



**HAL**  
open science

# Etude et développement d'une microbalance à quartz pour la réalisation d'un immunocapteur. Application à la détection d'antigènes en milieu liquide.

Karine Bizet

► **To cite this version:**

Karine Bizet. Etude et développement d'une microbalance à quartz pour la réalisation d'un immunocapteur. Application à la détection d'antigènes en milieu liquide.. Biotechnologies. Université Paris V, 1997. Français. NNT: 1997PA05CD09 . tel-04157143

**HAL Id: tel-04157143**

**<https://theses.hal.science/tel-04157143v1>**

Submitted on 10 Jul 2023

**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.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

# THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS V

**Spécialité : Biotechnologie**

Option : Anticorps et récepteurs cellulaires pour immunoanalyse et ciblage

Présentée par

**Karine BIZET**

**Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris V**

Sujet de la thèse :

**Etude et développement d'une microbalance à quartz pour la  
réalisation d'un immunocapteur**

**Application à la détection d'antigènes en milieu liquide**

Soutenue le 18 décembre 1997, devant le jury composé de :

Monsieur Jacques INGRAND  
Madame Nicole JAFFREZIC  
Monsieur Jean Louis MARTY  
Monsieur Claude GABRIELLI  
Monsieur Patrice BINDER  
Monsieur Pierre COULET  
Monsieur Hubert PERROT

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Directeur de thèse  
Examinateur  
Examinateur  
Examinateur

## *Remerciements*

*Je tiens tout d'abord à exprimer ma sincère reconnaissance aux membres du jury qui ont accepté de consacrer du temps à l'examen de ce travail.*

*Je remercie Madame Nicole Jaffrezic-Renault, Directeur de recherche à l'Ecole Centrale de Lyon et Monsieur Jean-Louis Marty, Professeur à l'Université de Perpignan, d'avoir bien voulu rapporter sur ce mémoire et participer au jury de ma thèse.*

*Mes remerciements vont aussi à Messieurs Jacques Ingrand, Professeur à l'Université Paris V, Pierre Coulet, Professeur à l'Université de Lyon I et Patrice Binder, Médecin Colonel à la DSP, qui me font l'honneur de participer au jury de ma thèse.*

*Ce travail a été effectué au Laboratoire de Physique des Liquides et Electrochimie (UPR 15 du CNRS) en collaboration avec le Laboratoire des Biotechnologies du Centre d'Etudes du Bouchet. J'exprime mes remerciements à Monsieur Michel Froment ainsi qu'à Monsieur Michel Keddam qui lui a succédé à la direction de l'UPR 15 pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire.*

*Mes remerciements vont aussi à Monsieur Claude Eon, Directeur du Centre d'Etudes du Bouchet, pour m'avoir permis d'effectuer une partie de mon travail de recherche dans son établissement et à Messieurs Lucien Coppet, Sous-Directeur scientifique, Gérard Trouiller, Chef du département Biologie et Jean-Louis Gouasdoué, Chef du service d'évaluation du matériel de défense biologique pour m'avoir accueillie au sein de leurs équipes.*

*Que la DRET soit remerciée du soutien financier qu'elle a apporté à ce travail.*

*J'exprime toute ma gratitude à Monsieur Claude Gabrielli, Directeur de recherche à l'UPR 15, pour m'avoir intégrée dans son équipe ainsi que pour avoir suivi et dirigé mes recherches.*

*J'exprime particulièrement ma reconnaissance et mon amitié à Monsieur Hubert Perrot, Chargé de recherche à l'UPR 15, qui a assuré la co-direction de cette thèse pour son aide et la patience dont il a fait preuve pendant l'encadrement de ce travail. L'enthousiasme et l'intérêt qu'il a toujours manifesté pour le sujet ont été des atouts majeurs pour entretenir ma motivation et pour mener à bien ce travail.*

*Ce travail de thèse n'aurait pas pu être réalisé sans le soutien et l'aide de Monsieur Joël Therasse, Responsable du Laboratoire des Biotechnologies du Centre d'Etudes du Bouchet qui a initié le sujet. Je le remercie sincèrement pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire ainsi que pour avoir suivi et orienté rigoureusement mon travail.*

*Je tiens à adresser toute ma sympathie et ma reconnaissance à Monsieur Jean-Pierre Toqué pour l'aide constante qu'il m'a apportée concernant la réalisation technique de ce travail, mais aussi et surtout pour la bienveillance et la disponibilité dont il a fait preuve pendant mon séjour à l'UPR 15.*

*Je remercie d'une manière générale les membres du Laboratoire de Physique des Liquides et Electrochimie, notamment les membres du secrétariat et de l'atelier ainsi que plus particulièrement :*

*- Messieurs L. Beaunier et S. Borensztajn pour les observations réalisées par microscopie électronique à balayage ;*

*- Madame C. Henry de Villeneuve et Monsieur P. Allongue pour les observations réalisées par AFM et par STM ;*

*- et Madame I. Choquet pour son travail de relecture de ce manuscrit.*

*Que Mesdames Chantal Broustal et Bernadette Montigny, Mesdemoiselles Patricia Sylvestre et Béatrice Elouard et Monsieur Joël Pastre, membres du Laboratoire des Biotechnologies du Centre d'Etudes du Bouchet soient remerciés pour m'avoir accueillie avec bienveillance au laboratoire et pour la disponibilité dont ils ont toujours fait preuve pendant mon séjour au CEB. Que les personnes qui m'ont aidée dans la réalisation de ce travail trouvent ici l'expression de ma sincère reconnaissance.*

*J'exprime ma sympathie aux thésards, stagiaires en tout genre et amis rencontrés au CEB ainsi qu'à l'UPR 15 pendant ces années, notamment à Guy Patra, Jacques Faberon, Stéphan Borensztajn ainsi qu'à Corinne Le Pape.*

*Je remercie sincèrement Ursula Vincent et Roberta Collino pour leur aide, leurs conseils, leurs discussions... Qu'elles sachent combien leur amitié m'est essentielle !*

*Je tiens enfin à remercier ma famille et mes amis qui m'ont aidée et encouragée durant mes années d'études, en particulier mes parents, ma soeur et Olivier Aude.*

*Ce manuscrit est dédié à mon grand-père.*

# Sommaire

<b>Introduction</b>	6
<b>Chapitre I : les biocapteurs</b>	10
Introduction	11
1. Définition	11
2. Généralités	12
2. 1. Historique	12
2. 2. Intérêts et domaines d'application	13
2. 3. Classification	14
2. 4. Critères d'évaluation et problèmes à résoudre	16
3. Les transducteurs	17
3. 1. Transduction électrochimique	17
3. 1. 1. Transduction potentiométrique	17
3. 1. 2. Transduction ampérométrique	18
3. 1. 3. Transduction conductimétrique et impédancemétrique	19
3. 2. Transduction optique	20
3. 3. Transduction piézoélectrique	21
4. La couche bioréceptrice	22
4. 1. Les biorécepteurs	22
4. 2. Les techniques d'immobilisation	23
4. 2. 1. L'adsorption	24
4. 2. 2. Greffage covalent	25
4. 2. 3. L'inclusion	26
4. 2. 4. Techniques d'assemblage en multicouches	26
4. 3. L'interaction antigène / anticorps	27
4. 3. 1. Rappels d'immunologie	27
4. 2. 2. Les techniques immunoanalytiques classiques	33
5. Etat de l'art des immunocapteurs piézoélectriques	36
Conclusion	38

## Chapitre II : Les transducteurs piézoélectriques - aspects théoriques 39

Introduction	40
1. Les transducteurs piézoélectriques	40
1. 1. Généralités sur le quartz	40
1. 1. 1. Structure et propriétés du quartz $\alpha$	41
1. 1. 2. L'effet piézoélectrique	42
1. 1. 3. Les différentes coupes de quartz et effet de la température	43
1. 2. Les différents dispositifs piézoélectriques	45
1. 2. 1. TSM	45
1. 2. 2. SAW	47
1. 2. 3. APM	48
2. Principe de la microbalance à quartz	49
2. 1. L'équation de Sauerbrey	49
2. 2. Comparaison des sensibilités massiques des différents transducteurs piézoélectriques	54
2. 3. Comportement d'une microbalance à quartz en milieu liquide	55
2. 2. 1. Influence du liquide	55
2. 2. 2. Influence combinée du liquide et d'un dépôt	57
3. Etude du mécanisme de transduction de la microbalance à quartz par des mesures d'admittance électroacoustique	58
3. 1. Introduction	58
3. 2. Définitions et intérêt de la mesure de l'admittance électroacoustique	58
3. 3. Théorie	59
4. Modélisation du fonctionnement du résonateur à quartz	62
4. 1. Introduction	62
4. 2. Rappels généraux	62
4. 3. Modélisation	64
4. 3. 1. Cas d'un matériau non piézoélectrique	64
4. 3. 2. Cas d'un résonateur à quartz ou d'un matériau piézoélectrique seul	65
4. 3. 3. Cas d'un résonateur à quartz chargé	66
4. 3. 4. Cas de la microbalance à quartz avec un dépôt et en milieu liquide	67
4. 4. Simulation du fonctionnement de la microbalance à quartz	69
4. 4. 1. Généralités	69
4. 4. 2. Influence du coefficient de cisaillement élastique du film sur la réponse du résonateur	70
4. 4. 3. Influence de la viscosité du film sur la réponse du résonateur	71
4. 5. Conclusion	73
Conclusion	73

<b>Chapitre III : Mise au point et caractérisation du dispositif piézoélectrique</b>	74
Introduction	75
1. La microbalance à quartz	75
1. 1. Augmentation de la sensibilité	75
1. 1. 1. But et principe	75
1. 1. 2. Caractéristiques des quartz	76
1. 1. 3. Les oscillateurs	78
1. 2. Les montages expérimentaux réalisés	79
1. 2. 1. Montage sur plaquette	79
1. 2. 2. La cellule à jet immergé	80
1. 2. 3. La cellule miniature	82
1. 3. Le logiciel "multimes"	83
1. 4. Etude de la stabilité et du bruit de fond de la fréquence d'oscillation	84
1. 4. 1. Influence de la température	84
1. 4. 2. Influence de la circulation des solutions	89
1. 4. 3. Influence de la nature des solutions	92
2. La mesure couplée de la fréquence de la microbalance à quartz et de l'admittance électroacoustique	95
2. 1. Rappels et but	95
2. 2. Mise au point du dispositif de mesure	96
2. 3. Mise au point de la mesure	97
3. Etudes préliminaires - analyse de la réponse du transducteur piézoélectrique	100
3. 1. Expériences réalisées avec la microbalance à quartz	100
3. 1. 1. Calibration par dépôt électrochimique de cuivre	100
3. 1. 2. Mesure de l'adsorption de protéines	104
3. 2. Mesures couplées pendant l'adsorption de protéines	111
Conclusion	114

## **Chapitre IV : Elaboration et caractérisation de la couche immunosensible** 115

Introduction	116
1. Immobilisation des anticorps sur les électrodes en or de la microbalance à quartz	116
1. 1. Choix du couple antigène/anticorps	116
1. 2. Les différentes techniques d'immobilisation utilisées	117
1. 2. 1. Greffage covalent	117

1. 2. 2. Adsorption	122
2. Contrôle de l'immobilisation	123
2. 1. Mesure de l'activité peroxydasique	123
2. 2. Techniques d'imagerie	125
3. Résultats	126
3. 1. Mesure de l'activité peroxydasique	126
3. 1. 1. Comparaison de la quantité de peroxydase mesurée pour les différentes méthodes d'immobilisation	126
3. 1. 2. Choix de la concentration optimale en anticorps	128
3. 1. 3. Influence de l'hydrophobicité de la surface des électrodes	129
3. 2. Etude de la surface des électrodes immunosensibilisées par les techniques d'imagerie	130
4. Etude de l'influence du flux de la solution de peroxydase et de la vibration des quartz sur l'interaction antigène/anticorps	133
4. 1. But	133
4. 2. Matériel et méthodes	133
4. 2. 1. Préparation des quartz et mesure de la quantité de peroxydase	133
4. 2. 2. Système sans flux et sans vibration	134
4. 2. 3. Système avec flux et sans vibration	134
4. 2. 4. Système avec flux et avec vibrations	134
4. 3. Résultats	135
Conclusion	137

## **Chapitre V : Détection spécifique d'antigènes en milieu liquide à l'aide de la microbalance à quartz**

Introduction	140
1. Détection de la peroxydase	140
1. 1. But	140
1. 2. Matériel et méthodes	140
1. 3. Résultats	142
1. 3. 1. Evaluation de la spécificité	142
1. 3. 2. Réponse de la microbalance à quartz à l'antigène	143
2. Détection d'immunoglobulines G	147
2. 1. But	147
2. 2. Matériel et méthodes	147
2. 3. Résultats	148
2. 3. 1. Evaluation de la spécificité	148

2. 3. 2. Réponse de la microbalance à quartz à l'antigène	149
3. Détection de la SEB	152
3. 1. But	152
3. 2. Matériel et méthodes	152
3. 3. Résultats	152
3. 3. 1. Evaluation de la spécificité	152
3. 3. 2. Réponse de la microbalance à quartz à l'antigène	155
Conclusion et discussion	157
<b>Conclusion</b>	160
<b>Références bibliographiques</b>	164
<b>Annexes</b>	172

## *Introduction*

Un grand nombre d'interactions moléculaires sont mises en jeu pour assurer le bon fonctionnement des organismes vivants. Les réactions enzyme/substrat, récepteur/ligand, antigène/anticorps... participent aux fonctions métaboliques vitales de ces organismes, contrôlent leur développement et assurent leur défense dans leur environnement. Ces réactions, bien connues car très étudiées par les biologistes, sont mises à profit par les biotechnologistes qui utilisent ce "savoir faire" du monde vivant.

Dans le domaine des biocapteurs, les composants biologiques capables de se lier spécifiquement avec une molécule cible sont utilisés pour constituer une couche bioréceptrice à la surface d'un transducteur qui assure la conversion de l'interaction moléculaire en un signal physique. La réponse d'un biocapteur est relative à la présence de l'analyte à détecter et peut être reliée à sa concentration dans l'échantillon.

Le développement des biocapteurs est lié à l'émergence de besoins nouveaux dans des secteurs économiquement importants où la détection spécifique et rapide de molécules ou de micro-organismes est un problème crucial. Les biocapteurs fournissent une réponse non différée et ce sans manipulation délicate de l'échantillon à analyser. Nous avons donc décidé de développer un biocapteur pour répondre à ces besoins analytiques.

Les activités de recherche liées au développement des biocapteurs sont en pleine expansion depuis ces dix dernières années car elles bénéficient du transfert de technologie des disciplines de la microtechnologie et des biotechnologies. Néanmoins, l'obtention d'une couche réceptrice fonctionnelle sur une surface transductrice et la maîtrise du mécanisme de transduction, en terme de sensibilité et de stabilité, sont difficiles à combiner. Nous avons donc focalisé notre étude sur ces deux points dans le but de concevoir et d'étudier un immunocapteur reposant sur une mesure de masse.

Nous avons choisi d'utiliser, parmi les différents transducteurs existants, un dispositif piézoélectrique basé sur une microbalance à quartz, en association avec une couche d'anticorps, pour mesurer les variations de masse consécutives à la fixation spécifique des antigènes à détecter. En effet, la microbalance à quartz, constituée d'une pastille de quartz pourvue d'électrodes métalliques, vibre à une certaine fréquence, proche de sa fréquence dite de résonance, entretenue par une électronique appropriée : le tout constitue un oscillateur à quartz qui peut fonctionner même en milieu liquide. Grâce aux propriétés piézoélectriques du cristal de quartz, les variations de la fréquence d'oscillation sont proportionnelles aux variations de masse ayant lieu au niveau de l'une des électrodes métalliques. Le principe de transduction des biocapteurs basés sur une microbalance à quartz repose sur cette propriété. La sensibilité massique de ces dispositifs augmentant avec le carré de la fréquence de

résonance des cristaux, nous pouvons accroître cette sensibilité en utilisant des quartz ayant une fréquence de résonance plus élevée. Ce paramètre est toutefois limité par l'épaisseur du quartz qui le contrôle : plus sa fréquence de résonance est élevée, plus le quartz est mince et donc plus fragile.

Le problème majeur lié au développement des biocapteurs en général, et notamment à la microbalance à quartz, concerne les quantités très faibles à détecter qui mettent souvent en défaut la sensibilité de ces différents dispositifs. C'est dans ce cadre que nous avons choisi une voie nouvelle pour concevoir une microbalance à quartz de haute sensibilité, notre objectif étant de pouvoir réaliser directement l'immunodétection spécifique et rapide de différents antigènes solubles à l'aide de ce nouveau transducteur.

La compréhension du mécanisme de transduction est primordiale. Que mesure réellement le transducteur pendant l'interaction des deux partenaires ? Il est important de se poser cette question lors de la mise au point d'un biocapteur pour s'assurer de la spécificité du signal mesuré. Comme nous l'avons vu, la microbalance à quartz est sensible à la masse, mais elle est également sensible à la température, aux propriétés physico-chimiques des solutions avec lesquelles elle est en contact et aux propriétés viscoélastiques de la couche déposée à sa surface. Une étude approfondie de la réponse de ce transducteur dans nos conditions d'utilisation s'avérerait essentielle. Nous avons donc mis au point une méthodologie d'analyse et de mesure, basée sur l'admittance électroacoustique, pour étudier le mécanisme de transduction du résonateur à quartz en milieu liquide recouvert d'une couche de protéines.

L'élaboration de la couche d'anticorps est une étape primordiale dans le développement d'un immunocapteur puisque la qualité de cette couche va conditionner la réponse du capteur en terme de spécificité, de sensibilité et de reproductibilité. Pour l'élaboration de cette couche, nous avons examiné différentes techniques d'immobilisation des immunoglobulines du couple antigène/anticorps modèle que nous avons choisi en comparant les résultats en terme d'immunoréactivité mesurée au niveau de la surface de l'électrode. De plus, différentes techniques d'imagerie ont été mises à profit afin de caractériser la couche d'immunoglobulines formée. En outre, nous avons étudié l'influence de la vibration des quartz sur l'interaction antigène/anticorps.

Enfin, nous avons utilisé "notre" microbalance à quartz pour l'immunodétection en milieu liquide d'antigènes de poids moléculaires différents. Dans chaque cas, des contrôles concernant la spécificité de la mesure et de la réaction antigène/anticorps ont été effectués.

Le premier chapitre de ce manuscrit fera l'état de l'art des biocapteurs aujourd'hui. Nous aborderons ensuite l'étude théorique des transducteurs piézoélectriques. Nous décrirons

dans les deux chapitres qui suivront, le travail que nous avons réalisé d'une part, pour mettre au point et caractériser notre dispositif expérimental et d'autre part, pour élaborer et caractériser la couche immunosensible. Enfin, nous montrerons dans un dernier chapitre, la faisabilité de l'immunodétection directe, spécifique, en temps réel et en milieu liquide, à l'aide de la microbalance à quartz développée. Trois exemples concernant la détection de la peroxydase, d'immunoglobulines G et de l'entérotoxine B de Staphylocoque seront présentés.

*Chapitre I*

***LES BIOCAPTEURS***

## INTRODUCTION

Ce premier chapitre est une introduction aux biocapteurs où après avoir donné quelques définitions et généralités, nous présenterons plus en détail les deux entités qui composent les biocapteurs. Après avoir fait un inventaire des différents transducteurs et de leur principe de transduction, nous aborderons la couche bioréceptrice. Nous présenterons les différentes techniques d'immobilisation des composants biologiques sur la surface d'un transducteur. Nous rappellerons ensuite quelques notions d'immunologie, l'interaction antigène/anticorps étant à la base même du fonctionnement de notre biocapteur. Après avoir rappelé le principe des techniques immunoanalytiques classiques, nous présenterons alors un état de l'art des immunocapteurs piézoélectriques.

### 1. DEFINITION

Un *biocapteur* peut être défini comme un dispositif constitué de l'association d'une *couche bioréceptrice spécifique* (molécules biologiques capables d'interaction moléculaire spécifique) et d'un *transducteur* qui convertit l'interaction moléculaire en un signal physique, généralement électrique, facilement exploitable (Coulet, 1991).

La réponse d'un biocapteur est relative à la présence de l'analyte à détecter et doit être correlable à sa concentration dans l'échantillon. Il faut noter que le terme "bio" de biocapteur caractérise la couche réceptrice et non pas l'analyte à détecter.

Différents composants biologiques doués de fonction de liaison spécifique peuvent être utilisés pour élaborer la couche réceptrice et différents systèmes de transduction peuvent être retenus comme le présente la figure 1.

