $\text{CH}=\text{CH}_2$ par un groupement COOH ; la variation de longueur résultant de cette réaction est plus petite que la précision de la mesure de l'ellipsomètre. Il est donc normal de ne pas voir de changement [Was89]. Rapide, très simple d'utilisation et fiable, la mesure de l'angle de contact regorge d'avantages pour la caractérisation des surfaces fonctionnalisées. Elle donne une première indication quant à la réussite de la réaction entreprise. Il est très aisé d'observer la différence entre des wafers bruts, silanisés et silanisés et oxydés avec cette méthode.

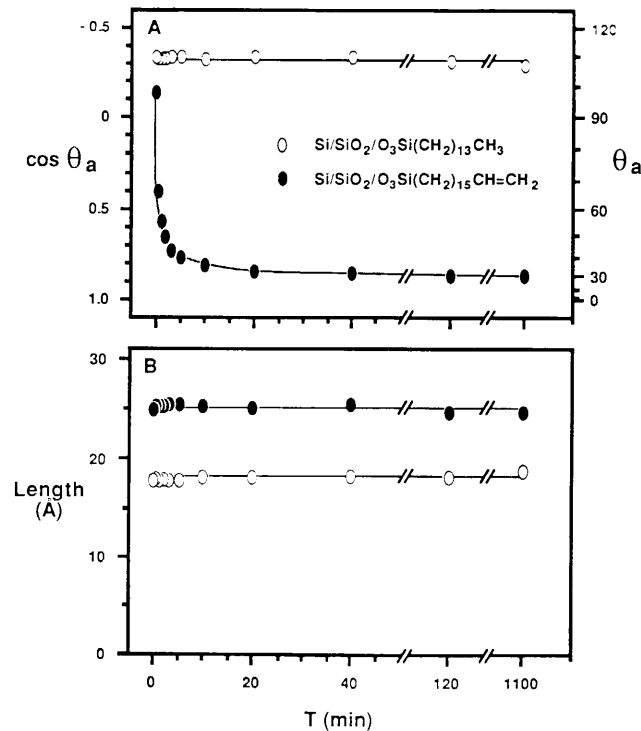


Figure 18 : Oxydation de monocouches d'alkylsiloxanes vinyl- et méthyl-terminés préparés à partir de $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{SiCl}_3$ et $\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CH}_2)_{15}\text{SiCl}_3$. L'angle de contact (A) et l'épaisseur (B) ont été mesurés en fonction du temps d'oxydation.

2-3-2 Microscopie à force atomique (AFM)

L'équipe d'Imura et al a effectué une étude de la réaction de silanisation suivie par AFM en fonction du temps d'immersion (figures 19 et 20). Ils ont utilisé une solution de trichloro(docosyl)silane (C22) dans un mélange 80/20%^{vol} de bicyclohexyl et CCl_4 . La silanisation était réalisée sur des substrats de verre. La réaction avait lieu dans une boîte à gants dont l'humidité était maintenue inférieure à 20% afin de minimiser l'effet de la présence d'eau dans l'atmosphère sur la qualité de la silanisation. La température de la réaction était de 5°C, contrôlée par un bain thermostaté. Ce choix de température n'est pas anodin : Imura et al. ont travaillé en dessous de la température de transition T_c pour obtenir la meilleure qualité de couche possible. La figure 19 fait clairement ressortir la croissance de la monocouche en îlots (en gris). Dans les premiers temps de la silanisation on observe une croissance rapide du nombre d'îlots. Quand le temps de silanisation augmente, la taille et le nombre d'îlots augmentent également. Dans les derniers temps de la silanisation, la croissance des îlots est stoppée et une structure fibreuse se développe entre eux. Pour finir, les trous sont comblés et la surface apparaît presque uniformément couverte.

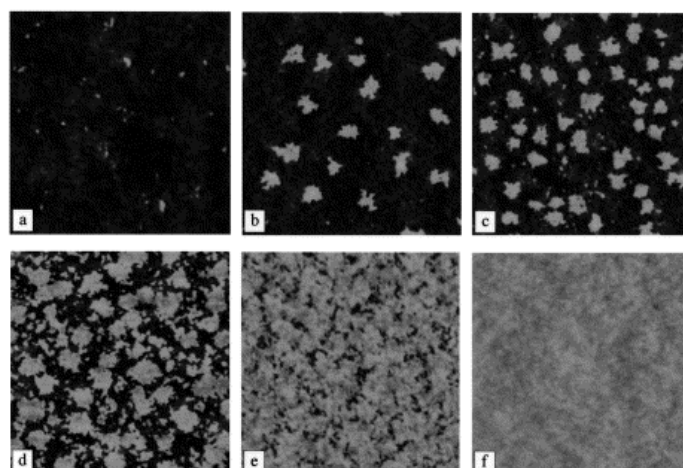


Figure 19 : formation d'une couche de silane C22 sur un substrat de verre, à 5°C, observée par AFM. Le temps de réaction était de 3 min (a), 10 min (b), 20 min (c), 1 heure (d), 2 heures (e) et 4,5 heures (f). Les images mesurent $1 \times 1 \mu\text{m}^2$

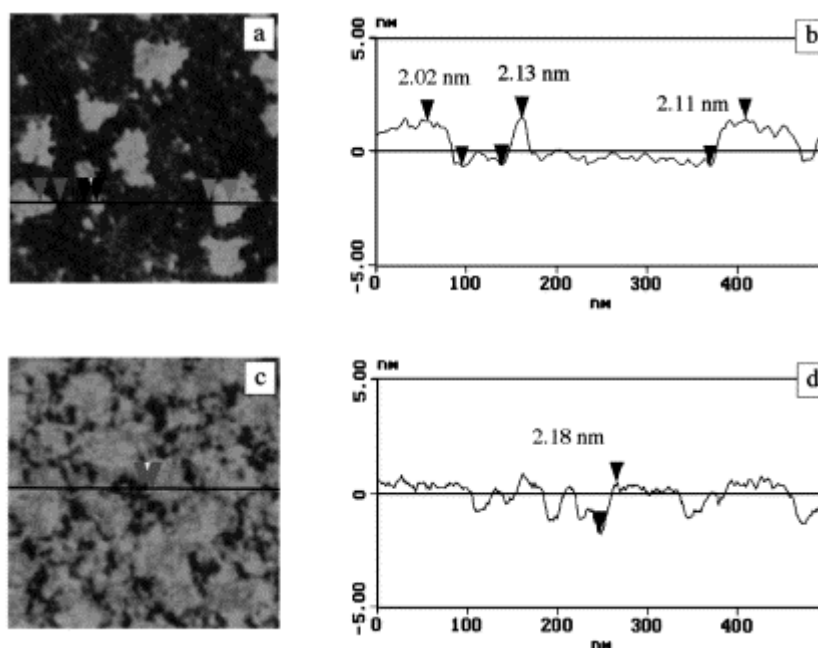


Figure 20 : vues de $500 \times 500 \text{ nm}^2$ d'une monocouche de silane C22 avec un temps de réaction de 20 min (a) et 2 heures (c) à 5°C. Coupes transversales de $500 \times 500 \text{ nm}^2$ le long des lignes matérialisées sur les images (a) et (c).

Les coupes transversales de la figure 20 soulignent que la différence de hauteur entre les îlots et les régions qui les entourent est d'à peu près 2 nm, ce qui est moins que la longueur attendue pour une molécule de C22 totalement dépliée et bien orientée. Le fait que la

différence de hauteur soit la même pour des temps de réaction de 20 min et 2 heures révèle qu'à ce stade les molécules ont déjà fixé leur conformation et qu'elles sont bien ordonnées et en couche dense. Iimura et al précisent que cette structure en îlots n'est jamais observée quand la réaction a lieu au-dessus de T_c . Il est donc crucial de travailler, si possible, à $T < T_c$ pour être assuré d'obtenir la meilleure monocouche possible [Iim00]. Libertino et al ont, eux, étudié la rugosité des surfaces par AFM pour démontrer que leurs réactions avaient fonctionnées [Lib08]. Le wafer de silice propre a une rugosité rms de surface de 0,14 nm, ce qui veut dire qu'il n'a pas subi de modification macroscopique durant le nettoyage.

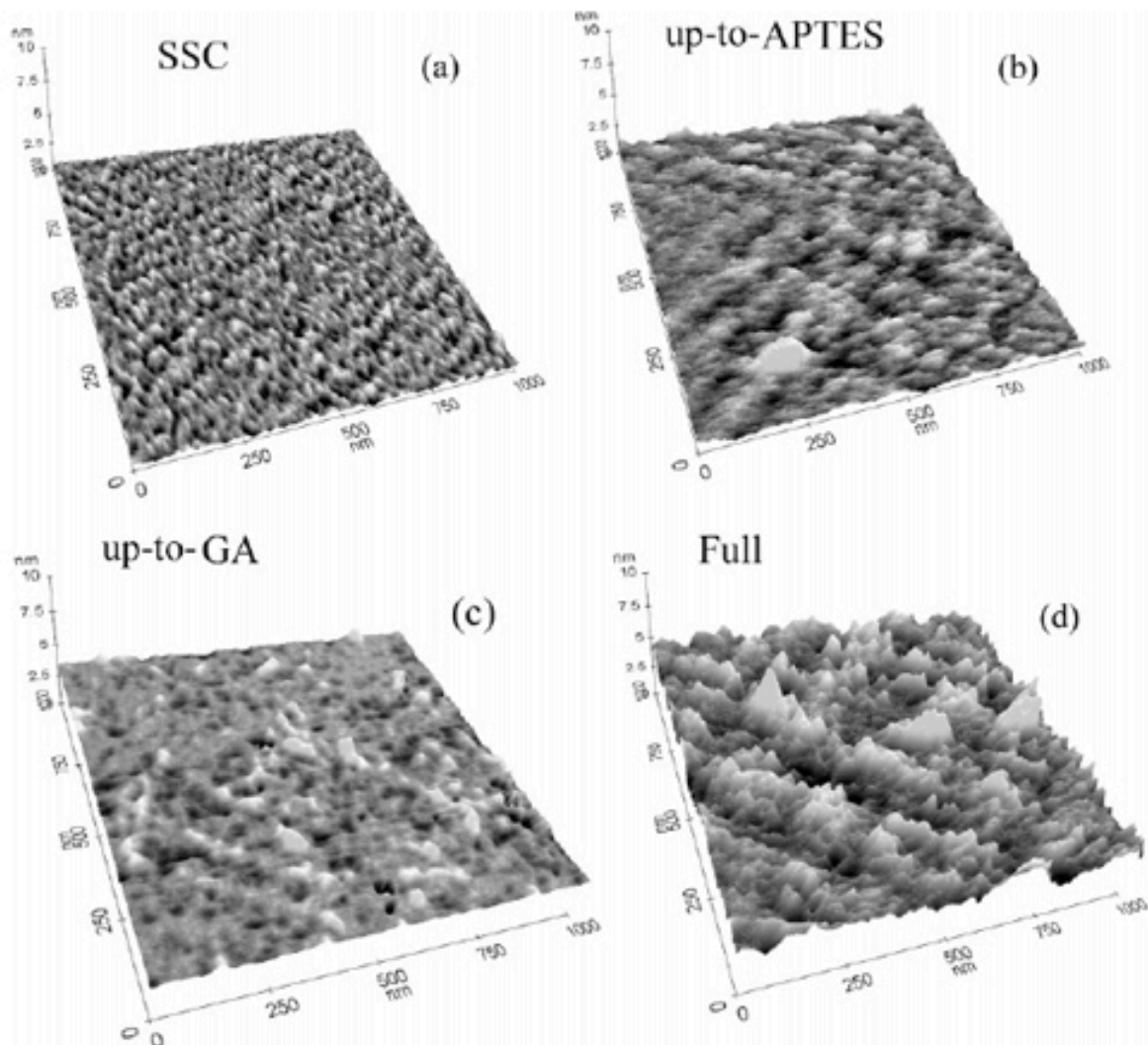


Figure 21 : Images AFM d'un wafer de silice propre (a), silanisé (b), silanisé + dépôt glutaraldéhyde (c), silanisé + dépôt + greffage (d).

La silanisation utilisant le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) en phase vapeur a permis de fonctionnaliser la surface en groupements NH_2 . Ces groupements peuvent se lier très facilement avec le ligand : le glutaraldéhyde (GA). La rugosité rms de la surface silanisée est de 0,22 nm, soit presque deux fois plus que pour le wafer propre. Cependant, l'épaisseur de l'APTES est normalement de 0,8 +/- 0.1 nm. Il est alors concevable de penser que les chaînes alkyles du silane ne sont pas bien ordonnées sur la surface. Ce problème peut venir notamment de la température mais elle n'est malheureusement pas mentionnée dans l'étude. Il n'est donc pas possible d'en savoir plus. L'immobilisation du GA lors de la troisième étape donne une rugosité rms de 0,19 nm, peu distinguable de l'étape précédente. Enfin le procédé d'immobilisation total donne une rugosité rms de 0,59 nm. La plus forte augmentation de rugosité intervient à la dernière étape, là où la molécule à greffer est la plus grosse. Ce résultat est tout à fait logique.

On voit bien dans ces exemples que la détermination par AFM de la rugosité des surfaces donne de précieuses indications quant à la réussite des différentes étapes du procédé [Lib08]. C'est une méthode topographique d'excellence, qui une fois corrélée avec les caractéristiques du procédé peut nous donner des indications sur l'agencement des molécules greffées ou même sur la nature chimique de la surface, sans pour autant remplacer l'XPS.

2-3-3 Spectroscopie Photo-émissive des Rayons X (XPS)

Cai et al ont silanisé des films de titane avec le 7-octenyltrichlorosilane en solution dans du pentane anhydre pendant 1 heure [Cai06]. Ils ont ensuite généré des groupements carboxyliques par oxydation des groupes $\text{CH}=\text{CH}_2$ terminaux du silane selon le procédé décrit par Wasserman et al [Was89]. La caractérisation a été effectuée par XPS.

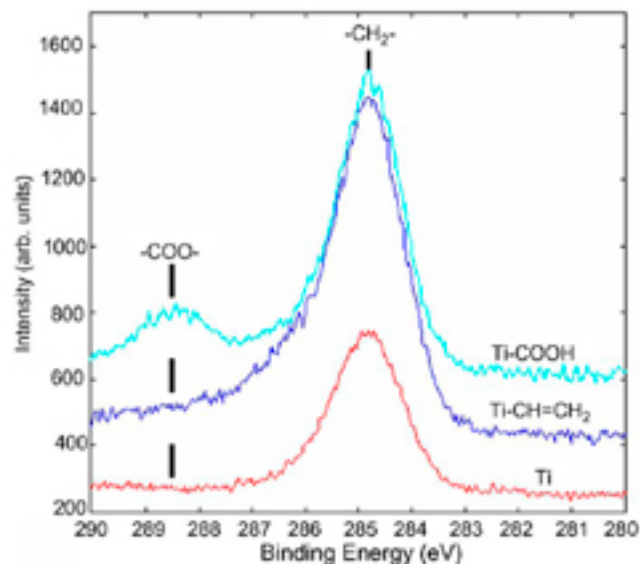


Figure 22 : spectres haute résolution normalisés du pic C1s

La figure 22 expose les spectres haute résolution du film de titane et des films fonctionnalisés dont le groupement terminal est $-\text{CH}=\text{CH}_2$ et $-\text{COOH}$. Les spectres des deux surfaces fonctionnalisées affichent une concentration de carbone relativement haute, dont le pic est centré à 284,8 eV. Ce résultat prouve l'existence d'une chaîne carbonée sur les films de titane. Elle ne peut venir d'autre part que du silane ; il a donc été greffé la surface. Sur le spectre de l'échantillon silanisé et oxydé est apparu un pic à 288,5 eV, il est caractéristique du groupe $-\text{COOH}$. Ceci suggère fortement une réussite de l'oxydation. Ce travail est très semblable au notre, tant dans le procédé de fonctionnalisation que dans la caractérisation, il revêt donc une grande importance pour notre travail. Une étude quasiment identique a été menée par Wasserman et al dans laquelle ils ont vu l'apparition d'un pic à 289,2 eV pour des surfaces de silice silanisées avec différents silanes (longueur de chaîne différente) et oxydées [Was89]. L'XPS apparaît alors comme la méthode idéale pour caractériser la fonctionnalisation de surface d'un point de vue chimique. Cependant, elle est plus lourde à mettre en œuvre que les autres (temps de manipulation plus important), elle doit donc être utilisée quand des informations précises sur la nature chimique de la surface, que les autres méthodes ne peuvent apporter, sont nécessaires.

2-3-4 Spectroscopie Infra-rouges à transformée Fourier (FTIR)

Dans le but de mettre en évidence la fonctionnalisation de surface apportée par la silanisation, nous utilisons la caractérisation par spectroscopie infra-rouge. Le principe cette spectroscopie repose sur l'énergie de vibration des molécules. En effet, lorsque que l'énergie du faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule irradiée, celle-ci

absorbe une partie du rayonnement infra-rouge. Cette absorption entraîne une diminution d'intensité du faisceau transmis, dans le cas de la transmission, ou réfléchi, dans le cas de la réflexion, une fois arrivé au niveau du détecteur.

Les surfaces silanisées représentent un environnement chimique ayant une influence importante sur les groupements de surface que l'on souhaite mettre en évidence. Cela s'explique par la très forte proportion de silicium/silice par rapport à celle des groupements greffés par la fonctionnalisation de surface. Cet environnement induit donc des réponses différentes de celles trouvées dans les tables classiques de spectroscopie infra-rouge. C'est pourquoi, une étude bibliographique menée au préalable nous permet de situer sur les spectres les réponses attendues suivant la silanisation effectuée :

Tableau 1 : Mode de vibrations des différents groupements chimiques

Type de silanisation	Liaison et mode de vibration	Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Références
Silanisation avec l'alkylsilane : Groupements C=C attendus en surface	$\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_2)$ et $\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_2)$	2919 et 2851	[Lum04]
	$\nu(\text{C}=\text{C})$	1640	[Lau87]
Silanisation avec l'APTES : Groupements NH ₂ attendus en surface	$\nu(\text{NH})$ élongation	3373 et 3310	[Van95]
	$\nu(\text{NH}_2)$ déformation	1597	[Mii10]
Après oxydation de silanisation avec l'alkylsilane : Groupements COOH attendus en surface	$\nu(\text{C}=\text{O})$ élongation	1718	[Li07]
	$\nu(\text{C}-\text{OH})$ élongation et déformation $\nu(\text{OH})$ des acides carboxyliques	1278 et 1413 3500	[Adj11]

Conclusion

Il existe une grande variété de silanes permettant d'obtenir des surfaces présentant des groupements chimiques variées, notamment carboxyles ou amines. Nous constatons qu'il existe une grande variété d'outils de caractérisation de surface fonctionnalisée, qui permettent de vérifier que la formation de la mono-couche auto-assemblée est bien homogène et que les groupements chimiques souhaités sont présents à la surface. Nous pouvons, pour cela, nous appuyer sur des méthodes microscopiques (AFM) et spectroscopiques (XPS et FTIR) et réaliser des mesures d'angles de contact. Deux types de silanes nous ont semblés particulièrement intéressants pour notre étude, le 7 octenyl trichlorosilane (OTS) et l'APTES, qui permettent d'obtenir des surfaces présentant respectivement des groupements carboxyliques et aminés. Ceux-ci vont permettre une immobilisation des protéines/bio-récepteurs à la surface du biocapteur. Cependant, il est important de noter qu'il existe une grande variété de méthodes permettant l'immobilisation des protéines. C'est pourquoi, dans le chapitre suivant, nous avons étudié ces différents modes, afin de choisir celui qui nous paraissait le plus adapté pour notre étude.

Chapitre 3

Immobilisation des protéines sur des supports fonctionnalisés

3-1 Introduction

Comme, nous l'avons vu dans le chapitre précédent, nous nous sommes attachés dans ce chapitre à évaluer les avantages et inconvénients des différentes méthodes de greffage des protéines sur ces surfaces. Cette étape d'immobilisation des protéines constituant une étape-clé dans le développement du biocapteur. Cette étape est particulièrement délicate car, compte-tenu de la nature « métastable » des protéines, il faut éviter, lors de leur immobilisation, une altération de leur conformation donc de leur fonction biologique.

Différentes méthodes ont été proposées pour attacher les protéines sur des surfaces fonctionnalisées. Elles reposent généralement sur des interactions entre les protéines et les groupements chimiques présents sur les surfaces et sont divisées en deux catégories; non covalente (électrostatiques, hydrophiles ou hydrophobes) et covalentes.

3-2 Immobilisation non-covalente

3-2-1 Immobilisation par physisorption

L'immobilisation des protéines sur les surfaces fonctionnalisées peut être réalisé à l'aide d'interactions de différentes natures ; électrostatiques, hydrophobe, liaisons hydrogènes. Un exemple d'immobilisation non covalente, utilisant les interactions électrostatiques, a été proposé par Caglayan et ses collaborateurs pour la serum albumine bovine (BSA) [Cag09]. Ces interactions impliquaient un groupe carboxylique chargé négativement de la monocouche auto-assemblée et un groupe aminé chargé positivement de la BSA (figure 26). Cette interaction a également été exploité pour l'immobilisation du Cytochrome c sur une monocouche auto-assemblée présentant un acide carboxylique à son extrémité [Gro07].

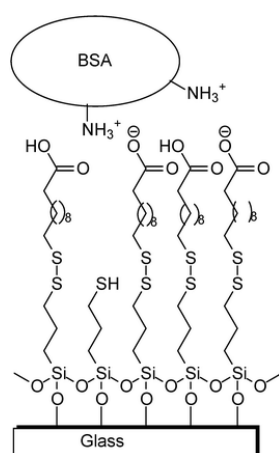


Figure 23 : Représentation schématique de l'immobilisation d'une protéine par interactions électrostatiques. [Sam11]

D'autres travaux font état de l'immobilisation du cytochrome c, sur une surface fonctionnalisée à l'aide de liaisons hydrogènes établies entre les groupements glycosylés de la surface et les groupements chimiques présents au niveau des chaînes latérales des acides aminés des protéines [Gom06].

En conclusion, les avantages, de l'immobilisation par physisorption, sont liées à une mise en œuvre facile, ne nécessitant qu'une seule étape, pouvant être appliqué à un grand nombre de protéines. Cependant, de nombreux inconvénients sont à souligner tels que ; (i) le détachement de la protéine de son support, (ii) un contrôle difficile de la densité de greffage, (iii) une possible réduction de l'activité biologique de la protéine due à une dénaturation lors de l'immobilisation sur son support ou à une immobilisation aléatoire pouvant masquer les sites actifs de la protéine (e.g. anticorps ou enzyme).

3-2-2 Immobilisation par bio-affinité

L'immobilisation utilisant l'affinité biologique permet une immobilisation orientée des protéines évitant ainsi le masquage de leur site actif. Ceci offre un avantage non négligeable par comparaison avec d'autres techniques. De plus, il est souvent possible de détacher la protéine et de réutiliser la surface.

Interaction Biotine/Streptavidine

Une des méthodes d'immobilisation non covalente la plus couramment utilisée repose sur l'interaction d'une vitamine, la biotine avec une protéine qui peut être la streptavidine, la neutravidine ou l'avidine (**Figure 24**). Ces différentes entités biologiques sont des glycoprotéines tétramériques. Elles sont solubles en solution aqueuse et stable dans une large

gamme de pH et température. L'avidine ou la streptavidine peut lier jusqu'à 4 molécules de biotine. L'interaction biotin-avidine est une des plus forte et présente une grande affinité ($K_d = 10^{-15}$ M). La liaison biotine / streptavidine, se forme très rapidement, c'est pourquoi ce mode d'immobilisation est utilisé par de très nombreux groupes. Holmberg et al, ont cependant montré que l'incubation en phase aqueuse non ionique à plus de 70 °C entraînait une rupture de l'interaction biotine-avidine [Hom05]. La biotine ou l'avidine/streptavidine peuvent être attachées à une grande variété de substrat par adsorption ou couplage covalent. L'immobilisation d'une protéine sur une surface, par cette méthode, se produit généralement par l'intermédiaire d'une multicouche formée par la biotine/ l'avidine ou streptavidine/ et la protéine « biotinylée ». Cette approche est très souvent utilisée car elle donne lieu à une organisation supramoléculaire où deux sites de liaisons sont du côté de la surface fonctionnalisée, et les deux autre sites disponibles pour la reconnaissance protéique (figure 24)[Rus07].

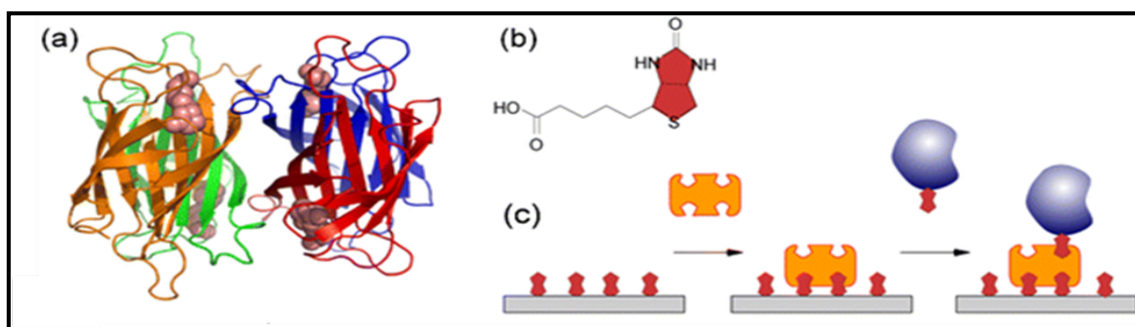


Figure 24 : Représentation schématique du greffage non covalent streptavidin/biotine : structure tridimensionnelle de la streptavidine (tétramérique), (b) biotine, (c) immobilisation d'une protéine biotinylée via la streptavidine (format de type sandwich) [Chi09]

Pour l'attachement de la biotine, les surfaces doivent être préalablement activées. Les surfaces silanisées peuvent être traitées par de l'acrylamide ou du 4-aminophenylmercurique acétate (APMA) pour générer des groupements aminés libre qui vont réagir avec la biotine estérifiée par le NHS. Une autre approche consiste à fonctionnaliser la surface sous forme de monocouche auto-assemblée biotinylée. Cette stratégie a été employée par l'équipe de Knoll pour immobiliser sur une surface d'or de la betalactamase biotinylée par l'intermédiaire de la neutravidin, elle-même immobilisé sur une surface biotinylée [Xu05]. Une stratégie alternative a été proposée, ou la streptavidine a été immobilisée de manière covalente sur une surface d'or, recouverte de chaînes polyéthylène glycol (PEG) présentant à leur extrémité des groupements carboxyliques. Ceci a permis d'immobiliser des anticorps biotinylés dirigés

contre le peptide amyloïde, bio-marqueur de la maladie d'Alzheimer pour des analyses par SPR. Les auteurs ont également exploité la possibilité de rompre les interactions biotine/streptavidine pour réutiliser le biocapteur avec d'autres anticorps biotinylés. En conclusion, une réutilisation de cette surface est possible par cette méthode. Cependant, le fait que les protéines à immobiliser doivent être préalablement biotinylés représente une contrainte.