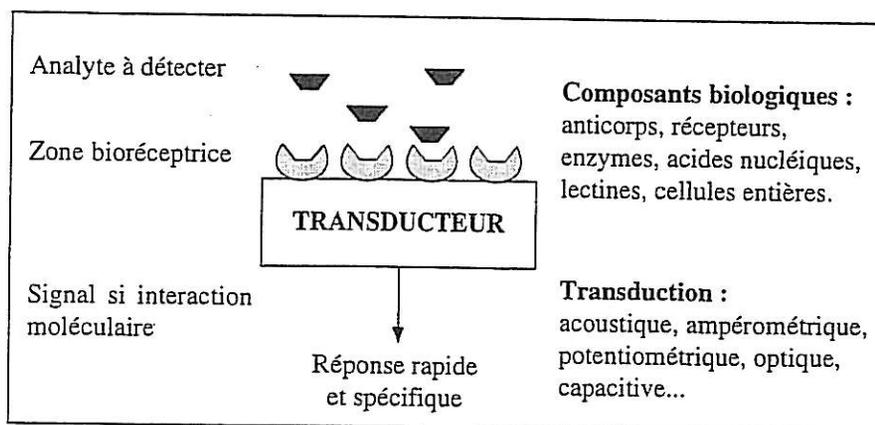


Figure 1 : Représentation schématique d'un biocapteur

## 2. GENERALITES

### 2. 1. Historique

Les premiers travaux concernant la mise au point d'un biocapteur peuvent être attribués à Clark et Lyons (Clark et Lyons, 1962) qui utilisèrent l'électrode à oxygène de Clark pour la détection du glucose. La glucose oxydase retenue sur l'électrode permettait la détection ampérométrique spécifique du glucose. Le premier capteur électrochimique à enzyme pour la détection du glucose voyait le jour grâce à la glucose oxydase qui, encore aujourd'hui, est l'enzyme de référence pour ce type de détection. Les travaux qui suivirent concernèrent l'amélioration des techniques d'immobilisation des enzymes sur les électrodes. Par la suite, Guilbault et Montalvo (Guilbault et Montalvo, 1969) présentèrent le premier capteur potentiométrique pour la détection de l'urée.

Depuis les années 1970, une centaine d'enzymes ont été utilisées en association avec une détection électrochimique et parallèlement d'autres types de biorécepteurs, en particulier des immunoglobulines, ont été utilisés en association avec d'autres transducteurs. Ainsi en 1975 le premier immunocapteur à fibre optique est conçu (Kronick et Little, 1975). C'est en 1972 que Shons (Shons et *al.*, 1972) utilise pour la première fois un transducteur piézoélectrique constitué d'une microbalance à quartz revêtue d'antigènes pour détecter les anticorps correspondants. Depuis un grand nombre d'immunocapteurs ont été décrits notamment depuis l'avènement des anticorps monoclonaux.

Plus récemment, des bicouches lipidiques, déposées sur un transducteur, incorporant des protéines de transport ou des récepteurs cellulaires ont été utilisées comme élément sensible (Kiefer et *al.*, 1991) ; ainsi que des acides nucléiques (Caruso et *al.*, 1997; Su et *al.*, 1997).

## 2. 2. Intérêts et domaines d'application

Les biocapteurs permettent une détection spécifique rapide et directe, dans les meilleurs cas, de l'analyte à détecter par le biais de la conversion par le transducteur, en quasi temps réel, de l'interaction moléculaire en signal électrique.

Les intérêts de l'utilisation des biocapteurs dépendent du domaine d'application, mais les deux avantages principaux sont la rapidité de l'analyse et la simplicité.

En effet, les étapes de séparation de l'analyte libre de l'analyte lié ne sont pas nécessaires puisque la réponse du biocapteur est spécifique de la partie liée sur la couche biosensible du transducteur, quel que soit le type de transduction. C'est cette caractéristique qui minimise le temps de l'analyse par rapport aux autres techniques analytiques et en particulier par rapport aux techniques immunoenzymatiques (comme l'ELISA) où les temps d'incubations sont longs et les étapes de lavages et de révélations sont nécessaires. Typiquement la réponse d'un biocapteur est donnée en quelques minutes contre plusieurs heures pour les techniques classiques. De plus, ces dispositifs peuvent être miniaturisés et peuvent être utilisés sur le "terrain" : l'analyse est réalisée sur le lieu même où l'échantillon est prélevé, celui-ci ne risque donc pas de se détériorer pendant un transport jusqu'au laboratoire d'analyse. Ce gain de temps supplémentaire est primordial quand il faut faire face, rapidement, à un événement critique.

D'autre part, l'utilisation d'un biocapteur ne requiert pas la manipulation de produits dangereux comme des molécules marquées par des isotopes radioactifs.

De plus, certains dispositifs permettent de visualiser la cinétique de l'interaction couche sensible / molécule cible en continu et en temps réel. Ceci permet d'étudier les interactions protéines/protéines (antigènes/anticorps, ligands/récepteurs), protéines/acides nucléiques, acide nucléiques/acides nucléiques... Ces dispositifs, plus destinés au domaine de la recherche, reposent sur une transduction optique et sont commercialisés, entre autre, par les sociétés BIAcore AB (BIAcore) et Affinity Sensors (IASys).

Les secteurs concernés par l'utilisation des biocapteurs sont variés et quelques exemples typiques sont donnés dans la liste qui suit :

- le secteur médical et de la santé pour le diagnostic rapide et en continu, pour les "home test" comme par exemple le capteur pour le dosage du glucose (Exactech commercialisé par la société Medisense) qu'utilisent les diabétiques pour contrôler leur glycémie (figure 2),

- le secteur agro alimentaire et industriel pour le contrôle de qualité (de l'eau notamment), pour le suivi des processus de fermentation, la détection de la prolifération de micro-organismes dans les aliments...
- le secteur environnemental pour la détection de polluants (pesticides, herbicides, engrais...) dans différents milieux,
- le secteur militaire pour l'identification rapide de toxines, de virus ou de bactéries,
- le secteur de la recherche pour l'étude des interactions biomoléculaires en temps réel (figure 3).



Figure 2 : Le "stylo" à glucose Exactech (Medisense)

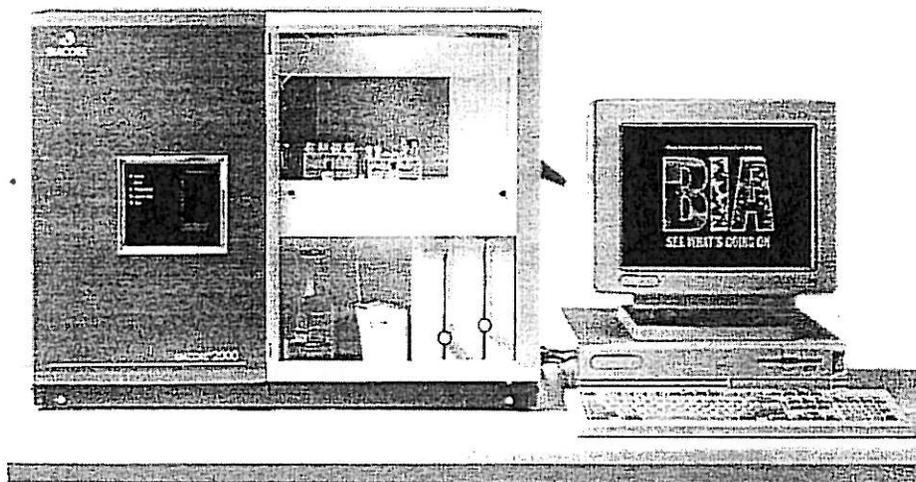


Figure 3 : Exemple de dispositif permettant l'étude des interactions moléculaires en temps réel, le "BIAcore" (BIAcore AB)

### 2. 3. Classification

Les biocapteurs peuvent être classés en fonction de la nature de la couche biosensible et du type d'interactions mises en jeu avec la molécule cible (figure 4).

Nous pouvons ainsi distinguer 4 classes de biocapteurs :

- les systèmes de bioaffinité (figure 4a),
- les systèmes catalytiques (figure 4b),

- les systèmes transmembranaires (figure 4c),
- et les systèmes à cellules entières (figure 4d).

Il faut néanmoins noter que la majorité des capteurs composés de cellules entières ou de membranes font aussi appel à des principes d'affinité ou catalytique.

Dans tous les cas un transducteur approprié doit rendre compte de l'interaction moléculaire, le choix du système de transduction est de ce fait conditionné par le type d'interaction ayant lieu à sa surface.

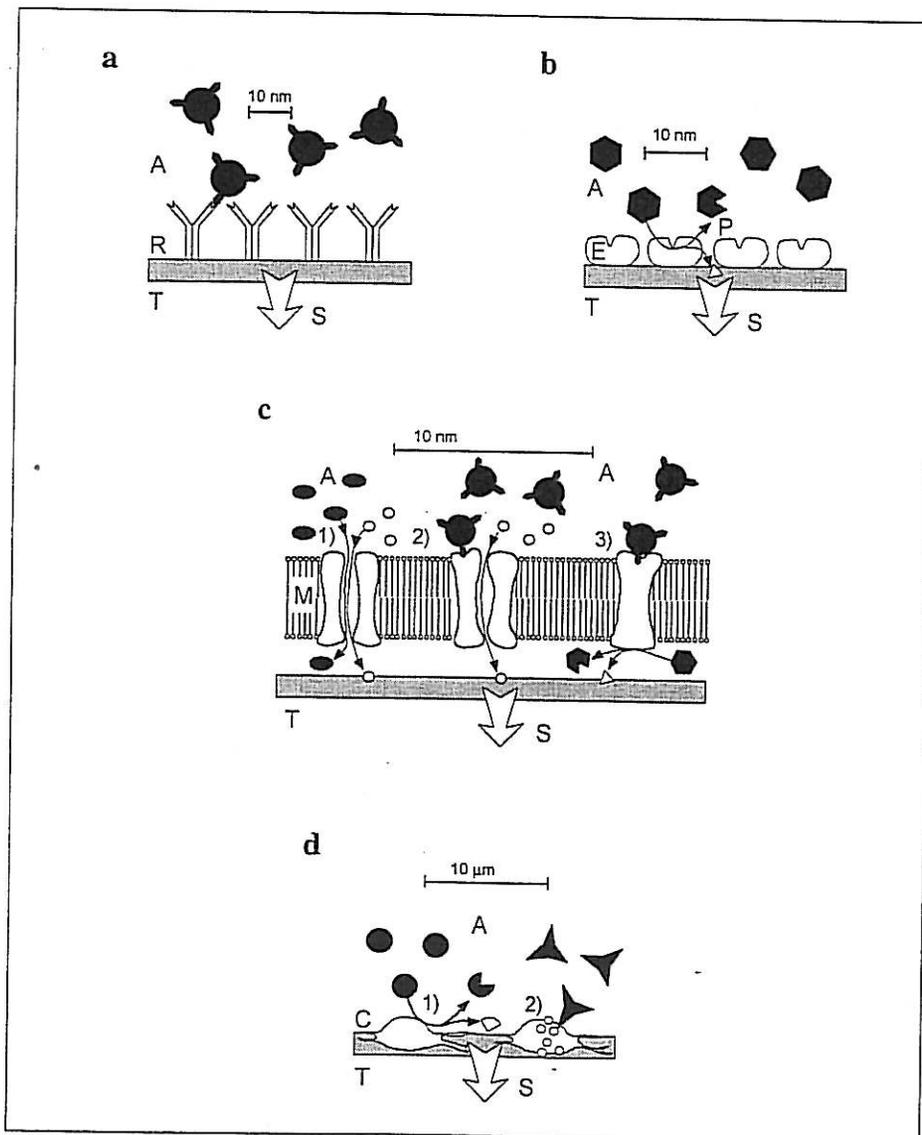


Figure 4 : Représentation schématique des différentes couches biosensibles (d'après Göpel et al. 1995). L'analyte à détecter est noté A, le transducteur T et le signal mesuré S

Pour les capteurs de bioaffinité, l'analyte se fixe spécifiquement sur la couche sensible (antigène/anticorps, récepteur/ligand, ADN/ADN...). Les transducteurs les plus adéquats pour

convertir ce type d'interaction sont les systèmes optiques (mesure de la variation de l'indice de réfraction et de l'épaisseur de la couche) et les systèmes piézoélectriques (mesure de la variation de masse).

Pour les systèmes catalytiques, l'analyte est transformé par des enzymes immobilisées E en produit P. Une transduction de type électrochimique ("électrode à enzyme") est la mieux adaptée pour rendre compte de ces réactions de catalyse.

Pour les systèmes membranaires, une protéine formant un canal (figure 4c, 1) laisse passer spécifiquement l'analyte à détecter ou laisse passer une autre espèce après fixation spécifique de l'analyte (figure 4c, 2). Une protéine transmembranaire peut aussi activer une cascade de réactions enzymatiques en fixant spécifiquement l'analyte à détecter (figure 4c, 3). Une transduction électrochimique est souvent associée à ce type de couche sensible.

Pour les capteurs à cellule entière, l'analyte est soit converti en produit (figure 4d, 1) soit se fixe sur la cellule (figure 4d, 2).

## 2. 4. Critères d'évaluation et problèmes à résoudre

Les performances d'un biocapteur doivent être évaluées par des critères analytiques classiques comme : la sensibilité, la spécificité, la reproductibilité, la répétabilité, la justesse, le temps de réponse, la linéarité de la réponse, la limite de détection...

Malgré un essor considérable des activités de recherche liées au développement des biocapteurs, peu de dispositifs sont actuellement commercialisés car plusieurs paramètres doivent être encore améliorés en particulier la sensibilité des dispositifs et la reproductibilité des mesures qui doivent, au moins, atteindre celle des techniques classiques.

En ce qui concerne la spécificité, les problèmes de fixation non spécifique doivent être minimisés.

La couche biosensible doit être stable dans le temps et doit rester fonctionnelle même dans des conditions de pH et de force ionique extrêmes. De plus, la régénération de cette couche (pour les systèmes affins n'étant pas à usage unique) ne doit pas entraîner une perte de son activité biologique.

Enfin, l'aspect de la durée de vie et du coût de revient des biocapteurs doivent être pris en compte si nous voulons augmenter leur diffusion et leur utilisation.

### 3. LES TRANSDUCTEURS

Le *transducteur* est l'élément physique du biocapteur qui convertit l'interaction moléculaire entre l'analyte à détecter et la couche bioréceptrice en un signal facilement exploitable.

Le transducteur doit donc rendre compte des modifications physico-chimiques liées à l'interaction biomoléculaire.

Différents paramètres physico-chimiques associés à cette interaction peuvent être mesurés. Par exemple, l'interaction peut aboutir à la production d'ions et à un transfert d'électrons, ces signaux étant facilement mesurables par des transducteurs électrochimiques (mesure ampérométrique, potentiométrique, conductimétrique et impédancemétrique). L'interaction peut aussi entraîner une variation de température facilement détectable par un transducteur calorimétrique ou une variation de l'épaisseur de la couche et de son indice de réfraction détectables par un transducteur optique. Enfin, les variations de masse consécutives à la fixation de l'analyte sur la couche biosensible peuvent être mesurées directement par les transducteurs piézoélectriques.

Le choix du transducteur est de ce fait conditionné par la nature des paramètres physico-chimiques que nous voulons mesurer et qui varient pendant ou consécutivement à l'interaction.

#### 3. 1. Transduction électrochimique

##### 3. 1. 1. Transduction potentiométrique

Les dispositifs *potentiométriques* mesurent les variations de densités de charges à la surface d'une électrode qui se traduisent par des changements de potentiel à l'interface. Ces derniers sont mesurés entre une électrode de travail et une électrode de référence.

Un des exemples le plus représentatif de ce type d'électrode est l'"ISE" (Ion Selective Electrode) où l'interaction spécifique d'ions en solution avec une membrane sensible provoque une variation de la différence de potentiel entre l'électrode ionosensible et une électrode de référence aussi en contact avec la solution. Cette variation de potentiel est proportionnelle au logarithme de la concentration en ions en-solution. La sélectivité de l'électrode dépend de la nature de la membrane ionosensible utilisée. Les électrodes à pH ont d'abord été mises au point, puis des électrodes à  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ... ont été développées.

Le principe des capteurs potentiométriques à enzymes repose sur cette transduction : des enzymes sont immobilisées sur une "ISE" et la variation de potentiel consécutive à l'apparition d'un produit de la réaction enzymatique ( $H^+$ ,  $CO_2$ ,  $NH_3...$ ) est mesurée.

Des immunocapteurs peuvent aussi être réalisés avec ce type d'électrode. Des antigènes marqués par une enzyme, peuvent se fixer spécifiquement sur des anticorps immobilisés à la surface d'une électrode. La réaction enzymatique du marqueur génère un produit qui provoque une variation de potentiel détectée par le dispositif. L'antigène non marqué (i.e. l'analyte à détecter) et l'antigène marqué par l'enzyme entrent en compétition pour les sites de fixation sur les anticorps immobilisés. La concentration de l'analyte à détecter est alors inversement proportionnelle à la variation de potentiel généré par l'activité de l'enzyme.

D'autres dispositifs potentiométriques reposant sur la mesure du courant de drain d'un transistor à effet de champ ("Field Effect Transistor ou FET") peuvent être utilisés comme transducteur (Gardies et *al.*, 1990). Ces transducteurs peuvent être associés à des enzymes ("Enzyme field effect transistor ou ENFET") ou à des anticorps ("Immuno field effect transistor ou IMFET). Le principe de mesure des FET est équivalent à celui des ISE, mais la mesure est facilitée par la faible impédance de sortie des dispositifs. De plus, ces dispositifs sont de petite taille et peuvent être produits en grande quantité par les techniques de microélectronique.

### 3. 1. 2. Transduction ampérométrique

Les dispositifs *ampérométriques* mettent en jeu une mesure de courant. Ils sont en général associés à des enzymes ("électrode à enzyme") qui génèrent, ou consomment, une espèce électroactive proportionnellement à la concentration de l'analyte (substrat) à détecter. Ces espèces peuvent réagir (oxydation ou réduction), plus ou moins directement, à la surface de l'électrode ce qui génère un courant. Celui-ci est lié linéairement à la concentration de l'analyte en solution. La plupart des enzymes associées à une détection ampérométrique sont des oxydoréductases et des hydrolases.

L'exemple de la glucose oxydase, qui catalyse l'oxydation du glucose, est très représentatif de ce type de transduction ampérométrique (Sethi, 1994). Sur les figures 5 et 6, l'enzyme sous forme oxydée ( $GOD(FAD^+)$ ) réagit spécifiquement avec le glucose, pour le transformer en gluconolactone, et se retrouve sous forme réduite ( $GOD(FADH_2)$ ).

Dans le cas d'une réaction sans médiateur (figure 5) l'enzyme est régénérée par oxydation avec une molécule d'oxygène ce qui produit une molécule de peroxyde d'hydrogène. C'est cette

dernière qui va être détectée ampérométriquement par l'électrode après transformation en  $2\text{H}^+ + \text{O}_2 + 2\text{e}^-$ . La réponse du capteur est proportionnelle à la quantité de peroxyde d'hydrogène généré par la réaction enzymatique et le courant mesuré peut donc être corrélé à la concentration de l'analyte.

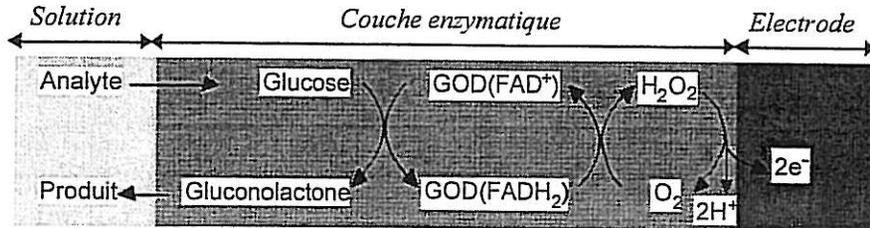


Figure 5 : Représentation schématique des étapes intervenant dans la détection ampérométrique sans médiateur du glucose

Dans d'autres cas, l'oxygène peut être remplacé par un médiateur pour régénérer l'enzyme sous forme active (figure 6). Un médiateur est constitué d'un couple redox de bas poids moléculaire qui va servir de "navette" pour les électrons qui sont transférés du centre redox de l'enzyme à la surface de l'électrode.

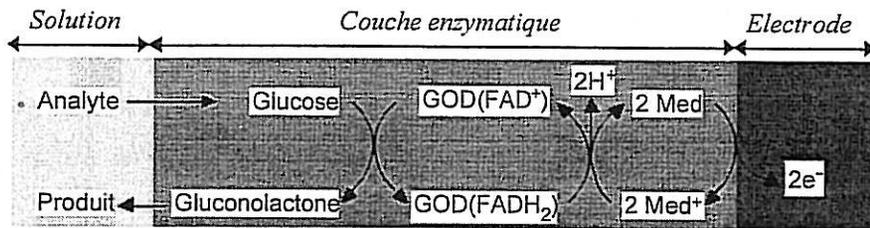


Figure 6 : Représentation schématique des étapes intervenant dans la détection ampérométrique avec médiateur du glucose

Des immunocapteurs à transduction ampérométriques peuvent aussi être mis au point. Dans ce cas les anticorps (ou les antigènes) sont marqués par une enzyme qui peut être détectée ampérométriquement. Des tests en "sandwich" et en compétition peuvent être réalisés.