System His-Tag

Ce mode d'immobilisation requiert l'utilisation de protéines recombinantes sur lesquelles sont greffées des histidines (his) ou des chaînes poly(his) [Sch97]. Il permet un greffage de protéines site-spécifique, car le marquage par l'histidine ou le poly histidine peut être réalisé, de manière localisée, au niveau de l'extrémité C ou N terminal ou au niveau de la boucle de protéine. Les chaînes poly(his) seront positionnés sur la protéine de manière à être éloignées du site actif. L'immobilisation de protéines marquées par une chaîne poly(his) s'effectue via une molécule chélatant le nickel telle que, l'acide nitriloacétique (NTA). Le NTA est un ligand tétradenté qui est susceptible de former un complexe hexagonal avec le Ni^{2+} , le Cu^{2+} , Co^{2+} laissant sur le métal deux sites de liaisons disponibles pour une séquence His_6 (figure 25). Le NTA peut être assemblé à la surface par l'intermédiaire de la formation d'une monocouche auto-assemblée. Des études ont montré qu'il était possible de former, sur une surface d'or, une monocouche auto-assemblée constituée de 11-mercaptopundecyl amine modifiée par le maléimide-NTA. Ils ont immobilisé de manière orientée une protéine liant une séquence spécifique de l'ADN (TATA box), la TBP [Weg03] (figure 25). D'autres auteurs ont utilisé la même stratégie pour immobiliser un fragment Fab recombinant poly(his) sur la surface fonctionnalisée d'un immunocapteur électrochimique [Val07].

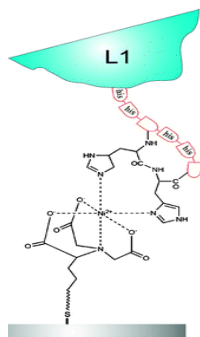


Figure 25 : Représentation schématique de l'immobilisation d'une protéine par l'intermédiaire d'une chaîne poly(his). [Fra10].

Cependant, de nombreux expérimentateurs ont constaté que la faiblesse de l'interaction entre l'histidine et le Ni-NTA, pouvait entraîner une dissociation non souhaitée de la protéine et de son support.

Immobilisation par ADN :

Un autre mode d'immobilisation par bio-affinité repose sur l'utilisation de l'ADN, notamment sa capacité à former des paires de base à l'aide de deux mono-brins complémentaires d'acide nucléique [Nie02]. L'immobilisation de protéine par cette méthode s'effectue en deux étapes; (i) conjugaison d'une protéine par un simple brin d'ADN comportant une séquence spécifique, (ii) hybridation avec une autre séquence d'ADN simple brin. Compte tenu de la spécificité des brins d'ADN complémentaires, cette méthode permet de greffer différents types de protéines sur une même surface (Figure 26). La surface peut ensuite être réutilisée après la dénaturation de la double hélice d'ADN en milieu alcalin [Sam11].

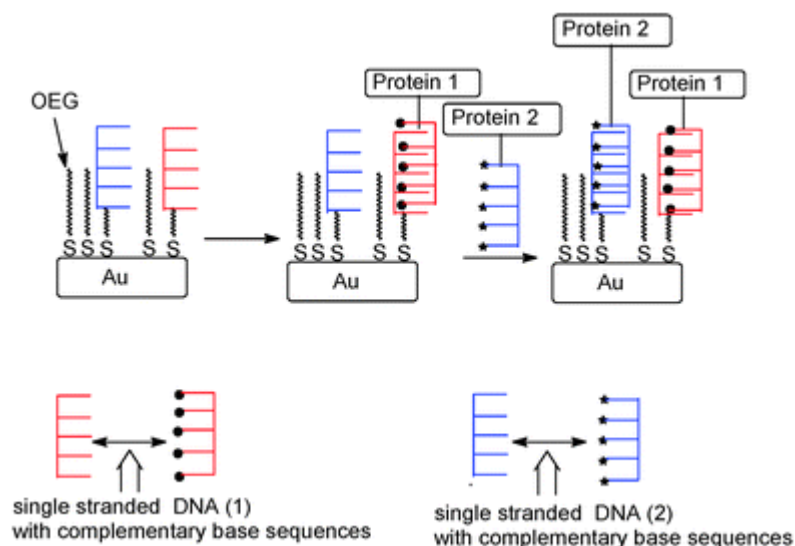


Figure 26: Représentation schématique d'une protéine immobilisée par l'intermédiaire des interactions ADN [Sam11].

Cependant, l'immobilisation d'une protéine à l'aide de cette stratégie requiert l'attachement d'un oligonucléotide. Pour cela, on utilise généralement le bis(sulfosuccinimidyl) pour lier de manière covalente les groupements aminés des protéine et les nucléotides. Ainsi, une équipe a développé un biocapteur SPR dont la surface était constituée d'une monocouche auto-assemblée comportant des oligoéthylène glycol (OEG) thiols et des OEG thiols substitués par de l'ADN simple brin. L'anticorps conjugué par la séquence d'ADN complémentaire a ensuite été immobilisé par hybridation spécifique des deux brins d'ADN [Boo06]. D'autres modes d'immobilisations plus complexes combinant les

interactions ADN avec d'autres types d'interactions biotine/streptavidine [Lad04] ou protéines G [Jun07] ont également été proposées.

3-3 Immobilisation covalente

Pour obtenir des greffages performants (robustes et durables dans le temps), les biomolécules peuvent être liées à la surface de matériaux de manière covalente. Pour cela, il est nécessaire d'avoir une couche de groupements organiques à la surface du matériau. La technique la plus utilisée à ce jour est le greffage de couches auto-assemblées à la surface des matériaux. Ainsi, des chaînes aliphatiques ont été greffées sur des surfaces de substrat de verre, de silicium ou de métaux; (i) des monocouches de longues chaînes alcool sur du verre], (ii) amines sur du platine, (iii) des chaînes alkyltrichlorosilane sur du silicium, (iv) des chaînes de thiols, thioesters, et alkyl-disulfides sur des surfaces d'or. Les couches auto-assemblées formées permettent des greffages de biomolécules avec une bonne reproductibilité et orientation. Dans la majeure partie des cas, les couches auto-assemblées sont des siloxanes pour les surfaces de silicium et les thiols pour les surfaces d'or. Les différentes conditions de greffages de ces composés, en particulier celles des siloxanes, sont traitées dans cette partie du rappel bibliographique. Lors du greffage covalent, la stratégie dépend de la nature chimique de la surface et ainsi que de celle des protéines greffées. Le greffage peut être non spécifique ou spécifique.

3-3-1 Immobilisation aléatoire

Dans ce mode d'immobilisation, les protéines sont ancrées sur des monocouches auto-assemblées par l'intermédiaire de liaisons covalentes impliquant les groupements présents sur les chaînes latérales des protéines. Les groupements principalement impliqués dans ce type de liaisons sont des groupements amines des chaînes latérales de la protéine qui vont réagir et former un ester avec un groupement carboxylique, des groupements carboxyliques ou des groupements thiols.

Greffage par la fonction amine

Les fonctions amines des résidues lysines des protéines sont les plus largement utilisées pour ancrer les protéines sur les surfaces fonctionnalisées. Une des méthodes les plus employées à l'heure actuelle pour immobiliser les protéines par l'intermédiaire de leur fonction amine repose sur l'utilisation du 1-ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC) et le *N*-hydroxysulfosuccinimide (S-NHS) (Figure 27). L'avantage d'utiliser le couple EDC/S-NHS réside dans la stabilité de l'intermédiaire activé. En effet, l'ester activé EDC a

une durée de vie de quelques secondes en milieux aqueux. L'ester activé S-NHS a, quant à lui, une durée de vie de plusieurs heures. Il est donc, moins sensible à l'hydrolyse [Sta82]. Dans cette expérience, lorsque l'EDC réagit avec le groupement carboxylique de la monocouche, il forme un intermédiaire O-acylisouré qui peut réagir avec un groupement amine de la protéine à immobiliser, conduisant à la formation d'un complexe relié par une liaison amide. Cependant, cet intermédiaire O-acylisouré est très facilement hydrolysable. Aussi, l'addition de sulfo S-NHS va stabiliser cet intermédiaire sous forme d'un sulfo-NHS ester susceptible de réagir avec le groupe aminé et ainsi augmenter le rendement de couplage de la réaction médiée par l'EDC.

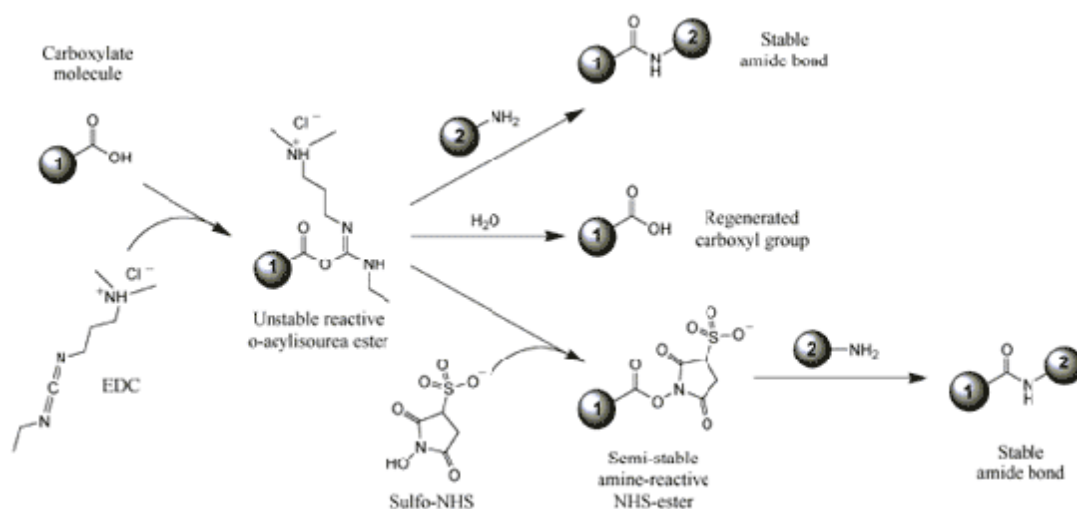


Figure 27 : Représentation schématique de l'immobilisation des anticorps [Sam11]

Une autre méthode immobilisant les protéines par l'intermédiaire du groupement amine de la protéine a été réalisée sur une surface composée de groupements aldéhyde. Des monocouches auto-assemblées, présentant à leur extrémité des groupements aldéhydes ont été greffées sur des surfaces d'or. Les protéines ont ainsi été immobilisées par formation de groupements imines qui ont ensuite été réduits en amine secondaire à l'aide de NaBH₃CN [Pee06]. Des puces à protéines ont ainsi été réalisées [Jon05]. D'autres biomolécules ont été immobilisées sur des surfaces comportant des extrémités isothiocyanates ou epoxy. Cependant, l'immobilisation des protéines sur des surfaces epoxy requiert un milieu de force ionique élevé risquant de dénaturer les protéines.

Greffage par l'intermédiaire de la fonction carboxylique

Ce mode d'immobilisation impliquant le groupement carboxylique est intéressante lorsqu'un grand nombre d'acide aspartique et glutamique composent la protéine. En 2008, Baldrich et ses collaborateurs ont greffé un anticorps en utilisant les groupes carboxyliques des protéines, par la méthode EDC/ S-NHS décrite dans le chapitre précédent [Bal08]. Une autre stratégie a été proposée pour immobiliser une protéine, la galactosidase, via leurs groupes carboxyliques en utilisant les carbodiimide (CDI) pour les activer [Fer93] (Figure 28).

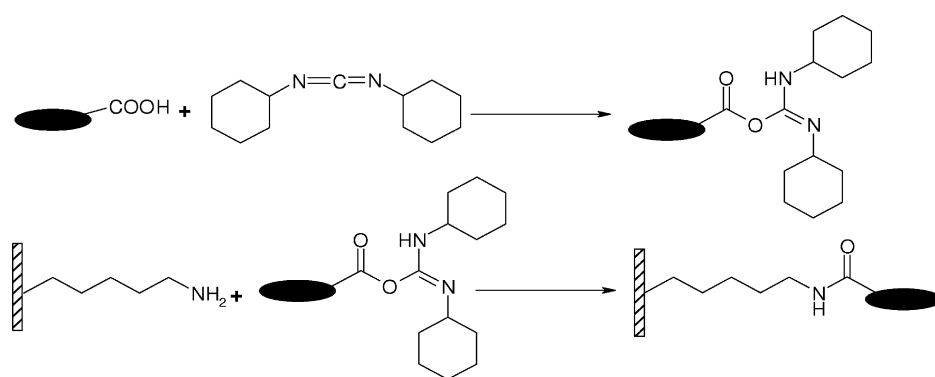


Figure 28 : Représentation schématique du greffage de protéine par l'intermédiaire de groupements carboxyliques après activation par les carbodiimides.

Immobilisation utilisant les groupements thiols

Ce mode d'immobilisation requiert la présence de cystéine ce qui permet de greffer la protéine en formant un pont disulfure avec les groupements présents à la surface. La cystéine étant un acide aminé moins abondant que la lysine dans les protéines, cette méthode est moins employée pour immobiliser les protéines. Dans ce mode de greffage, la chaîne latérale de la cystéine va réagir avec des groupes présents à l'extrémité de surfaces fonctionnalisées telles que ; α -haloacetyl ou maleimide pour former une liaison thio-éther stable [Gau04], [Bla06] (Figure 29). Ce mode d'immobilisation a été utilisé pour des protéines recombinantes comportant une cystéine éloignée du site actif de la protéine [Che03], [Fer08].

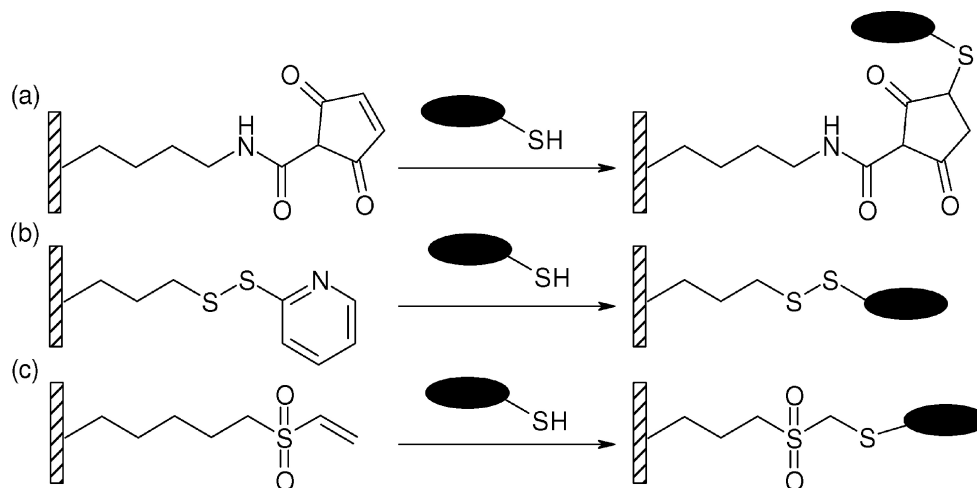


Figure 29: Représentation schématique de l'immobilisation de protéine par l'intermédiaire de groupement thiol [Rus07].

Immobilisation par photo-irradiation

L'immobilisation par photoirradiation offre plusieurs avantages tels que ; une réaction en une seule étape qui est rapide et efficace et bio-compatible. La photo-immobilisation requiert la présence d'agents photosensibles activés par une lumière incidente à une longueur d'onde généralement supérieure à 350 nm sans conséquence sur l'intégrité des biomolécules. Ceux-ci sont greffés à l'extrémité de la mono-couche auto-assemblées ou sur les biomolécules. Après activation par la lumière, une liaison covalente est formée entre les intermédiaires générés photo-sensibles et les protéines. Les réactifs les plus couramment utilisés sont les arylazides, diazirines, benzophénones et nitrobenziles. Après irradiation, les arylazides entraînent la formation de groupements de nitrènes, les diazirines génèrent des carbènes et les benzophénones sont responsables de la formation de radicaux ketyl [Sam11]. Ce sont ces intermédiaires qui vont être utilisés pour immobiliser des protéines à la surface. Des auteurs ont immobilisé des IgG sur une surface fonctionnalisée comportant un groupement benzophénone à leur extrémité [Sam11]. Des puces à protéines sur une surface de verre ont ainsi été développées. Elles sont composées de photopolymères, à base de poly(diméthylacrylamide) et de sulfonate de styrène qui présentent à leur extrémité un groupement benzophénone. Ensuite, une irradiation à une longueur d'onde de 254 nm, a permis de greffer en une seule étape des oligonucléotides dirigés contre le papilloma virus humain (HPV) ou des protéines comme la thyroïde peroxydase [Ren011] (Figure 30).

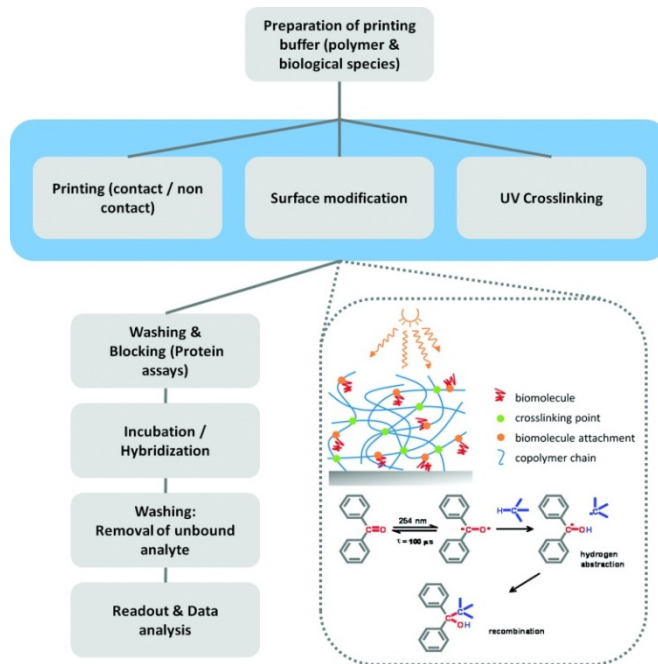


Figure 30 : représentation schématique des étapes de fabrication de la biopuce [Ren011].

A l'inverse, une héparine modifiée chimiquement par un groupe arylazide, a été greffée, après irradiation UV, sur une plaque de silicium fonctionnalisée par des silanes présentant à son extrémité des groupements méthyl. [Fan05]. D'autres auteurs ont également greffés une protéine G, par photoirradiation à une longueur d'onde de 365 nm sur une surface d'or modifié par des groupements polyazidophénylène [Viel13].

L'ensemble des méthodes d'immobilisation présentées ci-dessous conduisent généralement à une immobilisation aléatoire des protéines. Ceci peut être un inconvénient dans la mesure où le site actif de la protéine peut être masqué.

3-3-2 Immobilisation site spécifique

Afin de s'assurer que les protéines sont orientées de manière à ce que leur site d'action soit exposé à l'échantillon biologique, différentes méthodes ont été proposées nécessitant une modification chimique de la surface et/ou de la molécule à immobiliser (figure 31).

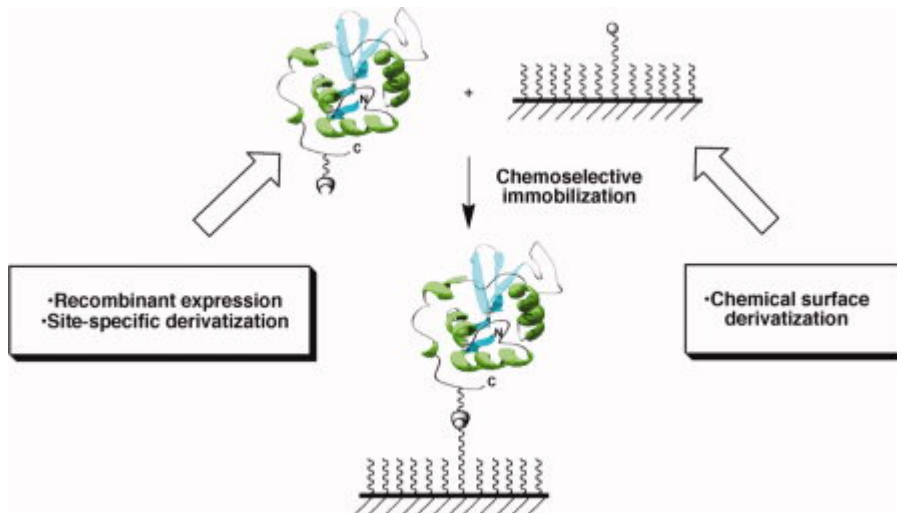


Figure 31 : Immobilisation régio-sélective d'une protéine et de la surface [Cam08].

Peptide ligation

L'immobilisation par " peptide ligation" est une méthode qui permet de coupler une protéine par l'intermédiaire d'une étape chemoselective suivie par un transfert intramoléculaire d'un groupement acyl. Cette capture chimique, nécessite un nucléophile/électrophile placé à proximité d'un segment N terminal et un autre Nucléophile/électrophile compatible localisé au niveau d'un segment C terminal. Cette capture d'une paire nucléophile/électrophile va entraîner un rapprochement des segments N et C terminaux et permettre le transfert intramoléculaire d'un groupement acyl formant ainsi une liaison amide. Pour que cette réaction chimique puisse se produire, il faut que la partie N-terminal soit constituée d'une cystéine, sérine, histidine ou thréonine comportant des nucléophiles faiblement basiques. En ce qui concerne le coté C-terminal, un ester ou un thioester est nécessaire [Rus07].

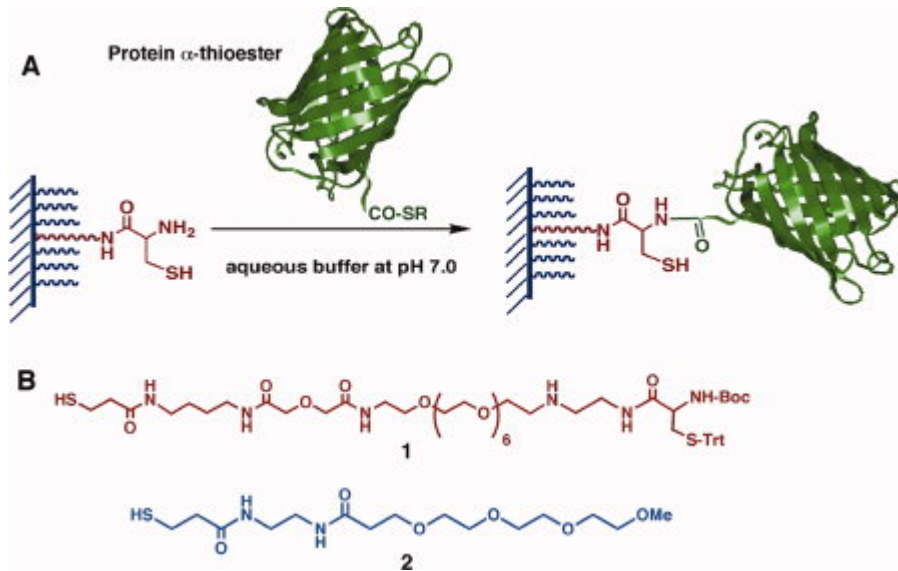


Figure 32 : (A) attachement de la protéine dérivée par un α -thioester du côté C-terminal, (B) ligand thiol PEGylé utilisé pour attacher la protéine sur les surface modifiées [Cam08].

Dans cette approche, une protéine recombinante avec du côté C-terminal un groupe α -thioester sera attachée sur une surface contenant un résidu cystéine coté N-terminal. Ainsi, un peptide contenant une Cys coté N-terminal et la protéine présentant un groupe α -thioester C-terminal, vont réagir de manière chimiosélective en condition neutre pour former une liaison peptidique au niveau du site de ligation. Ce procédé a été employé avec succès pour immobiliser deux protéines fluorescentes, EGPF et DsRed. Les protéines α -thioesters ont été immobilisées sur des surfaces de verre. Celles-ci ont été modifiées chimiquement dans un premier temps par silanisation (3-acyloxypropyl)-triméthoxysilane. Ces surfaces ont ensuite été soumises à une deuxième modification chimique par une mixture de ligands constitués de thiols PEGylés ; (i) le premier contenant une terminaison Cystéine protégée (Boc), (ii) le deuxième a été utilisé comme diluant afin de contrôler le nombre de sites réactifs sur la surface [Cam04]. Ce procédé a permis de proposer à terme des biopuces constituées de protéines immobilisées de manière orientées.

Greffage covalent spécifique par réactions de cyclo-addition de Diels-Alder

La réaction de Diels-Alder est une réaction de cyclo-addition entre un composé diénophile (pauvre en électrons) et un composé diène (riche en électrons) (figure 33). Cette configuration électronique permet la formation d'un cycle insaturé. Cette stratégie d'immobilisation est biocompatible car elle peut être effectuée dans un milieu aqueux. De plus le taux de

sélectivité est plus important dans un milieu aqueux que dans des solvants organiques. Un second avantage cette immobilisation est la rapidité et la sélectivité du site d'accroche des protéines. Le composé diénophile peut être un groupement maléimide présent à la surface de greffage et le composé diène soit être sur la protéine à greffer.

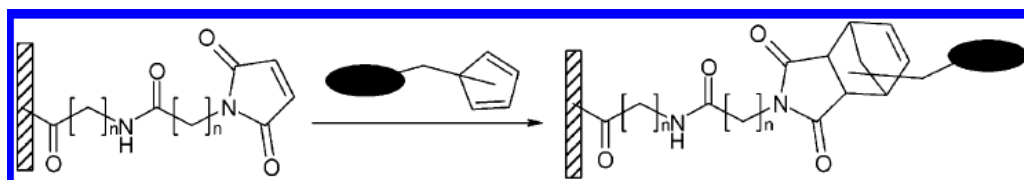


Figure 33 : réaction de Diels-Alder [Rus07]

Chimie « click »

Ce mode d'immobilisation a été très largement utilisé, car il est réalisé très simplement en une seule étape. Celle-ci est constituée par une cycloaddition 1,3-dipolaire d'un azide et d'un alcyne, catalysé par du Cu(I), pour former un 1,2,3-triazole (figure 34).

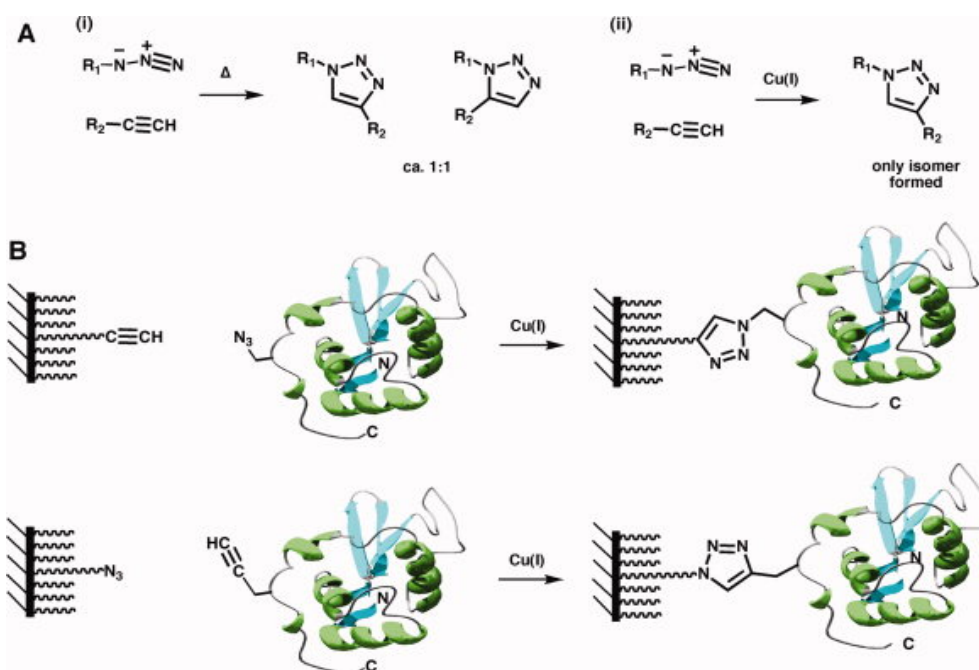


Figure 34 : Attachement de la protéine de manière chimio sélective (A) Mécanisme proposé pour la réaction de Staudinger, (B) immobilisation site-spécifique de la protéine sur un support solide [Cam08].