### 3. 1. 3. Transduction conductimétrique et impédancemétrique

La mesure de la *conductivité* d'une solution peut être utilisée comme système de transduction d'un biocapteur car les espèces chimiques libérées ou consommées lors d'une réaction peuvent entraîner des modifications de la conductivité de la solution.

Les mesures *d'impédance* peuvent caractériser les propriétés bloquantes de la surface d'une électrode (ou d'un autre substrat). Les protéines immobilisées à la surface d'une électrode

peuvent faire varier cette propriété. La fixation spécifique, par exemple, d'antigènes sur des anticorps immobilisés à la surface d'une électrode, ou d'une autre structure, va augmenter le caractère bloquant de la couche de protéine et peut être "visualisée" par la mesure de la capacité interfaciale (Billard, 1991; Maupas et al., 1997).

### 3. 2. Transduction optique

Les transducteurs *optiques* mesurent les variations des propriétés optiques d'une couche comme son indice de réfraction et son épaisseur (Brecht et Gauglitz, 1995). La transduction optique apparaît donc particulièrement bien adaptée pour rendre compte des réactions de bioaffinité. Dans le cas d'une interaction anticorps/antigène, récepteur/ligand l'indice de réfraction de la couche biologique et son épaisseur varient : la mesure de ses paramètres par un transducteur optique permet donc de détecter et de caractériser cette interaction.

Le principe des différents transducteurs optiques reposent le plus souvent sur le phénomène de *réflexion totale* et sur le phénomène *d'onde évanescente* qui lui est associé. Quand un rayon lumineux illumine l'interface plane séparant deux milieux transparents d'indice de réfraction différents ( $n_1$  et  $n_2$ ), le phénomène de réflexion totale apparaît dans le milieu d'indice de réfraction le plus élevé ( $n_1$ ) si l'angle d'incidence du rayon lumineux est supérieur à un angle critique. Le faisceau incident est alors totalement réfléchi. Avant de revenir dans le milieu d'indice  $n_1$ , une onde électromagnétique, appelée onde évanescente, est générée au niveau de l'interface et transite dans le milieu d'indice de réfraction le plus faible ( $n_2$ ) avec une certaine profondeur de pénétration qui dépend de l'angle d'incidence. Cette onde évanescente peut être utilisée pour "sonder" le milieu extérieur dans une zone délimitée par sa profondeur de pénétration. Si l'onde évanescente n'est pas perturbée dans le second milieu, la propagation s'effectue sans perte d'énergie au niveau du faisceau réfléchi. En revanche, si les propriétés optiques du milieu extérieur sont modifiées par la présence de molécules (modification locale de l'indice  $n_2$ ) la propagation de la lumière sera perturbée et une mesure de la variation de l'intensité du faisceau réfléchi sera effectuée.

Un autre phénomène optique, la résonance des plasmons de surface (Surface Plasmon Resonance : SPR) peut aussi rendre compte de l'interaction d'un analyte sur un récepteur spécifique immobilisé (Collino, 1994). Ce type de transduction est à la base des dispositifs "BIAcore" et "BIAcore probe" commercialisés par la société BIAcore AB. La résonance des plasmons de surface repose sur le principe de la réflexion totale de la lumière à l'interface d'un film métallique et d'une solution. Bien que la lumière soit totalement réfléchie, une onde évanescente pénètre à l'interface et peut interagir avec les électrons libres du film métallique. Une partie de l'énergie du faisceau de lumière incidente est perdue dans le film métallique ce

qui provoque une diminution de l'intensité de la lumière réfléchi (extinction du faisceau réfléchi se traduisant par un creux dans la courbe de réflectivité). Ce phénomène n'a lieu que pour un angle d'incidence précis qui dépend de l'indice de réfraction du milieu en contact avec le métal. Lors d'un changement des propriétés optiques survenant par exemple lors de la fixation d'une espèce biologique sur la surface du transducteur, un déplacement des pics de réflectivité pourra être observé. La limitation principale de cette technique repose sur son principe même de transduction. En effet, ces dispositifs mesurent les variations d'épaisseur d'une couche et les variations de son indice de réfraction. Comme ces paramètres dépendent du poids moléculaire et de la quantité d'analyte qui se fixe, des molécules de bas poids moléculaire et en concentration faible seront difficilement détectables.

Il existe d'autres systèmes de transduction optiques, que nous ne détaillerons pas ici, comme l'ellipsométrie, l'interférométrie, la technique du miroir résonnant... Il faut noter que, d'une manière générale, le coût des dispositifs optiques est élevé.

### 3. 3. Transduction piézoélectrique

Ce type de transduction a retenu toute notre attention du fait, entre autre, de son "universalité". En effet, les dispositifs piézoélectriques mesurent des *variations de masse* à la surface d'une électrode de travail et permettent donc de mettre en évidence la fixation spécifique d'un analyte sur une couche bioréceptrice grâce à la variation de masse que cette fixation occasionne.

De tous les systèmes de transduction, les transducteurs piézoélectriques sont les seuls qui permettent de mesurer une grandeur physique - la masse - directement reliable à la quantité de molécules fixées.

Ce type de transduction repose sur les propriétés *piézoélectriques* des matériaux utilisés et en particulier du cristal de quartz. En effet, il existe, dans certaines conditions, une relation linéaire entre les variations de la fréquence d'oscillation d'un cristal de quartz et les variations de masse ayant lieu au niveau d'électrodes métalliques déposées sur le cristal. Ainsi, l'enregistrement des variations de la fréquence de résonance d'un cristal de quartz rend directement compte des variations de masse ayant lieu au niveau du transducteur. C'est le principe de la *microbalance à quartz* (aussi appelée QCM pour Quartz Crystal Microbalance).

Il existe d'autres dispositifs piézoélectriques comme les dispositifs à *ondes de surface* (SAW pour Surface Acoustic Wave) et les dispositifs à *ondes de plaque* (APM pour Acoustic

Plate Mode) qui diffèrent par la nature de l'onde acoustique générée au sein du cristal. Dans tous les cas, la variation de masse perturbe la propagation de cette onde au sein du cristal et il existe toujours une relation reliant la variation de fréquence à la variation de masse.

Ces différents dispositifs sont à la base de nombreux capteurs et biocapteurs (Ward et Buttry, 1990) mais le plus attractif est la microbalance à quartz du fait de son coût modique et de sa simplicité de mise en oeuvre et d'utilisation. C'est ce dispositif de transduction qui a fait l'objet de notre étude dans le but de concevoir et d'étudier un immunocapteur.

Une étude théorique sur le fonctionnement des transducteurs piézoélectriques et de la microbalance à quartz en particulier fera l'objet du deuxième chapitre.

## 4. LA COUCHE BIORECEPTRICE

### 4. 1. Les biorécepteurs

La *sélectivité* des biocapteurs est assurée par la *couche bioréceptrice* élaborée au niveau de la surface du transducteur.

De nombreux composants biologiques doués de fonction de reconnaissance et de liaison spécifiques peuvent être utilisés pour élaborer la couche bioréceptrice d'un biocapteur. Les enzymes et les anticorps sont le plus souvent utilisés, mais on retrouve également des acides nucléiques, des récepteurs et autres protéines membranaires, des lectines et des cellules entières\*.

Les *enzymes* et les *anticorps* sont deux types de protéines qui reconnaissent une structure spécifique et complémentaire sur leur partenaire (substrat ou antigène). Le plus souvent, les enzymes sont utilisées en association avec une détection électrochimique et les anticorps avec des dispositifs optiques et piézoélectriques.

---

\* Des techniques récentes permettent d'élaborer une couche chimique de polymère dont la structure "mime" celle des sites de reconnaissance de molécules biologiques, c'est la notion d'empreinte moléculaire (Wulff, 1996). En effet, on peut provoquer la polymérisation de réactifs chimiques en présence d'une molécule biologique (enzyme ou anticorps par exemple) puis celle-ci est retirée après la polymérisation : le polymère se comporte comme un "moule" de la molécule biologique en gardant ses propriétés structurales et fonctionnelles. Ce principe est évidemment très schématique et la sensibilité de telles couches est bien moins grande que celle d'une "vraie" couche biologique. Néanmoins cette voie d'étude est intéressante, notamment pour le gain en stabilité de la couche réceptrice.

La contrainte liée à l'utilisation d'enzyme pour l'élaboration d'une couche bioréceptrice est que l'analyte à détecter doit intervenir dans la réaction enzymatique (substrat ou inhibiteur).

L'utilisation des anticorps offre plus de possibilités dans le choix de l'analyte à détecter puisqu'il est possible de fabriquer des anticorps contre, à peu près, n'importe quelle molécule. La connaissance actuelle concernant la technologie des anticorps (depuis l'avènement des anticorps monoclonaux et plus récemment avec les anticorps coliclonaux et les abzymes) en font des molécules de choix pour l'élaboration d'une couche réceptrice hautement spécifique; de plus leur obtention sous forme monoclonale, leur conservation et leur manipulation sont maintenant bien établies.

Nous utiliserons donc des anticorps pour former la couche bioréceptrice à la surface des électrodes d'or de notre microbalance à quartz.

## 4. 2. Les techniques d'immobilisation

L'*immobilisation* des biorécepteurs à la surface du transducteur est une étape fondamentale dans le développement d'un biocapteur car la qualité de la couche obtenue conditionnera l'efficacité du biocapteur en terme de sélectivité, sensibilité, répétabilité et reproductibilité.

La couche devra répondre à certains critères comme le maintien de l'activité biologique, une quantité suffisante de molécules immobilisées et une bonne stabilité vis-à-vis des variations de pH, de la force ionique et des étapes de régénération de la surface... Ces critères seront déterminés par la méthode d'immobilisation choisie. Celle-ci doit aboutir à la préparation d'une couche plus ou moins structurée à la surface du transducteur de manière reproductible et homogène. Du fait de la taille importante des molécules à immobiliser et pour garantir une accessibilité suffisante pour l'analyte qui doit se fixer, une séparation spatiale suffisante des molécules doit être obtenue : la réalisation d'une monocouche n'est donc pas forcément un objectif.

Les techniques d'immobilisation peuvent être réparties en 4 classes majoritaires : l'adsorption, le greffage covalent, l'inclusion et les techniques d'assemblage moléculaire en multicouches (figure 7).

Le principe des différentes techniques d'immobilisation des biorécepteurs repose sur la nature chimique de ces derniers, le plus souvent il s'agit de protéines, comme pour les enzymes et les anticorps, ou d'acides nucléiques.

Les supports majoritaires pour réaliser l'immobilisation des biorécepteurs sont en or, en platine, en silice et en carbone.

Chaque technique d'immobilisation possède ses spécificités, le choix de la technique à utiliser dépendra du type de support, du type de molécules à immobiliser et du but recherché.

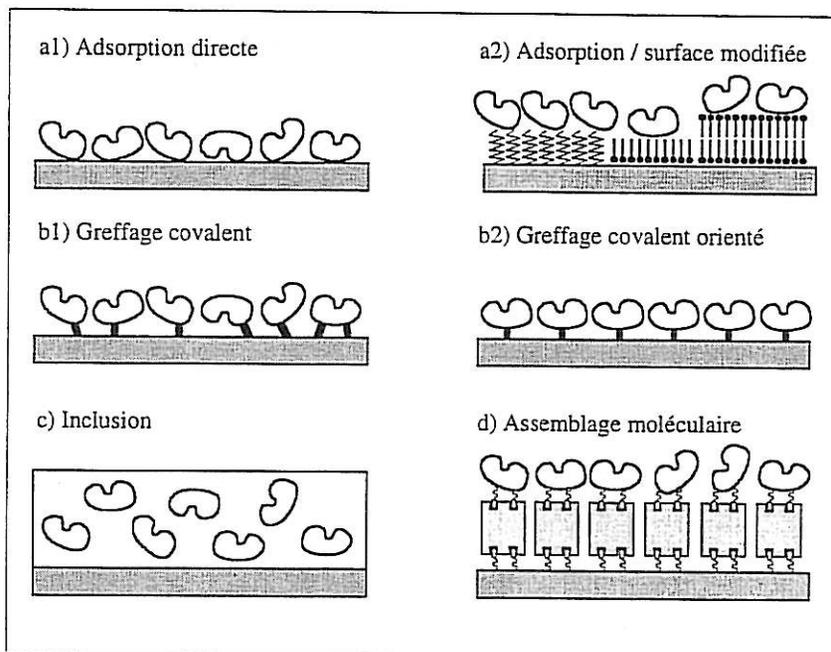


Figure 7 : Représentation schématique de différentes techniques d'immobilisation

#### 4. 2. 1. L'adsorption

L'*adsorption* des protéines sur un support est la plus simple des méthodes d'immobilisation et elle est couramment utilisée, par exemple, en immunologie analytique pour le revêtement des "plaques ELISA". L'établissement de nombreuses liaisons faibles (interactions hydrophobes, ioniques, force de Van der Waals, liaisons hydrogène) entre la surface et la protéine gouverne son adsorption. La nature du support conditionne le phénomène d'adsorption. Sur l'or celui-ci est renforcé par l'affinité très importante des atomes de soufre, présents dans les protéines, pour ce métal. Dans certains cas, l'adsorption des protéines peut entraîner leur dénaturation d'où une perte d'activité biologique. De plus, ce phénomène n'est pas contrôlable, il peut être réversible et ne permet pas de régénérer la

surface en gardant intacte la couche sensible. Toutefois cette technique est assez utilisée, surtout pour préparer des transducteurs à usage unique (Köbllinger et *al.*, 1992; Muratsugu et *al.*, 1993). Elle peut être réalisée directement sur la surface native du transducteur (figure 7a1) ou sur la surface modifiée par des monocouches d'alkyl thiols qui s'auto-assemblent, par des couches mono et bilipidiques... (figure 7a2).

#### 4. 2. 2. Greffage covalent

Le *greffage covalent* des biomolécules est une technique d'immobilisation *chimique* qui permet l'établissement de liaisons covalentes entre la molécule et le support (figure 7b1). Le greffage est réalisé par l'intermédiaire d'un agent de couplage (glutaraldéhyde, carbodiimide...) qui va créer une liaison covalente entre un groupement chimique de la surface et une fonction chimique de la molécule.

Pour les protéines il existe un grand nombre d'agent de couplage qui peuvent réagir avec différents groupements de la protéine à immobiliser (fonctions amines, thiols, hydroxyles, phénols, carboxyles, et carbohydrates).

Le greffage covalent est un phénomène irréversible qui doit permettre la régénération de la surface : des antigènes ayant interagi avec des anticorps greffés sur un transducteur peuvent être désorbés et le capteur est à nouveau utilisable. De plus, l'introduction d'un bras de couplage confère à la molécule une mobilité et une liberté stérique importante ce qui augmente l'accessibilité pour l'analyte. Cette technique d'immobilisation peut, dans certains cas, permettre l'orientation des molécules (greffage sur les résidus glycosilés de la partie Fc des immunoglobulines par exemple) ce qui optimise la probabilité de reconnaissance (figure 7b2).

La plupart des surfaces transductrices ne permettent pas un greffage direct du fait de l'absence de groupement réactif intéressant. Il est souvent nécessaire de *fonctionnaliser* cette surface, c'est-à-dire d'introduire en surface du transducteur des groupements chimiques susceptibles de réagir avec l'agent de couplage ; la fonctionnalisation permet d'assurer la continuité chimique entre la surface et la molécule à immobiliser. Cette modification des propriétés de la surface peut aussi entraîner une diminution des phénomènes d'adsorption non spécifique.

Sur l'or, les modifications chimiques peuvent s'effectuer par deux voies principales : par réaction d'organosilanes sur la surface (silanisation) et par la formation de monocouche de thiols qui s'auto-assemblent spontanément sur l'or ("Self-Assembled Monolayers : SAM"). En effet, les atomes de soufre ont une grande affinité pour l'or et les thiols à chaîne saturée (SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X) en solution s'auto-organisent spontanément sur l'or pour former une

monocouche dense, ordonnée et stable, par l'établissement de liaisons pseudo-covalentes entre les atomes de soufre et d'or (Nuzzo et *al.*, 1990). Les disulfures forment aussi des SAM, l'attachement à la surface d'or se faisant alors par l'intermédiaire de la liaison S-S (Cheng et Brajter-Toth, 1992). Tout groupement fonctionnel compatible avec un alkyl thiol pourra se retrouver en surface d'un support en or et pourra ensuite réagir avec un agent de couplage.

Le greffage covalent est très utilisé pour immobiliser des biorécepteurs en particulier pour les immunoglobulines (Billard, 1991; Johnsson et *al.*, 1991; Duan et Meyerhoff, 1994).

#### 4. 2. 3. L'inclusion

L'*inclusion* consiste à emprisonner la biomolécule dans un gel ou un polymère (figure 7c). Les matériaux les plus souvent utilisés sont l'acrylamide, le polyacrylamide, les sol-gels... et des matrices naturelles comme la gélatine et l'amidon. Cette technique d'immobilisation convient bien aux enzymes, mais entraîne souvent une diminution de l'immunoréactivité des anticorps (Avnir et *al.*, 1992). L'inclusion de biomolécules peut aussi s'effectuer dans un film d'acides gras par la technique Langmuir-Blodgett (Barraud et *al.*, 1993).

#### 4. 2. 4. Techniques d'assemblage moléculaire en multicouches

Ces techniques reposent sur les propriétés de fixation spécifiques de certaines protéines (protéine A et avidine par exemple) et permettent la construction d'assemblage moléculaire en multicouches régénérables.

La protéine A et la protéine G sont deux protéines, extraites respectivement de la paroi de *Staphylococcus aureus* et de *Streptococcus sp.*, qui se lient avec la partie Fc de certaines classes d'immunoglobulines. Le revêtement d'une surface transductrice par la protéine A (ou G) permet la fixation orientée d'anticorps (sites Fab à l'extrémité de la surface transductrice). Sur l'or, la protéine A est facilement utilisable car elle forme un complexe très stable avec ce métal sans perdre ses propriétés de fixation spécifique; elle a été, de ce fait, souvent utilisée, en particulier, sur les électrodes d'or de microbalances à quartz (Davis et Leary, 1989; König et Grätzel, 1994).

L'avidine est aussi utilisée pour immobiliser des biorécepteurs biotinylés (figure 7d). Cette glycoprotéine tétramérique, extraite du blanc d'oeuf, fixe quatre molécules de biotine avec une forte affinité (constante de dissociation à l'équilibre de l'ordre de  $10^{-15}$  M). La streptavidine est une protéine extraite de *Streptomyces avidinii* qui possède les mêmes propriétés de fixation vis-à-vis de la biotine. Toute molécule préalablement biotinylée pourra

facilement être immobilisée à la surface d'un transducteur revêtue d'avidine ou de streptavidine. Certains auteurs combinent la propriété des alkyls thiols qui s'auto-organisent sur l'or et la propriété de fixation streptavidine / biotine en utilisant des alkyls thiols biotinylés pour fonctionnaliser des électrodes d'or (Spinke et *al.*, 1993).

### 4. 3. L'interaction antigène/anticorps

L'interaction antigène/anticorps étant à la base du fonctionnement des immunocapteurs et des techniques immunoanalytiques, nous allons rappeler des notions élémentaires d'immunologie et décrire les techniques immunoanalytiques classiques.

#### 4. 3. 1. Rappels d'immunologie

##### *Définitions*

L'environnement contient une large variété de micro-organismes (bactéries, virus, champignons et parasites) qui peuvent être à l'origine de désordres pathologiques plus ou moins graves, voire mortels, chez un organisme infecté quand rien ne s'oppose à leur prolifération. Lors d'une infection, les individus normaux mettent en jeu leur *système immunitaire* pour combattre ces agents infectieux.

Le terme *immunité* caractérise la résistance des individus vis-à-vis des infections microbiennes et se définit comme l'ensemble des réactions humorales et cellulaires qui tendent à éliminer des substances étrangères.

Le système immunitaire met en jeu deux types de mécanismes : l'*immunité naturelle* et non spécifique, qui constitue une première ligne de défense souvent suffisante, représentée par la barrière cutéano-muqueuse et le système phagocytaire et l'*immunité spécifique* caractérisée par un ensemble de réactions dirigées spécifiquement contre le germe responsable et entraînant généralement sa destruction.

Les *antigènes* sont des substances, étrangères à l'organisme, capables de déclencher une réaction immunitaire spécifique puis de réagir spécifiquement avec les produits de cette réaction : les anticorps ou les lymphocytes sensibilisés.

Les *anticorps* sont définis comme des molécules dont la production, par l'organisme, est déclenchée par la présence d'un antigène et qui peuvent se lier spécifiquement avec lui.