L'introduction d'un azide ou d'un alcyne dans une macromolécule telle que la protéine se réalise aisément et n'altère pas sa stabilité. De plus, la formation du triazole est irréversible et

quantitative. Ainsi, cette stratégie « chimie click » peut conduire à la formation d'une surface uniforme, avec des biomolécules greffées avec une haute densité. Des auteurs ont montré qu'il était possible d'immobiliser une farnesyl transférase modifiée par un azide sur des billes d'agarose dérivées par un groupement alcyne [Duc06]. Ce type d'immobilisation a également été employé pour immobiliser un peptide (GRGD) modifié par un azide sur une surface de TiO_2 fonctionnalisée par un triméthyl germanil alcyne [Li11a]. Cette même expérience a été réalisée sur une surface de silicium [Li11b].

En conclusion, cette réaction d'immobilisation est très simple à réaliser. Cependant, une modification chimique des biomolécules à immobiliser est nécessaire. De plus, la cytotoxicité du cuivre, impliquée dans la réaction, limite son utilisation.

Conclusion

Comme nous l'avons exposé dans ce chapitre, il existe une grande variété de méthodes d'immobilisation de protéines covalentes et non covalentes. Nous les avons évaluées, dans une perspective de développement de biocapteur avec un anticorps comme bio-récepteur. La physisorption, qui est une méthode d'immobilisation non covalente présente l'avantage d'être simple à mettre en œuvre. Cependant, celle-ci risque d'entraîner une altération de la conformation des protéines, ce qui pose un problème de reconnaissance biologique ultérieure. L'autre méthode d'immobilisation non covalente présentant un grand intérêt est le couplage protéine biotinylée/streptavidine conduisant à une immobilisation orientée. Le problème que pose cette méthode est qu'elle nécessite un marquage par la biotine des protéines, et que les protéines sont immobilisées par l'intermédiaire de liaisons faibles moins stables que les liaisons covalentes. Aussi, nous avons choisi un mode covalent pour le greffage de protéines sur ces surfaces fonctionnalisées. Le mode de liaison permettant une immobilisation "site spécifique" (click chemistry et peptide ligation) n'a pas été retenu car celui-ci nécessite une modification de la protéine à immobiliser et donc une étape supplémentaire. Nous avons donc choisi la méthode EDC/S-NH-S très utilisée à l'heure actuelle, qui permet une immobilisation de la protéine par l'intermédiaire d'une liaison peptidique covalente. Cependant, j'ai conscience que ce mode d'immobilisation aléatoire peut poser un problème en terme d'orientation des anticorps immobilisés sur surfaces silanisées. C'est pourquoi, des méthodes permettant d'assurer une bonne orientation ont été étudiées au cours de ce travail.

Chapitre 4

Développement d'immuno-support utilisant le 7-octenyltrichlorosilane

4-1 Introduction

Je me suis donc intéressée durant mon doctorat au développement d'immuno-support constitué de plaque de silicium fonctionnalisée par des silanes pour un développement ultérieur de nano/microrésonateur. En effet, une des étapes clef pour les biocapteurs est l'immobilisation d'un bio-récepteur sur une monocouche auto-assemblée. Celle-ci consiste en une auto-organisation spontanée d'entités moléculaires identiques, guidées par les forces intermoléculaires (liaisons hydrogènes, forces de Van der Waals...), et qui conduit à la formation de structures très ordonnées aux propriétés uniques. Elles présentent l'avantage d'augmenter la biocompatibilité de la surface et de protéger la protéine des phénomènes de dénaturation durant l'étape d'immobilisation. Dans ce contexte, nous avons choisi d'étudier l'impact du composé organique constituant la mono-couche auto-assemblée sur la fonctionnalité du bio-récepteur.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la fonctionnalité des anticorps greffés sur une mono couche auto-assemblée composée de 7-octenyltrichlorosilane (OTS) présentant à sa surface un groupement carboxylique. Ainsi, après fonctionnalisation par ce silane, une caractérisation spectroscopique par XPS et infra-rouge à transformé de Fourier (FTIR) a tout d'abord été effectuée afin de vérifier la présence de ces groupements carboxyliques. Puis, des expériences par microscopie de force atomique (AFM) permettant d'évaluer l'homogénéité de la surface de silicium fonctionnalisée ont été menées. Nous avons ensuite immobilisé ces anticorps, sur ces supports, de manière covalente en employant la méthode EDC/S-NHS et une étude topographique par AFM a été effectuée pour mesurer la répartition de ces anticorps. L'orientation des anticorps greffés étant primordiale pour la reconnaissance biologique et donc pour la spécificité et la sensibilité de la détection du futur biocapteur, nous avons effectué des immuno-essais à l'aide d'anticorps dirigés contre le fragment Fab impliqué dans la reconnaissance antigénique pour évaluer leur accessibilité. Le marquage de ces anticorps par une enzyme, la horseradish peroxydase (hrp), nous a permis de réaliser une détection colorimétrique. Nous avons ainsi pu vérifier la capacité de capture de

ces anticorps immobilisés. Ceci ayant été démontré, nous avons ensuite testé, par microscopie à fluorescence, les potentialités de cette plate-forme immunologique pour la détection d'IgG modèle de souris marqué par un fluorophore, le FITC et la détection d'un bio-marqueur de la maladie d'Alzheimer le peptide amyloïde A β 1-42. Nous avons ensuite étudié l'influence du pH sur l'immobilisation d'anticorps modèles de souris (IgG), toujours par la méthode EDC/S-NHS sur les plaques de silicium fonctionnalisée par le 7-octenyltrichlorosilane. En effet, des travaux rapportent qu'une immobilisation à pH acide des anticorps par cette méthode sur des plaques comportant à leur extrémité des groupements COOH, favorisent une immobilisation de l'anticorps ou le fragment Fab présente une plus grande accessibilité [Pei10]. Aussi, nous avons réalisé des immuno-essais comparatifs à l'aide d'anticorps dirigé contre le fragment Fab, sur deux types de plaques de silicium ; (i) avec des IgG modèles de souris immobilisés à pH acide (pH 4), l'autre comportant des IgG immobilisés à pH neutre.

La dernière partie de mes travaux de doctorat a porté sur l'étude du vieillissement des plaques silanisées par l'APTES. En effet, nous avons constaté au cours des expériences précédentes une variabilité des résultats. Celle-ci pouvait être corrélée avec le délai observé entre la fin du processus de silanisation par l'APTES et le greffage des anticorps. Aussi, une caractérisation des plaques par FTIR, nous a permis de réaliser des études de stabilité, au cours du temps, du silane une fois immobilisé sur le support de silicium. Cette caractérisation par FTIR a ensuite été corrélée à des études de densité de site de reconnaissance et d'orientation des anticorps menées à l'aide d'immuno-essais réalisés en utilisant des anticorps dirigés contre les fragments Fab.

4-2 Fonctionnalisation du support

Nous avons donc réalisé un greffage préalable d'un composé organique formant une couche mono-couche auto-assemblée. Dans ce projet, nous avons choisi les organo-silanes qui peuvent se lier de manière covalente sur le silicium (Figure 35). Nous avons ensuite vérifié, que l'immobilisation des anticorps sur cette couche d'organo-silanes n'altérerait pas leur fonctionnalité biologique.

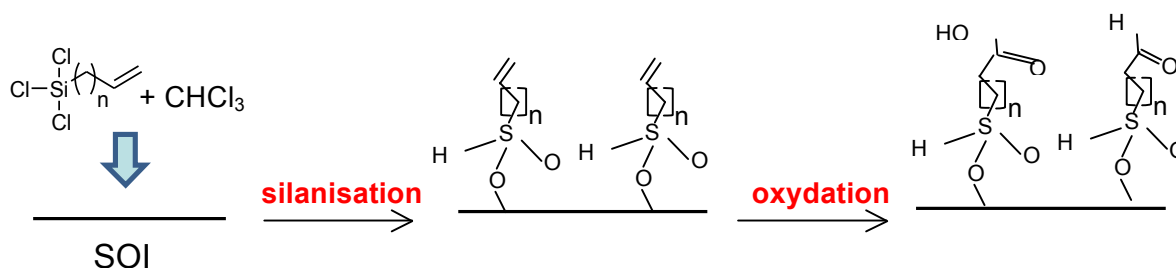


Figure 35 : Représentation schématique des étapes de fonctionnalisation de la plaque de silicium.

Nous avons dans un premier temps étudié la fonctionnalisation du silicium par le 7 octenyl trichlorosilane. Une couche de silanes auto-assemblés constitués de chaînes alkyls comportant une double liaison à leur extrémité a ainsi été préparée. La double liaison terminale a ensuite été oxydée en fonction -COOH pour permettre un greffage covalent ultérieur de protéines, sur cette couche auto-assemblée, par la formation d'une liaison amide. La présence de groupement COOH à la surface a été évaluée par « X-ray photoelectron spectroscopy » (XPS) et FTIR. L'homogénéité de la surface a ensuite été évaluée par microscopie de force atomique. Dans la deuxième partie de ces travaux, nous nous sommes focalisés sur l'étude de la fonctionnalité des anticorps immobilisés sur ces plaques de silicium fonctionnalisées de 1 cm². En effet, la sensibilité et la spécificité des biocapteurs reposent souvent sur une reconnaissance récepteurs-ligands, cela implique pour le développement du biocapteur une étape d'immobilisation de d'ADN (aptamères) ou protéines sur un support solide. Dans cette étude, notre choix s'est porté sur l'anticorps, dont la fonctionnalité biologique a été évaluée. Elle a porté sur trois axes principaux : (i) l'étude de la répartition des anticorps greffés sur la surface, (ii) l'étude de l'orientation des anticorps, notamment l'accessibilité du fragment de l'anticorps impliqué dans la reconnaissance antigénique, (iii) l'utilisation des surfaces en tant que plateforme immunologique pour un biocapteur. Dans la première partie de ce travail, après greffage d'anticorps IgG de souris modèles sur des surfaces de silicium fonctionnalisées, une étude de la topographie de surface par AFM a été menée pour vérifier

l'homogénéité du greffage de ces anticorps sur ces surfaces. Nous avons ensuite évalué l'activité biologique des anticorps greffés sur le silicium silanisé par la méthode EDC-S-NHS. Les expériences présentées ci-après, ont été effectuées en présence de serum albumine bovine (BSA), afin de prévenir les interactions non spécifiques. L'immobilisation des anticorps étant aléatoire, il était important d'étudier l'orientation de ces IgG de souris modèles. Un immuno-essai de type enzymatique a été effectué à l'aide d'anticorps dirigés contre les fragments Fab, afin de démontrer que les IgG greffées sur cette surface sont susceptibles de capturer efficacement les antigènes. Le principe de cette expérience est représenté schématiquement ci-dessous (Figure 36).

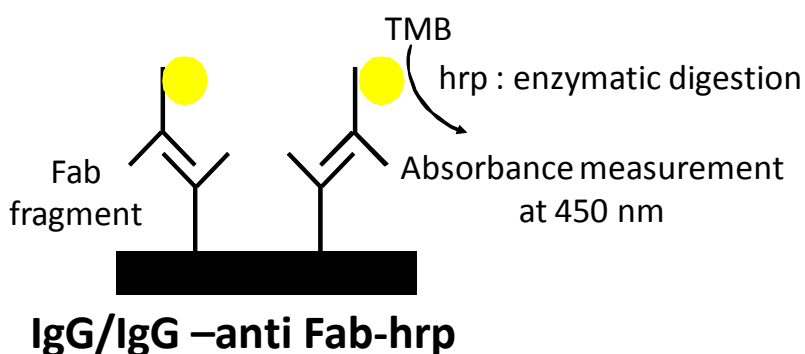


Figure 36 : Représentation schématique de l'immunoessai enzymatique.

Nous avons ensuite, étudié la possibilité de développer une méthode de détection du peptide amyloïde A β 1-42, un bio-marqueur de la maladie d'Alzheimer à l'aide de ces plates-formes immunologiques. Pour cela, nous avons effectué un immuno-essai de type sandwich de type Ac anti ab 1-42/Ab 1-42/Ac anti-Abeta 1-42/Ac anti Cy5 (Figure 37) et visualisé sa formation par microscopie à fluorescence anticorps anti-Fab.

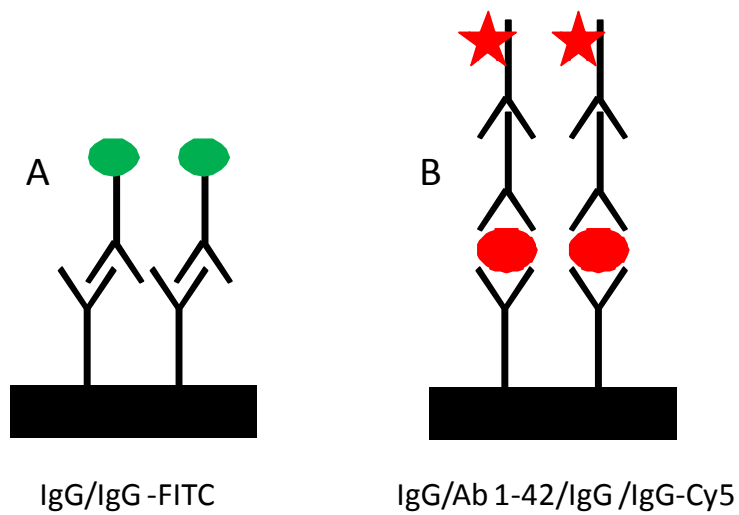


Figure 37: Représentation schématique des immuno-essais réalisés par microscopie à fluorescence ; (A) étude des interactions entre les IgG immobilisées sur le support et les IgG marquées par la fluorescence ; (B) Immuno-essais de type sandwich visant à détecter le peptide amyloïde.

Dans les travaux menés dans le chapitre ci-après portent sur la préparation chimique des plaques de silicium ainsi que sur l'étude de l'orientation de l'anticorps.

Article publié dans Biosensors & Bioelectronics

Référence; Ammar et al., Biosens. Bioelectron. **2013**, Feb 15;40(1):329-35

A new controlled concept of immune-sensing platform for specific detection of Alzheimer's biomarkers

M. Ammar^{1,2}, C. Smadja³, L. Giang Thi Phuong³, M. Azzouz^{1,2}, J. Vigneron⁴, A. Etcheberry⁴, M. Taverna³, E. Dufour-Gergam^{1,2}

¹Univ. Paris Sud, Institut d'Electronique Fondamentale, UMR 8622, Orsay, F-91405;

²CNRS, Orsay, F-91405;

³Univ. Paris Sud, Physico-chimie, Pharmacotechnie et Biopharmacie, UMR CNRS 8612, Chatenay-Malabry, F-92296;

⁴Univ. Saint-Quentin en Yvelines, Institut Lavoisier de Versailles, UMR 8180, Versailles, F-78035;

Abstract

We propose a concept of very specific immune-sensing platform dedicated to the quantification of biomarkers of Alzheimer disease (AD) in biological fluids. High sensitivity is required for the earliness of AD diagnostic, mainly based on clinical evaluation at present time. Accordingly, a controlled and adaptative surface functionalization of a silicon wafer with carboxylated alkyltrichlorosilane has been developed. The surface has extensively been characterized by AFM and X-ray Photoemissive Spectroscopy. The surface modification has been chemically assessed by XPS at each functionalization step. The survey spectra of silicon surface, after, 1, 3, 6 and 24h of silanisation, highlight a significant enhancement of the functionalization efficiency upon time. The oxidation reaction has been also investigated by XPS and showed components related to the carboxylic group. AFM measurements pointed out a morphological modification consistent with a homogenous development of the carboxylic group and an almost protein monolayer on the surface. Moreover, we evaluated the biological activity of the grafted antibodies involved in (AD) biomarker detection onto this silanized surface by fluorescent microscopy. A sandwich immunoassay dedicated to the sensitive detection of one biomarker of Alzheimer disease (AD), the amyloid peptide 1-42 (A β 1-42), was carried out. The results demonstrated that the controlled silanized surface provides a novel and viable way to detect biomarkers with high specificity and open the route to an original development of immunosensing applications on such surfaces.

Keywords Sensitive detection, Immunoassay, Chemical surface functionalization, XPS, AFM, Amyloid Peptide, ELISA, Fluorescence, Alzheimer.

1. Introduction

Self-assembled monolayers of organosilanes have focused much attention in the fields of immune-sensor technology. Organosilanes have been reported in the literature to be used for protein immobilization (Kanan et al., 2002; Gabriel et al., 2007, Rusmini et al., 2008, Hervas et al., 2012). They generally offer favorable properties such as biocompatibility of the surface and protein protection from denaturation during the immobilization process (Rusmini et al., 2007, Buchapudi et al., 2011). On the other hand, the main difficulty for protein immobilization on a solid support, particularly for antibodies, is to maintain their three dimensional conformation and orientation. Indeed, antibody orientation is crucial for an immunoassay in which the antibody is linked to a solid surface. A proper orientation allows the exposition of the binding sites to the sample solution and ensure a specific recognition,. Most of the immobilization strategies, lead to random immobilization of the antibodies that can limit the antigen binding capacity (Caruso et al., 1996, Pei et al., 2010, Seitz et al., 2011). Among these, one of the most popular strategies employed consists of an amine coupling on carboxylated or active ester substrates via their amino groups (Rusmini et al., 2007). This method has been widely used on flat carboxylated surfaces (Pei et al., 2010; Samanta and Sarkar, 2011). However, the grafting density, the orientation and the biological function of the grafted antibodies, following the immobilization strategy described previously, on silane modified silicon surfaces have to be investigated. In this way, a fine understanding and control of the chemical surface preparation are needed (Faucheux et al., 2004, Papat et al., 2002).

In this paper, we present an extensive characterization of chemically silanized silicon surface by contact angle, XPS and AFM. All these techniques constitute essential tools to control the chemical surface modification in view of a successful bio-functionalization (Boussert et al, 2009, Inoue et al., 2010). We also aimed at clarifying the immobilization mechanism relying on self-assembled silanes for antibodies and silicon surface. In this perspective, the grafting density and orientation of antibodies on the prepared immuno-sensing platform have been studied, by an immuno-enzymatic assay. Further, the ability of immobilized antibodies to establish specific interaction has been evaluated by fluorescence microscopy. This chemical platform was finally applied to the sensitive detection of one AD biomarker, the amyloid peptide 1-42 ($A\beta$ 1-42), by fluorescence based sandwich immunoassay. Limit of detection (LOD) and specific binding density have been also evaluated. Indeed, Amyloid- β 1-42 ($A\beta$ 1-42) peptide is a major component of senile plaques deposited in the brain of individuals with Alzheimer's disease (AD) (Hardy and Selkoe, 2002, Israel et al, 2012), Motter et al (annal

neurology, 38, 1995, 643-648) first reported that A β 1-42 concentration are decreased in CSF of AD patients.

2. Materials

Octane (99.9%), potassium permanganate (99%), potassium carbonate (99%), and Sodium periodate (99%) were purchased from VWR and were used without further purification. The 7-octenyltrichlorosilane (90%) was provided by Flurochem Ltd and stored at temperature smaller than 6°C. Hydrogen chloride and ethanol (99.9%) were HPLC grade and purchased from Fisher Scientific.

Polyclonal, Fab2-specific rabbit anti-mouse immunoglobulin G (IgG), and Polyclonal, Fc-specific rabbit anti-mouse IgG were obtained from Invitrogen (Saint-Aubin, France). Model immunoglobulin G (anti-mouse IgG), 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC), and N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS) were obtained from Sigma Aldrich. All the chemicals employed were of analytical reagent grade and were used as received.

3. Experimental methods

3.1. Chemical surface preparation

The surface functionalization consists in grafting the surface of a silicon wafer and creates alkylsilane with carboxylic groups at the end of carbon chains (fig. 1). The reaction occurs in liquid phase using an alkyltrichlorosilane (7-octenyltrichlorosilane) diluted in organic solvent as reported by the work of *Sagiv* (Savig, 1980). The proportion of silane in the solvent is 1:600 in volume and the system is maintained under moisture-controlled atmosphere to prevent the polymerization of silane (Ulman, 1996). In the other hand, the organosilane presents a carbon double-bond chain end; an oxidation reaction of terminal vinyl group can be achieved by a mixture of oxides in solution: potassium permanganate and sodium metaperiodate (Müller et al., 2007).

The silicone samples were sliced from B-doped Si (100) wafer, with a resistivity in the range 1-50 $\Omega\cdot\text{cm}$, in 1cm^2 : they present a natural layer of native SiO_2 with few dispersed silanol groups (Si-OH). The silanization solution is based on a mixture of 7-octenyltrichlorosilane and octane solvent freshly prepared with a respectively ratio of 1/600 (v/v). The expected monolayers were formed at ambient temperature ($\sim 19^\circ\text{C}$) in a glovebox with a N_2 permanent flow (humidity never exceeded 5%): samples were emerged in the prepared silanization solution enclosed in a lapping beaker into stirring plateau during 24h. Finally, the samples were rinsed using the same solvent. For the oxidation step, the oxidant mixture is prepared with KMnO_4 (0.5mmol), K_2CO_3 (1.8mmol), NaIO_4 (19.5mmol) in ultra-pure water. After 12h of

reaction time, the samples are washed in solution of NaHCO_3 (0.3mol.L^{-1}), DI water, HCl (0.1mol.L^{-1}) water, and ethanol.

3.2. Antibody immobilization and immunoassay procedure

All experiments have been carried out on the 1cm^2 surfaces previously silanized and oxidized. Firstly, samples were converted to activate ester by reacting with 5 mg/ml EDC and 5 mg/ml S- NHS. $20\ \mu\text{l}$ ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Diluted anti-mouse IgG antibody was added to the solution with $200\mu\text{l}$ of EDC and $200\mu\text{l}$ of S-NH-S and the covalent attachment was performed overnight at room temperature. The surfaces were rinsed twice with PBS containing tween 20 (0.01%). Silanized surfaces were then blocked with 2% BSA solution for 1 h. Immuno-reaction between immobilized IgG and anti-mouse IgG tagged with FITC or mouse IgG directed against Fab fragment and Fc fragment hrp conjugate were performed. After 2h incubation, the samples were washed with PBS containing 0.02% Tween 20 three times. For the immune enzymatic assay, the procedure followed consists in: after washing for 4–5 times, each well was added with $100\ \mu\text{L}$ anti-mouse IgG (secondary antibody) HRP conjugate and incubated. Then, each well were incubated with $100\mu\text{L}$ 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) solution for 15 min avoid of light after washing for 4–5 times. The absorbance at 450 nm was measured after blocking with a stop solution. All these experiments were compared with a silanized surface without grafted antibodies. The sandwich assay was performed by adding, $20\ \mu\text{l}$ ($1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$) of antigen sample completed by $180\ \mu\text{l}$ of PBS for 2h at room temperature. Then a washing was performed with PBS, and 0.2 % Tween 20 during 10 minutes three times. The sandwich immunoassay followed the procedure depicted in figure 2C. After the covalent capture of the antibody, different concentrations of amyloid peptide were added on the surfaces. The plate was washed as described above after incubation for two hours. After washing 5 times, each surface was added with $200\ \mu\text{L}$ of recognition antibody and incubated for 2 h. Then, each surface was incubated with $200\ \mu\text{L}$ of detection antibody anti-mouse Cy5 labeled, after washing. Then, for the fluorescence detection, the fluorescent intensity was measured by fluorescence microscopy. The fluorescence intensities reported are the means of the intensities of 5 different spots.

3.3. Characterization techniques

All steps of chemical preparation of the samples were finely characterized using the XPS spectrometer Thermo-Electron Theta-Probe model. Data were acquired using an Al KR1 monochromatic X-ray excitation at 1486.6 eV . Acquired spectra were processed using the Thermo Electron Avantage XPS software. The analysis spot had a dimension of $400\mu\text{m}$. The detector was put perpendicular to the analyzed surface. The step size was 1 eV for survey spectra and 0.1 eV for high resolution one focused on specific element. The surface

morphology was analysed by AFM (Agilent, Pico Plus 5500 LS) in tapping mode in room air using standard Si cantilevers. A model OCA22 Dataphysics Instruments Goniometer was used to measure water contact angles in room air using the sessile drop method. To investigate the proteins grafting, fluorescence images were acquired with an Olympus BX51 Epifluorescent microscope equipped with an Olympus DP71 Camera and appropriate filters. The excitation light was from an X-Cite Lamp Series 120 PC.

4. Results and discussion

4.1. Functionalized surface analysis

The effect of surface chemical modification was first highlighted by XP Spectroscopy performed before and after silanization and oxidation steps. In the figure 3-a, the XP spectrum survey of silanized and oxidized silicone surface presents the typical characteristics of silicon wafer covered by a thin layer of native silica: silicon with double peak of Si2p at 100 eV, Si2s peak at 151 eV, the Oxygen with O1s peak at 533 eV and carbon with C1s peak at 286 eV. Interestingly, the latter element (C%) is clearly enhanced after silanization, as shown in the table 1, and remains stable after oxidation. In fact, the grafting occurs specifically at the first step of chemical preparation *ie* the silanization. The oxidation guarantees, as expected and illustrated in the figure 1, the modification of the terminal groups of the carbon chain. To get further insights on the mechanism of silanization and oxidation, we have focused XP measurements on the carbon element. The enhancement of the C1s peak is notably shown in the figure 3-b on silanized surface compared to the uncoated silicon surface. After oxidation, the increasing of the carbon proportion on surface is stopped due to the emergence of the carboxylic groups which makes more detectable the oxygen element bound to the COOH group at the expense of carbon element bound to the alkylsilane chain. In the same spectra (fig. 3-b) at 290 eV, we notice the undeniable presence of carboxylic signature that do not appear on both uncoated and silanized samples. On the other hand, the energy shift observed in the spectra focused on C1s peak around 286 eV is probably due to a common surface charge phenomenon during the measurement.

In the table 1, we have extracted quantitative results from the survey XP Spectra regarding the atomic percentage of different elements interfering (or intended to evolve) in the chemical functionalization established in this work: carbon, silicon and oxygen. In fact, we can confirm the chemical stability of the grafted silane after oxidation; the C/Si ratio remains far above the ratio of the untreated sample. Moreover, the contact angle which was measured at each time of the functionalization confirms the presence of alkyl groups: the silanized surface shows a hydrophobic behaviour unlike the uncoated surface which is largely hydrophilic. This characteristic is maintained after oxidation as expected. Combined with those of XPS

analysis, the results clearly demonstrate the covalent grafting of the oxidized organosilane chains on the prepared surfaces (Cai et al, 2006, Zou et al., 2008).

The duration of silanization was also investigated in this work. The figure 3-c shows the progress of the C/Si ratio during the silanization. An optimum coverage of the surface was attained from 6 hours of coating while the C/Si ratio stopped rising from 24hours. Concurrently, the O/C ratio decreases during the silanization probably due to the increasing occupation of vacant hydroxyl sites by the silane chains: the oxygen of the surface is less and less accessible for the XPS analysis. AFM measurements were also carried out on the prepared samples. The silanized-oxidized surface, topographically illustrated in the figure 4-a, presents a homogenous shape with a roughness of 0.67 nm reported in the table 1. This value is obviously higher than the uncoated silicon surface itself (0.06 nm), due the functionalization steps. However, it does not increase drastically. In fact, the coated surface remains uniform after the chemical adsorption of silane groups and even after the oxidation step. Faucheux et al. have obtained the same range of roughness for self-assembled carboxylic monolayers (Faucheux et al., 2004).