Les motifs moléculaires présents sur l'antigène et qui sont reconnus spécifiquement par les anticorps sont les *déterminants antigéniques* ou *épitopes*.

Les anticorps appartiennent à la famille des *immunoglobulines* qui sont des glycoprotéines globulaires synthétisées par les lymphocytes B en réponse à une stimulation antigénique. Nous distinguons chez les mammifères cinq classes d'immunoglobulines : IgG, IgM, IgA, IgD et IgE qui diffèrent par leur structure et leur fonction (tableau I).

Nom	IgG	IgM	IgA	IgD	IgE
Structure	monomère	pentamère	dimère	monomère	monomère
Représentation sérique	70 - 75 %	10 %	15 - 20 %	<1 %	trace
PM g/mol	150000	970000	385000	184000	188000
Chaîne lourde	$\gamma$	$\mu$	$\alpha$	$\delta$	$\epsilon$
Particularité et fonction	lutte anti infectieuse	lutte anti infectieuse	présentes dans les sécrétions, lutte anti infectieuse locale	présentes dans la membrane des lymphocytes B	associées aux manifestations allergiques, lutte anti parasitaire

Tableau I : Caractéristiques des différentes immunoglobulines humaines

### *Structure générale des immunoglobulines*

Malgré la diversité structurale des différentes classes d'immunoglobulines, dont la fonction primordiale est de lier l'antigène, tous les anticorps ont une structure de base commune. La molécule d'IgG est l'exemple type de cette structure (figure 8).

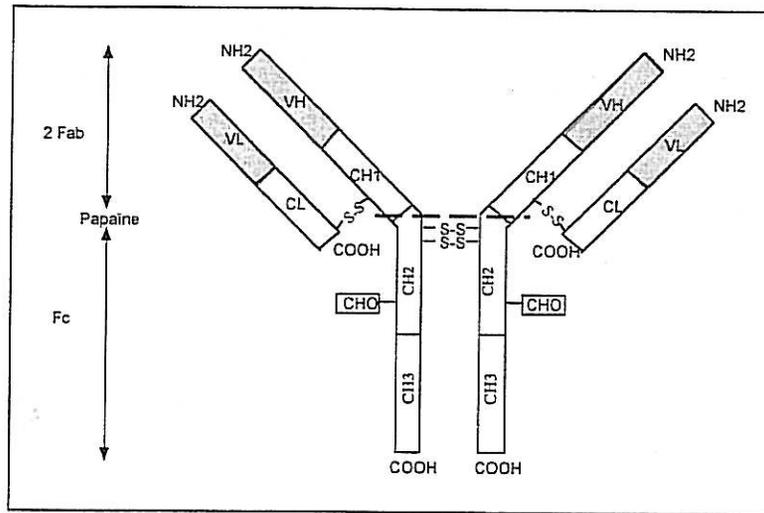


Figure 8 : Représentation schématique de la structure d'une immunoglobuline G

La molécule d'immunoglobuline G est symétrique, elle est constituée de deux chaînes lourdes (H) identiques de 450 acides aminés reliées par deux ponts disulfures et de deux chaînes légères (L) identiques de 212 acides aminés reliées aux chaînes lourdes par un pont disulfure.

La classe et la sous classe des immunoglobulines sont déterminées par la nature de la chaîne lourde :  $\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3, \gamma 4$  pour les IgG1, IgG2, IgG3, IgG4,  $\mu$  pour les IgM,  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  pour les IgA1 et IgA2,  $\delta$  pour les IgD et  $\epsilon$  pour les IgE. Pour les chaînes légères, il en existe deux types : les chaînes  $\kappa$  et  $\lambda$ .

Les régions N terminales des chaînes lourdes et légères sont caractérisées par des séquences variables appelées VH et VL. Le reste de la molécule a une structure relativement constante. La partie constante de la chaîne lourde comprend trois régions différentes CH1, CH2 et CH3 : ce sont des régions globulaires stabilisées par des ponts disulfures intracaténaux appelés domaines.

Les deux sites de liaison à l'antigène sont localisés dans les domaines variables, constitués de régions hypervariables, des chaînes lourdes et légères. La séquence en acides aminés de ces régions et leur structure caractérisent la spécificité de liaison. Une molécule d'IgG peut se lier à deux molécules d'antigène.

La molécule d'IgG est bifonctionnelle, une protéolyse limitée par la papaine la sépare en deux types de fragments :

- 2 fragments *Fab* formés par les chaînes légères et l'extrémité N terminale des chaînes lourdes qui conservent la capacité de fixer l'antigène,

- un fragment *Fc* formé par l'extrémité C terminale des chaînes lourdes qui est responsable des interactions avec les autres éléments du système immunitaire (cellules phagocytaires, cellules killer, complément).

### La liaison antigène/anticorps

De nombreuses *liaisons non covalentes* participent à la liaison entre l'épitope de l'antigène et les acides aminés (une douzaine) du site anticorps. Les forces attractives de ces liaisons sont faibles et sont très dépendantes de la complémentarité stérique entre le déterminant antigénique et le site anticorps, néanmoins leur grand nombre donne une énergie de liaison élevée.

Le déterminant antigénique et le site anticorps doivent posséder des structures complémentaires capables de se combiner. La forme du site anticorps doit être adaptée à l'épitope pour que plusieurs liaisons non covalentes puissent s'établir simultanément.

Les forces intervenant dans cette liaison sont de quatre types (figure 9) :

- les *liaisons hydrogène* qui résultent de la formation de ponts hydrogène entre des atomes appropriés,
- les *forces électrostatiques* qui sont liées à l'attraction de groupes ioniques de charges opposées,
- les *forces de van der Waals* qui sont créées par l'interaction entre différents nuages électroniques,
- les *liaisons hydrophobes* qui sont produites par l'association de groupements non polaires et hydrophobes d'où les molécules d'eau sont exclues, ces forces peuvent contribuer pour moitié à la force de liaison antigène/anticorps.

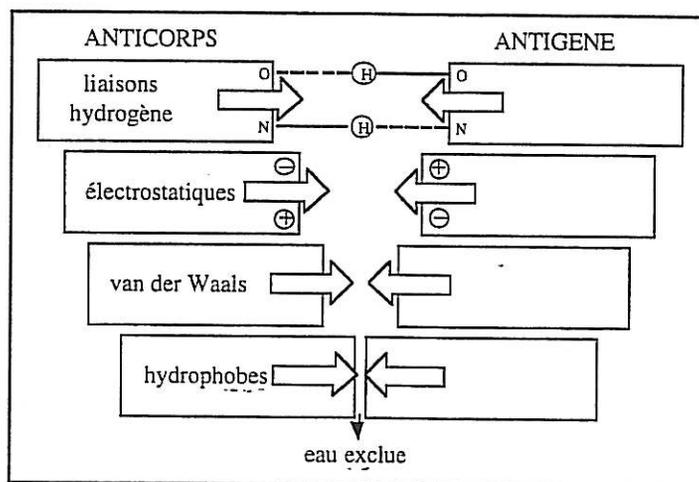
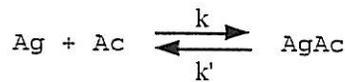


Figure 9 : Représentation schématique des différentes forces attractives intermoléculaires impliquées dans la liaison antigène / anticorps

Du fait de la nature des forces qui gouvernent l'interaction antigène/anticorps, celle-ci est fortement influencée par les conditions physico-chimiques du milieu dans lequel se déroule cette réaction. Des variations de pH, de force ionique et de température vont jouer sur l'ensemble des forces qui conditionnent l'interaction.

La force d'une liaison antigène/anticorps est appelée *affinité* de l'anticorps : elle représente l'ensemble des forces attractives et répulsives qui caractérisent l'interaction. Un anticorps de haute affinité implique des structures complémentaires parfaites (forces d'attraction importantes et faibles forces de répulsion), à l'inverse, un anticorps de faible affinité implique une complémentarité imparfaite (faibles forces d'attraction et fortes forces de répulsion).

La réaction antigène/anticorps est réversible :



où Ac représente le site anticorps, Ag le site antigène, k et k' les constantes de vitesse d'association et de dissociation du complexe antigène / anticorps.

La loi d'action de masse peut être appliquée ce qui permet de calculer l'affinité d'un anticorps à l'équilibre :

$$K = \frac{[\text{AgAc}]}{[\text{Ag}] \times [\text{Ac}]} = \frac{k}{k'}$$

où K définit la constante d'association intrinsèque de la réaction à l'équilibre et représente l'affinité du site anticorps pour l'antigène (en M<sup>-1</sup>).

La stabilité du complexe immun est d'autant plus grande que K est élevée. D'une manière générale, il est préférable de travailler avec des anticorps qui ont une forte affinité pour leur antigène.

### *Théorie de la sélection clonale, anticorps polyclonaux et monoclonaux*

Dans un organisme, il existe un immense répertoire de clones de lymphocytes B qui portent chacun un récepteur (immunoglobuline membranaire IgD) de spécificité différente. Les récepteurs préexistent à l'introduction de l'antigène, leur construction est le fruit du hasard (réarrangements dans la structure de l'ADN) qui se fait sans référence à un éventuel antigène.

La production d'immunoglobulines spécifiques d'un antigène donné repose sur le principe de la *sélection clonale* : après pénétration dans l'organisme l'antigène se fixe sur les récepteurs des lymphocytes B présentant pour lui la plus forte affinité. L'antigène sélectionne donc le(s) clone(s) de lymphocyte B qui possède(nt) des immunoglobulines le reconnaissant le plus exactement. Cette interaction entraîne l'activation spécifique de ce(s) clone(s) qui prolifère(nt) et se différencie(nt) en cellules sécrétrices d'anticorps spécifiques et en cellules mémoires.

En général, un antigène présente à sa surface plusieurs déterminants antigéniques de sorte que la réponse de l'organisme est polyclonale : différents anticorps spécifiques des différents épitopes reconnus sont produits par différents clones de lymphocytes B et toutes ces immunoglobulines se retrouvent dans la circulation sanguine (figure 10). Si un clone de lymphocytes B producteurs d'anticorps est isolé pour être mis en culture, le surnageant de culture contiendra des anticorps tous identiques (puisque descendant de la même cellule) : ce sont les *anticorps monoclonaux*. Il est possible maintenant de produire en quantité quasi illimitée des anticorps monoclonaux de spécificité connue grâce à la technique des hybridomes (Köhler et Milstein, 1975). Brièvement, un lymphocyte B sécrétant un anticorps donné est fusionné avec une cellule de myélome (type de tumeur de lymphocyte B). La cellule tumorale rend immortelle les cellules hybrides, appelées hybridomes. Ces hybridomes pourront dès lors être maintenus en culture et continuer de sécréter des anticorps de spécificité définie. Après sélection et clonage de ces cellules, les anticorps produits sont des anticorps monoclonaux.

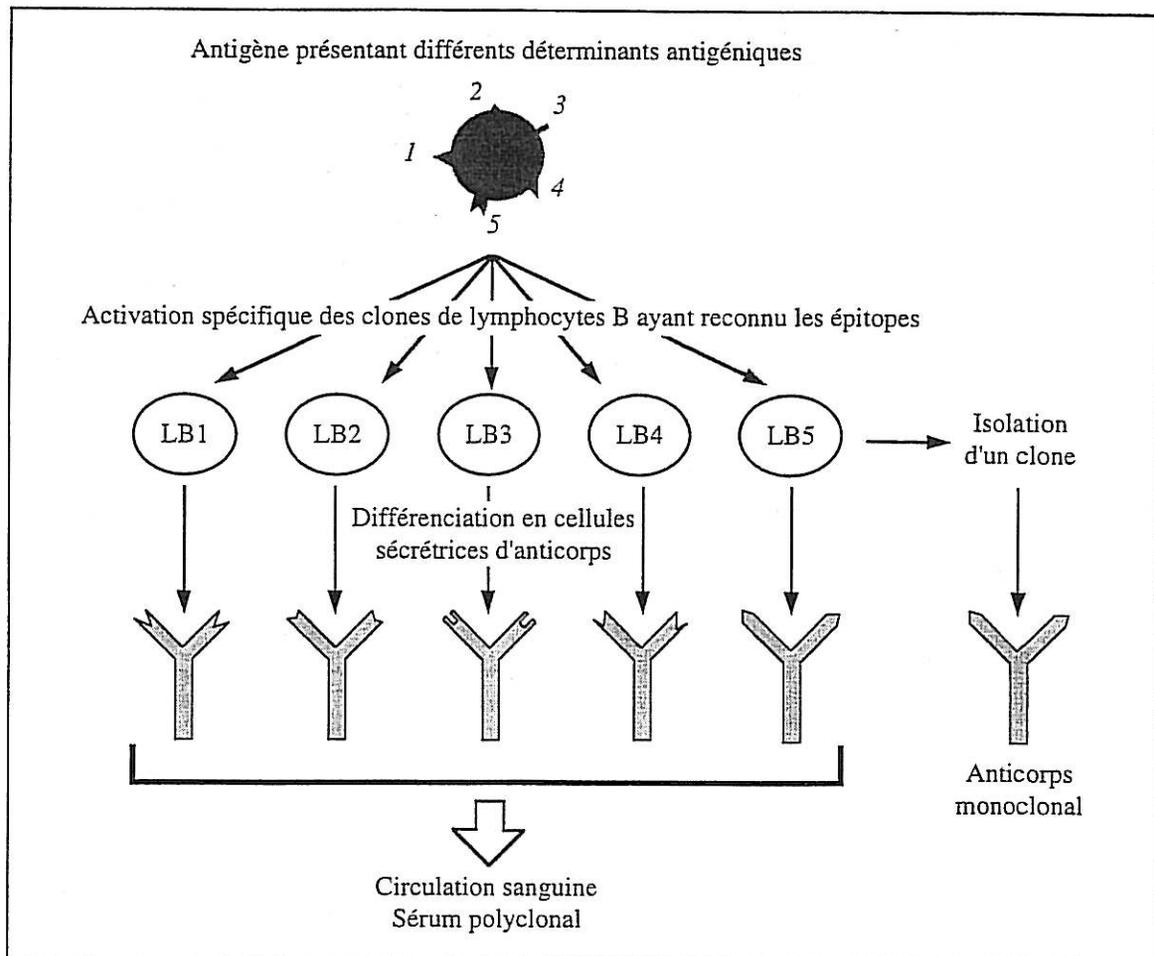


Figure 10 : Représentation schématique d'une réponse immunitaire

Les réactions antigène/anticorps sont très spécifiques, les sites de fixation des anticorps dirigés contre les épitopes d'un antigène ne sont pas complémentaires de ceux portés par un autre antigène. Toutefois, il se peut que des déterminants antigéniques soient communs à plusieurs antigènes et que des anticorps dirigés contre un épitope d'un antigène donné se fixent sur un autre antigène : nous parlons alors de *réaction croisée*.

#### 4. 3. 2. Les techniques immunoanalytiques classiques

Le principe des techniques d'immunoanalyse classiques et des immunocapteurs repose sur la spécificité de la réaction antigène/anticorps, le but de ces techniques étant de déterminer qualitativement et si possible quantitativement la présence d'un antigène dans un échantillon.

Les techniques immunoanalytiques peuvent être classées en trois catégories en fonction

du type d'observation qui rend compte de l'interaction antigène / anticorps :

- nous pouvons observer directement les effets de la réaction en réalisant, par exemple, des tests de précipitation, d'immunodiffusion, d'hémagglutination...
- nous pouvons observer un effet biologique en réalisant des tests de lyse, de différenciation ou de modification cellulaire,
- et nous pouvons observer la réaction antigène / anticorps indirectement par l'intermédiaire d'un marqueur associé à un des partenaires de la réaction : c'est le principe des immunodosages.

Quel que soit le type de marqueur utilisé dans les immunodosages (fluorescent, luminescent, radioactif ou enzymatique), il existe deux formats de test : les tests en compétition et les tests en sandwich (figure 11).

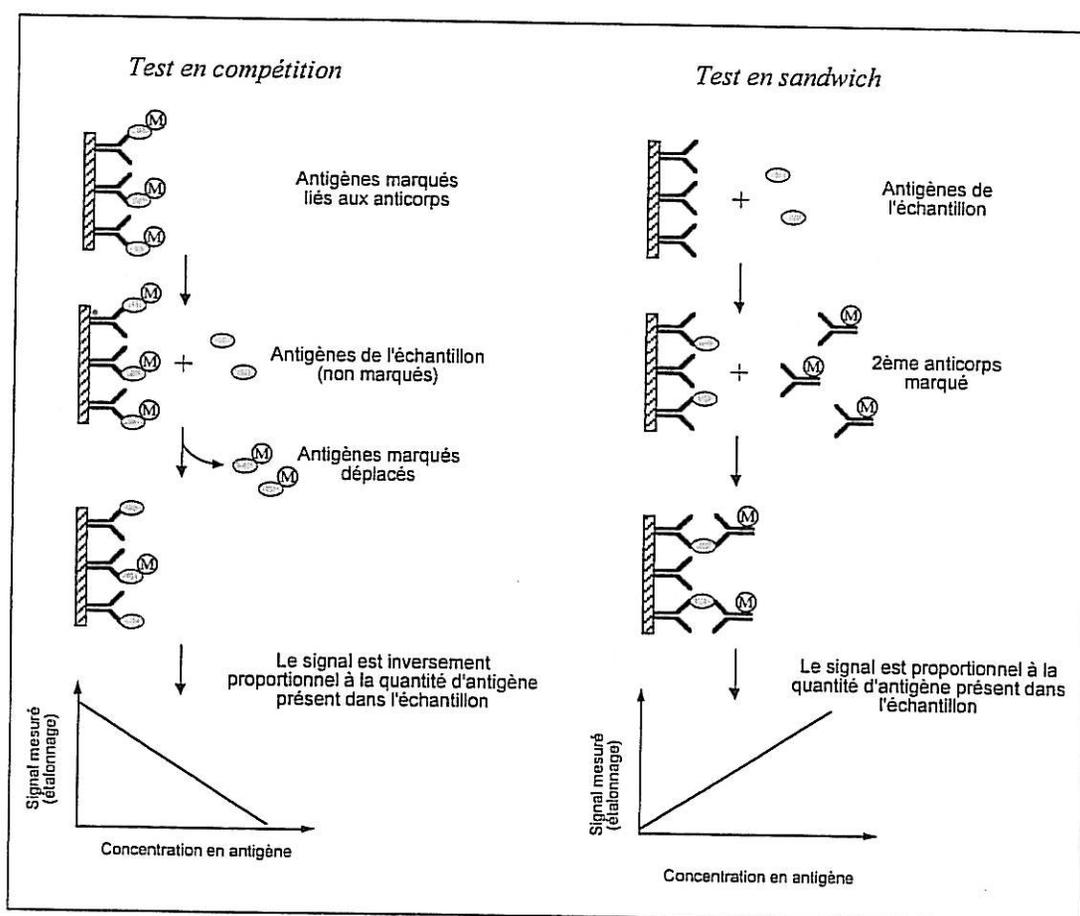


Figure 11 : Représentation schématique du principe des deux formats de test des immunodosages

Dans les tests en compétition, l'antigène à doser (non marqué) est incubé avec les anticorps en présence d'une quantité connue d'antigène marqué : les antigènes de l'échantillon entrent en compétition avec l'antigène marqué pour les sites de fixation des anticorps et

déplacent les antigènes marqués. Le signal mesuré est alors inversement proportionnel à la quantité d'antigène dans l'échantillon.

Dans les tests en sandwich, les antigènes de l'échantillon se fixent sur les anticorps immobilisés, puis un deuxième anticorps marqué (conjugué) vient se fixer sur un autre épitope de l'antigène qui est pris en "sandwich". Le signal mesuré est alors proportionnel à la quantité d'antigène dans l'échantillon. La réalisation de ce format de test implique que l'antigène présente plusieurs épitopes.

La plupart des immunodosages se réalisent en phase hétérogène c'est-à-dire qu'il est nécessaire de séparer l'analyte libre dans l'échantillon de l'analyte lié sur les anticorps (le plus souvent par des étapes de rinçage).

Les marqueurs les plus utilisés sont les radioéléments qui caractérisent les dosages radio immunologiques (RIA : Radio Immuno Assay) et les enzymes qui caractérisent les dosages immunoenzymatiques (EIA : Enzyme Immuno Assay) comme la technique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) où l'un des partenaires est immobilisé sur un support solide.

Les méthodes RIA sont très précises, hautement reproductibles et très sensibles (jusqu'au pg/ml) mais elles sont contraignantes du fait de l'utilisation de la radioactivité (laboratoires spécialisés) et elles sont limitées à cause de la difficulté d'obtenir certains bioréactifs radiomarqués.

Les méthodes EIA sont plus faciles à réaliser et à préparer, les techniques de couplage d'enzymes (la peroxydase et la phosphatase alcaline sont les deux enzymes les plus couramment utilisées) sur les anticorps ou les antigènes sont maintenant bien définies (Ternynck et Avrameas, 1987). La révélation de la présence de l'antigène se fait par la mesure de la densité optique par spectrophotométrie d'un produit coloré apparu consécutivement à l'ajout du substrat de l'enzyme. La sensibilité de ces techniques peut atteindre celle des techniques RIA et elles sont aussi reproductibles et précises. C'est une méthode dérivée de la technique ELISA qui a été utilisée pour contrôler la fixation des anticorps sur notre transducteur.

Bien que ces deux types de technique d'immunoanalyse soient très sensibles, elles ne peuvent être réalisées que par un personnel qualifié dans un laboratoire d'analyse, elles sont relativement longues (plusieurs heures), nécessitent des molécules marquées et surtout elles ne permettent pas de visualiser en temps réel l'interaction antigène/anticorps. Ceci explique l'essor important des biocapteurs en général et des immunocapteurs qui permettent de suivre la cinétique d'interaction antigène/anticorps en particulier.

## 5. ETAT DE L'ART DES IMMUNOCAPTEURS PIEZOELECTRIQUES

Cette étude bibliographique a pour but de montrer l'éventail des possibilités d'utilisation de dispositifs piézoélectriques comme transducteur d'un immunocapteur et l'évolution de leur développement.

Nous nous limiterons à l'étude des dispositifs reposant sur une microbalance à quartz, les autres systèmes (SAW et APM) ne seront pas détaillés.

La microbalance est constituée d'un cristal de quartz recouvert de deux électrodes qui, placé dans un champ électrique adéquat par l'intermédiaire d'un oscillateur, oscille à une certaine fréquence proche de la fréquence de résonance du cristal de quartz. Cette fréquence de résonance variant proportionnellement avec la masse déposée sur l'électrode de travail, la microbalance à quartz peut être utilisée comme transducteur gravimétrique d'un immunocapteur : la variation de masse engendrée par la réaction antigène/anticorps est alors mesurée par l'intermédiaire de l'enregistrement de la fréquence d'oscillation. La relation qui relie les variations de la fréquence de résonance et les variations de masse est l'équation de Sauerbrey (Sauerbrey, 1959). Celle-ci prend en compte la fréquence de résonance du cristal : plus la fréquence de résonance du cristal est élevée plus la sensibilité massique est grande (cf chapitre II).

Shons et *al.* en 1972 furent les premiers à décrire un immunocapteur en utilisant une microbalance à quartz. De l'albumine bovine sérique (BSA) était immobilisée sur un cristal prérevêtu d'une solution de Nyebar C qui formait une couche très hydrophobe capable de retenir la BSA. La fréquence du cristal ainsi préparé était mesurée à l'air ( $F_1$ ), puis celui-ci était plongé dans une solution contenant des anticorps anti-BSA. Après rinçage, le quartz était séché et la fréquence après réaction était mesurée ( $F_2$ ). La variation de fréquence, mesurée dans l'air, ( $\Delta F = F_1 - F_2$ ) était proportionnelle à la concentration d'anticorps en solution.

Cette technique de mesure de la fréquence dans l'air avant et après immunoréaction est retrouvée dans les travaux qui ont suivi. En effet, cette méthode dite du "dip and dry" était et est encore parfois utilisée car s'il est facile de faire osciller de manière stable une microbalance à quartz dans l'air, l'entretien des propriétés vibrationnelles d'un quartz immergé dans un liquide est plus compliqué. Les premières publications où nous trouvons une mesure directe de la fréquence d'oscillation d'un quartz immergé dans une solution datent de la fin des années 1980 (Davis et Leary, 1989), quand des oscillateurs plus performants, permettant d'entretenir les vibrations du cristal même en milieu liquide, ont été développés.

Le tableau suivant regroupe quelques exemples significatifs de travaux concernant l'utilisation de microbalance à quartz comme transducteur d'immunocapteur.

Auteurs	Année	Fréquence de résonance (MHz)	Technique de mesure de la fréquence	Analyte à détecter	Biorécepteur immobilisé	Format du test	Technique d'immobilisation
Muramatsu et al.	1986	9	dip and dry	<i>Candida albicans</i> en suspension en PBS	anticorps anti <i>C. albicans</i>	direct	silanisation et greffage covalent au glutaraldéhyde
Ngeh-Ngwainbi et al.	1986	9	en continu	parathion en milieu gazeux	anticorps anti parathion	direct	adsorption
Davis et Leary	1989	10	en continu	Ig G	anticorps anti Ig G	direct	adsorption de protéine A puis anticorps
Plomer et al.	1992	10	dip and dry	entérobactéries dans l'eau	anticorps anti entérobactéries	direct	- revêtement de polyéthylèneimine et glutaraldéhyde - silanisation et glutaraldéhyde - adsorption de protéine A puis Ig
Guilbault et al.	1992	10	dip and dry	atrazine dans l'eau	anticorps anti atrazine	direct	- revêtement de polyéthylèneimine et glutaraldéhyde - silanisation et glutaraldéhyde - adsorption de protéine A puis Ig
Kößlinger et al.	1992	20	en continu	anticorps anti HIV	peptide synthétique du HIV	direct	adsorption du peptide et saturation par la gélatine
Muratsugu et al.	1993	9	en continu	sérum albumine humaine	anticorps anti HSA	direct	adsorption des anticorps et saturation par BSA
Miura et al.	1993	6	en continu	methamphétamine (MA) dans l'urine	methamphétamine couplée à la BSA	en compétition (échantillon + anticorps anti MA)	adsorption de la methamphétamine couplée à la BSA
König et Grätzel	1993	10	dip and dry	globules rouges humains	anticorps anti glycophorine A	direct	- revêtement de polyéthylèneimine et glutaraldéhyde - silanisation et glutaraldéhyde - adsorption de protéine A puis Ig
Geddes et al.	1994	9	en continu	IgG de souris ou de mouton	anticorps anti IgG de souris ou de mouton	direct	formation d'une SAM carboxylée et greffage covalent au carbodiimide
Sakai et al.	1995	6	en continu	HSA	anticorps anti HSA	en sandwich	adsorption des anticorps
Chu et al.	1995	10	dip and dry	IgM humaines	anticorps de chèvre anti IgM humaines	direct	revêtement d'un polymère (HEMA/MMA), puis greffage covalent au CNBr
Steebhorn et Skadal	1997	10	en continu	atrazine dans l'eau	atrazine couplée à la BSA	en compétition	silanisation et greffage covalent de l'atrazine-BSA au glutaraldéhyde

Tableau II : Exemples d'immunocapteurs reposant sur une microbalance à quartz

Cette étude nous a permis d'orienter notre travail sur un certain nombre de points souvent négligés dans les publications, à la fois au niveau du transducteur et au niveau de la couche immunosensible.

En effet nos objectifs concernant le transducteur étaient, d'une part, de mettre au point une microbalance à quartz de grande sensibilité et stabilité et, aussi, d'étudier son mécanisme de transduction en milieu liquide avec une couche de protéine afin de valider son utilisation dans le domaine des immunocapteurs. Au niveau de la couche immunosensible, nous avons aussi cherché à contrôler son élaboration, à vérifier son immunoréactivité, à éviter les problèmes d'adsorption non spécifique et à vérifier la spécificité de la réponse.

Plus concrètement, notre but était de développer et d'étudier un immunocapteur reposant sur une microbalance à quartz fonctionnant à 27 MHz, en milieu liquide, avec une circulation des échantillons, et permettant la détection spécifique et directe de trois antigènes solubles (entérotoxine de Staphylocoque B, peroxydase et immunoglobulines G) de masses molaires différentes (28000, 44000 et 150000 g/mol) dans des gammes de concentrations intéressantes.

## CONCLUSION

Ce premier chapitre avait pour but de présenter et de faire le point sur les biocapteurs. En effet ces outils analytiques connaissent un essor considérable quant au nombre de publications depuis quelques années car ils répondent à un besoin émergeant dans de nombreux domaines d'application : détecter et identifier spécifiquement, en temps réel et de façon simple une molécule ou un micro-organisme.

Parmi les différents systèmes de transduction et les différents biorécepteurs nous avons choisi d'utiliser une microbalance à quartz en association avec un film d'anticorps qui rend spécifique la surface de notre transducteur. Ce système de transduction est parfaitement adapté pour rendre compte des interactions antigène/anticorps par la mesure de la variation de masse consécutive à la fixation des antigènes sur la couche d'anticorps immobilisés. De plus, le suivi en continu de ces variations de masse, par la mesure de la fréquence de la microbalance, permet d'étudier les cinétiques d'interactions antigène/anticorps. Un des avantages de ces dispositifs est son faible coût de revient et d'utilisation surtout au regard des dispositifs optiques déjà commercialisés mais onéreux.

*Chapitre II*

***LES TRANSDUCTEURS PIEZOELECTRIQUES  
ASPECTS THEORIQUES***

## INTRODUCTION

Ce deuxième chapitre sera consacré à l'étude théorique des transducteurs piézoélectriques qui sont à la base du développement de nombreux capteurs et biocapteurs. Après avoir rappelé quelques généralités sur le quartz et l'effet piézoélectrique, nous présenterons les principaux dispositifs mettant en jeu la propagation d'ondes ultrasonores pouvant être utilisés pour la réalisation de transducteurs. Ensuite, nous étudierons le principe de fonctionnement de la microbalance à quartz et sa sensibilité à différents paramètres physico-chimiques : la sensibilité à la masse sera exposée en détail. Enfin, nous présenterons le principe de la mesure d'admittance électroacoustique. Cette technique sera mise en œuvre afin de valider et de modéliser le fonctionnement de la microbalance à quartz dans nos conditions d'utilisation (milieu liquide et couches de protéines). Un nouveau modèle, plus explicite et plus complet que ceux existants, sera présenté brièvement : celui-ci permet de discerner clairement l'effet des différents paramètres physico-chimiques sur la réponse du résonateur.

### 1. LES TRANSDUCTEURS PIEZOELECTRIQUES

Les transducteurs piézoélectriques forment une classe de transducteurs qui mesurent, en premier lieu, des variations de masse à leur surface.

En fonction du dispositif utilisé et du type d'onde acoustique générée, des mesures peuvent être réalisées sous vide, en phase gazeuse ou en milieu liquide.

Le principe de ces transducteurs repose sur les propriétés piézoélectriques des matériaux utilisés comme, notamment, le cristal de quartz qui est majoritairement utilisé dans les applications capteurs du fait de son inertie vis-à-vis des produits chimiques et de son faible coût.

#### 1. 1. Généralités sur le quartz

Le quartz est l'un des minéraux les plus abondants de l'écorce terrestre : il forme 12% de la composition de la lithosphère comme constituant majoritaire des roches. Toutefois pour des applications nécessitant des quartz de bonne qualité, des quartz de synthèse (quartz  $\alpha$ ) sont préférentiellement utilisés aux quartz naturels. Le quartz de synthèse peut être obtenu en grande quantité, à faible coût et avec une bonne qualité cristalline.

### 1. 1. 1. Structure et propriétés du quartz $\alpha$

Le quartz  $\alpha$  cristallise dans un système hexagonal. Sa structure de base se compose de tétraèdres élémentaires de formule brute  $\text{SiO}_4$  (figure 12) liés entre eux par les sommets, chaque atome d'oxygène étant commun à deux tétraèdres. Chaque atome de silicium est entouré de quatre atomes d'oxygène.

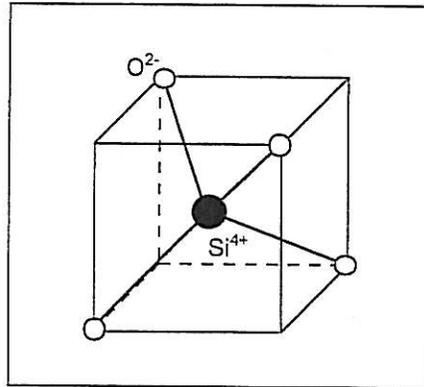


Figure 12 : Représentation schématique du tétraèdre  $\text{SiO}_4$

Le cristal de quartz (figure 13) ne possède pas de centre de symétrie, ce qui en fait un matériau piézoélectrique. Le quartz est un matériau d'une grande dureté et est chimiquement inerte. L'acide fluorhydrique est pratiquement le seul acide qui l'attaque et sa solubilité dans des solutions basiques est quasi nulle à température et pression ordinaires.

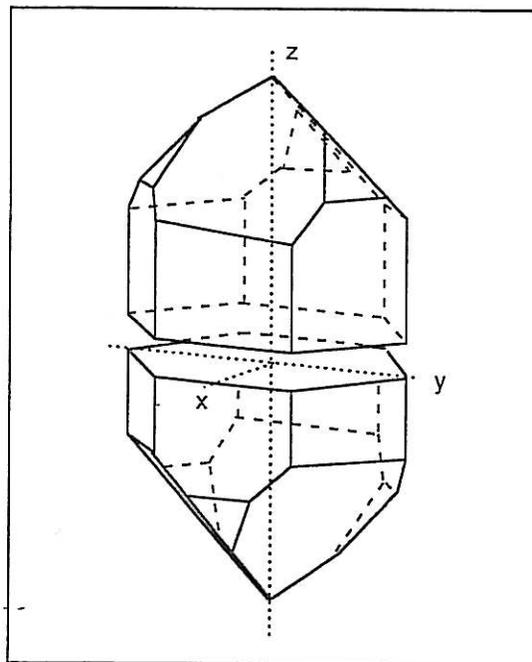


Figure 13 : Représentation schématique d'un cristal de quartz dans l'espace

### 1. 1. 2. L'effet piézoélectrique

En 1880, Jacques et Pierre Curie découvrent l'*effet piézoélectrique direct* en constatant qu'une contrainte mécanique appliquée sur les faces d'un solide cristallin provoque une déformation du cristal qui s'accompagne d'une polarisation électrique, l'amplitude du potentiel électrique étant proportionnelle à la contrainte appliquée. Cette propriété existe seulement dans les matériaux dits acentriques, c'est-à-dire qui cristallisent dans un réseau sans centre de symétrie.

Concernant le cristal de quartz, la force appliquée sur ce cristal provoque un déplacement des atomes entraînant une déformation de la liaison SiO. Cette déformation génère l'apparition de dipôles électriques conduisant à une distribution de charges électriques sur les faces du cristal. Le préfixe piézo vient du grec "piezein" qui signifie presser, la piézoélectricité traduit donc l'interdépendance des propriétés électriques et mécaniques de certains cristaux.

A l'inverse, et c'est l'*effet piézoélectrique inverse*, si une différence de potentiel est appliquée entre les faces d'un matériau piézoélectrique cela fait apparaître des contraintes au sein du matériau qui induisent sa déformation.

Cet effet est à la base du fonctionnement des transducteurs piézoélectriques. Le champ électrique issu d'une polarisation induit une réorientation des dipôles du matériau ce qui provoque sa déformation (figure 14). C'est dans les années 1920, que Cady a démontré que l'effet piézoélectrique inverse pouvait être exploité pour développer des oscillateurs très stables. En effet, l'application d'un champ électrique alternatif au sein d'un cristal de quartz provoque sa déformation : le cristal se met alors à vibrer, nous parlons d'oscillations, et une *onde acoustique* est générée au sein du matériau. Le quartz vibre préférentiellement à une certaine fréquence proche de la fréquence dite *de résonance* du cristal de quartz et ce en fonction de différents critères. Quand le quartz est inséré dans un circuit électronique approprié (oscillateur) la vibration peut être entretenue. La fréquence de l'oscillation est alors proche de la fréquence de résonance du cristal et l'amplitude de l'onde générée est maximum.

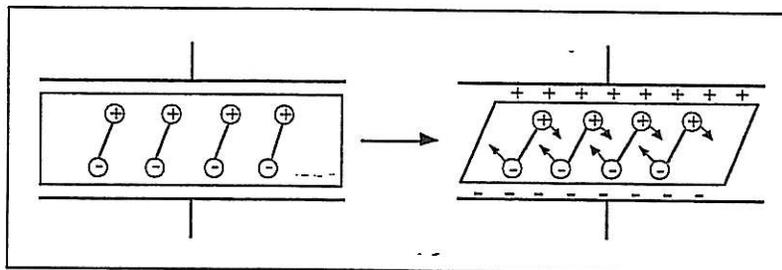


Figure 14 : Représentation schématique de la déformation d'un quartz de coupe AT polarisé

Le couplage électromécanique et les contraintes résultant du champ électrique appliqué dépendent de la symétrie du cristal, de son angle de coupe et de la configuration des électrodes excitatrices.

Le type d'ondes acoustiques générées dépend essentiellement de la coupe du cristal et de la direction du champ électrique appliqué. Il existe différents modes de vibration comme le mode de vibration en flexion, le mode de vibration longitudinale, le mode de vibration de cisaillement de face et d'épaisseur. Ce dernier mode est utilisé pour les microbalances à quartz classiques.

### 1. 1. 3. Les différentes coupes de quartz et l'effet de la température

La coupe du cristal de quartz, par rapport à ses axes cristallographiques, caractérise son mode de vibration, son domaine de fréquence et sa sensibilité aux variations de température. Le tableau III regroupe quelques coupes avec leurs modes de vibration respectifs.

Nom de la coupe	Angle par rapport à l'axe de symétrie	Mode de vibration
AT	+35°15'	Cisaillement d'épaisseur
BT	-49°	Cisaillement de face
CT	38°	Cisaillement de face
DT	-52°	Cisaillement de face
+5°X-cut	66°	Longitudinale
NT	-	Flexion

Tableau III : Caractéristiques de quelques coupes du cristal de quartz

La représentation schématique des différentes coupes du cristal de quartz par rapport aux axes cristallographiques est donnée figure 15.

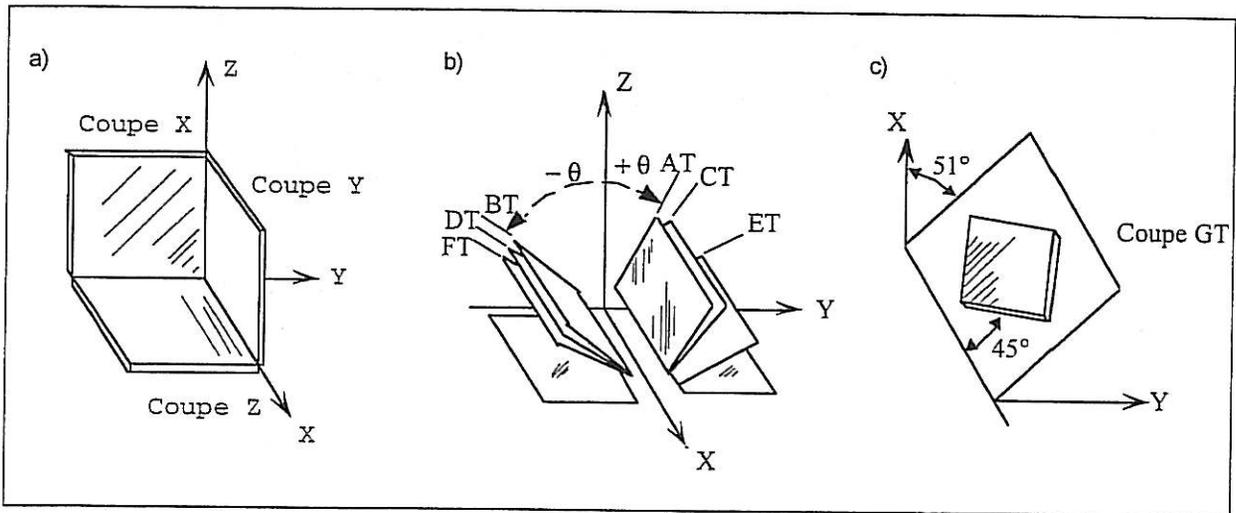


Figure 15 : Représentation des différentes coupes de cristal de quartz (d'après Mason 1964)  
 a) coupe X, Y, Z, b) coupes par rapport aux principaux axes, c) coupe GT

Les lames de quartz issues de ces différentes coupes sont plus ou moins sensibles à la température c'est-à-dire que leur fréquence de résonance varie plus ou moins en fonction des variations de température.

Les courbes de la variation relative de la fréquence de résonance en fonction de la température, pour différentes coupes, sont représentées figure 16.