4.2. Immobilized antibodies orientation and topography; an immuno-enzymatic assay

In order to investigate the effective presence of carboxylic groups, we have operated to a preliminary proteins grating by immobilizing IgG-Mouse antibodies on the silanized surface prepared in this work, as illustrated in the figure 2 and described in the part 2. Only one layer of IgG is expected to be adsorbed into the surface. IN the figure 4-b, the AFM topographic measurements of the prepared surface show an acceptable distribution of the proteins with an approximate spacing of 100 nm. Moreover, the roughness enhanced during the bio-grafting process but remains low ($R_a = 1.63$ nm) ie. the proteins have been well distributed on the surface and tended to be organized on an uniform layer. In fact, the thickest regions are very localized with maximum thickness not exceeding 20 nm. All this observations are in agreement with results reported by the literature (Popat et al., 2002). The latter result indicates that the chemical functionalized protocol used in this work leads to acceptable SAM surfaces ready to receive further layers of proteins for specific bio-recognition reactions.

To obtain a functional immuno-sensor, it is of paramount importance to check the biological activity of immobilized antibodies. Indeed, the antibodies attachment process (EDC/SNHS) could lead to their random orientation lowering thereby the antigen binding capacity of the biosensor surface. Thus, antibodies orientation and the antigen binding capacity of model mouse IgG were investigated on this silanized surface (1 cm^2). The accessibility of antibodies fragments (Fab), involved in the recognition process has been evaluated. Model IgG grafted

on silanized surfaces were tested for their ability to bind Fab antibodies labeled with Horse Radish Peroxydase (HRP). The immunoassay has been performed following the procedure depicted in figure 2-c. In a first step, the IgG were grafted on the silanized surfaces. Then, specific anti-Fab-hrp antibodies were allowed to react with immobilized IgG. After washing, the hrp substrate was added and the colorimetric signal obtained from the hrp enzymatic reaction measured. This measurement lead to the determination of the quantity of bound Anti-Fab- hrp and therefore that of Fab binding sites. Figure 5 presents calibration curves obtained with surfaces bearing three different concentrations of immobilized IgG. As expected, when the amount of immobilized IgG increases, an elevation of the specific anti-Fab-capture capacity is observed. A saturation of the Fab binding sites was however obtained by grafting IgG at 1000 ng/ml. The number of captured specific anti-Fab was estimated around $4 \cdot 10^{-3}$ molecule/nm². This result is consistent considering the typical dimension of the IgG molecules determined by Tan and co-workers (14.5 nm x 8.5 nm x 4.0 nm) (Tan et al., 2007).

Further, we can observe from the figure 5 that the amount of model IgG grafted lead to an increase of the capture of anti-Fab. This is in agreement with previous immuno-assay performed with another type of immune-support such as micro-beads (Teste et al., 2011). In this reported work, some micro-beads were bio-functionalized with antigens (allergens) and authors showed that, when the micro-beads content (i.e. the antigen level) increased, the capture rate of the immunological target, antibodies involved in allergy called IgE is amplified.

We can conclude from this experiment, that after model IgG immobilization, their Fab fragments are available for antigen capture binding on the chemically carboxylated surfaces.

4.3. Immuno-assay based on fluorescent detection

In order to compare with the previous ELISA experiment, the ability of immobilized mouse IgG to interact specifically with IgG-FITC was evaluated by fluorescence detection. For this purpose, an anti-mouse IgG-labeled with FITC was employed as the detection antibody. The procedure followed is depicted in the figure 2-C. In this experiment, the concentration of the capture antibody was first optimized. The concentration of the model IgG grafted in silanized surface was maintained at 40 µg/ml, while varying the concentration of the detection antibody (IgG-FITC). The intensities measured from the fluorescence microscopy at different concentrations of IgG (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 µg.mL⁻¹) are displayed in the figure 6. A saturation of the binding sites was obtained at 0.8 µg/ml. These results are in agreement with other studies performed with other types of surfaces such as cyclic olefin copolymers or commercial microtiter plates (Raj et al., 2009; Teste et al., 2011). Nevertheless, their range

of concentration of the captured bio-molecules is larger than that of our experiment. This discrepancy could be explained by the different surfaces employed in these studies. On the other hand, the curve shape for the measured fluorescence confirms the ability of the immobilized antibody to efficiently capture IgG-FITC.

4.4. Development of a sandwich immunoassay coupled to a fluorescent detection; application to an Alzheimer disease biomarker, the amyloid peptide A β 1-42

Following these preliminary validations, the immune sensing platform was applied to one Alzheimer disease biomarker, the amyloid peptide, A β 1-42. The whole sandwich immunoassay was performed following the procedure depicted in figure 2-C. After immobilizing the capture antibody directed against A β 1-42. The standard amyloid peptide was allowed to react with the capture antibody. After washing, a second antibody directed against amyloid peptide A β 1-42 was allowed to react with the bound biomarker. Then, a third recognition antibody targeting mouse Antibody labeled with Cy5 was added. After washing procedure, the surfaces were observed by fluorescent microscopy. This experiment is relying on a strategy analogous to a gold standard technique based on sandwich immunoassay such as Enzyme Linked ImmunoSorbent Assays (ELISA). The linearity of the response was obtained in a concentration range from 2.5 to 7.5 $\mu\text{g/mL}$. The determination coefficients 0.988 showed an excellent linearity compatible with a fully quantitative method. The limit of detection (LOD), chosen as the concentration corresponding to the background signal plus three times its SD, was estimated at 300 ng/mL (66 nM) . This value is closed to the level of total A β peptides found in the cerebrospinal fluid (CSF) (around 1 nM). However, it should be noted that this peptide, A β 1-42, has propensity to form oligomers even in in vitro environment which can lead thereby to a decrease of its capture efficiency and thus to its detection sensitivity. Interestingly, the overall results show that the implemented immune-sensing platform coupled to fluorescent detection presents a valuable tool for pathologies diagnosis.

5. Conclusion

Immunosensors operating in the direct competitive format were elaborated and assessed for the detection of proteins with different techniques. Silanized surfaces were finely characterized by water contact angle measurements, XPS and AFM. All results corroborate the expected chemical modification of the surface allowing the emergence of stable and uniform carboxylic layer required for the biological functionalities targeted in this work. In fact, the covalent grafting of antibodies has been evidenced by AFM on the silanized silicon

surfaces. The immobilization procedure of the antibodies capture selected in this study favors the availability of the Fab portions of antibodies. The immune-support has been applied to the recognition of antibodies labeled either with FITC or with HRP but also to a sandwich immunoassay structure dedicated to the detection of the amyloid peptide, $A\beta$ 1-42. Sandwich immunoassay yielded a limit of detection of 66 nM. The procedures used to prepare chemically the bio-functionalized surface may turn out to have the potential to improve the diagnostic sensitivity by employing enzymatic immunoassay detection or fluorescent techniques. The interesting results highlighted in the chemical and biological preparation steps proved that the proposed immunological platform dedicated to protein grafting offers an original development for high bio-sensing applications.

6. Acknowledgments

The *C'Nano IDF (2010, Cantiproté)* together with the *PRES UNIVERSUD* are gratefully acknowledged for financial supports.

References

- Buchapudi, K. R., Huang X., Yang X., Ji, H., Thundat T., 2011. *Analyst* 136, 1539-1556.
- Boussert, S., Diez-Perez, I., Kogan, M., J., De Oliveira, E., Giralt, E., 2009. *ACS Nano* 3, 3091-3097.
- Cai, K.; Frant, M.; Bossert, J.; Hildebrand, G.; Liefelth, K.; Jandt, K.D.*, 2006. *Colloid and surf. B: Biointerf.* 50, 1-8.
- Caruso F., Rodda E., Furlong D.N., 1996. *J. Colloid Interface Sci.* 178, 104-115.
- Faucheux, N., Schweiss, R., Lützwow, K., Werner, C., Groth, T., 2004. *Biomaterials* 25, 2721-2730.
- Gabriel, S., Jérôme, C., Jérôme, R., Fustin, C.A., Pallandre, A., Plain, J., Jonas, A.M., Duwez, A.S., 2007. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 8410-8411.
- Hardy, J., Selkoe, D. J., 2002. *Science* 297, 353 – 356
- Hervas, M., Lopez, M. A., Escarpa, A. 2012. *Trends in Anal. Chem.* 31, 109-127.
- Kanan S.M., Tze W.Y.Y., Tripp C.P., 2002. *Langmuir* 18, 6623-6627.
- Popat, K.,C., Johnson, R.,W., Desai, T., A., 2002. *Surf. & Coatings Techno.*154, 253-261.
- Inoue, Y., Ishihara, K. 2010. *Colloids and Surf. B: Biointerf.* 81, 350-357
- Israel, M. A.; Yuan, S. H.; Bardy, C.; Reyna, S.M.; Mu, Y.; Herrera, C.; Hefferan, M.P.; Van Gorp, S.; Nazor, K.L.; Boscolo, F.; Carson, C.T.; Laurent, L.C.; Marsala, M.; Gage, F.H.; Remes, A.M.; Koo, E.H.; Goldstein, L.S.B. 2012. *Nature* 481, 216-222.
- Müller A., Chetham, A.K., 2007. *Nanomaterials Chemistry Wiley* 5, 177-179
- Pei Z., Anderson H., Myrskog A., Duner G., Ingemarsson B., Aastrup T., 2010. *Anal. Biochem.* 398, 161-168.
- Raj. J, Herzog G., Manning M., Volcke C., MacCraith B.D., Ballantyne S., Thompson M., Arrigan D.W.M., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2654-2753.

Rusmini F., Zhong Z., Feijen J., 2007. *Biomacromolecules*, 8, 1775-1789.

Samanta D. and Sarkar A., 2011. *Chem. Soc. Rev.* 40, 2576-2592.

Sagiv, J., 1980. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 92-98.

Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaaari, S. M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L., John, V., 1999. *Nature* 402, 537-540.

Seitz, O., Fernandes, P. G., Tian, R., Karnik, N., Wen, H. C., Stiegler, H., Chapman, R. A., Vogel E. M., Chabal, Y. J., 2011. *J. of. Mat. Chem.* 21, 4384-4392.

Tan H.Y., Liu M., Nolting B., Go J.G., Gervay-Hague J., Liu G.Y., 2008. *ACS. Nano* 11, 2374-2384.

Teste B., Kanoufi F., Descroix S., Poncet P., Georgelin T., Siaugue J.M., Petr J., Varenne A., Hennion M.C., 2011. *Anal. Bioanal.Chem.* 400, 3395-3407.

Vigo-Pelfrey, C., Lee, D., Keim, P., Lieberburg, I., Schenk, D. B., 1993. *J. Neurochem.* 61, 1965–1968..

Ulman, A., 1996. *Chem. Rev.* 96, 1533-1554.

Zou, J., Kauzlarich, S. M., 2008. *J. Clust. Sci.* 19, 341-355.

4-3 Résultats-Discussion

Nous avons dans un premier temps procédé à la caractérisation de la surface fonctionnalisée par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier. Cette caractérisation a été effectuée en deux temps ; avant et après fonctionnalisation. Ces résultats n'étant pas présentés dans la publication, ils sont donc détaillés ci-dessous.

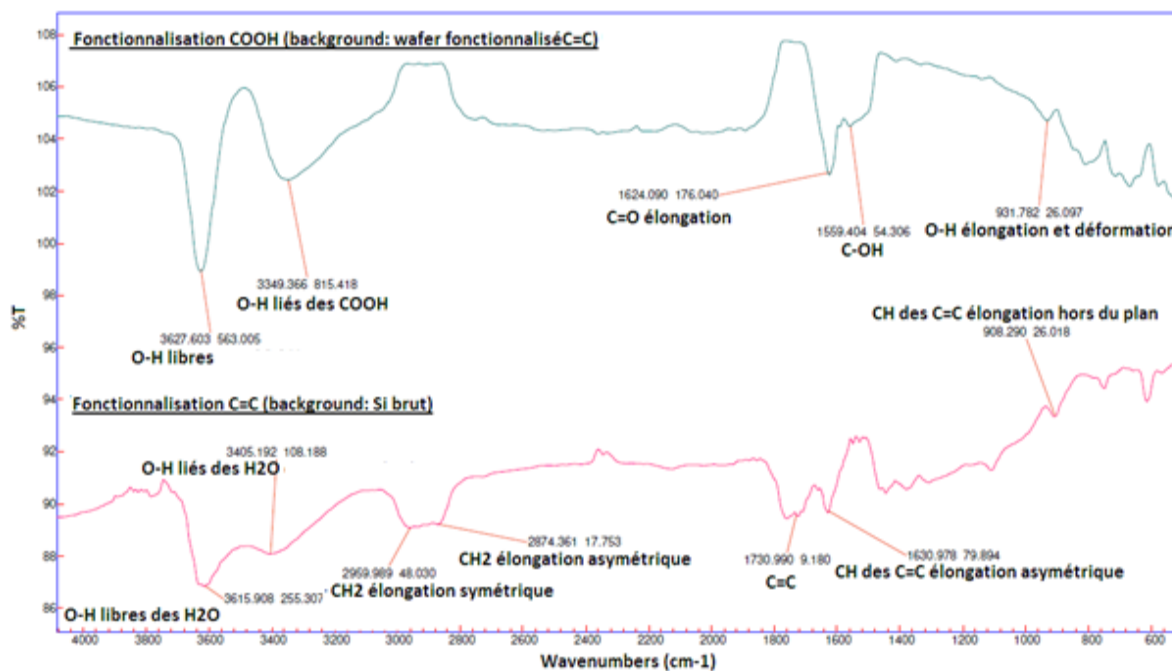


Figure 38: Spectres FTIR de la plaque silanisée enregistrés avant (signature du groupement C=C) et après oxydation (signature du groupement COOH)

Nous avons ainsi observé ci-dessus (Figure 38), la présence des groupements caractéristiques des groupements vinyles attendus en surface du silicium (spectre rose), grâce à la présence des modes de vibration liés aux liaisons C=C à 1710 cm⁻¹, C-H à 1630 cm⁻¹ lié aux groupements C=C et CH₂ symétrique et asymétrique à 2959 et 2872 cm⁻¹ respectivement [Lu04], [La87]. Cependant, on observe un épaulement des pics correspondant aux groupements CH₂. Cela témoignerait à nouveau de la présence des contaminants de carbone, comme cela a été mis en évidence sur le spectre du wafer brut auparavant, induisant des pics de groupements CH₃ symétrique et asymétrique à 2935 et 2908 cm⁻¹ respectivement, proches en fréquence des modes liés aux groupements CH₂. Nous avons également remarqué la présence de pics correspondant aux liaisons O-H libres à 3617 cm⁻¹ de molécules d'eau.

En ce qui concerne la mise en évidence de l'oxydation du wafer (spectre bleu), nous avons pu aisément observer la présence des liaisons C=O à 1623 cm⁻¹, O-H à 3349 cm⁻¹ lié

aux groupements COOH et C-OH à 1559 cm^{-1} des acides carboxyliques. Cependant, malgré un bruit environnant fortement réduit grâce à une atmosphère contrôlée lors de l'acquisition de la mesure et le wafer silanisé par l'alkylsilane utilisé comme background, nous avons pu mettre en évidence la présence intense de vibrations correspondant à des liaisons O-H libres à 3627 cm^{-1} . L'hypothèse proposée est que, en tenant compte de la présence localisée de quelques molécules d'eau en surface, une oxydation légèrement éparsée provoquant un éloignement des groupements acides carboxyliques les uns avec les autres a empêché la formation de liaisons hydrogènes entre eux. Nous avons ensuite étudié les conditions de stockage. Ainsi, après l'étape de silanisation par l'alkylsilane et oxydation, les échantillons ont été stockés à l'air et dans l'eau.

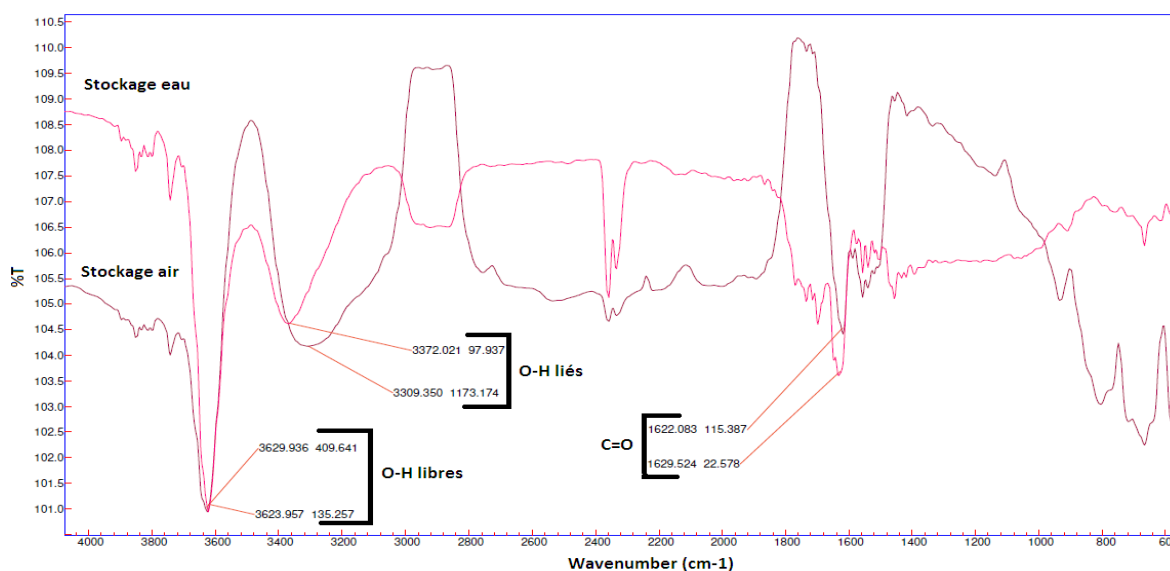


Figure 39: Spectre FTIR notifiant le nombre d'onde et l'air des pics de wafers fonctionnalisés COOH stockés dans l'air et dans l'eau

Les spectres infra-rouges (Figure 39) des wafers stockés à l'air et dans l'eau montrent de grandes similitudes. Cependant, ils révèlent une présence plus importante de groupements acides carboxyliques dans le cas d'un stockage à l'air. Nous avons donc considéré que le stockage optimal pour ces plaques silanisées est un stockage à l'air dans des tubes munis de bouchons pour tout de même les protéger un minimum de l'humidité existante dans l'air.

L'ensemble de ces spectres ont ainsi présenté des réponses cohérentes et instructives sur l'état de la surface des plaques de silicium suite aux différentes fonctionnalisations de surface. Nous avons notamment observé que les groupements d'intérêt sont bien présents tout en remarquant la présence résiduelle d'eau et de contaminants carbonés en surface des wafers.

Les études spectroscopiques menées ensuite par XPS (ILV, A. Etcheberry) ont confirmé la présence de groupements carboxyliques à la surface de ces plaques de silicium silanisées. De plus, les images topographiques réalisées par AFM montrent que les surfaces étaient homogènes après silanisation et oxydation. L'augmentation de la rugosité après fonctionnalisation est restée limitée et caractéristique d'une surface homogène qui a prouvé l'absence de polymérisation. La rugosité finale obtenue était de l'ordre de 2.67 nm.

Nous avons donc immobilisé sur ces surfaces les anticorps en utilisant la méthode EDC/S-NHS. Les études AFM menées ont montré que la répartition de l'IgG de souris était régulière avec un espacement approximatif de 100 nm entre chaque anticorps immobilisé. Ce résultat nous a indiqué que la saturation maximale des sites présents à la surface de l'échantillon de silicium fonctionnalisé n'était pas atteinte dans nos conditions expérimentales. Les mesures effectuées montrent également que l'épaisseur de la couche de protéine ne dépassait pas 20 nm. Ces valeurs sont en accord avec les travaux menés par Tan, dont les mesures font état d'une hauteur de 13 nm pour des anticorps IgG [Tan08]. Cela implique donc que les protéines ont été greffées en monocouche. Enfin, la rugosité arithmétique (R_a) après greffage de l'IgG de souris est faible (1.63 nm), ce qui montre que l'immobilisation est homogène, en accord avec les travaux de Popat en 2002 [Pop02]. Cela signifie que les conditions expérimentales d'immobilisation des anticorps n'a pas entraîné d'amas de protéines à la surface de l'échantillon et ainsi qu'une seule couche d'IgG a été immobilisée sur l'échantillon de silicium fonctionnalisé.

Les immuno-essais réalisés à l'aide d'anticorps anti-Fab ont démontré un lien entre la concentration d'IgG de souris immobilisées à la surface de l'échantillon de silicium fonctionnalisé et la concentration d'IgG de souris anti-Fab capturées. En effet, à une concentration constante d'IgG de souris anti-Fab, une augmentation de la concentration d'IgG de souris greffées induit une augmentation de l'absorbance. Ceci peut être interprété comme une augmentation de la capture des anticorps anti-Fab. Ainsi lorsque la teneur en anticorps à la surface de l'échantillon de silicium fonctionnalisé augmente, le taux de capture de la cible immunologique est amplifié.

Les résultats obtenus par microscopie à fluorescence montrent que pour une concentration fixe d'IgG de souris immobilisées, une saturation est obtenue lorsque la concentration en IgG de souris marqués par du FITC augmente. Ceci confirme l'accessibilité des sites Fab des anticorps immobilisés. Nous avons donc réalisé ensuite un immunoessai de type sandwich (Ac anti $\alpha\beta$ 1-42/ $\alpha\beta$ 1-42/Ac anti-Abeta 1-42/Ac anti Cy5) dédié à la détection

des peptides amyloïdes. Nous avons pu mettre en évidence la formation de complexes immuns de type sandwich lorsque les anticorps anti-A β amyloïdes sont immobilisés sur la surface silanisée. En revanche, en l'absence d'anticorps immobilisé, il n'y a pas de formations de complexes immuns (figure 40).

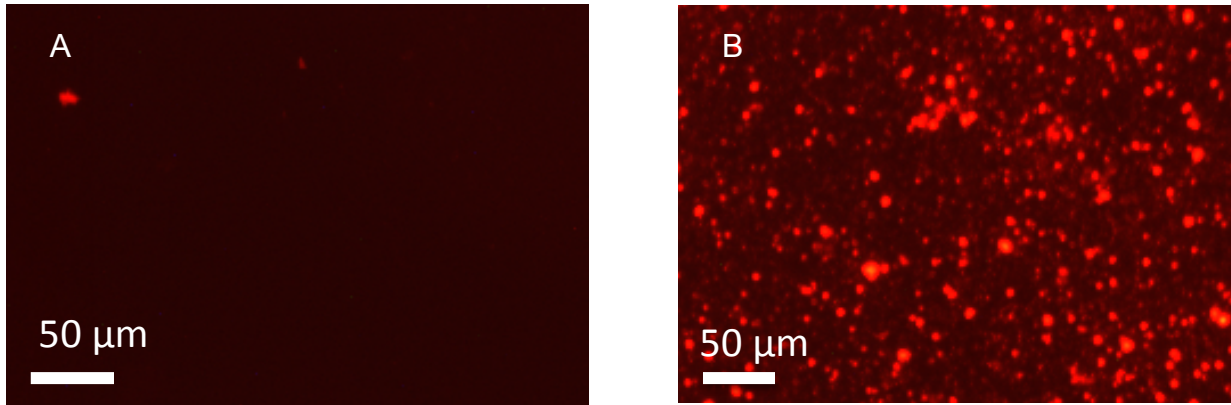


Figure 40 : Imuno-essais de type sandwich, pour la détection du peptide amyloïde A β 1-42: (A) en l'absence d'anticorps immobilisés sur la surface fonctionnalisée, (B) anticorps dirigés contre le peptide amyloïde immobilisés sur le support fonctionnalisé.

Cependant, nous avons constaté que si une réponse linéaire était obtenue lorsque nous avons fait varier la concentration du peptide amyloïde, nous observons à certaines concentrations un écart type important. Ceci a également été rapporté par de nombreux auteurs qui ont effectués des mesures du taux de A β 1-42 dans le liquide céphalo-rachidien [Wag12]. Une des hypothèses les plus couramment admises repose sur la capacité de ces peptides à s'agréger, conduisant ainsi à une diminution de la sensibilité de détection [Has07]. En conclusion, ces plaques de silicium fonctionnalisées constituent de véritables supports pour biocapteur.

Au vu de ces expériences, nous avons considéré qu'une meilleure compréhension des phénomènes de greffage et d'orientation des IgG serait bénéfique pour ce type de plateforme et à terme pour le biocapteur développé. De fait, l'immobilisation des IgG par la méthode EDC/S-NHS conduit à une immobilisation aléatoire de ces anticorps, entraînant ainsi le masquage d'une partie des sites de reconnaissance antigénique. Ceci peut conduire ultérieurement à une diminution de la sensibilité de détection du futur biocapteur. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés aux travaux de Pei et ses collaborateurs [Pei10], qui rapportent qu'une immobilisation optimale est obtenue lorsque les anticorps sont immobilisés à pH 4,5 à l'aide de tampon de faible molarité, par la méthode EDC/S-NHS, sur des surfaces méthyl-carboxyles-dextran. L'hypothèse proposée est qu'à ce pH, les groupements

carboxyliques ne sont plus chargés, alors que les groupements sulfonates restent chargés négativement et les groupements aminés des protéines sont chargés positivement. Ainsi, une interaction électrostatique peut s'établir favorisant la formation de la liaison covalente. De plus, ces auteurs ont montré à l'aide d'expériences effectuées sur micro-balance à cristal de quartz, que ce mode d'immobilisation à pH acide favorisait une meilleure orientation de l'anticorps en augmentant l'accessibilité du fragment Fab. C'est pourquoi, la deuxième partie de nos travaux a porté sur une comparaison de l'orientation plaques silanisées où les anticorps ont été greffés à pH acide et à pH neutre. Dans la dernière partie de cette étude, nous avons évalué l'activité biologique des IgG modèles de souris immobilisés à pH acide ou neutre. Pour cela, trois concentrations d'anticorps ont été employées pour l'immobilisation (200 ; 600 ; 1000 ng/mL). Une fois les premiers IgG immobilisés, l'ajout du deuxième anticorps dirigés contre le fragment Fab a été effectué après l'étape de rinçage. Nous avons ainsi testé trois concentration d'anticorps anti Fab ; 100, 300 et 500 ng/mL. Après révélation par réaction enzymatique couplé à une détection colorimétrique, nous avons obtenus les résultats représentés dans la figure ci-dessous (Figure 41).

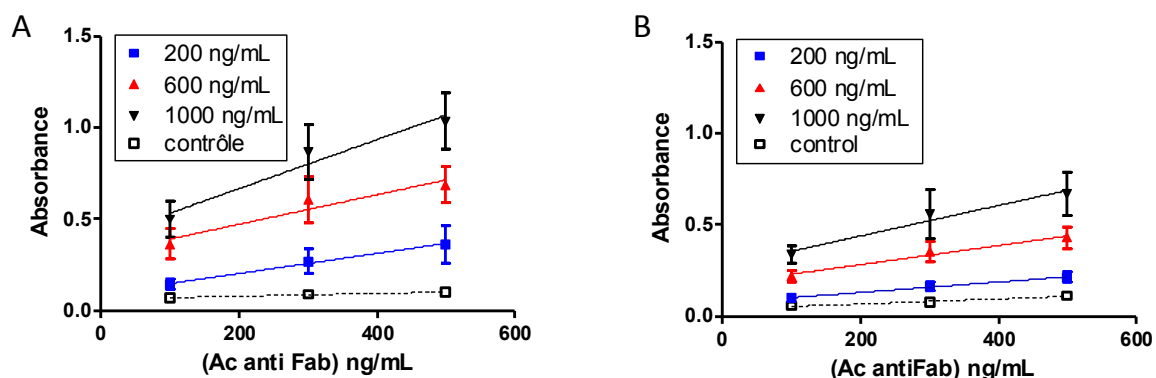


Figure 41 : droite de calibration des anticorps anti Fab (100; 300; 500 ng/mL) après immobilisation de trois concentrations d'IgG modèles de souris (200; 600; 1000 ng/mL).; (A) à pH acide, (B) à pH neutre.