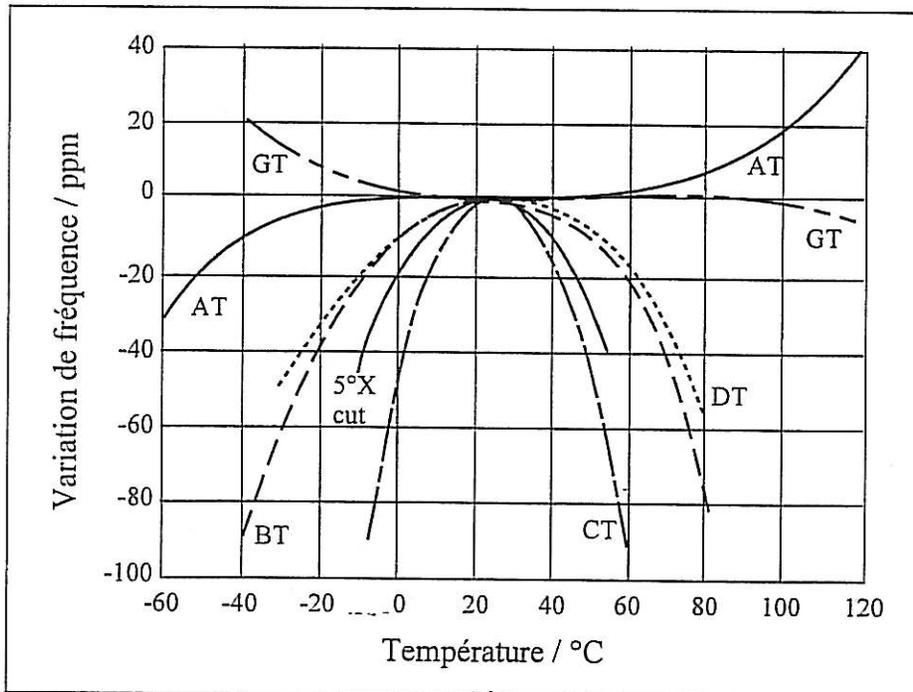


Figure 16 : Variation relative de la fréquence de résonance en fonction de la température pour différentes coupes de quartz (d'après Mason 1964)

La coupe du cristal de quartz sera choisie en fonction des propriétés souhaitées. Dans le cas d'une utilisation de type biocapteur, nous préférons la coupe AT qui est la plus stable vis-à-vis des variations de température et ce dans un domaine de température assez large (de 0 à 55°C).

La coupe GT présente aussi une grande stabilité vis-à-vis des variations de température mais elle est plus difficile à réaliser et son coefficient de qualité est inférieur à celui de la coupe AT.

## 1. 2. Les différents dispositifs piézoélectriques

### 1. 2. 1. TSM

Les dispositifs à TSM (Thickness Shear Mode) sont basés sur la propagation d'ondes acoustiques en mode de cisaillement d'épaisseur (figure 17) au sein d'une lame de cristal de quartz de coupe AT. Ces dispositifs sont à la base des *microbalances à quartz* aussi appelées "QCM" pour Quartz Crystal Microbalance.

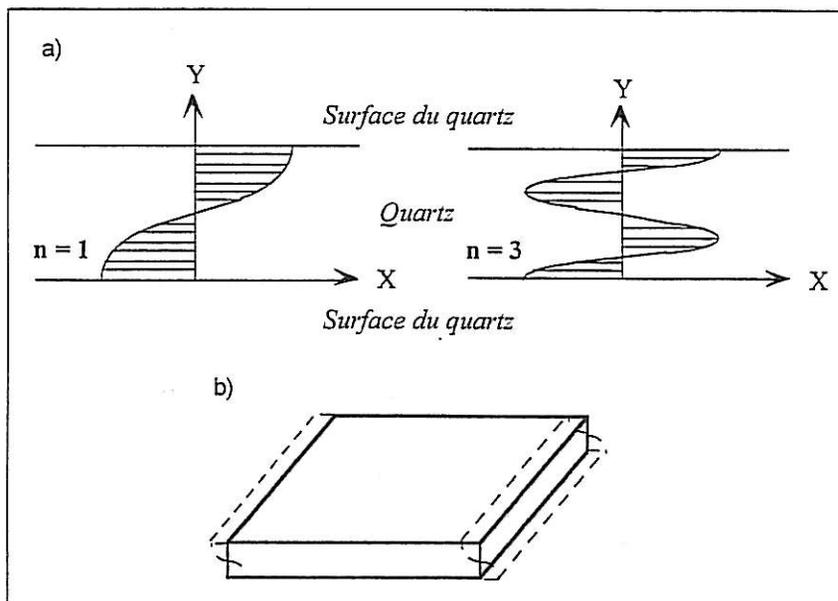


Figure 17 : a) Représentation schématique d'une onde de cisaillement d'épaisseur dans un cristal de quartz pour le mode de vibration fondamental ( $n=1$ ) et pour la troisième harmonique ( $n=3$ ), b) représentation de la vibration en cisaillement d'épaisseur

L'élément actif d'une microbalance à quartz (figure 18) est constituée d'une fine lame de quartz recouverte de deux électrodes métalliques (une sur chaque face).

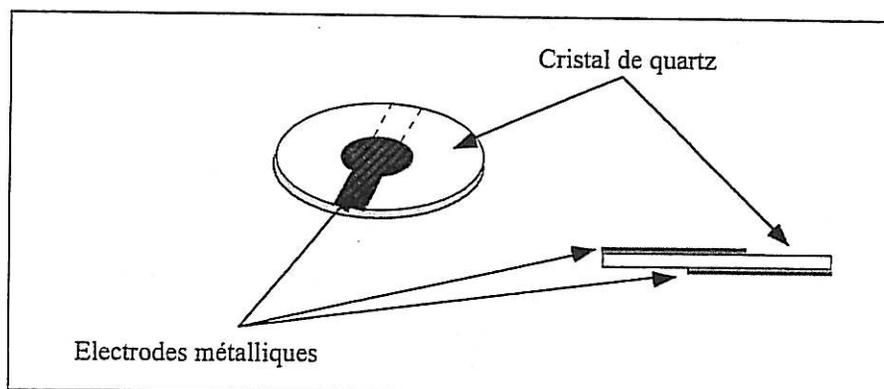


Figure 18 : Représentation schématique d'une microbalance à quartz

Les électrodes permettent d'établir un champ électrique alternatif au sein du cristal par l'intermédiaire d'un oscillateur dans lequel la lame de quartz est insérée. Le quartz oscille alors à une fréquence proche de la fréquence de résonance du cristal, ce dernier paramètre étant conditionné par l'épaisseur du cristal. Une variation de masse au niveau des électrodes induit une variation de la fréquence d'oscillation qui varie proportionnellement à cette masse. Cette variation peut alors être mesurée par l'intermédiaire d'un fréquencemètre.

La sensibilité massique d'une microbalance à quartz dépend de la fréquence de résonance du cristal : plus la fréquence de résonance est élevée plus la sensibilité est grande. La sensibilité massique de ces transducteurs peut donc être modulée en jouant sur l'épaisseur des cristaux : plus les cristaux sont fins, plus la fréquence de résonance est élevée et plus la sensibilité du dispositif est grande. Classiquement la fréquence des microbalances à quartz utilisables en milieu liquide est comprise entre 5 et 10 MHz (cf tableau II, chapitre I).

Ces dispositifs sont, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, parfaitement bien adaptés aux applications de type biocapteur. La microbalance à quartz est de ce fait le dispositif piézoélectrique le plus couramment utilisé dans ces applications en raison de sa simplicité de mise en œuvre et de son coût modique. Nous l'avons donc choisi comme transducteur de notre immunocapteur. Toutefois, il existe d'autres transducteurs piézoélectriques que nous allons décrire brièvement maintenant.

### 1. 2. 2. SAW

Les dispositifs à ondes acoustiques de surface (SAW : Surface Acoustic Wave) reposent sur la technologie des électrodes interdigitées (IDTs : Interdigital Transducers). Un exemple de configuration de telles électrodes est donné figure 19.

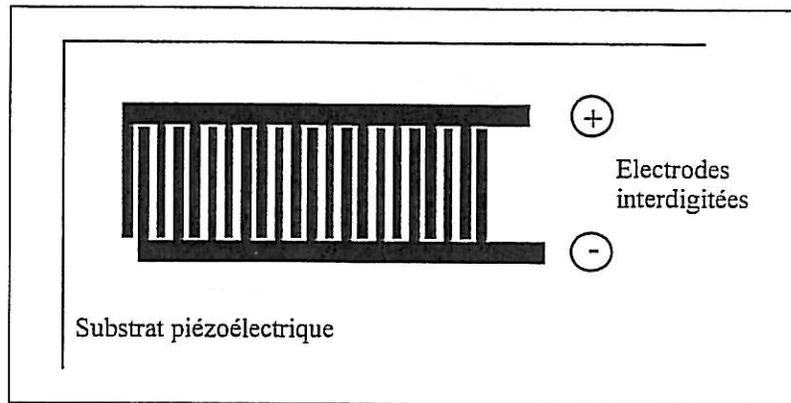


Figure 19 : Exemple de configuration d'électrodes interdigitées

Ces dispositifs sont basés sur l'étude de la perturbation de la vitesse de propagation d'une onde acoustique (onde de Rayleigh) se propageant entre deux paires d'électrodes interdigitées à la surface d'une plaque de quartz (généralement de coupe ST).

La vitesse de propagation de l'onde,  $v$ , est caractéristique du matériau utilisé et de la coupe du cristal. La fréquence de ces dispositifs est simplement fonction de l'espacement des doigts des peignes pour un matériau piézoélectrique donné.

La figure 20 représente un dispositif à onde de surface en configuration ligne à retard : deux paires de peignes sont disposées en vis-à-vis sur une plaque de quartz. La couche sensible est comprise entre ces deux paires d'électrodes. Lorsque cette couche s'alourdit la vitesse de propagation de l'onde acoustique va diminuer proportionnellement à la masse déposée.

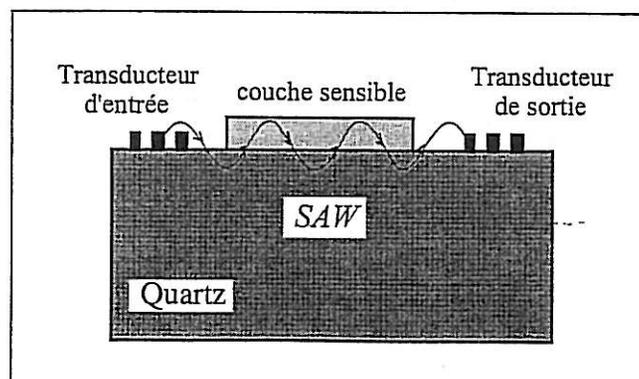


Figure 20 : Représentation schématique d'un dispositif à ondes de surface (SAW)

Les fréquences atteintes avec ce type de dispositif sont en général de l'ordre de 30 à 200 MHz et la sensibilité massique augmente avec le carré de la fréquence comme pour les microbalances à quartz. Des sensibilités massiques très importantes peuvent donc être obtenues mais ces dispositifs à onde de Rayleigh ne fonctionnent qu'en milieu gazeux et ne permettent pas de mettre au point des capteurs utilisables en milieu liquide.

Un autre type d'onde acoustique de surface peut être utilisé avec un autre matériau piézoélectrique que le cristal de quartz pour un fonctionnement en milieu liquide. Il s'agit du dispositif à SH-SAW (Shear Horizontally polarized Surface Acoustic Wave) fonctionnant avec des matériaux piézoélectriques à base de tantalate de lithium (Welsch et *al.*, 1996).

### 1. 2. 3. APM

Les dispositifs à onde de plaque (APM : Acoustic Plate Mode) sont constitués d'un quartz (plus épais que dans le cas des dispositifs à ondes acoustiques de surface) servant de guide d'onde et de deux paires d'électrodes interdigitées, l'une servant de générateur et l'autre de collecteur de l'onde acoustique. Une représentation schématique d'un dispositif à onde de plaque est donnée figure 21.

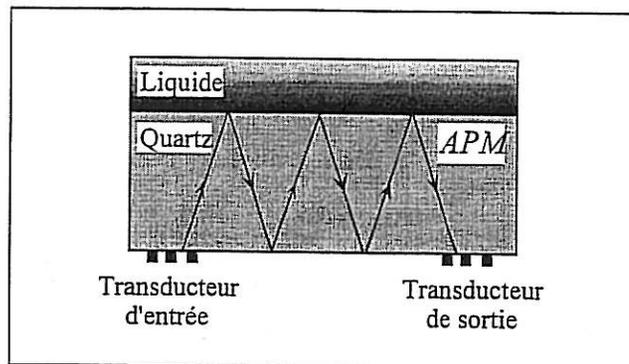


Figure 21 : Représentation schématique d'un dispositif à onde de plaque

Les transducteurs interdigités sont déposés sur la face arrière du quartz alors que la zone sensible est localisée sur la face avant du cristal : ces dispositifs peuvent donc être utilisés en milieu gazeux comme en milieu liquide (les contacts électriques n'ont pas besoin d'être isolés puisqu'ils ne sont pas en contact avec le liquide).

Les ondes de plaques se propagent par réflexion sur les parois du substrat piézoélectrique. La superposition de ces ondes donne naissance à une série d'ondes de plaque ayant chacune une fréquence différente. La diminution de l'épaisseur du quartz induit

l'augmentation de la fréquence des ondes de plaque ainsi que l'augmentation de la différence de fréquence entre deux modes.

Les dispositifs à ondes de plaque et leur électronique associée sont conçus pour fonctionner sur un mode particulier. Leurs fréquences de fonctionnement vont de 25 à 200 MHz. Comme pour les dispositifs à SAW, une variation de masse au niveau de la zone sensible se répercutera sur la vitesse de propagation de l'onde de plaque (Hoummady, 1991).

Si les dispositifs à onde de surface et à onde de plaque sont des transducteurs théoriquement très sensibles, peu d'applications de type biocapteur sont retrouvées dans la littérature. Ceci est en partie dû au bruit de fond très important de la fréquence, celui-ci étant d'autant plus difficile à minimiser que la fréquence du dispositif est élevée. De plus, la mise en œuvre de ces dispositifs (électronique associée, électrodes interdigitées) est compliquée et coûteuse et fait appel à des techniques de microtechnologie assez sophistiquées.

## 2. PRINCIPE DE LA MICROBALANCE A QUARTZ

### 2. 1. L'équation de Sauerbrey

Les propriétés piézoélectriques du cristal de quartz permettent de corréler les variations de la fréquence d'oscillation et la masse déposée (ou retirée) sur la surface active du quartz.

Sauerbrey en 1959 fût le premier à établir une équation simple reliant les variations de masse et de fréquence, dans l'air, en considérant que la variation de masse consécutive à un dépôt est assimilable à une augmentation de masse du quartz lui-même.

L'épaisseur du quartz,  $e$ , est liée à la fréquence de résonance du cristal par la relation suivante :

$$e = \frac{n\lambda_n}{2}$$

$$\text{avec } \lambda_n = v \times T = v \times \frac{1}{f_n}$$

où :  $n$  est le rang de l'harmonique (1, 3, 5...),  $\lambda_n$  est la longueur d'onde correspondant à la fréquence,  $v$  est la vitesse de propagation de l'onde ultrasonore

dans le quartz ( $3340 \text{ m. s}^{-1}$ ),  $T$  est la période et  $f_n$  est la fréquence de résonance du cristal en Hz (fréquence fondamentale pour  $n = 1$  ou fréquence correspondant à l'harmonique pour  $n$  différent de 1).

$$e = \frac{nN}{f_n} \quad (1)$$

$$\text{avec } N = \frac{v}{2}$$

L'épaisseur du quartz est aussi liée à sa masse par la relation suivante :

$$e = \frac{m}{A\rho} \quad (2)$$

où :  $m$  est la masse du quartz en g,  $A$  est la surface du quartz active (i.e. la surface des électrodes) en  $\text{cm}^2$  et  $\rho$  est la densité du quartz ( $2,648 \text{ g. cm}^{-3}$ ).

En combinant les équations (1) et (2), la relation suivante est obtenue :

$$f_n = \frac{nNA\rho}{m} \quad (3)$$

Si une masse  $\Delta m$ , s'attachant uniformément sur une des électrodes, de surface  $A$ , est ajoutée et en faisant l'hypothèse que cette masse correspond à une augmentation de masse du quartz lui-même l'équation devient :

$$\Delta f_n + f_n = \frac{nNA\rho}{m + \Delta m} \quad (4)$$

où :  $\Delta f_n$  correspond à la variation de fréquence consécutive à la variation de masse.

En réarrangeant l'équation (4) nous obtenons :

$$\Delta f_n + f_n = \frac{nNA\rho}{m(1 + \frac{\Delta m}{m})} \quad (5)$$

En faisant l'hypothèse que  $\Delta m$  est très petit devant  $m$ , sont obtenues successivement :

$$\Delta f_n + f_n = \frac{nNA\rho}{m} \times \left(1 - \frac{\Delta m}{m}\right) \quad (6)$$

$$\Delta f_n = \frac{nNA\rho}{m} \times \left(1 - \frac{\Delta m}{m}\right) - f_n \quad (7)$$

$$\Delta f_n = \frac{nNA\rho}{m} \times \left(1 - \frac{\Delta m}{m}\right) - \frac{nNA\rho}{m} \quad (8)$$

$$\Delta f_n = -\frac{nNA\rho}{m^2} \times \Delta m \quad (9)$$

En remplaçant  $m$  par  $\frac{nNA\rho}{f_n}$  la relation suivante est finalement obtenue :

$$\Delta f_n = -\frac{1}{N\rho} \times \frac{f_n^2}{n} \times \frac{\Delta m}{A} \quad (10)$$

L'application numérique donne alors :

$$\Delta f_n = -2,26.10^{-6} \times \frac{f_n^2}{n} \times \frac{\Delta m}{A} \quad (11)$$

$$\text{d'où } \Delta f_n = -k \times \frac{\Delta m}{A} \quad (12)$$

avec  $k = 2,26.10^{-6} \times \frac{f_n^2}{n}$  en Hz. g<sup>-1</sup>.cm<sup>2</sup> qui représente le coefficient de sensibilité massique de la microbalance à quartz.

L'équation de Sauerbrey (11) montre qu'une augmentation de masse au niveau de l'électrode provoque une diminution de la fréquence et que la sensibilité massique d'une microbalance à quartz augmente avec le carré de la fréquence de résonance du cristal utilisé.

Cette propriété est particulièrement intéressante puisqu'il suffit, pour augmenter la sensibilité d'une microbalance, d'utiliser des quartz ayant une fréquence de résonance élevée.

La fréquence de résonance fondamentale d'un cristal de quartz est inversement proportionnelle à son épaisseur : plus le quartz est mince, plus sa fréquence de résonance est élevée. C'est donc l'épaisseur du cristal qui limite la sensibilité des microbalances puisqu'en dessous d'une certaine limite les quartz sont trop fins et deviennent alors difficilement manipulables. De plus, l'électronique associée aux fréquences de résonance élevées est aussi plus difficile à mettre en oeuvre.

Par exemple, un cristal de coupe AT oscillant à 6 MHz en mode fondamental a une épaisseur de 280  $\mu\text{m}$ , et pour une fréquence fondamentale de 9 MHz l'épaisseur est de 190  $\mu\text{m}$ . La limite physique pour des quartz d'une taille classique (diamètre de l'ordre d'une dizaine de millimètres) se situe aux alentours de 10 MHz en fréquence de résonance fondamentale.

Néanmoins, la sensibilité d'une microbalance à quartz peut encore être augmentée, malgré cette limite, en travaillant sur une *harmonique* de la fréquence fondamentale. C'est cette voie que nous avons choisie pour mettre au point une microbalance "ultrasensible" fonctionnant à 27 MHz. En effet, des quartz ayant une fréquence de résonance fondamentale de 9 MHz peuvent osciller à 27 MHz sur la troisième harmonique par le biais d'un oscillateur adéquat.

Le tableau IV regroupe les différents coefficients de sensibilité théorique correspondant à différentes fréquences de résonance.

Fréquence de résonance en MHz	Epaisseur du cristal en $\mu\text{m}$	Coefficient de sensibilité théorique calculé à partir de l'équation de Sauerbrey en $\text{Hz.g}^{-1}.\text{cm}^2$	Gain en sensibilité par rapport à une microbalance à 6 MHz
6 sur le mode fondamental	278	$8,14. 10^7$	-
9 sur le mode fondamental	185	$18,31. 10^7$	x2,25
9 sur le partiel 3 soit 27 MHz	185	$54,95. 10^7$	x6,75
27 sur le fondamental	62	$164,85. 10^7$	x20,25

Tableau IV : Sensibilité théorique de différentes microbalances ayant différentes fréquences de résonance

En passant d'une microbalance à quartz fonctionnant à 6 MHz à un dispositif oscillant à 27 MHz (sur le partiel trois d'un quartz à 9 MHz) une augmentation de la sensibilité massique théorique d'un facteur environ 7 est obtenue. Ce gain est 3 fois plus important en travaillant à

27 MHz sur la fréquence de résonance fondamentale (soit une augmentation d'un facteur 20 de la sensibilité par rapport à un dispositif fonctionnant à 6 MHz).

Les limites de détection théoriques peuvent être calculées à partir des coefficients de sensibilité pour différentes microbalances, celles-ci sont présentées dans le tableau V.

Fréquence de résonance en MHz	Coefficient de sensibilité théorique calculé à partir de l'équation de Sauerbrey (en Hz.g <sup>-1</sup> .cm <sup>2</sup> )	Masse correspondant à une chute de fréquence de 1 Hz (en ng/cm <sup>2</sup> )	Masse correspondant à une chute de fréquence de 1 Hz pour une électrode de 0,2 cm <sup>2</sup> (en ng)
6 sur le mode fondamental	8,14. 10 <sup>7</sup>	12,28	2,457
9 sur le mode fondamental	18,31. 10 <sup>7</sup>	5,46	1,092
9 sur le partiel 3 soit 27 MHz	54,95. 10 <sup>7</sup>	1,82	0,364

Tableau V : Limites de détection théoriques pour différentes microbalances à quartz

Les fréquencesmètres permettent de mesurer la fréquence des quartz avec une précision inférieure au dixième de Hz, nous pourrions donc envisager une limite de détection encore plus basse. Néanmoins, il faut considérer le bruit de fond de la fréquence, qui augmente avec la sensibilité, et qui peut être stabilisé au niveau du Hz dans le meilleur des cas.

La limite de détection théorique du dispositif mis au point est de 364 pg pour une électrode de 0,2 cm<sup>2</sup> et pour une variation de fréquence de 1 Hz. Du point de vue pratique, nous nous sommes limités à un quartz à 9 MHz sur le partiel 3 car les quartz de fréquence de résonance 27 MHz sont de diamètre trop faible.

## 2. 2. Comparaison des sensibilités massiques des différents transducteurs piézoélectriques

Le tableau VI regroupe les différentes sensibilités théoriques des trois principaux transducteurs piézoélectriques : les dispositifs TSM, SAW et APM.

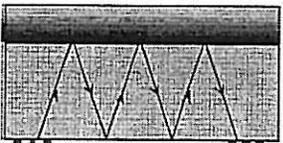
Dispositif	Coefficient de sensibilité théorique $k$ en Hz. g <sup>-1</sup> . cm <sup>2</sup>	$\Delta$ masse correspondant à un $\Delta f$ de 1 Hz pour une fréquence de résonance donnée ( $f$ )
<p>TSM</p> 	$k = -2,26.10^{-6} \times \frac{f_n^2}{n}$	$f = 6 \text{ MHz} \rightarrow 12,3 \text{ ng.cm}^{-2}$ $f = 27 \text{ MHz (9 MHz sur le partiel 3)} \rightarrow 1,8 \text{ ng.cm}^{-2}$
<p>SAW</p> 	$k = -2,26.10^{-6} \times f^2$	$f = 200 \text{ MHz} \rightarrow 0,01 \text{ ng.cm}^{-2}$
<p>APM</p> 	$k = -20f \text{ (pour } n \geq 1)$	$f = 104 \text{ MHz} \rightarrow 0,5 \text{ ng.cm}^{-2}$

Tableau VI : Sensibilités massiques théoriques des différents transducteurs piézoélectriques

Les dispositifs à SAW présentent la meilleure sensibilité théorique (10 pg.cm<sup>-2</sup>) mais ne fonctionnent qu'en milieu gazeux.

Pour des dispositifs fonctionnant en milieu liquide, les transducteurs à modes de plaque sont théoriquement plus sensibles que les microbalances à quartz, bien que cet écart soit moins important pour des microbalances fonctionnant à haute fréquence comme notre dispositif. Mais, pratiquement le bruit de fond des dispositifs à mode de plaque est très important et difficile à réduire en raison des fréquences d'utilisation très élevées. Ceci relativise cette différence de sensibilité par rapport aux microbalances à quartz, qui sont, en outre, beaucoup plus faciles à mettre en œuvre pour un coût considérablement moins important.

### 2. 3. 2. Influence combinée du liquide et d'un dépôt

Martin (Martin et *al.*, 1991) a démontré que dans le cas d'un dépôt de faible masse effectué dans un liquide Newtonien, les variations de fréquence dues à la masse déposée et au couplage avec le liquide sont additives.

Sa théorie repose sur une analyse électromécanique qui aboutit à une modélisation électrique d'un résonateur simultanément chargé par un film mince et un liquide. En faisant les hypothèses suivantes : épaisseur des électrodes négligeable, masse déposée rigidement liée au quartz, continuité du déplacement à l'interface quartz / film (hypothèses de Sauerbrey) et en considérant que le liquide est d'épaisseur semi infinie, l'équation suivante est obtenue :

$$\Delta_f \cong -\frac{2f_s^2}{n\sqrt{c_{66}\rho_q}} \left[ \rho_f h_f + \left( \frac{\rho_L \eta_L}{4\pi f_s} \right)^{\frac{1}{2}} \right] \quad (17)$$

où :  $f_s$  est la fréquence de résonance série du quartz,  $n$  est l'ordre de l'harmonique,  $c_{66}$  est la constante élastique complexe du quartz,  $\rho_L$  la densité du liquide,  $\rho_q$  la densité du quartz,  $\rho_f$  la densité du film,  $\eta_L$  la viscosité dynamique du liquide et  $h_f$  l'épaisseur du film.

En introduisant  $\sqrt{\frac{c_{66}}{\rho_q}} = v_q$ , vitesse de propagation de l'onde acoustique dans le quartz,

et en se plaçant sur le mode fondamental ( $n=1$ ), l'équation (17) devient :

$$\Delta_f \cong -\left[ \frac{2f_s^2}{v_q \rho_q} \rho_f h_f + f_s^{\frac{1}{2}} \left( \frac{\rho_L \eta_L}{\pi c_{66} \rho_q} \right)^{\frac{1}{2}} \right] \quad (18)$$

Nous pouvons remarquer que deux termes distincts s'ajoutent : le premier correspond à la variation de fréquence liée au film déposé (d'après Sauerbrey, équation (11)) et le deuxième correspond à la variation de fréquence liée au contact avec le liquide (d'après Kanazawa, équation (15)). Ainsi, les variations de fréquence de la microbalance à quartz dues à la masse déposée et au liquide sont additives.

Cette relation montre que pour relier *strictement* la variation de fréquence à la masse d'un dépôt (purement élastique), les propriétés du liquide (viscosité et densité) et la température doivent rester constantes lors du dépôt. D'une part, une variation de température peut faire varier la fréquence de résonance (même pour des quartz de coupe AT qui sont les moins

sensibles à ce facteur) et d'autre part, une variation de température peut entraîner une modification de la viscosité des solutions ce qui conduit aussi à une variation de fréquence.

De plus, le dépôt lui-même n'est pas purement élastique comme il est considéré dans les hypothèses de départ, surtout si nous considérons une couche de protéines. Les propriétés visco-élastiques de cette couche peuvent aussi jouer sur la fréquence de résonance de la microbalance en parallèle de l'effet purement massique.

Dans le cadre de notre application immunocapteur, nous nous intéressons à une réponse *relative* de la microbalance et non pas à une réponse absolue, puisque nous réalisons une gamme d'étalonnage avec des solutions d'antigène en concentration connue et que la réponse de la solution à tester est comparée à cette gamme d'étalonnage. Il est néanmoins important de comprendre et de modéliser, le comportement de la microbalance en milieu liquide et avec une (ou plusieurs) couche(s) de protéines. En particulier, pour essayer de discriminer les différents effets (masse du dépôt et propriétés physico-chimiques du liquide et du dépôt) qui font varier la fréquence de la microbalance.

### **3. ETUDE DU MECANISME DE TRANSDUCTION DE LA MICROBALANCE A QUARTZ PAR DES MESURES D'ADMITTANCE ELECTROACOUSTIQUE**

#### **3. 1. Introduction**

Nous avons vu qu'il était important de comprendre le mécanisme de transduction de la microbalance à quartz dans le cadre de notre étude et en particulier pour discriminer les effets sur la réponse en fréquence de différents paramètres. Ceci est possible grâce à la mesure de l'admittance électroacoustique du résonateur à quartz.

#### **3. 2. Définitions et intérêt de la mesure d'admittance électroacoustique**

Un résonateur à quartz peut être modélisé par un *circuit électrique équivalent* (figure 22), connu sous le nom de Butterworth-van Dyke, constitué d'une capacité statique,  $C_p$ , en parallèle avec une branche dynamique (une résistance,  $R$ , une inductance,  $L$  et une capacité,  $C$ , placées en série).

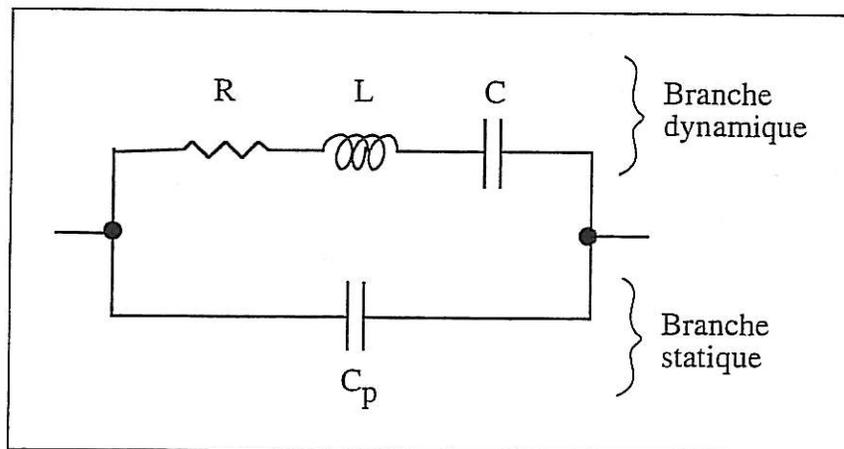


Figure 22 : Circuit électrique équivalent modélisant le comportement électrique d'un quartz

Les caractéristiques électriques de la microbalance à quartz peuvent être évaluées à travers une grandeur physique appelée *admittance électroacoustique*, définie comme le rapport entre le courant traversant le quartz et la tension d'excitation appliquée entre ses électrodes (l'admittance électroacoustique,  $Y$ , est la grandeur inverse de l'impédance électroacoustique,  $Z$ ).

La mesure de l'admittance électroacoustique permet donc de déterminer les éléments du circuit équivalent qui peuvent être reliés aux propriétés physiques du quartz mais aussi aux propriétés du dépôt massique et aux propriétés du liquide en contact avec le quartz (Granstaff et Martin, 1994). Elle peut permettre ainsi de faire la distinction entre les effets, sur la réponse globale en fréquence de la microbalance, des différents phénomènes qui surviennent à la surface du transducteur, telles que les variations de masse, de viscosité et de densité de la solution et de viscoélasticité de la couche sensible déposée à la surface du quartz.

Notons que lors de cette mesure le quartz est dit *passif* : il est soumis à une tension électrique sinusoïdale et son admittance au voisinage de sa fréquence de résonance est mesurée, alors qu'un quartz utilisé en microbalance est dit *actif* : c'est-à-dire que nous le soumettons à des oscillations, entretenues par le quartz lui-même, sur son mode fondamental ou sur ses harmoniques et les variations de sa fréquence de résonance sont mesurées.

### 3. 3. Théorie

Pour un résonateur à quartz, en référence au circuit équivalent de Butterworth-van-Dyke modélisant un quartz non chargé (figure 22), l'admittance électroacoustique calculée est donnée par la relation suivante :

$$Y = j\omega C_p + \frac{1}{R + j\omega L + \frac{1}{j\omega C}} \quad (19)$$

En séparant partie réelle et imaginaire, l'admittance devient :

$$Y = G + jB \quad (20)$$

où G est la conductance telle que,

$$\text{Re}(Y) = G = \frac{R}{R^2 + \left(L\omega - \frac{1}{C\omega}\right)^2} \quad (21)$$

et B la susceptance,

$$\text{Im}(Y) = B = \omega C_p - \frac{L\omega - \frac{1}{C\omega}}{R^2 + \left(L\omega - \frac{1}{C\omega}\right)^2} \quad (22)$$

En combinant ces expressions, au voisinage de la résonance, la relation suivante est obtenue :

$$\left(G - \frac{1}{2R}\right)^2 + (B - \omega_s C_p)^2 = \left(\frac{1}{2R}\right)^2 \quad (23)$$

avec  $\omega_s = 2\pi f_s$

Dans le plan de Nyquist, où l'axe des abscisses correspond à l'axe des réels et l'axe des ordonnées correspond à l'axe des imaginaires, l'équation (23) est celle d'un cercle tangent à l'axe des imaginaires, de rayon  $1/2R$  et de centre de coordonnées  $(1/2R, \omega_s C_p)$ . La figure 23 donne une représentation de l'admittance d'un quartz dans le plan de Nyquist (Reese et Kanazawa, 1986).

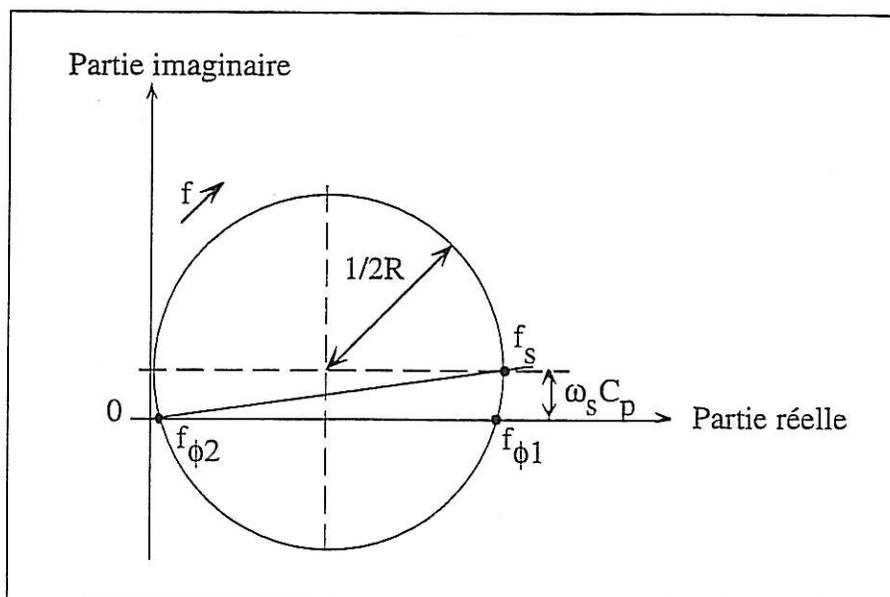


Figure 23 : Représentation de l'admittance d'un quartz dans le plan de Nyquist

Des fréquences particulières peuvent être définies dans la représentation dans le plan de Nyquist, elles sont visualisées dans la figure 23. Celles-ci peuvent être comparées à la fréquence délivrée par la microbalance.

La fréquence  $f_s$  est la fréquence correspondant au maximum de la conductance, elle est appelée fréquence de résonance série. Elle est définie par l'équation suivante (Noël et Topart, 1994) :

$$f_s = \frac{1}{2\pi} \frac{1}{\sqrt{L C}} \quad (24)$$

Cette fréquence série dépend de la masse, des propriétés visco-élastiques de la couche et de la viscosité et de la densité du liquide. Les fréquences  $f_{\phi 1}$  et  $f_{\phi 2}$  sont les fréquences pour lesquelles la partie imaginaire de l'admittance du résonateur s'annule (dites fréquences à phase nulle). Expérimentalement, la fréquence d'oscillation mesurée à l'aide d'un dispositif microbalance se situe toujours en valeur absolue entre  $f_s$  et  $f_{\phi 1}$  pour les oscillateurs que nous utilisons et pour des mesures en milieu liquide.

L'évolution de la fréquence de la microbalance consécutivement à un dépôt en milieu liquide est facilement mesurable (c'est notre transducteur) mais nous ne savons pas la calculer théoriquement. Par contre,  $f_s$  est à la fois facilement déterminable (comme nous venons de le voir à partir des mesures d'admittance) et nous pouvons calculer théoriquement ses variations en fonction des différents paramètres caractéristiques du dépôt et du liquide (comme nous le

verrons plus loin). Il est donc intéressant de comparer les variations de la fréquence de la microbalance et celles de la fréquence série. Pour ce faire, nous avons mis au point un dispositif expérimental qui nous permet de réaliser alternativement sur le même transducteur des mesures d'admittance (quartz en mode passif) et de fréquence microbalance (quartz en mode actif).

Nous pouvons également déterminer la valeur de la résistance motionnelle,  $R$ , à partir des mesures d'admittance. Ce paramètre n'est pas sensible à la masse, mais dépend des propriétés viscoélastiques de la couche, de la densité et de la viscosité du liquide.

## 4. MODELISATION DU FONCTIONNEMENT DU RESONATEUR PIEZOELECTRIQUE

### 4. 1. Introduction

L'objectif de la modélisation est de calculer théoriquement la fréquence série et la résistance motionnelle d'un résonateur à quartz en tenant compte des caractéristiques physico-chimiques du film et du liquide. Il s'agira de prédire l'influence de ces paramètres sur la réponse du résonateur. Parmi tous les modèles physiques qui permettent de simuler le comportement du résonateur à quartz (Granstaff et Martin, 1994; Filiâtre, 1994), le modèle développé par Gabrielli (Gabrielli et *al.*, soumise) présente une approche relativement simple, claire et complète du problème. De plus, ce modèle permet de simuler facilement le comportement électroacoustique de couches additionnées successivement sur le résonateur à quartz. Nous commencerons, dans ce sous-chapitre, par donner la définition de quelques grandeurs caractéristiques puis nous présenterons rapidement le modèle. Enfin, nous terminerons par une simulation concernant l'évolution de la fréquence série et de la résistance motionnelle en fonction des paramètres caractéristiques du film : masse et coefficient de cisaillement complexe. Ce dernier caractérise les propriétés viscoélastiques du dépôt.

### 4. 2. Rappels généraux

Au sein des matériaux piézoélectriques, les propriétés élastiques et piézoélectriques sont couplées. Avec les notations habituelles pour un cristal de quartz deux équations sont obtenues en fonction de deux variables indépendantes,  $S_6$  et  $E_2$  :

$$T_6 = c_{66}S_6 - e_q E_2 + \eta_q \frac{\partial S_6}{\partial t} \quad (25)$$

$$D_2 = e_{26}S_6 + \epsilon_q E_2 \quad (26)$$

La première partie de l'équation (25) représente la relation linéaire (modèle à une seule dimension) entre le tenseur des contraintes ( $T_6$ ) et le tenseur des déformation du matériau ( $S_6$ ), le coefficient  $c_{66}$  étant la constante de rigidité élastique. Cette relation est communément appelée loi de Hooke. Le deuxième élément correspond à la contribution piézoélectrique où  $E_2$  est le champ électrique et  $e_q$  la constante piézoélectrique. La dernière partie concerne le terme de perte ou d'adsorption ("viscosité du matériau") où la constante de viscosité du cristal,  $\eta_q$ , est introduite. La deuxième équation (26) représente l'expression du déplacement électrique,  $D_2$ , en fonction des contraintes et du champ électrique,  $\epsilon_q$  étant la constante diélectrique du quartz.

Le déplacement en cisaillement,  $u_x(y,t)$ , peut s'écrire d'après la loi de Newton. Pour un modèle unidimensionnel, l'équation de propagation s'écrit alors :

$$\frac{\partial T}{\partial y} = \rho \frac{\partial^2 u_x}{\partial t^2} = \rho \frac{\partial v_x}{\partial t} \quad (27)$$

où  $T$  est la contrainte externe,  $v_x$  la vitesse et  $\rho$  est la masse volumique du cristal.

A partir de cette équation, il est alors possible de trouver une solution générale et de calculer les vitesses de déplacement,  $v_x$ .

Une impédance électrique correspond au rapport entre une tension et un courant. Par analogie en mécanique, il est possible d'assimiler la tension électrique à la contrainte ( $T_6$ ) et le courant électrique avec la vitesse ( $v_x$ ). Dans ce cas,  $Z$ , l'impédance acoustique du matériau est définie par :

$$Z = -\frac{T_6}{v_x} \quad (28)$$

En réorganisant cette relation (Rosembaum, 1988), il vient :

$$Z = \sqrt{\rho \times C} \quad (29)$$

où  $\rho$  représente la masse volumique du matériau et  $C$  le coefficient complexe de cisaillement.

Il faut aussi définir la constante de propagation complexe :

$$\theta = j \times \omega \times \sqrt{\frac{\rho}{C}} \quad (30)$$

### 4. 3. Modélisation

Une analogie entre les variables mécaniques et électriques permet de calculer, relativement simplement, l'admittance électroacoustique du résonateur à quartz chargé. Des rappels sur les modèles basés sur les lignes de transmission seront donnés et plusieurs cas seront distingués : matériau non piézoélectrique chargé ou non, matériau piézoélectrique non chargé et chargé et enfin résonateur chargé plongeant dans un liquide. Ce dernier cas correspond à notre configuration, c'est-à-dire au résonateur à quartz fonctionnant en milieu liquide avec un film déposé à sa surface.