La première observation que nous pouvons constater pour les deux types de plaques est que plus la concentration en IgG est élevée, plus la réponse augmente. Celle-ci est plus importante au niveau des supports où les IgG ont été immobilisées à pH acide. Ceci implique, un plus grand nombre de site Fab accessible et donc une meilleur efficacité de capture de ces plaques par rapport à aux supports immunologiques où les IgG ont été immobilisés dans du PBS à pH neutre. Par ailleurs, le calcul des pentes des droites montrent que quelque soit la concentration des IgG immobilisées, la pente est plus importante quand ceux-ci ont été

immobilisés à pH acide (Tableau 2). Ceci est en faveur d'une réponse plus sensible des supports immunologiques carboxyliques lorsque ceux-ci sont immobilisés à pH acide.

Tableau 2 : étude de linéarité sur les plaques silanisées par le 7-octenyltrichlorosilane ; comparaison entre des IgG immobilisées à pH acide et à pH neutre.

	Concentration IgG immobilisés (ng/mL)	200	600	1000
Pente	pH acide	5,4 10 ⁻⁴	8 10 ⁻⁴	13. 10 ⁻⁴
	pH neutre	2, 8 10 ⁻⁴	5,2 10 ⁻⁴	8,310 ⁻⁴

Il est à noter toutefois que les coefficients de régression étaient plus satisfaisants pour l'immobilisation à pH neutre que pour le pH acide (Tableau 2).

Tableau 3 : coefficients de régression des droites de linéarité obtenus pour l'immobilisation des IgG à pH acide et à pH neutre.

	Concentration IgG immobilisés (ng/mL)	200	600	1000
Coefficient de régression	pH acide	0,99	0,92	0,96
	pH neutre	0,99	0,99	0,96

Quoiqu'il en soit, ces résultats montrent une efficacité de capture plus importante pour les plaques ou les anticorps sont immobilisés à pH acide. Nous avons en effet effectué parallèlement à la droite dose-réponse présenté ci-dessous, une gamme étalon avec des anticorps anti-Fab de quantité connues. Ceci nous a permis d'estimer que lorsque nous avons immobilisé les IgG sur la plaque de silicium à une concentration de 1000 ng/mL, et que nous avons mis en contact avec cette surface des anticorps anti-Fab à la concentration de 500 ng/mL, la quantité d'anticorps anti-Fab capturés était de 42,9 ng/cm² à pH acide et 24 ng/cm² à pH neutre. Ceci peut s'expliquer par un nombre d'IgG greffés plus important lorsque celui-ci est effectué à pH acide, par comparaison au pH neutre. En effet, le pKa des IgG étant autour de 8,5, à pH acide la charge globale des IgG est plus élevée qu'à pH 7,5. Ceci va favoriser les interactions électrostatiques entre les groupements sulfonates chargés négativement présents à la surface des silanes lorsque la méthode EDC/S-NHS est employé et les groupements aminés, chargés positivement, des anticorps, liés à la présence d'acides

aminés basiques comme la lysine et l'arginine. Aussi, la formation de liaisons covalentes entre la protéine et la surface des silanes sera facilitée. Les bases de données (Expasy) signalent également la présence au niveau des fragments Fab et Fc (partie constante de l'anticorps) de lysine et d'arginine. Ceci est en faveur d'une augmentation du greffage des anticorps en milieu acide ce qui conduit à un plus grand nombre de site Fab accessibles, mais pas nécessairement à une meilleure orientation des anticorps ainsi greffés. En effet, nous avons également observé, lors des études préliminaires à l'aide d'anticorps anti-Fc, une augmentation du nombre de fragments Fc lorsque les IgG sont immobilisés à pH acide. Ceci est en désaccord avec les travaux de Pei [Pei10]. Une différence de composition en acides aminés peut être proposée pour expliquer ces résultats contradictoires. Cette équipe a réalisé ces études en utilisant des anticorps dirigés contre une hormone humaine, l'hormone gonadotrophique chorionique (β hCG) qui peut différer des anticorps que nous avons employé par leur composition en acides aminés

En conclusion, le greffage aléatoire des anticorps sur ces plaques silanisés conduit à la formation de plates-formes immunologiques pouvant être adaptés à la détection des peptides amyloïdes. Celles-ci peuvent néanmoins être optimisés en terme d'efficacité de capture lorsque les IgG sont immobilisés à pH acide sur les surfaces silanisées à l'aide du 7-octenyltrichlorosilane. Cependant, d'autres travaux font état de l'utilisation de l'APTES, générant la présence de groupement $-NH_2$ disponibles pour le greffage de biomolécules, comme revêtement pour le développement de biocapteurs [Cho06], [How06], [Rit09], [Kim10], [Did12]. C'est pourquoi, nous avons voulu mener une étude comparative entre les deux revêtements, APTES et 7-octenyltrichlorosilane.

Chapitre 5

Etude comparative des plaques silanisées par le 7-octenyltrichlorosilane et l'APTES

5-1- Introduction

Dans cette partie de mon doctorat, nous avons comparé les deux types de silanes ; le 7-octenyl trichlorosilane et l'APTES. Dans la première partie de mon travail de thèse, nous avons développé des plates-formes immunologiques à l'aide du 7-octenyltrichlorosilanes (OTS) (figure 42). Cependant, celui-ci nécessite une étape d'oxydation après la silanisation ce qui rend ce processus plus complexe et plus long. Parallèlement, des travaux rapportent une large utilisation de l'APTES, pour les dispositifs miniaturisés [Fou12]. Ce revêtement présente en effet l'avantage de permettre une silanisation en une seule étape et de générer des surfaces présentant des groupements fonctionnels $-NH_2$. Comme nous l'avons mentionné dans la partie bibliographique, ces groupements aminés permettent un greffage covalent des protéines, notamment en utilisant la méthode EDC/S-NHS [Her98]. De plus, L'APTES est d'autant plus intéressant pour les anticorps, que ceux-ci sont constitués d'un grand nombre, d'acides aminés porteurs de groupements carboxyliques comme l'acide aspartique et l'acide glutamique au niveau du fragment Fc [Sah10] (base de données Expasy). Ceci va permettre leur immobilisation covalente via la formation d'une liaison amide entre un groupement $COOH$ de la protéine et un groupement fonctionnel $-NH_2$ du support solide. Nous pouvons ainsi supposer que cela sera en faveur d'une meilleure accessibilité des fragments Fab des immunoglobulines immobilisés par la méthode EDC/ S-NHS que nous avons utilisé. En effet, un greffage impliquant une fonction carboxylique présente en proportion importante au niveau du fragment Fc conduira à une meilleure orientation qu'une immobilisation liée à la fonction amine présente en plus faible proportion au niveau du fragment Fc. C'est pourquoi, nous avons souhaité comparer la capacité de capture de ces deux types de surfaces. Nous avons donc, dans un premier temps, fonctionnalisé à l'aide de ces deux silanes, des plaques de silicium de 1 cm^2 . Les étapes de silanisations sont représentées dans la figure ci-après.

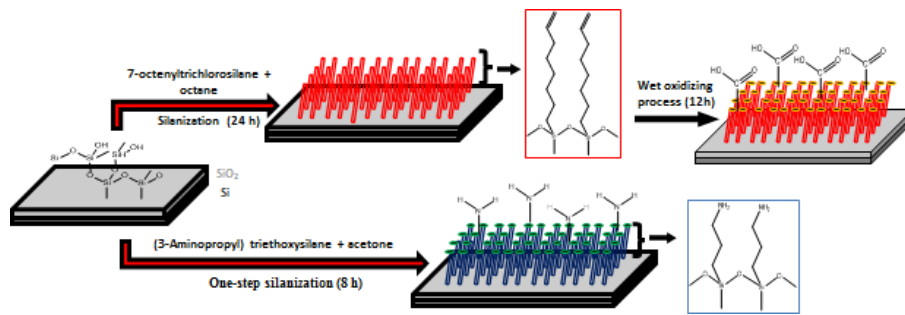


Figure 42: Représentation schématique de la silanisation par le 7-octenyltrichlorosilane et l'APTES.

Dans un premier temps, nous avons effectué une caractérisation de ces deux types de silanes par XPS afin de confirmer la présence des fonctions carboxyliques et amines à la surface des plaques de silicium. Les expériences AFM ont été réalisées afin d'évaluer la rugosité ainsi que l'homogénéité de la surface ainsi silanisée.

Dans la deuxième partie de l'expérience, nous avons immobilisé des Immunoglobulines G modèles de souris sur ces plaques de silicium fonctionnalisées. Des expériences AFM ont été menées sur ces surfaces greffées afin de réaliser une étude topographique de la surface bio-fonctionalisée. Ensuite, nous avons évalué l'activité biologique des anticorps immobilisés. Pour cela, nous avons effectué un immunoessai enzymatique avec des anticorps dirigés contre les fragments Fab, impliqués dans la reconnaissance antigénique (cf partie expérimentale chapitre 1). Les résultats obtenus sont présentés dans l'article ci-après.

Article soumis à ACS Appl Mater Interfaces

Surface bio-functionalization for the development of immune-sensing platform: comparison between two methods of silanization

TPL. Giang ¹, M. Ammar ^{2,3}, M. Taverna¹, J. Vigneron ⁴, A. Etcheberry ⁴, E. Dufour-Gergam³, C. Smadja¹

1. Institut Galien Paris-Sud, UMR CNRS 8612, Chatenay-Malabry F-92296, France
2. Univ. ParisSud, Institut d'Electronique Fondamentale, UMR CNRS 8622, Orsay F-91405, France
3. CNRS, Orsay F-91405, France Univ. Paris-Sud
4. Univ. Saint-Quentin en Yvelines, Institut Lavoisier de Versailles, UMR 8180, Versailles F-78035, France

Key words: silanization, self-assembled monolayer, APTES, 7 octenyltrichlorosilanes, antibody, orientation.

Abstract

The aim of this work is to develop an ultrasensitive and specific immune-sensing platform dedicated to the quantification of potential biomarker in biological fluids. For biosensing applications, the chemical nature of the surface which will host the biomarkers is critical; in fact grafting antibodies with suitable orientation should be established to promote an optimal covering of the bioactive surface. For proteins biomarkers, two procedures of trapping antibodies are possible using carboxylic or amino groups. Thus, biological grafting can be carried out by the mean of self assembled layers composed by one of the previous molecules chemically prepared on silicon surface. In this work, two types of silanes have been investigated on silicon wafer; (i) 7-octenyltrichlorosilane to graft carboxylic groups, (ii) (3-Aminopropyl) triethoxysilane (APTES) leading to the presence of amino groups (Rusmini et al., 2007). After the silanization process which was optimized to achieve maximum yields obtained of silanization (time, solvent), XPS experiments have been performed. Results confirmed the presence of the desired chemical groups on both surfaces. In addition, the AFM topographic measurements of APTES surface showed a homogeneous and uniform layer indicating a good distribution and organization of the self assembled monolayer as compared to the 7-octenyltrichlorosilane surface. In the second part of our study, the biological activity of antibody (IgG) covalently grafted on the two types of surfaces has been evaluated. Thus, antibodies orientation and the antigen binding capacity of model mouse IgG were investigated with 7-octenyltrichlorosilane and APTES surfaces. Model IgG grafted on silanized surfaces were tested for their ability to bind recognition antibodies, directed against their fragment (Fab) involved in the specific bio-recognition by an immuno-enzymatic assay. The results showed that grafted surfaces by APTES exhibited a higher available bio-recognition site compared to the 7-octenyltrichlorosilane surfaces. In addition, the surfaces with self assembled monolayer exhibiting amino groups provided an efficient grafting and an optimal orientation of the immobilized IgG. In summary, we demonstrated a controlled APTES surface functionalization that could provide a novel reliable method to determine biomarkers with high sensitivity and specificity. This comprehensive study may eventually lead to the development of immune-sensing applications in the field of biosensors.

1. Introduction

Silicon chips have been the backbone of modern electronic technology and computing for several decades. As the size of devices on silicon wafers scales down to sub-nanometer, the surface characteristics become dominant and play an increasingly crucial role in device operation, the ratio of surface area-to-volume increases in smaller objects, precise control of interface properties is required in the many fields. The silicon devices are widely use in the immunosensors area. They have been employed over thirty years and are still the most important diagnostic tools in medical diagnostics area. They require the integration at molecular scales, solid state inorganic structure with biological active interface. Most of the biological interfaces rely on the immobilization of antibodies onto different support for the purpose of antigen detection and therefore the ability of the immobilized antibody to capture molecules. Indeed, sensivity and specificity of biosensors depend on high-affinity and specific capture molecules. Commonly, antibodies are grafted on silicon substrate through binding to a self-assembled monolayer (SAM) for functionalization of surfaces. SAM provides a powerful tool for immobilization of antibodies on various substrates because. Organosilicon are currently among the most popular chemistries employed for coating glass slides. 3-aminopropyltriethylethoxysilane (APTES) and 7-octenyltrichlorosilane are two organosilanes agents frequently used for chemical preparation of silicon substrate (Haller et al., 1978, McBeath et al., 2000, Kim et al., 2010; pallandre et al., 2005; Moussa et al., 2013). They are able to enhance the biocompatibility of the surface and protect proteins from denaturation during the immobilization step (Rusmini et al., 2007). However, efficient immobilizations of the antibodies and their orientation on the surfaces remain key elements in the preparation of biosensors. Indeed, as the active sites of the antibody are on the antigen binding fragment (Fab), the ideal orientation of the immobilized is when the Fc fragment is attached on the surface and the Fabs oriented toward the analyzed solution. A great variety of methods suitable for immobilization of antibodies has been described in the literature. Physical adsorption proves the easiest immobilization method, but leads to the denaturation of immobilized antibodies yielding poor reproducibility and poor sensitivity. Alternatively, covalent bounding provides a better stability and reproducibility, although this type of immobilization causes random immobilization. One of the most popular covalent strategy relies on 1—ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide (EDC) and sulfo-N-hydroxysuccinimide (S-NHS). Therefore, the functionalized semiconductor surfaces result in great versatility and adaptability since terminal groups can react with any biomolecules containing or modified with a chemical group able to form a stable amide bond. The present study aimed at evaluated the influence of two types of silanes, (APTES) and 7-octenyltrichlorosilane, exhibiting at their surfaces an amino group and a carboxylic group respectively, on model antibodies (IgG) orientation after the immobilization process. Monoclonal immunoglobulin G (IgG) was chosen as a model protein because of its selective

binding affinity toward the corresponding antigen. These functionalized surfaces have been first extensively characterized by XPS and atomic force microscopy (AFM) to provide information about surface chemistry (XPS) and surface roughness (AFM). The surface coverage after IgG immobilization has been studied by AFM experiment. To assess antibody orientation, it is of paramount importance to determine the physical accessibility of the Fab fragment. Several methods such as spectroscopy ellipsometry (Xu et al., 2006), SPR (Chen et al., 2003) have been already employed to acquire information about the orientation of antibodies grafted on SAM. However, these methods have not yielded a consensus. In the present study, we use an immunoassay experiment to characterize the orientation of the antibodies on the studied surface, by using antibodies, tagged with enzyme, directed against the Fab fragment.

2. Materials

Octane (99.9%), potassium permanganate (99%), potassium bisulfite (99%) and sodium periodate (99%), were purchased from VWR and were used without further purification. Acetone (99.9%) from Technic. The 7-octenyltrichlorosilane (90%) -provided by Flurochem Ltd. and the 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) from sigma Aldrich were stored at 4°C. Hydrogel chloride and ethanol (99.9%) were HPLC grade and purchased from Fisher Scientific. IgG from mouse serum 95%, anti-mouse IgG Fab specific, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), stop reagent for TMB substrate, phosphate buffered saline 10x (PBS), Tween20, N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt (S-NHS), Bovine serum albumin (BSA) from sigma Aldrich.

3. Experimental methods

3.1. Functionalization of silica surfaces :

The surface functionalization consists in grafting the surface of a silicon wafer and creates alkylsilane with carboxylic and amine groups at the terminal of the carbon chains. The silicone samples were sliced from B-doped Si (100) wafer, with a resistivity in the range 1–50 Ωcm , in 1cm^2 . They present a native layer of silica with few dispersed silanol groups (Si–OH). For the carboxylated surface, the silanization solution is based on a mixture of 7-octenyltrichlorosilane and octane solvent freshly prepared with a respectively ratio of 1/600(v/v). The expected monolayers were formed at ambient temperature ($\sim 19^\circ\text{C}$) in a glovebox with a N_2 permanent flow (humidity never exceeded 5%): samples were emerged in the prepared silanization solution enclosed in a lapping beaker into stirring plateau during 24h. Finally, the samples were rinsed using the same solvent. For the oxidation step, the oxidant mixture is prepared with KMnO_4 (0.5mmol), K_2CO_3 (1.8mmol), NaIO_4 (19.5mmol) in ultra-pure water. After 12h of reaction time, the samples are washed in solution of NaHSO_3 (0.3molL^{-1}), DI water, HCl (0.1molL^{-1}) water, and ethanol. Concerning the functionalization using amine silanes, the one-step reaction was performed with APTES ((3-aminopropyl)triethoxysilane) 2%(v/v) in acetone, in a glovebox as previously described for 7 -octenyltrichlorosilane during 8h. Finally, the samples were rinsed using the same solvent.

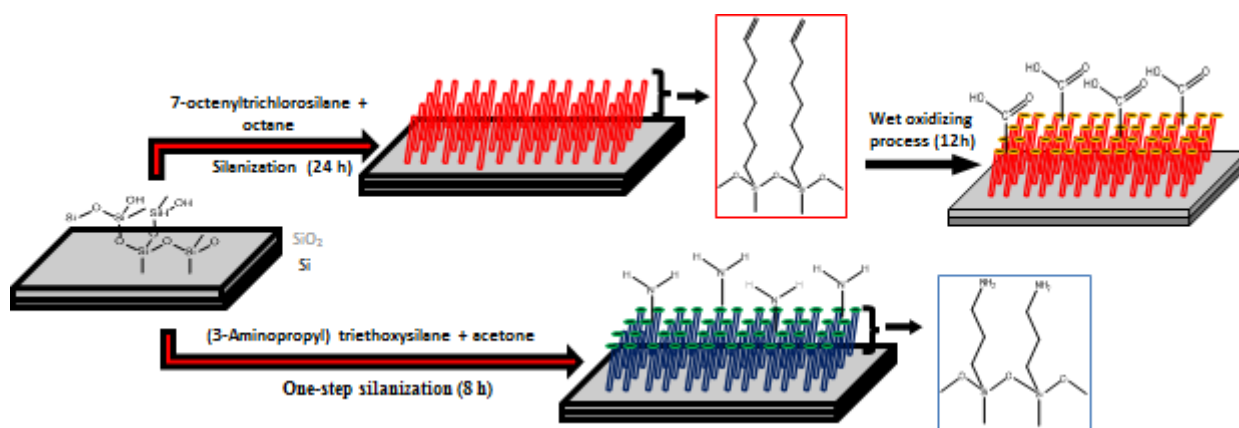


Fig. 1. Schematic procedures of the functionalization of silicon surface using 7 –octenyltrichlorosilane and (3-aminopropyl)triethoxysilane

3.2.Characterization techniques:

All steps of chemical preparation of the samples were finally characterized using the XPS spectrometer Thermo-Electron Theta-Probe model. Data were acquired using an AlK α 1 monochromatic X-ray excitation at 1486.6 eV. Acquired spectra were processed using the Thermo Electron Avantage XPS software. The analysis spot had a dimension of 400 μ m. The detector was put perpendicular to the analyzed surface. The step size was 1 eV for survey spectra and 0.1 eV for the higher resolution one focused on specific element. The surface morphology was analyzed by AFM (Agilent, PicoPlus5500LS) in tapping mode in room air using standard Silicon cantilevers. Absorbance immunoassay was measured in a microtiter reader (EL 800, BioTek, USA).

3.3 Antibody immobilization and immunoassay procedure

All experiments have been carried out on the 1cm 2 surfaces previously functionalized. Firstly, functionalized surfaces were converted to activate ester by reacting with EDC and S–NHS (5 mg/mL). Diluted anti-mouse IgG antibody was added to the solution with 200 μ L of EDC and 200 μ L of S–NHS and the covalent attachment was performed overnight at 4°C. The samples were rinsed five times with PBS containing Tween 20 (0.01%). Silanized surfaces were then blocked with 4% BSA solution for 1h at 37°C, then washed five times with PBS containing 0.2 % Tween. Immuno-reaction between immobilized IgG and anti-mouse IgG tagged directed against Fab fragment horseradish peroxidase (hrp) conjugate were performed. After over night incubation at 4°C, the samples were washed with PBS containing 0.2% Tween 20 five times. Then, each sample was incubated with 50 μ L 3,3',5,5' tetramethyl benzidine (TMB) solution for 10 min at 37°C (light avoided). The absorbance at 450 nm was measured after blocking with a stop reagent solution. All these experiments were compared with a silanized surface without grafted antibodies. The sandwich assay was performed

with fixed concentration of model IgG and various concentration of IgG directed against Fab fragment were added.

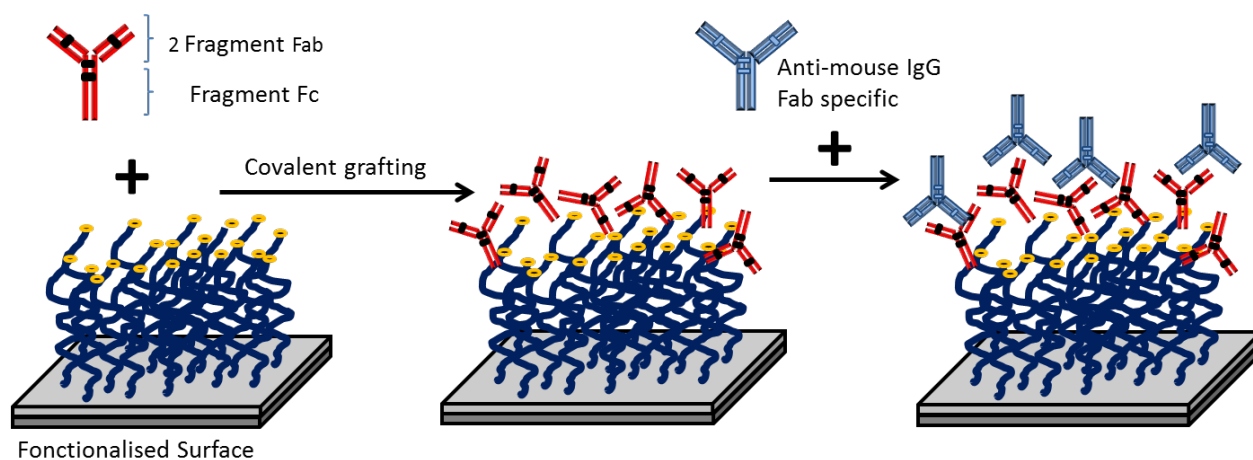
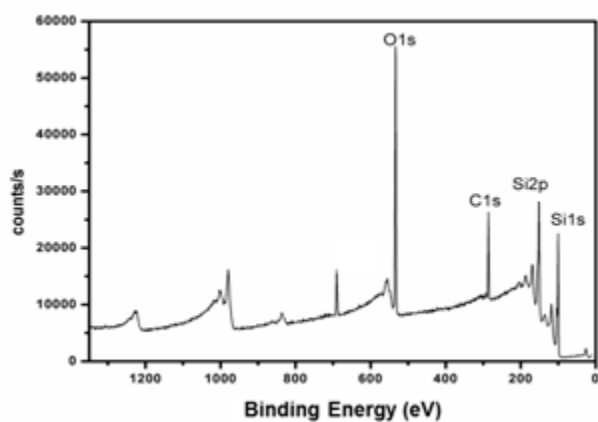


Fig. 2. Schematic IgG immobilization characterized by specific Anti- IgG Fab

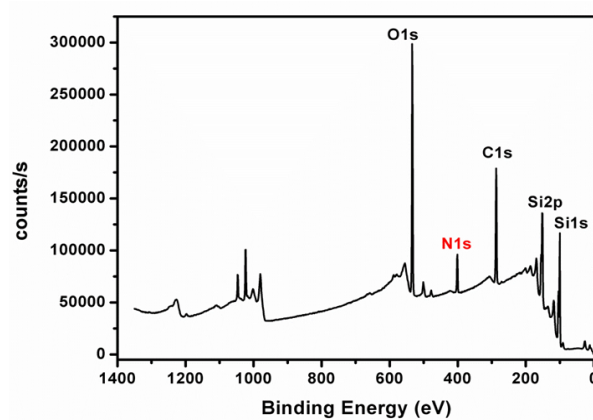
4. Results and discussion

4.1. Functionalized surface analysis:

XPS and AFM analyses were performed on the silicon surface before and after silanization. Concerning the XPS spectra, the functionalized surfaces highlighted all the components related to the carboxylic and amino groups (fig. 3).



a)



c)

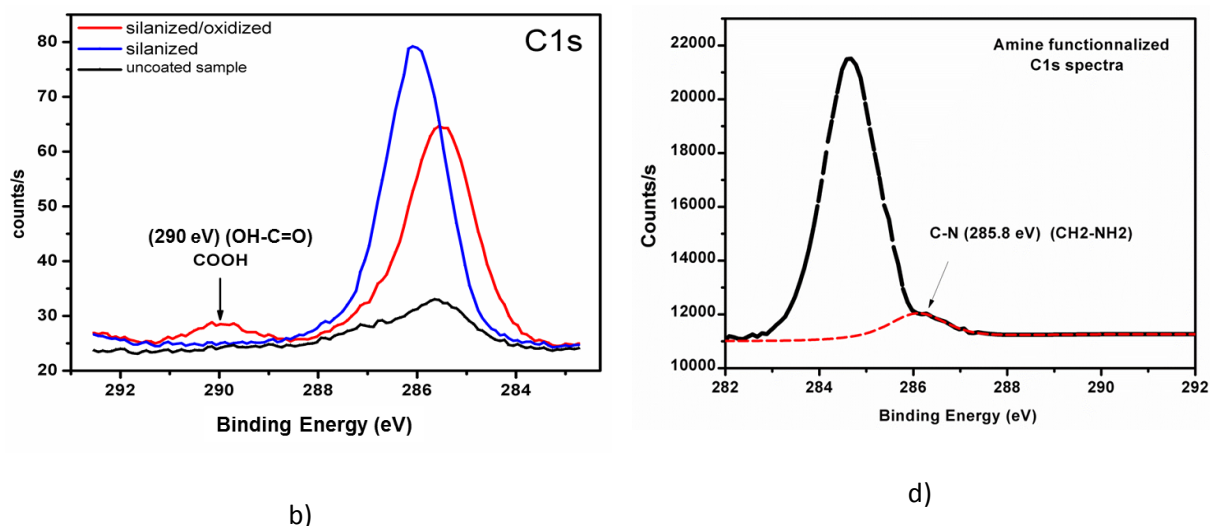


Fig. 3. (a) XPS survey of the oxidized alkyl silanized surface and XP spectra centered on carbon element, before and after silanization, and after oxidation (b). (c) XPS survey of the amino silanized surface and (d) XP spectra centered on carbon C1s after silanization.

In fact, In Fig. 3(a) and (c), the survey spectra of the two types of silanization presented the typical characteristics of silicon wafer covered by a thin layer of native silica: silicon with double peak of Si2p at 100 eV, Si2s peak at 151 eV, oxygen with O1s peak at 533 eV and carbon with C1s peak at 286 eV, N1s peak at 400eV. Interestingly, the latter element (C%) is clearly enhanced after the two silanizations due to the presence of the carbon chain, as shown in Table1. The functionalization surface guarantees as expected and illustrated in Fig. 1, the modification of the terminal groups of the carbon chain. To get further in sights on the mechanism of two methods, we have focused XP measurements on the carbon element. The enhancement of the C1s peak is notably shown in Fig. 3(b) and (d) on silanized surface compared to the uncoated silicon surface. For the alkylsilane and after oxidation (Fig. 3(b)), the increase of the carbon proportion on surface is stopped due to the emergence of the carboxylic groups which makes more detectable the oxygen element bound to the COOH group at the expense of carbon element bound to the alkylsilane chain. In the same spectra (Fig.3(b)) at 290 eV, we noticed the undeniable presence of carboxylic signature at 290 eV that do not appear on both uncoated and silanized samples. On the other hand, the energy shift observed in the spectra focused on C1s peak around 286 eV is probably due to a common surface charge phenomenon during the measurement.

Regarding the amino-silnization (Fig.3 (d)), we observed the existence presence of C-N bound of group $\text{CH}_2\text{-NH}_2$ at 285.8 eV

Table 1. Atomic surface composition of silicon, carbon, oxygen, Nitrogen, N/Si and C/Si ratios extracted from XPS measurements for uncoated, silanized and silanized-oxidized silicon surface

(table 1.a), for uncoated and amino-silanized surfaces (table 1.b). We report also the AFM roughness for each characterized surface.

Table 1.a

Silicon	Atomic composition %			Ratio	Roughness (nm)
	Si	C	O	C/Si	
Uncoated	51.28	7.17	31.41	0.14	0.06
Silanized by alkylsilane	42.36	21.52	31.41	0.5	0.69
Carboxylated silane	42.44	17.16	36.33	0.4	2.5

Table 1.b

Silicon	Atomic composition %			Ratio		Roughness (nm)
	Si	C	N	C/Si	N/Si	
Uncoated	63.3	5.51	0.21	0.087	0.003	0.06
Amino-Silanized	36.6	31.56	6.05	0.9	0.16	0.32

In table 1, the survey XP Spectra shows the atomic percentage of different elements interfering (or intended to evolve) in the chemical functionalization established in this work: C, O, N and Si. In fact, we can confirm the chemical stability of the grafted silane after oxidation; the C/Si ratio remains far above the ratio of the untreated sample.

4.2 Immobilized antibodies topography

AFM measurements were also carried out on both types of silanized surfaces. The two surfaces are topographically illustrated in figure 5 and 6.

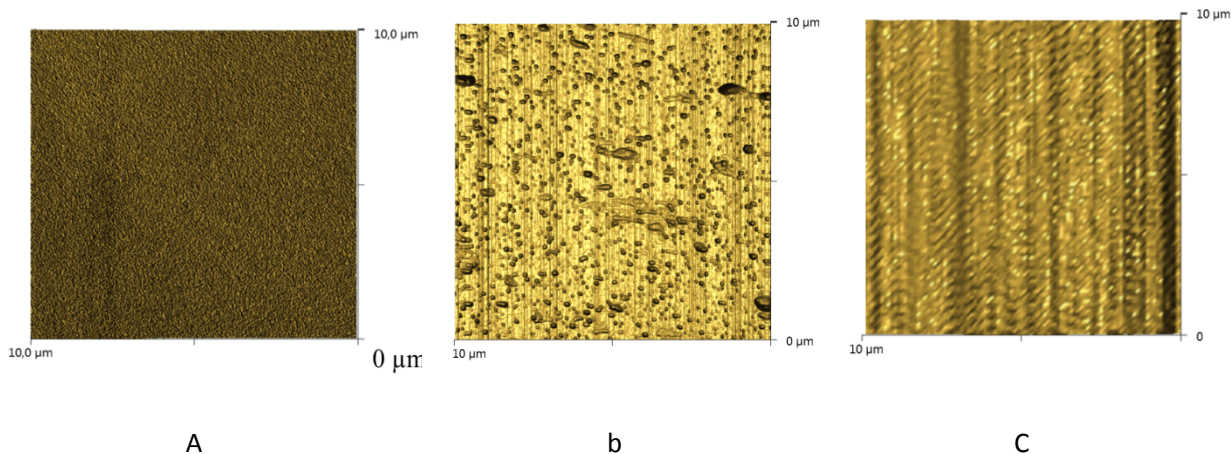


Fig. 4. Topographic overviews using tapping mode on atomic force microscopy of (a) silanized and (b) silanized and oxidized silicon surface using alkylsilane . (c) aminosilanized silicon surface. Roughness enhances from 0.06 nm for the uncoated surface to 0.67 nm after silanization, up to 2.5 nm after oxidation and 0.32nm for the amino-silanized surface.

The AFM topographic overviews showed the difference of roughness of the two types of silanization(fig. 4). In fig 4 a-b, we observed the morphological differences between surfaces before and after functionalization steps : The carboxylated surface with two steps of modification surface silanization and oxidation. On the first step of silanisation by alkylsilane in organic solvent (octane 99%), the vinyl-silane surface (fig.4a) is homogeneous . The roughness (0.69 nm) slightly enhances compared to uncoated sample (0.06 nm) which confirm the controlled morphological modification of the surface. The second steps, the vinyl groups were oxidized in aqueous solution. The silanized-oxidized surface, topographically illustrated in fig.4 b presents a roughness of 2.5 nm. This value, increases compared to the silanized surface (fig.4a). This result highlighted that the oxidation is certainly appeared but with probably other derivatives of oxidation because of the notable enhancement of the roughness. On the other hand, the roughness of the carboxylated surface is more important than the amino-silanized surface 0.32 nm. In fact, the functionalized method using the carboxylic groups is complex including a long time of reaction and several washing steps using inorganic-salt solution. This result should have two effects, first the functionalization provides a complex surface topography which could lead to difficulties in the grafting procedure of antibodies. The second effect which should be considered as a consequent of the first one, the inappropriate orientation of molecules in this complex surface could cause an inappropriate orientation of antibodies, certainly a serious problem for the grafting of the second layer of antibodies (layer of recognition), and could encourage the aggregation of the biological entities which encounter difficulties to be grafted on the surface.

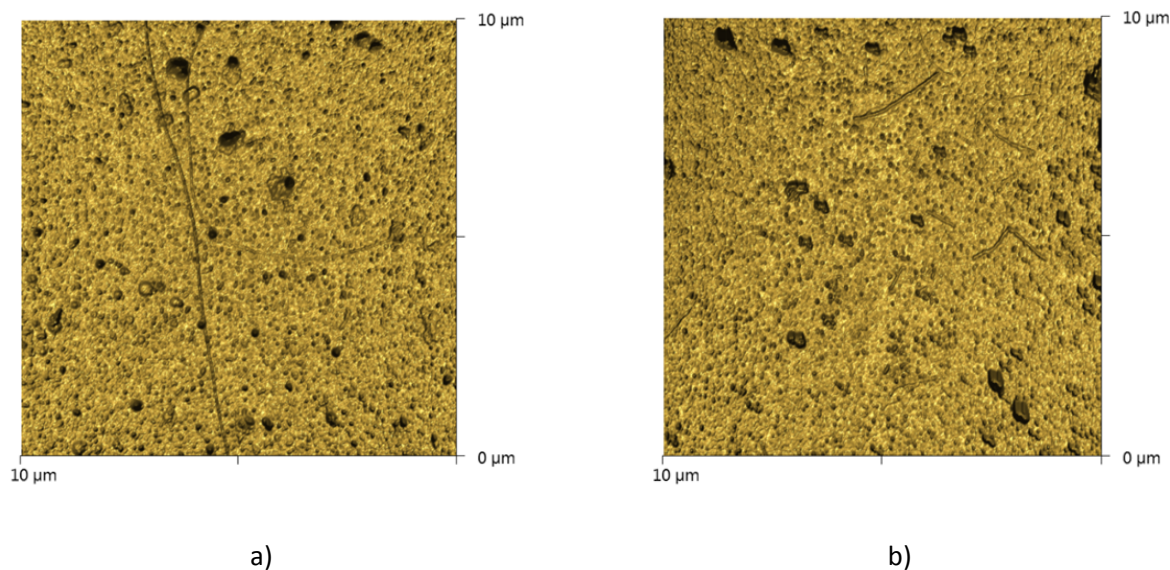


Fig. 5 Topographic overviews using tapping mode on atomic force microscopy of silicon surface grafted with IgG mouse antibodies (a) carboxylated surface, roughness is 2,8 nm and (b) aminosilanzed surface, roughness reaches 1.05 nm after IgG adsorption.

In comparison with the silanized surface (fig. 4), after the IgG immobilization (fig5), both of two surfaces are rougher than the chemical prepared surface, which confirm the antibodies grafting. In fact, the controlled enhancement of the roughness demonstrates that the grafting is occurred homogenously because, it doesn't reaches high values (< 3 nm) relative to a complex surface due probably an aggregation phenomenon. Moreover the amino-silanized surface is on behalf of the measured roughness on each surface. In other hand, we carried out focused topographic measurements on the same surface presented on the figure 5. The dimensions of the scanning area were (1.8×1.8 μm). As we can observe on the figure 6.a the carboxylated surface permit us to reach an homogenous grafting with a very limited presence of aggregation of the Immobilized IgG. Indeed, the high of the grafted layer doesn't exceed 20 nm which is expected for this type of bio-functionalisation. In the other hand, the spacing between the antibodies (< 100 nm) proves that the covering is almost present on the entire fonctionalized surface. Therefore, we can observe some features of aggregation corresponding to continuous blocks of immobilized IgG.

The figure 6.b shows the localized topography of immobilized antibodies on amino-silanized surface. We observed the same characteristics compared to the figure 6.a regarding the homogeneity and the uniformity of the grafting. In contrast, there are very limited marks of potential aggregation of the immobilized IgG. The thickness of the grafted layer (< 25 nm) seems to be compatible with the length of silane groups added to the length of antibodies (~ 20 nm). The lateral resolution of the grafted IgG showed a controlled surface distribution with roughly a reduced antibodies spacing (< 100 nm) and morphologically the same shape of the grafted entities. In contrast and as shown in the figure 6.a,

the carboxylated surface presents typically random patterns as morphology, which can be related to the aggregation of antibodies or an uncontrolled deposition of other biochemical entities.

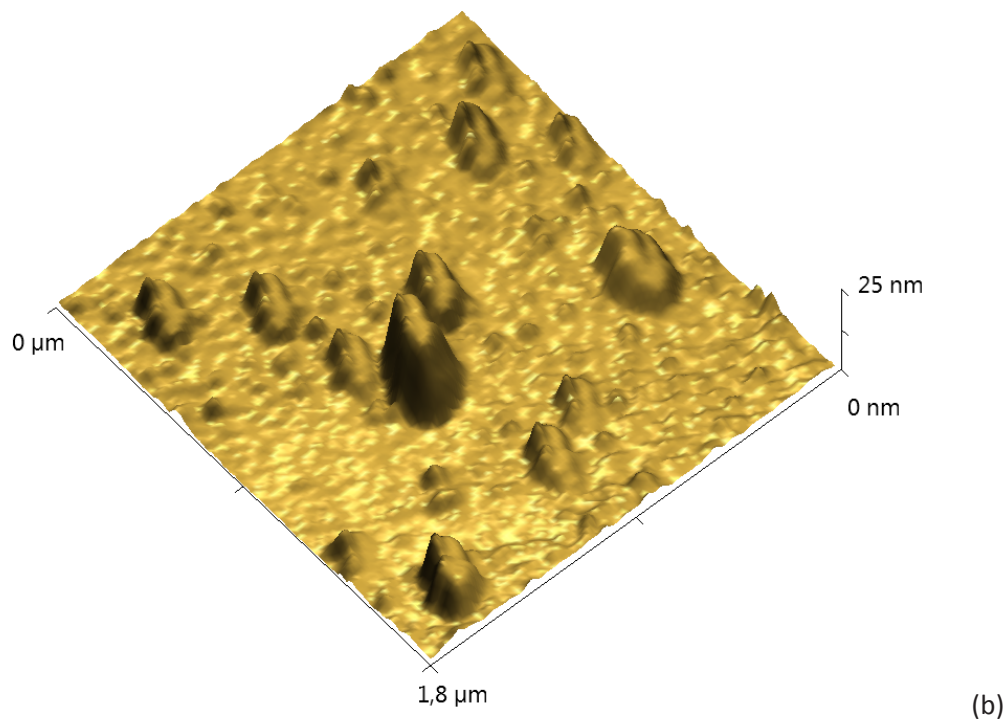
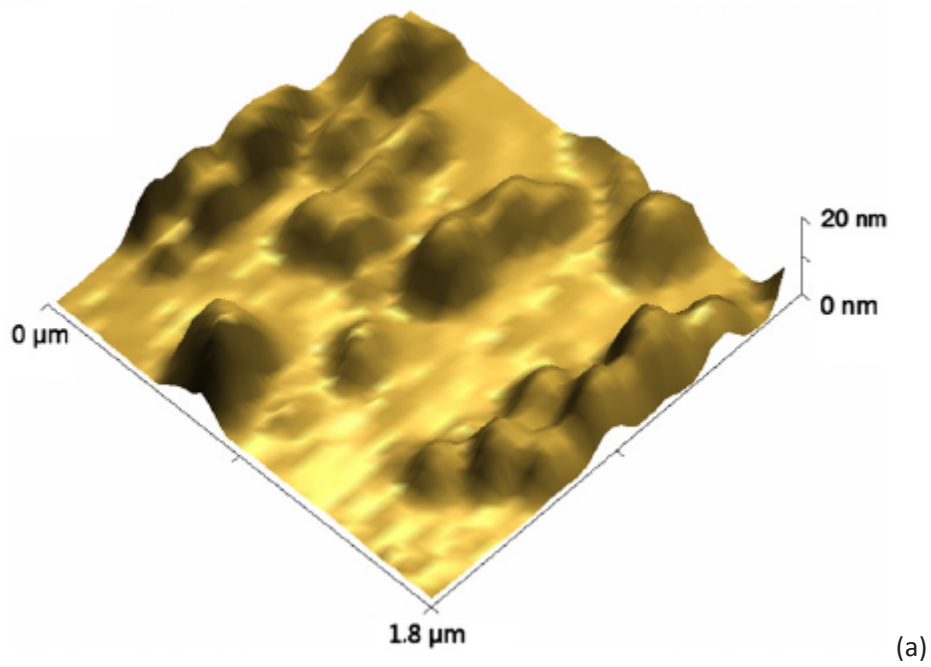


Fig. 6 High resolution AFM topographic image of the Immobilized IgG on (a) carboxylated surface and (b) amino-silanized surface.

4.3 Immobilized antibodies orientation; an immune-enzymatic assay

To obtain a functional immuno-sensor, it is of paramount importance to verify the orientation and thereby the biological activity of immobilized antibodies. Indeed, the antibodies attachment process (EDC/SNHS) could lead to their random orientation and lowering the antigen binding capacity of the biosensor surface. Thus, antibodies orientation and the antigen binding capacity of model mouse IgG were investigated on the two types of silanized surface (1 cm²); 7-octenyltrichlorosilane and (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES). The accessibility of antibodies fragments (Fab), involved in the recognition process has been evaluated and comparison has been made between the two types of surfaces. Model IgG grafted on silanized surfaces were tested for their ability to bind Fab antibodies labeled with Horse Radish Peroxydase (HRP). The whole immunoassay has been performed following the procedure depicted in Fig. 2. In the first step, the IgG were grafted on the silanized surfaces. Then, specific anti-Fab-hrp antibodies were allowed to react with immobilized IgG. After washing, the hrp substrate was added and the colorimetric signal obtained from the hrp enzymatic reaction was measured. This measurement leads to the determination of the quantity of bound Anti-Fab-hrp and Fab binding sites. Fig. 7 presents calibration curves obtained with surfaces where three concentrations of IgG were tested.

Affinity of the Antibody directed against Fab fragment

We have first studied the affinity of the Fab antibody on both surfaces. The observed affinity constant (K_D) was similar on the two types of surfaces ($1.5 \cdot 10^{-8}M$ and $1.3 \cdot 10^{-8}M$ respectively). We can therefore observe from these results that when model IgG were grafted on these two types of hydrophilic surfaces, they exhibit the same behavior towards antibodies directed against their Fab fragment.

Performance of the immunoassay

To validate the potential of this immunoassay on the two types of surfaces, the sensitivity and the domain of linearity of the signal were performed using calibrations curves.

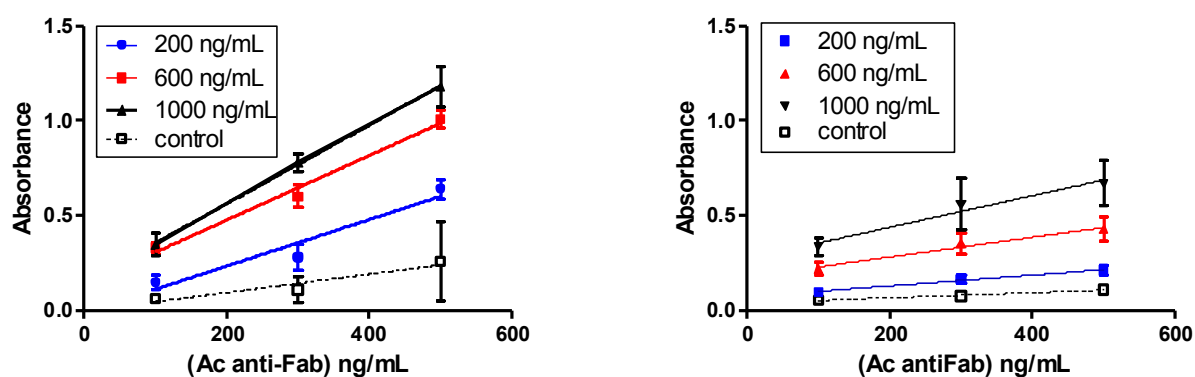


Fig. 7. Calibration curve of antibodies directed against Fab portions on (a) amino-silanzed surface and (b) carboxylated surface. Three concentrations of immobilized antibodies were tested (200 ng/mL; 600 ng/mL; 1000 ng/mL). Three anti Fab concentrations (100 ng/mL; 300 ng/mL; 500 ng/mL) were evaluated.

The limit of detection (LOD) has been chosen to be three standard deviations above the background (in the absence of anti Fab). The LOD, for the immobilized IgG at concentration 1000 ng/mL, was estimated around 21,4 ng/mL and 180 ng/mL for amino-silanzed surface and carboxylic-silanzed surfaces respectively. The LOD for APTES is 8 times lower than the one estimated for the carboxylic surface. These results indicated a higher sensitivity for the APTES surfaces for anti Fab detection. These results are encouraging as regards the use of silanzed surface with APTES for efficient capture.

In the concentration range studied, a linear response has been achieved with a correlation coefficient of 0.93; 0.98 and 0,99 for 200; 600; 1000 ng/mL respectively on the amino-silanzed surfaces, and 0,99, 0,99 and 0,96 for 200; 600; 1000 ng/mL respectively on the carboxylic surfaces.

The erros bars indicate the relative standard deviation (RSD, n = 3) wich can be around 14%, and we also observed unsatisfactory correlation coefficient at 200 ng/mL on APTES surfaces. These values can be explained by the enzymatic detection which is drastically dependant on temperature variation and on sample incubation time.

Influence of the surface chemistry on the target capture capacity

The capture efficiency is a key element for the sensitivity of an immune-sensing platform. Therefore, we investigated the capture capacity of the IgG when immobilized at two concentration 600 ng/mL and 1000 ng/mL on both types of surfaces.

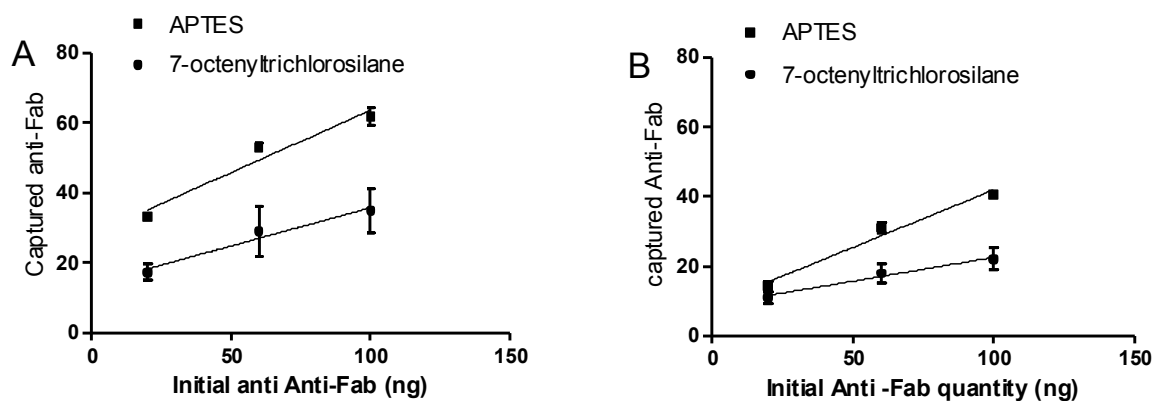


Fig.8 : Capture capacity of immobilized IgG on amino-silanized surface and carboxyl-silanized surface at two concentrations (A) 1000 ng/mL, (B) 600 ng/mL. Three Initial quantity (20 ng; 60 ng and 100 ng) were evaluated.

We can observed from figure 8 that the capture efficiency is higher using APTES as compared to 7-octenyltrichlorosilane in both concentration of immobilized IgG. Overall results suggest a higher binding capacity for APTES sorbent. Indeed, in the same experimental conditions when the concentration of immobilized IgG was 1000 ng/mL and the initial quantity of Fab was 100 ng, the quantity of estimated anti-Fab captured were 61,8 ng/cm² for amino surfaces and 34,7 ng/cm² for carboxylic surfaces. At the immobilization concentration of 600 ng/mL for IgG and with an anti-Fab initial quantity of 100 ng, we estimated that 40,7 ng of anti-Fab/cm² bounded the amino surface whereas 22,1 ng/cm² of anti-Fab/cm² interacted with the IgG immobilized on the carboxylic surfaces. Two phenomenons related to the previous AFM studies could explained these results. First, the possible IgG aggregation suggested by AFM in the carboxylic surface could lower the number of Fab sites available for the antigen capture. In addition, the APTES surface exhibit a lower IgG density that should limit steric hindrance and thus favor immune recognition by anti-Fab antibodies.

Conclusion

In the present study, two types of silanized surfaces have been compared. Both surfaces have been extensively characterized by XPS and AFM. Surface chemistry confirmed the presence of carboxylic group in 7-octenyltrichlorosilane surface and amino group in APTES surface. The AFM topographic measurement evidenced that both silanized surfaces were roughly homogeneous. After the grafting of the mouse model IgG, AFM studies showed a controlled surface distribution with roughly a reduced antibodies spacing. The APTES surface was slightly more homogeneous than the carboxylated surface. This could be due to a trace aggregation process on carboxylic silanized

surface, decreasing thereby the amount of antigen binding sites. Therefore, immunoassays were performed in order to evaluate the antigen binding capacity of the IgG immobilized on both surfaces by using antibodies directed against Fab fragment. The results demonstrated that the sensitivity of the detection was higher using functionalized surfaces with APTES. In addition, the evaluation of the capture efficiency of the two immunosorbents, showed a higher antigen binding capacity for the APTES surface. These results demonstrate that silanized surfaces provide a tunable immunoassay platform for further development into immunosensing applications.

Acknowledgments

References

Chen S.F., Liu L.Y., Zhou J., Jiang S.Y., 2003, *Langmuir*, 19 (7) 2859-2864.

Elissa H. Williams, Albert V. Davydov, Abhishek Motayed, Siddarth G. Sundaresan, Peter Bocchin, Lee J. Richter, Gheorghe Stan, Kristen Steffens, Rebecca Zangmeister, John A. Schreifels, Mulpuri V. Rao, *Applied Surface Science* 258 (2012) 6056– 6063.

¹ Engel, A. & Muller, D.J. (2000) *Nat. Struct. Biol.* 7, 715–718.

Garcia, R. & San Paulo, A. (2000). *Phys. Rev. B*, 61, R13381–R13384.

Haller I. J. *AM. Chem. Soc.*, 1978, 100, 8050.

Kim J., Cho J., Seidler P.M., Kurland N.E., Yadavalli V.K., *Langmuir.*, 2010, **26**, 2599.

MacBeath G., Schreiber S.L., *Science*, 2009, **289**, 1760.

Moussa S.G., Stern A.C., Raff J.D., Dilbeck C.W., Tobias D.J., Finlayson-Pitts B.J., *Phy. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 448.

Pei Z., Anderson H., Myrskog A., Dunner G., Ingemarsson B., Astrup T., *Anal. Biochem.* 2010, 398, 161.

¹ Peluso, P., Wilson, D., DO, D., Tran, H., Venkatasubbaiah, M., Quincy, D., Heidecker, B., Poindexter, K., Tolani, N., Phelan, M., Witte, K., Jung, L., Wagner, P., Nock, S., 2003. *Analytical Biochemistry* 312, 113–124.

Popat, K.,C., Johnson, R.,W., Desai, T., A., 2002. *Surf. & Coatings Techno.*154, 253-261.

Ritter H., Brülwiler D., *J. Phys. Chem. C.*, 2009, **113**, 10667.

Roy S., Dixit C.K., Wolley R., MacCraith B.D., O’Kennedy R., McDonagh C., *Langmuir.*, 2010, 26, 18125.

Rusmini F., Zhong Z., Feijen J., *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 1775.

Tan H.Y., Liu M., Nolting B., Go J.G., Gervay-Hague J., Liu G.Y., 2008. *ACS. Nano* 11, 2374-2384.

Xu H., Lu J. R., Williams D.E., 2006, *J. Phys. Chem. B.*, 110 (4) 1907-1914.

5-2 Résultats-discussion

Les expériences de caractérisation extensive menées par XPS, ont confirmé la présence de groupement carboxylique pour le 7-octenytrichlorosilane et de $-NH_2$ pour l'APTES.

La mesure de la rugosité de ces surfaces silanisées par AFM, a montré que les surfaces silanisées par le 7-octenyltrichlorosilanes présentaient une rugosité supérieure à celle des plaques silanisées par l'APTES (0.69 et 0.32 nm respectivement). Ces résultats sont similaires à d'autres travaux où les deux types de silanes ont été greffés sur des surfaces de silicium dans les mêmes conditions [Kim10], [Mat08], [Mou13]. Ensuite, les anticorps de souris ont été immobilisés sur les deux types de plaques silanisées. Les études topographiques menées par AFM ont mis en évidence sur ces deux types de plaques une augmentation de l'épaisseur de la plaque de silicium silanisée liée au greffage des IgG. Ces mesures ont montré que les plaques $-COOH/IgG$ ont une rugosité de 2,8 nm, alors que celle des plaques $-NH_2/IgG$ est de 1,05 nm. Ceci témoigne d'une répartition homogène des anticorps sur les plaques APTES et l'absence d'agregats. Dans la dernière partie de cette étude, nous avons évalué l'activité biologique des anticorps immobilisés. Pour cela, trois concentrations d'anticorps ont été employées pour l'immobilisation (200 ; 600 ; 1000 ng/mL). Une fois l'immobilisation des premiers anticorps effectués, après plusieurs rinçages, nous avons ajouté un deuxième anticorps anti Fab. Trois concentrations d'anticorps anti Fab ; 100, 300 et 500 ng/mL ont été testées. Ceci a permis d'estimer la quantité d'anticorps anti-Fab interagissant avec les IgG immobilisés et donc la capacité de capture de ces supports immunologiques. Les résultats obtenus montrent que les études de linéarité montrent des coefficients de régression dans l'ensemble satisfaisant pour les deux plaques. Cependant, nous avons observé des écart-type parfois important (autours de 14% de la réponse moyenne) et des coefficients de régression de l'ordre de 0.95. Ceci peut être expliqué par le fait que le mode de détection enzymatique, qui est sensible à de très faibles variations de température et de temps d'incubation.

En terme de signal, nous constatons pour les deux types de plaques, qu'un accroissement de la concentration d'IgG immobilisée conduit à une augmentation de la réponse. Cependant, il est à noter que la réponse est plus sensible sur les plaques de silicium silanisées par l'APTES, comme en témoigne la valeur des pentes.

Au niveau des plaques APTES, la pente est plus importante, ce qui correspond à une réponse plus sensible des plaques de silicium silanisées par l'APTES par comparaison avec les plaques fonctionnalisées avec le 7-octenyltrichlorosilane.

Nous avons ensuite évalué l'efficacité de capture des anticorps immobilisés sur ces surfaces. Nous avons constaté que lorsque les IgG sont immobilisées sur les surfaces silanisées APTES, la capacité de capture est plus élevée ce qui peut conduire à terme, au développement d'un capteur de meilleure sensibilité. Ceci peut être dû soit à une meilleure densité de greffage et/ou une meilleure orientation des anticorps. Ces résultats concernant l'immunocapture, peuvent être corrélés avec les données résultant des études menées par AFM. Une épaisseur plus importante des plaques silanisées par le 7-octenyltrichlorosilane sur lesquelles les IgG ont été greffées peut être liée à une tendance des IgG à s'agréger sur ces surfaces. Cette agrégation des anticorps va conduire à une diminution des sites Fab disponibles ce qui peut expliquer ces différences. En revanche, sur les plaques silanisées APTES, une répartition homogène et moins dense des anticorps peut conduire à un nombre plus grand de sites Fab accessibles par réduction des problèmes d'encombrements stériques.

En conclusion, nous avons réalisé deux types de plaques silanisées, présentant à leur surface des groupements carboxyliques et aminés respectivement. La présence des groupements carboxyliques et aminés est attestée par les études XPS. Les études AFM ont montré que les surfaces silanisées par APTES présentaient une meilleure homogénéité avant et après greffage des IgG. Cela semble avoir un impact sur l'orientation et/ou le taux de greffage des IgG immobilisés par la méthode EDC/S-NHS, car l'efficacité de capture est meilleure à concentration d'IgG et d'anticorps Fab égales pour l'APTES.

Chapitre 6

Etude de la stabilité des plaques silanisées par l'APTES

6-1 Introduction

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la stabilité de la plaque après silanisation par l'APTES. En effet, celui-ci est un revêtement très utilisé pour le développement d'outils miniaturisés. Il est généralement admis, que la formation de la couche d'APTES débute par l'hydrolyse du groupement ethoxy, conduisant à la formation de silanols (figure 43). Ces groupements silanols présents au niveau des silanes vont se condenser avec les silanols déjà présents à la surface du silicium pour former une monocouche d'APTES par l'intermédiaire d'un réseau de liaisons siloxanes latérales ou le groupement NH_2 sera orienté du côté opposé à la surface de silicium. La présence de ce groupement aminé à l'extrémité d'une mono-couche permet de greffer une grande variété de biomolécules, ce qui est très utile pour un grand nombre de dispositifs bio-médicaux notamment, car il offre la possibilité d'immobiliser de manière contrôlée des bio-récepteurs comme les protéines ou les acides nucléiques [Moo93], [Mac00], [Did12], [Fou12]. En effet, le contrôle de l'immobilisation des anticorps sur des supports solides est l'objet d'un grand nombre de recherche, du fait des applications potentielles, dans la fabrication d'outils de diagnostic miniaturisés basés notamment sur des immuno-essais. Dans ce contexte, l'immobilisation des biomolécules implique une stabilité chimique et physique et par conséquent une conservation de leur activité biologique une fois immobilisées sur le support solide. Des auteurs ont montré, une légère diminution, au cours du temps, de la capacité de bio-reconnaissance d'anticorps immobilisés sur des surfaces silanisées par l'APTES [Kim10].

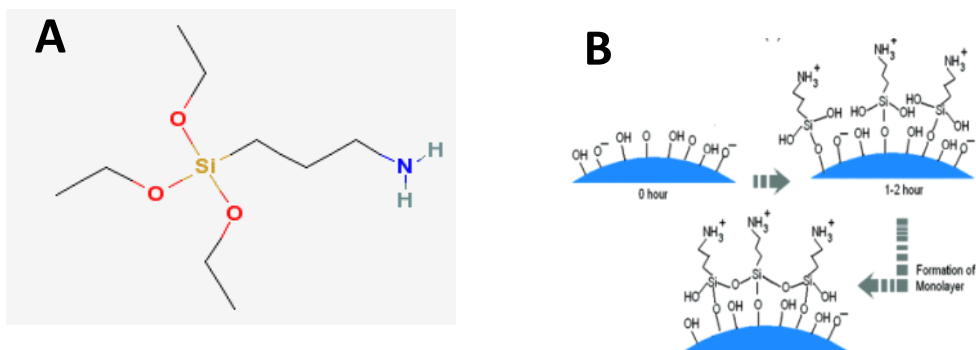


Figure 43 : (A) Formule semi-développée de l'APTES, (B) Dépôt de l'APTES sur une plaque de silicium.

Au cours de nos expériences, nous avons constaté que le délai entre la fin du processus de silanisation de la plaque de silicium par l'APTES et l'immobilisation des anticorps sur ces surfaces était un paramètre important pour la reproductibilité de l'activité biologique des anticorps immobilisés. En effet, plus le délai était important, plus la diminution de la capacité de capture de l'anticorps immobilisé était importante. Par conséquent, nous nous sommes intéressés à l'étude de la stabilité du silane au cours du temps. Celle-ci a été corrélée avec l'activité biologique des anticorps immobilisés par la méthode EDC/S-NHS sur le support solide.

Dans un premier temps, une étude de la stabilité du revêtement a donc été réalisée par infra-rouge à transformé de Fourier (FTIR). C'est une technique auxquelles de nombreux auteurs ont eu recours pour identifier les différentes espèces chimiques présentes sur la surface fonctionnalisée par l'APTES [Kim09], [Kim10], [Roy10]. Nous avons donc effectué des mesures de spectroscopie infra-rouge sur une plaque de silicium silanisée par l'APTES, à des temps variable allant de 5 minutes à 48h. Parallèlement, nous avons évalué la capacité de capture de l'IgG immobilisé par immunoessais réalisés à l'aide d'anticorps anti-Fab en respectant les mêmes délais.

6-2 Résultats-discussion

6-2-1 Caractérisation des amino-silanes

Dans la première partie de nos travaux, nous avons réalisé une première expérience comparant une plaque de silicium silanisé avec une plaque de silicium vierge, afin d'identifier le groupement aminé sur le spectre FTIR enregistré. Cependant, les échantillons analysés ont une surface complexe lié aux chaînes carbonées présentent au niveau des mono-couches auto-assemblées. Ceci implique un environnement chimique ayant une influence importante sur les groupements de surface que l'on souhaite mettre en évidence. Cela s'explique par la très forte proportion de silicium/silice par rapport à celle des groupements greffés par la fonctionnalisation de surface. Cet environnement induit donc des réponses différentes de celles trouvées dans les bases classiques de spectroscopie infra-rouge. C'est pourquoi, nous avons au préalable mené une étude bibliographique permettant de situer sur les spectres les réponses attendues suivant la silanisation effectuée. Ainsi, nous avons choisi de réaliser ces expériences pour le suivi du groupement NH_2 aux nombres d'ondes suivants, 3373, 3310 et

1597 cm^{-1} préconisés par de nombreux auteurs [Kim09], [MaB00]. Nous avons ainsi pu mettre en évidence la présence de groupement $-\text{NH}_2$ à la surface de ce support (figure 48).

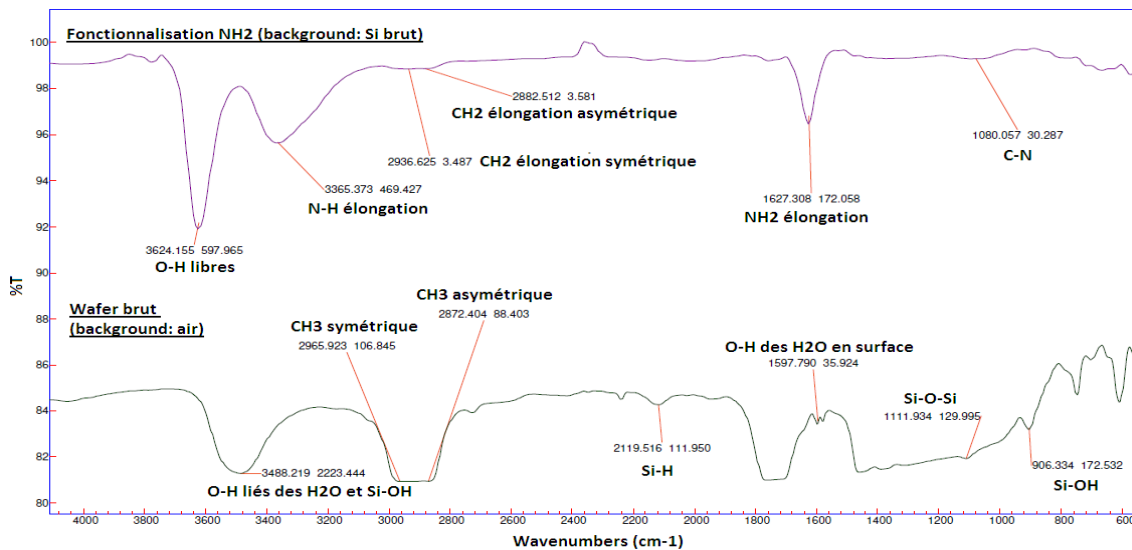


Figure 44: Spectre FTIR notifiant le nombre d'onde et l'air des pics de wafers brut et silanisé NH_2

Le spectre infra-rouge du silicium brut (Figure 44), n'ayant subi aucun traitement préalable et dont on s'est servi pour préparer nos échantillons, a présenté les pics caractéristiques de cette surface, soit ceux des Si-O-Si à 1111 cm^{-1} et des Si-OH à 905 et 3488 cm^{-1} . Le pic à 2118 cm^{-1} lié à la liaison Si-H montre une surface de silicium pas entièrement oxydée ce qui est acceptable puisqu'il s'agit d'une oxydation native par l'air uniquement. De plus, la présence d'eau en surface, indispensable à la réactivité du wafer, est bien représentée par les pics caractéristiques des liaisons O-H à 1599 et 3488 cm^{-1} . Cependant, on peut également déduire qu'il y a eu une contamination par le carbone grâce aux pics caractéristiques des groupements CH_3 à 2873 et 2964 cm^{-1} . Cette contamination peut être due à l'usinage des plaques de silicium qui ont été coupées à la bonne dimension à l'aide d'une scie en diamant (constitué de carbone).

Une fois la silanisation avec l'APTES effectuée (fonctionnalisation NH_2), on a constaté que le spectre de l'échantillon (Figure ci-dessus), présentait les pics caractéristiques des liaisons des groupements amines ; des liaisons N-H à 3366 cm^{-1} et NH_2 à 1628 cm^{-1} . Nous avons également remarqué, la présence d'un mode de vibration propre aux liaisons O-H libres à 3624 cm^{-1} . Cependant, cette réponse est différente de celle observée sur le spectre du wafer brut car il s'agit de molécules d'eau éparses restées en surface du wafer. Cela implique que la surface du wafer continue à être réactive et, de ce fait, continue à hydrolyser les silanes greffés.

6-2-2 Etude de la stabilité de ces échantillons par FTIR

Comme évoqué précédemment, la conservation des échantillons suite à leur fonctionnalisation chimique est primordiale, notamment pour l'étude de la fonctionnalisation biologique nous oblige donc à mettre en place une gestion contrôlée du temps entre ces deux fonctionnalisations. Nous avons donc poursuivi par l'étude des conditions de stockage des échantillons et de leur vieillissement.

Etude de stockage après silanisation

Dans le but d'optimiser les conditions de stockage des plaques de silicium préparées chimiquement, nous avons comparé différents milieux de stockage. Ceci afin de déterminer le milieu le plus adapté pour conserver les groupements fonctionnels -NH_2 . Ainsi, nous avons comparé trois conditions de stockages différentes ; (i) air, (ii) eau, (iii) acétone (Figure 45).

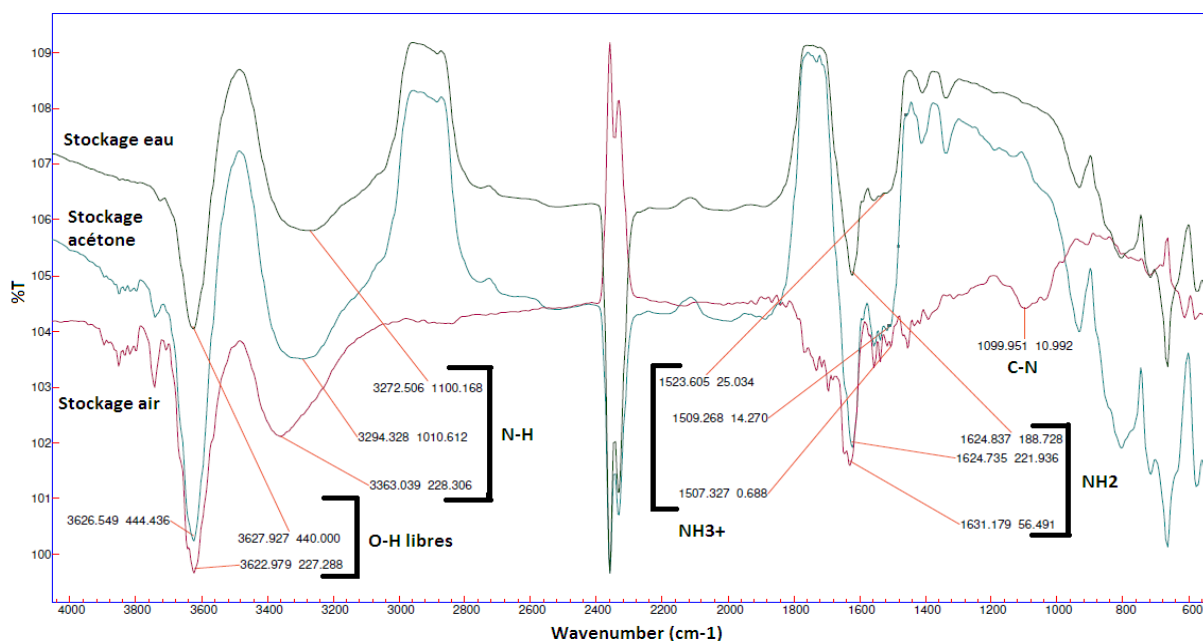


Figure 45 : Spectre FTIR notifiant le nombre d'onde et l'air des pics de wafers silanisés NH_2 puis stockés dans différents milieux.

Nous avons ainsi constaté que chacun des milieux apporte des résultats différents. Dans un premier temps, nous pouvons remarquer l'apparition de groupements NH_3^+ pour chacun des différents stockages. Cette protonation des groupements amines situés à la surface de silicium, peut être liée à l'hydrolyse des molécules d'eau présentes à la surface. Ensuite, nous observons des réponses plus ou moins intenses selon le stockage des groupements d'intérêts tel que les groupements NH_2 et les liaisons N-H. Une différence probante a été mise en évidence en comparant les spectres car en transmission, plus la transmittance est basse, plus l'absorption est forte et donc plus la présence des groupements est intense. De cette

manière, nous pouvons en déduire que le stockage à l'air le plus efficace car il a conservé le mieux les amines (avec un taux d'humidité ne dépassant pas les 40%).

Etude de stabilité des échantillons silanisés : caractérisation physico-chimique et biologique.

Nous nous sommes ensuite intéressés au temps de conservation de ces échantillons à l'air. Des études précédentes ont été menées par spectroscopie XPS pour la fonctionnalisation d'acides carboxyliques montrant un vieillissement sans dégradation de la surface jusqu'à environ 15 jours. Nous avons alors étudié le vieillissement des wafers fonctionnalisés à l'aide de l'aminosilane. Pour cela, des mesures par spectroscopie infra-rouge ont été effectuées à des durées de stockage précises, soient après 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 minutes de stockage puis tous les quart d'heures jusqu'à 2 heures, toutes les heures jusqu'à 8 heures et enfin toutes les 5 à 10 heures de 24 jusqu'à 48 heures de stockage. La mise en évidence de la dégradation des groupements amines est faite en étudiant l'évolution de l'aire des pics correspondant aux liaisons N-H et aux groupements NH₂ qui sont aux alentours de 3300 cm⁻¹ et 1630 cm⁻¹ respectivement (Figure 46).

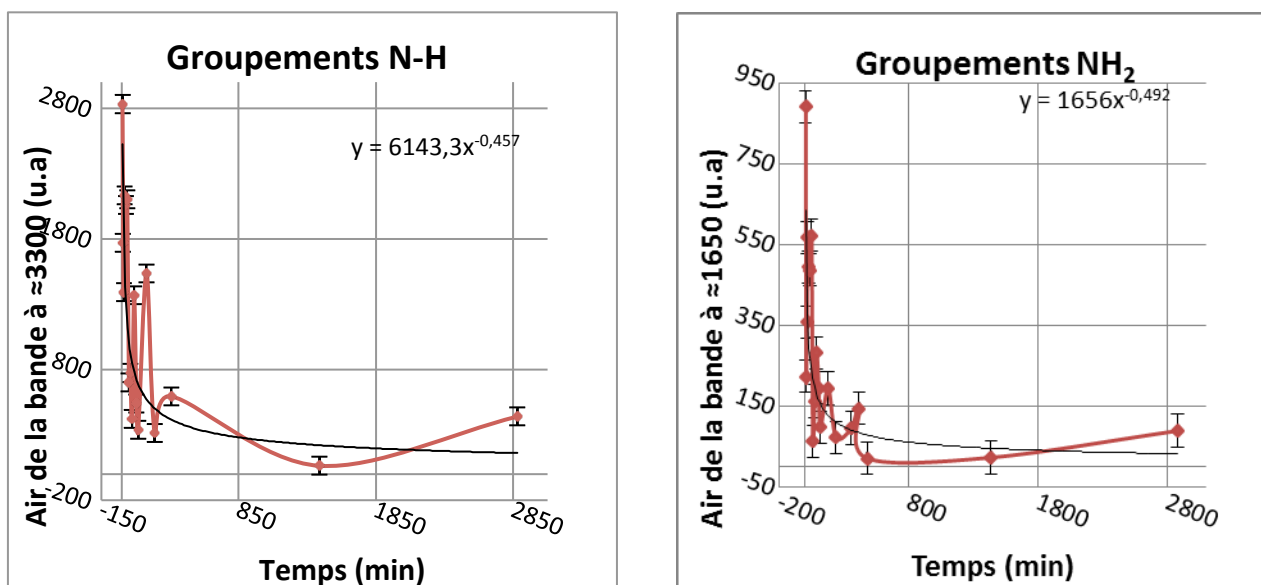


Figure 46: Evolution de l'aire des pics NH et NH₂ en fonction du temps.

Les résultats de cette étude de vieillissement montrent une diminution notable au niveau de l'aire des pics liés aux groupements amines et plus précisément au bout de deux heures suivant le début de stockage à l'air des wafers. Cette dégradation pourrait être causée par les résidus d'eau en surface des wafers mis en évidence dans la partie III-1.1. En effet, les

molécules d'eau peuvent hydrolyser les groupements amines les rendant alors inaccessibles aux anticorps pour le greffage biologique.

6-2-3 Etude de la stabilité de ces échantillons par immuno-essai

Pour évaluer l'influence de cette altération du revêtement, sur l'immobilisation des anticorps, nous avons greffé des IgG modèles de souris, à la concentration de 600 ng/mL, à des temps variables après silanisation, à la surface de ces plaques de silicium. Nous avons ensuite vérifié leur activité biologique. Pour cela, nous avons testé leur capacité à interagir avec des anticorps dirigés contre le fragment Fab par un immuno-essai enzymatique (500 ng/mL) (cf Partie expérimentale, chapitre 1). Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 47. Les temps étudiés étaient ; 20, 30, 60 minutes, 2h, 3h, 12h, 24h, 48h. Les résultats obtenus sont représentés ci-dessous.

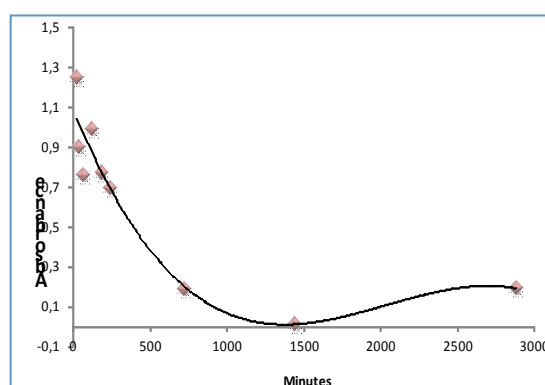


Figure 47: Evolution de la capacité de capture d'IgG immobilisés (600 ng/mL), d'anticorps anti-Fab (500 ng/mL) à des temps variables.

Ainsi, nous constatons une diminution significative du signal, lorsque les anticorps sont immobilisés une heure après la silanisation. Ceci est dû à une altération de la capture des anticorps anti-Fab par des anticorps immobilisés sur le support par comparaison avec plaques fonctionnalisées ou les anticorps sont immobilisés immédiatement après silanisation. Lorsque le greffage est réalisé 12h (750 min) après la silanisation, nous avons un signal résiduel, qui disparaît totalement 24h après silanisation. Aussi, ces immuno-essais sont en parfaite corrélation avec les expériences menées par FTIR ; lorsque les groupements NH_2 ne sont plus détectés par FTIR, nous constatons parallèlement une absence de la capture des anticorps anti-Fab, par ces supports immunologiques. Ces résultats peuvent s'expliquer par une altération du silane, constatée par les études FTIR, qui empêcherait l'immobilisation covalente des

anticorps. Ceci conduirait à la diminution significative du nombre d'anticorps immobilisés entraînant ainsi une très faible capture des anticorps anti-Fab au niveau de ce support solide. On ne peut cependant, pas totalement exclure un phénomène d'adsorption des Ig sur ces supports. En effet, des études préliminaires réalisées au laboratoire ont montré que lorsque ces anticorps étaient physisorbés sur une plaque de silicium vierge, celle-ci présentait une diminution partielle, mais non totale, de la capacité de capture, par rapport à une plaque de silicium fonctionnalisée par l'APTES (communication personnelle). Ces résultats sur le silicium non fonctionnalisé sont en accord avec d'autres études qui ont montré par réflectométrie neutronique et interférométrie que lorsque qu'un anticorps, dirigé contre la PSA, marqueur du cancer de la prostate est adsorbé sur une surface d'oxyde de silicium (couverture de surface $2\text{mg}/\text{m}^2$), celui-ci adoptait une orientation « flat-on » c'est-à-dire allongé permettant une interaction avec le PSA [Zha11] (Figure 48).

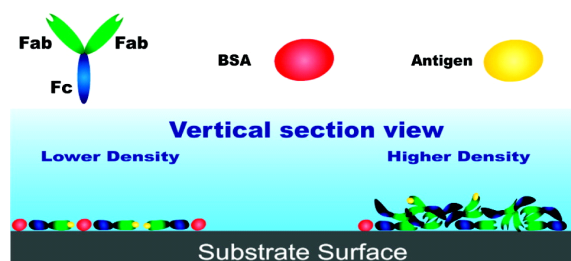


Figure 48: Représentation schématique des anticorps adsorbés sur une surface de silicium [Zha11].

D'autres travaux effectués sur des micro-balances à cristal de quartz, portant sur l'orientation des anticorps sur des mono-couches auto-assemblées composées de 1-dodécane-thiol (hydrophobes) suggèrent également une tendance des anticorps à adopter une conformation de type « flat-on », c'est-à-dire allongé (cf chapitre 1). Cependant, l'hypothèse proposée dans cette étude est que cette orientation est conditionnée par la quantité d'anticorps immobilisés. Ainsi, une quantité plus élevée d'anticorps favoriserait une transition vers une orientation plus favorable à la capture antigénique pour une partie des anticorps, avec une couverture de surface de $468\text{ ng}/\text{cm}^2$ [Wis11]. En revanche, à faible concentration d'anticorps, une faible couverture de surface $100\text{ ng}/\text{cm}^2$ a été constatée, avec une orientation des anticorps peu favorable à la reconnaissance antigénique. En ce qui concerne nos travaux, dans nos conditions expérimentales la couverture de surface est inférieure à $120\text{ ng}/\text{cm}^2$. Cependant, il est difficile d'établir une comparaison avec les travaux mentionnés ci-dessus, dans la mesure où nous avons évalué, la reconnaissance biologique par un immuno-essai enzymatique, alors que dans l'expérience de Wiseman et ses collaborateurs la capacité de capture antigénique a

été mesurée par micro-balance à cristal de quartz. De plus, nous ne sommes pas placés dans des conditions de saturation de nos plaques de silicium fonctionnalisées.

L'autre explication qui peut être avancée, est qu'une fois ces IgG de capture sont physisorbés sur ces plaques de silicium, cela pourrait avoir comme conséquence une modification de la conformation de l'anticorps responsable d'une perte de son activité biologique. Il a en effet été démontré récemment, que l'immobilisation des anticorps sur des surfaces silanisées hydrophobes et hydrophiles pouvait entraîner une modification de la conformation spatiale. Des études de dichroïsme circulaire ont ainsi mises en évidence une diminution au niveau du nombre de feuillets β lorsque les anticorps étaient immobilisés sur des surfaces fonctionnalisés par des silanes ; (i) de nature hydrophobes telles que le trichloro(méthyl)silane, ou le trichloro(dodécyl)silane, (ii) hydrophile comme le (3 aminopropyl)triméthoxysilane est observé. Ceci peut conduire à terme à une dégradation de la capacité de capture de l'anticorps [Cou12].

En ce qui concerne nos plaques de silicium, les mesures d'angle de contact effectuée immédiatement après silanisation par l'APTES ont montré que la surface était globalement hydrophile. La diminution de l'intensité du pic correspondant au groupement $-NH_2$ constaté, au cours du vieillissement de la plaque silanisée par l'APTES, ne s'accompagne pas d'une variation significative du degré d'hydrophilie. Ceci pourrait être expliqué par la formation de groupement NH_3^+ , qui expliquerait la diminution de l'intensité des pics mise en évidence par les études FTIR. Cependant, une augmentation du nombre de ces groupements serait plutôt en faveur d'un greffage des anticorps sur les plaques de silicium, ce qui est en contradiction avec les résultats obtenus au cours des immuno-essais. Une autre hypothèse est que même si la surface est globalement hydrophile, on ne peut pas exclure la formation de sites hydrophobes au niveau de la plaque altérée et donc une possibilité d'interactions hydrophobes. Cependant, à l'heure actuelle, il nous est difficile de conclure par rapport à toutes les hypothèses proposées.

En effet, des expériences complémentaires sont à effectuer. En premier lieu, des expériences devront être menées pour attester si après altération complète du silane, les IgG sont susceptibles d'être immobilisés sur ces supports solides. Pour répondre à cette question, il faudrait, par exemple, effectuer des expériences permettant la mesure de l'épaisseur de la plaque de silicium après sa mise en contact avec des IgG, telles que l'AFM ou l'ellipsométrie. Nous avons également tenté de quantifier le taux d'anticorps surnageant après l'étape de greffage, mais cela n'a pas été possible sur le plan technique. Cependant, s'il est avéré que des

anticorps se fixent dessus, des manipulations supplémentaires permettant de vérifier la conformation de ces anticorps pourraient être effectuées notamment par dichroïsme circulaire.

En conclusion, les résultats de l'analyse des différents paramètres par spectroscopie infra-rouge ont permis de caractériser les échantillons produits mais aussi d'optimiser leurs conditions de conservation jouant sur le milieu de stockage d'une part et la durée stockage d'autre part. De plus, nous avons montré que ce revêtement ne présentait pas une grande stabilité dans l'air ambiant et qu'il nous faudrait par la suite privilégier un stockage dans une atmosphère confinée. Cette absence de stabilité se reflète parfaitement sur la capacité de cette surface à lier un antigène. En revanche, nous n'avons pu expliquer quel était le mécanisme qui conduisait à cette absence d'interaction avec les sites antigéniques de l'anticorps immobilisé.

Conclusion et perspectives

Avant d'introduire des perspectives pour les travaux futurs, nous ferons un résumé des principaux points traités et des résultats obtenus pendant cette thèse.

Conclusion générale

L'objectif de ce travail était de développer une plate-forme immunologique, constituée de silicium silanisé pouvant être adaptée à différents types de biocapteurs dont le développement repose sur l'utilisation de silicium. Mon travail de thèse a porté sur la caractérisation de la fonctionnalisation chimique de la surface de silicium, par XPS, AFM, angle de contact et FTIR et d'évaluer son influence sur le greffage des anticorps.

- Dans un premier temps, nous avons utilisé le 7-octenyltrichlorosilane pour obtenir une surface présentant des groupements carboxyliques disponibles pour le greffage d'anticorps. Les études par XPS et FTIR ont permis de confirmer la présence de COOH à la surface de ces plaques de silicium silanisées. De plus, les images topographiques réalisées par AFM montrent que les surfaces étaient homogènes après silanisation et oxydation. Après greffage d'IgG de souris en utilisant la méthode EDC/S-NHS, la rugosité de la surface est faible montrant que l'immobilisation est homogène. Les immuno-essais réalisés à l'aide d'anticorps anti-Fab ont démontré un lien entre la concentration d'IgG de souris immobilisées à la surface de l'échantillon de silicium fonctionnalisé et la concentration d'IgG de souris anti-Fab capturés. Plus la concentration employée pour immobiliser les IgG est importante, plus il y a d'anticorps anti-Fab capturés. La saturation de la réponse nous a permis de déterminer qu'elle était la capacité de capture de cette plaque de silicium silanisée. Les résultats obtenus par microscopie à fluorescence (par FITC) confirment l'accessibilité des sites Fab des anticorps immobilisés. Nous avons donc réalisé ensuite un immunoessai de type sandwich (Ac anti $\alpha\beta$ 1-42/A β 1-42/Ac anti-A β 1-42/Ac anti Cy5) dédié à la détection des peptides amyloïdes. Nous avons pu mettre en évidence la formation de complexes immuns de type sandwich lorsque les anticorps anti-A β amyloïdes sont immobilisés sur la surface silanisée. En revanche, en l'absence d'anticorps immobilisé, il n'y a pas de formations de complexes

immuns. Nous avons constaté que même si une réponse linéaire était obtenue aux faibles concentrations, nous avons observé pour certaines concentrations à certaines un écart type important, probablement lié à l'oligomérisation des peptides amyloïdes.

- Pour optimiser l'immobilisation des anticorps, nous avons étudié le greffage des IgG à différents pH. Les résultats des immuno-essais montrent qu'à pH acide (3.5) il y a une augmentation des sites Fab. Cependant, d'autres expériences menées au laboratoire ont montré une augmentation parallèle du nombre de sites Fc. Ceci peut s'interpréter comme une augmentation globale du greffage des anticorps en milieu acide. Il est donc difficile de conclure en ce qui concerne l'impact d'une immobilisation à pH sur l'orientation des anticorps. De plus, d'autres travaux ont montré qu'un pH acide pouvait altérer les silanes. Aussi, une immobilisation en pH acide, n'est peut être pas un bon choix sur le plan expérimental.

- Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés au (3-aminopropyl)triéthoxysilane (APTES) afin d'obtenir une surface avec des groupements amines disponible pour l'immobilisation des protéines. Les études microscopiques menées par AFM ont montré que la surface était homogène. Parallèlement, les spectres XPS et FTIR ont confirmé la présence des groupements amines. Par comparaison avec OTS, l'APTES présente l'avantage de permettre une silanisation en une seule étape (OTS nécessite deux étapes : silanisation 24h et oxydation 12h). Après immobilisation des anticorps, les images topographiques montrent que qu'une rugosité d de plaque $-NH_2/IgG$ est de l'ordre de 1,05 nm –alors qu'elle est de 2,8 nm pour les plaques $-COOH/IgG$. Ceci témoigne d'une répartition plus homogène des anticorps sur les plaques silanisées par l'APTES et l'absence d'agregats. Aussi, les conditions de greffage semblent plus favorable dans sur des plaques APTES.

- Les immuno-essais réalisés à l'aide d'anticorps anti-Fab sur les surfaces aminés ont montré une capture plus importante que sur les surfaces carboxyliques, ce qui correspond à un nombre plus important de sites de liaison antigénique.

- Enfin, dans une perspective de développement d'outils miniaturisés, nous nous sommes intéressés à la stabilité de la surface spécifique après silanisation par l'APTES et son influence sur sa capacité à immobiliser anticorps. Les résultats obtenus par FTIR et immuno-essais sont parfaitement corrélés : dans les deux première heures, les expériences menées en FTIR montre que les aires des pics de NH_2 sont variables. Ce qui est également observé avec les résultats biologiques. Après deux heures de stockage, les mesures ne permettent plus de détecter à la surface des groupements NH_2 . De même, les immuno essais montrent que la plaque silanises n'a plus aucune efficacité de capture.

Perspectives

A la fin de ces travaux dans le domaine de la bio détection et suite aux conclusions ci-dessus, nous dégageons les perspectives de recherche suivantes :

Cette thèse s'inscrivait dans une perspective de développement de biocapteurs. Dans ce contexte, mes résultats ouvrent la voix à plusieurs perspectives d'amélioration de la sensibilité des biocapteurs. En effet, nous avons pu établir qu'un greffage à pH acide sur le 7-octenyltrichlorosilanes permettait très probablement de greffer un plus grand nombre d'anticorps. Nous avons également démontré que l'utilisation de l'APTES permet d'augmenter l'efficacité de capture des anticorps immobilisés. Ces avancées sont très utiles pour les biocapteurs résonnants basés sur l'utilisation du silicium, mais également pour tout autre type de capteurs à base de silicium comme les nano/microrésonateur en anaux. Par ailleurs, nous avons dans ce travail étudié l'activité biologique d'IgG modèle de souris, il serait intéressant d'appliquer ces résultats à la capture de bio-marqueur de pathologies neuro-dégénératives ou cancéreuses.

Cependant, il faut auparavant répondre aux questions posées par mes résultats, notamment dans la partie portant sur l'étude du vieillissement de l'APTES. Tout d'abord, vérifier la dégradation des groupements $-NH_2$ par une autre méthode comme le XPS, ou la spectroscopie Raman. Ensuite, il faudrait également mieux comprendre ce qui s'est produit lorsque les anticorps ont été mis en contact avec les plaques APTES vieilles: (i) y a-t-il eu un greffage covalent des anticorps, (ii) si les anticorps sont immobilisés, conservent-ils leur orientation. Pour cela des études complémentaires peuvent être menées par éllipsométrie. Parallèlement, une étude permettant de mettre en évidence des conditions de conservations de plaques APTES serait primordiale. Nous pouvons supposer, à l'aide de nos premiers résultats, qu'une conservation à température élevée, à l'abri de l'humidité, permettrait le maintien de l'intégrité de cette plaque.

Parallèlement, des optimisations méthodologiques sont possibles pour obtenir une surface plus sensible, notamment lorsque l'on silanise par l'APTES sur la surface de silicium pour augmenter les sites actifs du groupement NH_2 sur la surface. Ceci pourrait être réalisé en modifiant la concentration des silanes, ou par chauffage pour éliminer les molécules d'eau résiduelles responsable de l'hydrolyse des silanes. On peut espérer que la présence d'un plus grand nombre de groupement $-\text{NH}_2$ conduirait à un greffage plus important d'anticorps et donc ultérieurement à une plus grande sensibilité du biocapteur.

A plus long terme, une intégration dans un dispositif fluide serait souhaitable, compte-tenu des avantages apportés quand on travaille en milieu biologique. Il serait souhaitable de transposer les résultats obtenus sur plaques à des canaux microfluidique et d'intégrer toutes les étapes nécessaires au développement du biocapteur ; de la fonctionnalisation par les silanes jusqu'à l'immobilisation des anticorps.

Concernant les perspectives pour ces travaux de thèse, l'un des objectifs visé est de s'affranchir des difficultés de micro-fabrication du microrésonateur afin d'obtenir la structure vibrante. L'utilisation de canaux enterrés telle qu'elle est proposée par l'équipe de Manalis (décrite dans le chapitre 1) est particulièrement intéressante, puisqu'elle permet de combiner la possibilité de travailler en milieu liquide et de conserver la sensibilité apportée par l'ultra-vidé. Après la réalisation de ce dernier, il est nécessaire d'entreprendre in situ le greffage des anticorps et ainsi d'accomplir l'immuno-sandwich dédié à la détection du peptide amyloïde. Enfin, nous nous proposons pour abaisser le seuil de détection d'une amplifier la masse par l'ajout de nanoparticules sur l'anticorps de détection. La dernière perspective serait de tester le dispositif vibrant, dans l'ultra-vidé, dans un environnement microfluidique.

Bibliographie

- Adjrad A. *Rapport de stage « Développement de techniques basées sur la structuration chimique de surface pour le diagnostic de maladies neurodégénératives »*, IEF 2011
- Arlett J.L., Myers E.B. Roukes M.L., *Nature Nanotechnology.*, 2001, **6**, 203-215.
- Baldrich E., Laczka O., Del Campo F.J., Munoz F.X., *J. Immunol. Methods.*, 2008, **336**, 203.
- Balladur V., Theretz A., Mandrand B. *J Colloid Interface Sci* 1997, 194, 408
- Balasundaram G., Sato M.; Webster T., *J. Biomaterials* 2006, 27, 2798
- Bataillard P., Gardies F., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., Colin B., *Anal.Chem.*, 1998, **60**, 2374.
- Bigelow W. C., Pickett D. L., Zisman W. A . *J. Colloid Sci.*, 1946, 1, 513
- Blank K., Morfill J., Gaub H.E., *ChemBioChem.* 2006, **7**, 1349.
- Boozer C., Ladd J. , Chen S., Jiang S., *Anal. Chem.* 2006, **78**, 1515.
- Braun T., Ghatkesar M.K., Backmann N., Grange W., Boulanger P., Letellier L., Lang H.P., Bietsch A., Gerber C., Hegner M.,*Phys. Rev. E.* 2005, **72**, 179-185.
- Brzoska J. B., Ben Azouz I., Rondelez F. *Langmuir* 1994, 10, 4367
- Butler J.E., *J. Immunoassay*, 2000, **21**, 165.
- Burg, T. P., Godin, M., Knudsen, S. M., Shen, W., Carlson, G., Foster, J. S., Babcock, K. and Manalis, S. R. *Nature* , 2007, **446**, 1066.
- Cabeça R., Martinsa V.C., Ferraria A.M., Botelho do Rego A.M, Brogueira P., Prazeres D.M.F., Fonseca L.P., Chu V., Condea J.P. *Sensors and Actuators* 2011, **149**, 432.
- Caglayan M.O., Sayar F., Demirel G., et al., *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2009, **5**, 152.
- Cai et al., *Colloid and surfaces B : Biointerfaces* 2006, 50, 1
- Camarero J.A., Kwuon Y., Coleman M.A., *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 14730.
- Camarero J.A., *PeptideScience*, 2008, **90**, 450.
- Chai R., Yuan R., Chai Y., Ou C., Cao S., Li X., *Talanta*, 2008, **74**, 1330.
- Che X., Yuan R., Chai Y., Li J., Song Z., Wang J., *J. Colloid. Interface. Sci.* 2010, **345**, 174.

Cheung C.L., Camarero J.A., Woods B.W., Lin T.W., Jonhson J.E., De Yoreo J.J., *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 6848.

Chikkaveeraiah B.V., Bhirde A.A., Morgan N.Y., Eden H.S. and Chen X. *ACSNano*. 2012, **8**, 6546.

Choi S.H., Zhang Newby B.M. *Surf. Sci.* 2006, **600**, 1391.

Clark L.C., Lyons C., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1962, **102**, 29-45.

Couston R.G., Lamprou D.A., Uddin S., Van der Walle C.F., *Int.J.Pharm.*, 2012, **438**, 71.

Debliquy M., Capteurs Chimiques, *Techniques de l'ingénieur*, 2010, 1-18.

Didar F.T., Foudeh A.M., Tabrizian M., *Anal.Chem.*, 2012, **84**,1012.

Duckworth B.P., Xu J., Taton T., Gui A., Distefano M.D., *Bioconjugate. Chem.*, 2006, **17**, 967.

El-Ghannam A.R., Ducheyne P., Risbud M., Adams C. S., Shapiro I.M., Castner D., Golledge S., Composto R.J *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2004, 68, 615.

Engvall E., Perlman P., *Immunohistochemistry*, 1971, **8**, 871.

Escamilla-Gomez V., Campuzano S., Pedredo M., Pingarron J.M., *Biosens. Bioelectron.* 2009, **24**, 3365.

Fadeev A. Y., McCarthy T. J. *Langmuir* 1999, 15, 3759

Fadeev A. Y., McCarthy T. J. *Langmuir* 2000, 16, 7268

Fang A.F., Cao T., Tang H.Y., Liang X.M., Salley S.O., Ng K.Y.S., *Colloids. Surf. B.*, 2005, **43**, 245.

Faucheux N., Schweiss R., Lützow K., Werner C., Groth T. *Biomaterials* 2004, 25, 2721

Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C. M., Rodriguez, V., Santana, C., Soler, G., Bastida, A., Guisan, G. M *Enzyme Microb. Technol.* 1993, **15**, 546.

Ferrero V.E.V., Andolfi L., Di Nardo G., Sadeghi S.J., Fantuzzi A., Cannistraro S., Gilardi G., *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 8438.

Foudeh A.M., Didar T.F., Veres T., Tabrizian M., *Lab Chip*, 2012, **12**, 3249.

- Frasconi M., Mazzei F., Ferri T., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **398**, 1545.
- Gedig E.T. 2008, In: Schasfoort RBM, Tudos AJ (eds) Handbook of surface plasmon resonance, 1st edn. RSC, Cambridge.
- Ghatkesar M. K., Barwich V., Braun T., Ramseyer J., Gerber C., Lang H.P., Drechsler U., Despont M., *Nanotechnology* 2007, **18**, 445.
- Howarter J.A., Youngblood J.P., *Langmuir*, 2006, **22**, 11142.
- Hsiao V.K.S., Waldeisen J.R., Zheng Y., Llyyd P.F., Bunning T.J., Huang T.J., *J. Mater. Chem.*, 2007, **17**, 4896.
- Gauvreau V., Chevallier P., Vallières K., Petitchlarc E., Gaudreault R.C., Laroche G., *Bioconjugate. Chem.*, 2004, **15**, 1146.
- Godin M., Delgado F. F., Son S., Grover W. H., Bryan A.K., Tzur A., Jorgensen P., Payer K., Grossman A.D., Kirschner M.W., Manalis S.R. *Nature Methods* **7**, 387–390 (2010). 73.
- Gomes I., Di Paolo R.E., Pereira P.M., Perira I.A.C., Saraiva L.M., Penades S. Franco R., *Langmuir*, 2006, **22**, 9809.
- Gonzales-Martinez M.A., Puchades R., Maquieira A., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **387**, 205.
- Gupta, A., Akin, D., Bashir, R., *Appl. Phys. Lett.* 2004, **84**, 1976–1978.
- Harada Y., Girolami G.S., Nuzzo R. G. *Langmuir* 2004, **20**, 10878
- Hass C., Selkoe D.J., *Nature Rev.*, 2007, **8**, 101-112.
- Herrwerth S., Rosendahl C., Feng C., Fick J., Eck M., Himmelhaus M., Dahint R., Grunze M., *Langmuir*, 2003, **19**, 1880.
- Holford T.R.J., Davis F., Higson S.P.J., *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, **34**, 12.
- Holmberg A., Blomstergen A., Nord O., Likacs M., Lundeberg J., Uhlen M. *Electrophoresis*, 2005, **26**,501.
- Iimura K., Nakajima Y., Kato T. *Thin solid films* 2000, **379**, 230.
- Ilic, B., Yang, Y., Craighead, H. G., *Appl. Phys. Lett.* 2004, **85**, 2604.
- Howarter J. A., Youngblood J. P. *School of Materials Engineering*, Purdue University, West Lafayette, Indiana 47907, September 22, 2006
- Jones K. *J. Chromatogr. A*, 1987, **392**, 11.

- Jones R.B., Gordus A., Krall J.A., MacBeath G., *Nature*, 2005, **439**, 168.
- Jradi K., Larour D., Daneault C., Chabot B. *Canada Research chair on value-added papers*, Canada, 2010.
- Jung Y., Lee J.M., Jung H., Chung B.H., *Anal. Chem.* 2007, **79**, 6534.
- Kellner C., Botero M.L., Latta D., Drese K., Fragoso A., O'Sullivan C.K., *Electrophoresis*. 2011, **32**, 926.
- Kim J., Seidler P.M., Wan L.S., Fill C., *J. Colloid and Interface Sci.*, 2009, **329**, 114.
- Kim J., Cho J., Seidler P.M., Kurland N.E., Yadavalli V.K., *Langmuir.*, 2010, **26**, 2599.
- Knudsen, S. M., von Muhlen, M. G., Schauer, D. B. & Manalis, S. R., *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 7087–7090.
- Kyprianou D., Chianella I., Guerreiro A., Piletska E.V., Piletsky S.A., *Talanta*, 2013, **103**, 260.
- Ladd J., Boozer Q., Yu M., Homola J., Jiang S., *Langmuir*. 2004, **20**, 8090.
- Launer P. “*Infrared analysis of organosilicon compounds: spectra-structure correlations*”, Edited by B. Arkles et al. Petrarch Systems 1987.
- Lenci, S., Tedeschi, L., Pieri, F., Domenici, C. *Applied Surface Science*. 2011, **257**, 8413.
- Li Meng “*Modification of silicon by self-assembled monolayers for application in nano-electronics and biology*” *Dissertation Abstracts International*, 2007, **69**, 3599.
- Li Y., Zhao M., Wang J., Kai L., Cai C., *Langmuir*, 2011a, **27**, 4848.
- Li Y., Wang J., Cai C., *Langmuir* 2011b, **27**, 2437.
- Libertino S. et al, *Langmuir*, 2008, **24**, 1965.
- Liang W., Yi W., Li S., Yuan R., Chen A., Chen S., Xiang G., Hu C., *Clin. Biochemistry*. 2009, **42**, 1524.
- Lummerstorfer T., Hoffmann H. *Langmuir*, 2004, **20**, 6542.
- Luppa B.P., Sokoll L.J., Chan D.W., *Clin. Chim. Acta. Int. J. Clin. Chem.*, 2001, **314**, 1.
- Maboudian R. *Surf. Sci. Rep.*, 1998, **30**, 207.

- MacBeath G., Schreiber S.L., *Science*, 2009, **289**, 1760.
- Makila E., Bimbo L.M., Kaasalainen M., Herranz B., Airaksinen A.J., Heinonen M., Kukk E., Hirvonen J., Santos H.A., Salonen J., *Langmuir*, 2012, **28**, 14045.
- March G., Reisberg S., Piro B., Pham M.C., Favre C., Noel V., *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 3523.
- Martin C. « Développement, par une approche mixte top-down/bottom-up, de dispositifs planaires pour la nanoélectronique » *Thèse INSA*, 2005.
- Matijasevic J., Hassler N., Reiter G., Fringeli U.P., *Langmuir*, 2008, **24**, 2588.
- Mileti N., Fahriansyah, Le-Thu Nguyen T., Loos K. *Biocatalysis and Biotransformation* 2010, **28**, 357.
- Mooney J.F., Hunt J.R., McIntosh C.A., Liberko D.M., Walba C.T., *Proc. Natl.Sci. Acad. USA.*,1993, **93**, 12287.
- Moussa S.G., Stern A.C., Raff J.D., Dilbeck C.W., Tobias D.J., Finlayson-Pitts B.J., *Phy. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 448.
- Niemeyer C.M. *Trends Biotechnol.*, 2002, **20**, 395.
- Niu Y., Matos A.I., Abrantes L.M., Vian A.S., Jin G., *Langmuir*. 2012, **28**, 17718.
- Noll W., *Chemistry and technology of silicones*, Academic Press : New York, 1968.
- Ogi H., Nagai H., Fukunishi Y., Yanagida T., Hirao M., Nishima M., *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 3957.
- Peelen D., Kodoyianni V., Lee J., Zheng T., Shortreed M.R., Smith L.M., *J. Proteome. Res.* 2006, **5**, 1580.
- Pei Z., Anderson H., Myrskog A., Dunner G., Ingemarsson B., Aastrup T., *Anal. Biochem.* 2010, 398, 161.
- Popat K.C., Johnson R.W., Desai T. A., *Surf. Coatings Techno.* 2002, **154**, 253.
- Rapp B. E., Gruhl F. J., Länge K., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **398**, 2403.
- Rendl M., Bönisch A., Mader A., Schuh K., Pricker O., Brandstetter T., Rühle J., *Langmuir*, 2011, **27**, 6116.
- Ritter H., Brülwiler D., *J. Phys. Chem. C.*, 2009, **113**, 10667.
- Roy S., Dixit C.K., Wolley R., MacCraith B.D., O’Kennedy R., McDonagh C., *Langmuir.*, 2010, **26**, 18125.

Rusmini F., Zhong Z., Feijen J., *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 1775.

Sahin E., Grillo A.O., Perkins M.D., Roberts C.J., *J. Pharm. Sci.*, 2010, **99**, 4830.

Sajiv J. *J. J. Am. Chem. Soc.* 1980, **102**, 92.

Samanta D., Sarkar A., *Chem.Soc.Rev.* 2011, **40**, 2567.

Schaasfort R., Kooyman R., Bergveld P., Greve J., *Biosens. Bioelectron.* 1990, **5**, 103.

Shankaran D.R., Gobi K.V., Miura N., *Sens. Actuators B*, 2007, **121**, 158.

Schmid E.L., Keller T.A., Dienes Z., Vogel H., *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 1979.

Silberzan P., Léger L., Ausserré D., Benattar J. *Langmuir* 1991, **17**, 1807.

Soellner M.B., Dickson K.A., Nilsson B., Raines R.T., *J. Am. Chem. Soc.* 2003, **125**, 11790.

Su T.J., Lu J.R., Thomas R.K., Cui Z.F., Penfold J., *Langmuir* 1998, **14**, 438.

Tan H.Y., Liu M., Nolting B., Go J.G., Gervay-Hague J., Liu G.Y., *ACS Nano* 2008, **11**, 2374.

Tinazli A., Tang J.L., Valiokas R., Picuric S., Lata S., Liedberg B., Tampe R. *Chem. Eur. J.*, 2005, **11**, 5249.

Trilling A.K., Harmsen M.M., Ruigrok V.J.B., Zuilhof H., Beekwiler J. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, **15**, 219.

Tripp C. P., Hair M. L. *Langmuir* 1992, **8**, 1961.

Tripp C. P., Hair M. L. *Langmuir* 1995, **11**, 1219.

Updike S.J., Hicks G., *Nature*, 1967, **214**, 986.

Vallina-Garcia R., Garcia-Suarez M. D., Fernandez-Abedul M. T., Mendez F. J., Costa-Garcia A., *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **23**, 21.

Vansant E.F., Van Der Voort P. , Vrancken K.C. *Characterization and Chemical Modication of The Silica Surface*, Elsevier, Chapter 9, New York 1995.

Varshney M, Waggoner P.S., Tan C.P., Aubin K., Montagna R.A., Craighead H.G., *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 2141.

Viel P., Walter J., Bellon S., Berthelot T., *Langmuir*, 2013, **29**, 2075.

Von Muhlen M.G., Brault N.D., Knudsen S. M., Jiang S., Manalis S.R. *Anal. Chem.* 2010, **82**, 1905.

Wagner M., Wolf S., Reischies F.M., Daerr M., Wolfsgruber S., Jessen F., Popp J., Maier W., Hull M., Frolich L., Hampel H., Pernecky R., Peters O., Jahn H., Luckhaus C., Gertz H.J., Schroder J., Pantel J., Lewczuk P., Kornhuber J., Wiltfang J., 2012. *Neurology*, **74**, 379.

Wagoner P.S., Craighead H.G., *Lab Chip.*, 2007,**7**, 1238.

Wan Y., Su Y., Zhu X., Liu G., Fan C., *Biosens. Bioelectron.* 2013, **47**, 1.

Wang Y., Brunsen A., Jonas U., Dostalek J., Knoll W., *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 9625.

Wasburn A.L., Gunn L.C., Bailey R.C., *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 9499.

Wasburn A.L., Luchansky M.S., Bowman A.L., Bailey R.C., *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 69.

Wu G., Datr R.H., Hansen K.M., Thunda T., Cote R.J., Majumdar A., *Nature.*, 2001, **19**, 856.

Xia N., Liu L., Harrington M.G., Wang J., Zhou F., *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 10151.

Yalow R.S., Berson S.A., *Nature*, 1959, **184**, 1648.

Yuging M., Jianguo G., Jianrong C., *Biotechnol. Adv.*, 2003, **21**, 527.

Wasserman S. R., Tao Y.T., Whitesides G. M. *Langmuir* 1989, **5**, 107.

Watzke A., Gutierrez-Rodriguez, Khn M., Wacker R., Schroder H., Breinbaur R., Kuhlman J., Alexandrev K., Niemeyer C.M., Goody R.S., Waldman H., *Bioorg. Med. Chem*, 2006, **14**, 6288.

Wegner G.J., Lee N.J., Marriot G., Corn R.M., *Anal.Chem.*, 2003, **75**, 4740.

Wiseman M.E., Franck C.W., *Langmuir*, 2011, **28**, 1765.

Xia N., Liu L., Harrington M.G., Wang J.X., Zhou F., *Anal.Chem.*, 2010, **82**, 10151

Xu F., Zhen G., Yu F., Kuennemann E., Textor M ;, Knoll W., *J. Am. Chem. Soc.* 2005, **127**, 13084.

Zhang J., Sun Y., Xu B., Zhang H., Gao Y., Zhang H., Song D., *Biosens. Bioelectron.* 2013, **45**, 230.

Zhao X., Pan F., Cowsil B., Lu J.R., Garcia-Gandelo L., Flewitt A.J., Ashley G.M., Luo J., *Langmuir*, **27**, 7654.

Zhou J., Battig M.R., Wang Y., *Anal. Bioanal. Chem*, 2010, **398**, 2471.

Zhen X., Shen Z., Mernaugh R., *Anal. Bioanal. Chem*, 2012, **402**, 3027.