#### 4. 3. 1. Cas d'un matériau non piézoélectrique

La figure 24 présente le cas d'un matériau non piézoélectrique chargé. Il est alors possible de calculer son impédance caractéristique,  $Z_{in}$ . L'impédance de charge est noté  $Z_L$  et correspond à l'impédance caractéristique vue par notre matériau. Ce dernier est caractérisé par son impédance acoustique,  $Z$ , sa constante de propagation complexe,  $\theta$  et son épaisseur,  $h$ .

Alors  $Z_{in}$  se calcule à partir l'équation suivante :

$$Z_{in} = Z \times \frac{Z_L + Z \times \text{th}(\theta h)}{Z + Z_L \times \text{th}(\theta h)} \quad (31)$$

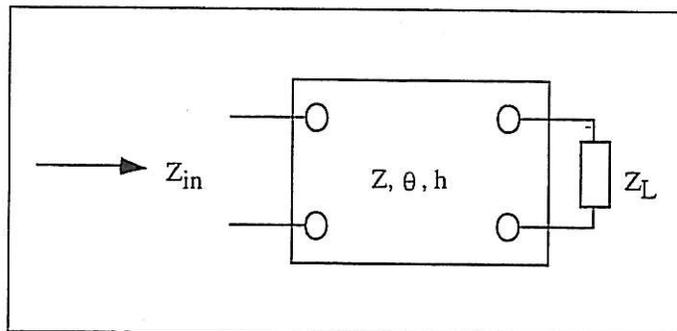


Figure 24 : Représentation schématique de l'impédance caractéristique,  $Z_{in}$ , d'un matériau ou d'une solution en fonction de l'impédance de charge,  $Z_L$

Pour le cas particulier où le matériau est dans l'air, l'impédance de charge,  $Z_L$ , peut être considérée comme nulle et il vient pour l'impédance caractéristique après simplification :

$$Z_{in} = Z \times \text{th}(\theta h) \tag{32}$$

Lorsque plusieurs couches, non piézoélectriques, sont placées les unes sur les autres, il est possible de calculer l'impédance caractéristique globale. Chaque couche,  $i$ , sera caractérisée par son impédance acoustique,  $Z_i$ , sa constante de propagation complexe,  $\theta_i$ , et son épaisseur,  $h_i$ .  $Z_{in}$  pour la couche  $i$  est calculée grâce à l'équation 31 où l'impédance de charge correspond à l'impédance caractéristique de la couche  $i+1$ .

### 4. 3. 2. Cas d'un résonateur à quartz ou d'un matériau piézoélectrique seul

Le circuit équivalent de Mason (O'Donnell et *al.*, 1981) permet de calculer l'impédance électroacoustique du résonateur non chargé comme nous pouvons le voir sur la figure 25. Ce modèle basé sur les lignes de transmission est utilisé et des paramètres fondamentaux, caractéristiques du matériau piézoélectrique, sont alors définis :

$$Z_1 = A Z_q \tanh (\theta_q h_q / 2) \tag{33}$$

$$Z_2 = A \frac{Z_q}{\sinh (\theta_q h_q)} \tag{34}$$

où  $A$  est la surface active du transducteur,  $Z_q$  l'impédance acoustique du quartz,  $\theta_q$  la constante de propagation complexe de l'onde ultrasonore et  $h_q$  l'épaisseur du quartz.

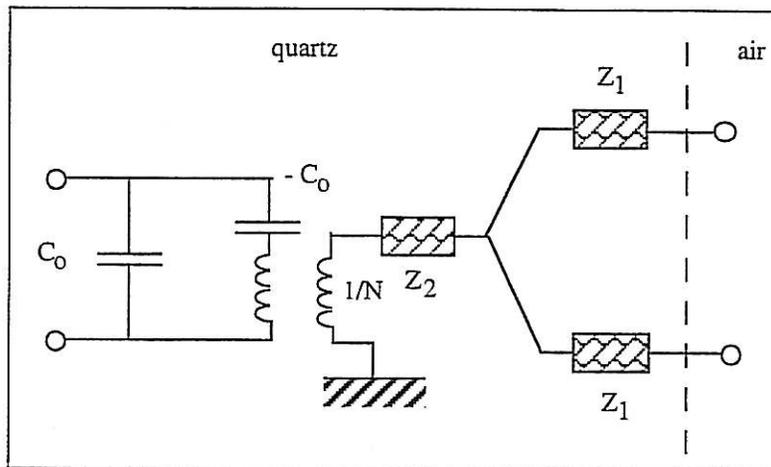


Figure 25 : Représentation schématique du circuit équivalent de Mason du quartz seul dans l'air

La capacité statique du cristal,  $C_o$ , est définie classiquement comme suit :

$$C_o = \frac{\varepsilon_q A}{h_q} \quad (35)$$

où  $\varepsilon_q$  représente la constante diélectrique du quartz,  $A$  la surface active et  $h_q$  l'épaisseur du quartz.

Un terme de transformation, caractéristique du phénomène piézoélectrique, est alors posé afin de faciliter les calculs :

$$N = \left( \frac{e_q C_o}{\varepsilon_q} \right)^2 \quad (36)$$

L'impédance motionnelle du résonateur,  $Z_m$ , s'écrit alors :

$$Z_m = \frac{j}{\omega \times C_o} + \frac{Z}{N^2} \quad (37)$$

où  $Z$  se calcule avec  $Z_1$  et  $Z_2$  (figure 25).

Il vient alors :

$$Z = Z_2 + \frac{1}{\frac{1}{Z_1} + \frac{1}{Z_1}} \quad (38)$$

L'admittance électroacoustique théorique,  $Y$ , du résonateur est calculée à partir des deux branches du circuit équivalent : statique et motionnelle, avec l'impédance motionnelle,  $Z_m$ .

$$Y = jC_o\omega + \frac{1}{Z_m} \quad (39)$$

#### 4. 3. 3. Cas d'un résonateur à quartz chargé

Dans le cas d'un dispositif chargé (électrode, film, solution...), l'impédance globale doit tenir compte des impédances de charge sur chaque face du cristal (figure 26).

Nous avons toujours :

$$Z_m = -\frac{1}{j\omega C_0} + \frac{Z}{N^2} \quad (40)$$

mais dans ce cas, en tenant compte de  $Z_{L1}$  et  $Z_{L2}$ , il vient :

$$Z = Z_2 + \frac{1}{\frac{1}{Z_1+Z_{L1}} + \frac{1}{Z_1+Z_{L2}}} \quad (41)$$

où  $Z_{L1}$  et  $Z_{L2}$  représentent les impédances de charge sur chacune des faces du cristal.

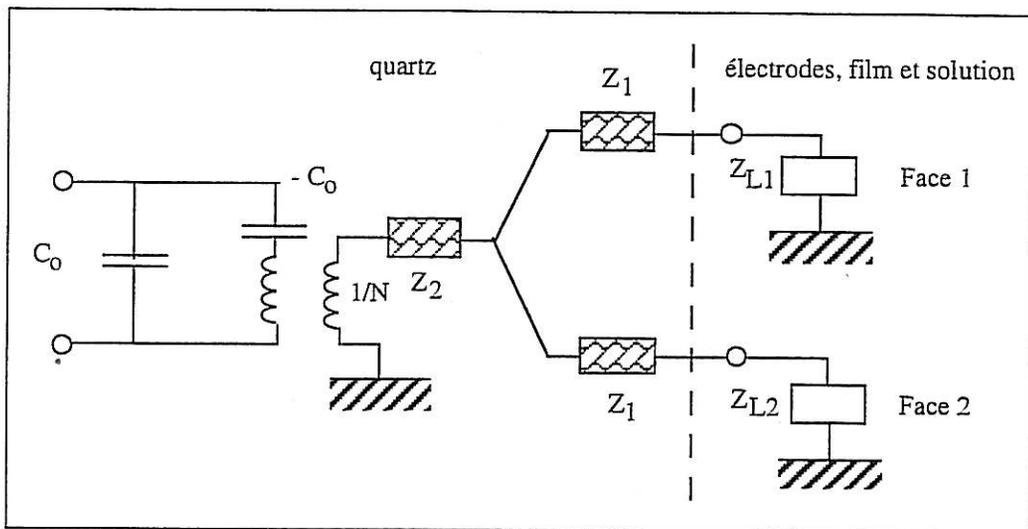


Figure 26 : Représentation schématique du circuit équivalent de type Mason du résonateur à quartz chargé

L'admittance électroacoustique théorique,  $Y$ , du résonateur est calculée à partir des deux branches du circuit équivalent : statique et motrice, avec l'impédance motrice,  $Z_m$ .

$$Y = jC_0\omega + \frac{1}{Z_m} \quad (42)$$

#### 4. 3. 4. Cas de la microbalance à quartz avec un dépôt et en milieu liquide

Pour notre application, nous nous situons dans la configuration suivante :

- charge sur la face 1 du cristal : air / électrode d'or
- charge sur la face 2 du cristal : liquide semi infini / film / électrode d'or.

L'impédance de charge,  $Z_L$ , sur chaque face est calculée pour pouvoir estimer  $Z$  (équation 37). Dans ce cas précis, la charge sur la face 1 devient, d'après la figure 27, et avec un contact avec l'air :

$$Z_{L1} = Z_{e1} \operatorname{th}(\theta_{e1} h_{e1}) \tag{43}$$

avec  $Z_{L1}$  impédance de charge sur face 1,  $Z_{e1}$ , impédance acoustique de l'électrode en or,  $\theta_{e1}$ , constante de propagation complexe et  $h_{e1}$  épaisseur de l'électrode.

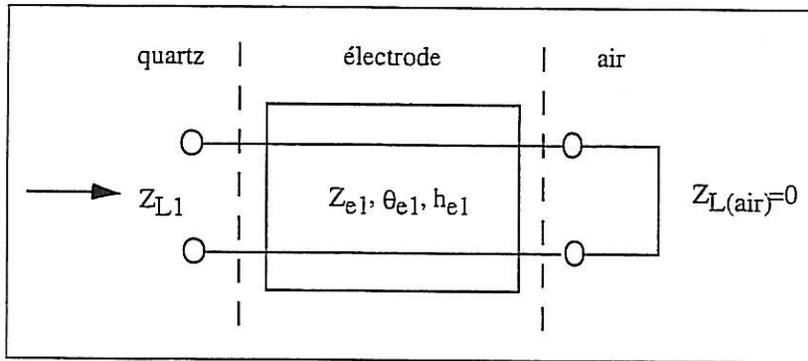


Figure 27 : Représentation schématique de l'impédance caractéristique d'une électrode à l'air

Pour la face 2, il est nécessaire d'utiliser la relation (31) pour mettre "en cascade" les différents milieux comme le présente la figure 28. La charge constituée par la solution et le film devient :

$$Z_{EF} = Z_f \times \frac{Z_{so} + Z_f \times \operatorname{th}(\theta_f h_f)}{Z_f + Z_{so} \times \operatorname{th}(\theta_f h_f)} \tag{44}$$

où  $Z_f$  est l'impédance acoustique du film,  $\theta_f$ , la constante de propagation complexe,  $h_f$  l'épaisseur du film et  $Z_{so}$  l'impédance acoustique de la solution.

Ainsi, l'impédance de charge de la face 2 se calcule comme suit à partir de  $Z_{EF}$  (figure 28) :

$$Z_{L2} = Z_{e2} \times \frac{Z_{EF} + Z_{e2} \times \operatorname{th}(\theta_{e2} h_{e2})}{Z_{e2} + Z_{EF} \times \operatorname{th}(\theta_{e2} h_{e2})} \tag{45}$$

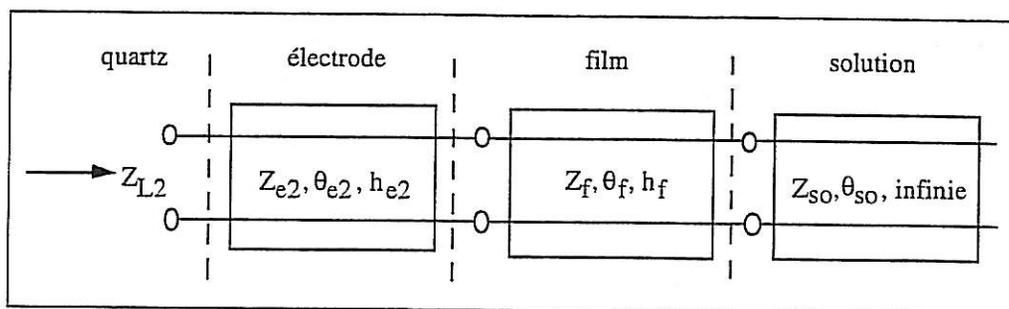


Figure 28 : Représentation schématique de l'impédance caractéristique d'une électrode chargée par un film au contact d'une solution

La connaissance de  $Z_{L1}$  et  $Z_{L2}$  permet de calculer  $Z$  et par conséquent  $Z_m$ . Lors de la simulation, l'impédance motionnelle  $Z_m$  est une fonction de la fréquence (pulsation) : nous pouvons calculer numériquement la valeur de fréquence qui annule la partie imaginaire de  $Z_m$  et qui correspond à la fréquence série  $f_s$ . La résistance motionnelle  $R$  équivaut simplement à la partie réelle de  $Z_m$ .

## 4. 4. Simulation du fonctionnement de la microbalance à quartz

### 4. 4. 1. Généralités

Notre but est de calculer l'admittance électroacoustique,  $Y$ , d'un résonateur aux alentours de 27 MHz, sur lequel se trouve une monocouche fictive de protéines : nous tiendrons compte de la masse adsorbée et des propriétés viscoélastiques de cette dernière (caractérisées par le coefficient de cisaillement complexe). Dans ce calcul, la masse de protéines est maintenue constante et c'est le coefficient de cisaillement complexe qui est changé. Celui-ci tient compte, à la fois, du coefficient de cisaillement élastique du film (caractérisant son élasticité) et de sa viscosité. Son influence sur la réponse de la fréquence série et de la résistance motionnelle sera examinée. L'idée est d'estimer l'importance de ce paramètre sur la réponse de notre transducteur par rapport à la contribution purement massique due au film déposé.

La densité du film est prise égale à  $1200 \text{ kg/m}^3$  (Rodalh et al., 1997) et son épaisseur est de  $50 \text{ \AA}$ . Nous travaillons dans ce qui suit à masse constante, cette dernière correspond approximativement à celle d'un film de protéines. Les tableaux VII et VIII regroupent les différentes données relatives au quartz et aux électrodes en or (Bouché-Pillon, 1996) que nous avons fixées pour réaliser les simulations. Concernant la viscosité et la densité de la solution, nous avons pris les valeurs correspondant à celles de l'eau.

Epaisseur, $\mu\text{m}$	Masse volumique, $\text{kg/m}^3$	Constante piézoélectrique, $\text{C/m}^2$	Coefficient complexe de cisaillement
183	2651	0,091	$2,947 \times 10^{10} + jx\omega \times 50 \times 10^{-4}$

Tableau VII : Données utilisées concernant le quartz

Epaisseur, $\text{Å}$	Densité, $\text{kg/m}^3$	Coefficient de rigidité élastique, $\text{N/m}^2$
1400	19300	$27,8 \times 10^9$

Tableau VIII : Données utilisées concernant les électrodes en or

#### 4. 4. 2. Influence du coefficient de cisaillement élastique du film sur la réponse du résonateur

Nous allons d'abord étudier l'influence des propriétés élastiques du dépôt (assimilé à une couche de protéine) sur la réponse du résonateur en analysant les résultats des simulations de l'admittance ou plus précisément en calculant l'évolution de  $f_s$  et R. Pour une viscosité constante de la couche ( $0,1 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), la figure 29 présente l'évolution de  $f_s$  retranchée de sa valeur dans l'eau sans film ( $f_s$  dans l'eau =  $26968002 \text{ Hz}$ ) en fonction du coefficient de cisaillement élastique.

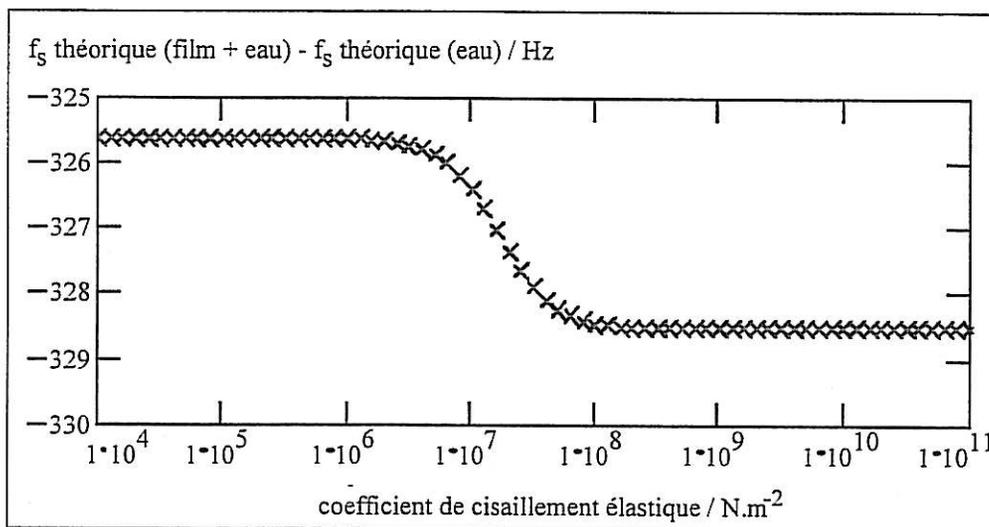


Figure 29 : Evolution de la fréquence série théorique en fonction du coefficient de cisaillement élastique

Pour des valeurs de coefficient élastique de cisaillement, proche de  $10^{10} \text{ N/m}^2$ , le film peut être considéré comme purement élastique : la variation de  $f_s$  correspondant à l'addition du film, en milieu liquide, correspond alors à une diminution de  $328,5 \text{ Hz}$ . Cette réponse équivaut

à la contribution purement massique du film. Pour une viscosité fixe et une masse constante, nous constatons que la réponse de  $f_s$  en fonction du coefficient de cisaillement élastique varie peu, ces variations étant inférieures à 1 %, même pour une gamme de ce coefficient très grande. Les variations des propriétés élastiques de la couche de protéines adsorbées influencent donc peu la réponse de  $f_s$  à la masse.

La résistance motionnelle théorique,  $R_{th}$ , varie elle aussi faiblement en fonction du coefficient de cisaillement élastique comme le présente la figure 30 : pour une résistance théorique de 523,8  $\Omega$  dans l'eau sans film déposé sur le résonateur, la variation théorique n'atteint pas 0,1 % lorsque le coefficient de cisaillement élastique du film déposé varie. Il est à noter que cette valeur de  $R_{th}$  ne varie pas lors de l'ajout d'un matériau purement élastique (coefficient de cisaillement de l'ordre de  $10^{10}$  N/m<sup>2</sup>) comme le prévoit la théorie.

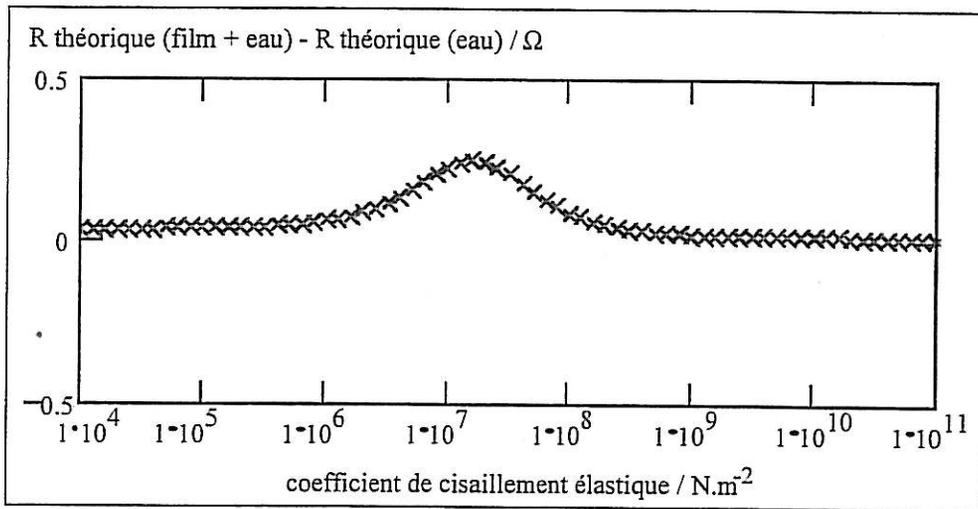


Figure 30 : Evolution de la résistance motionnelle théorique en fonction du coefficient de cisaillement élastique

#### 4. 4. 3. Influence de la viscosité du film sur la réponse du résonateur

Pour étudier l'influence des variations de la viscosité du film sur la réponse du résonateur, nous avons maintenu constant le coefficient de cisaillement élastique (fixé à  $10^6$  N/m<sup>2</sup>) pour s'affranchir des effets élastiques de la couche et n'étudier que ses propriétés visqueuses. Les figures 31 et 32 présentent l'influence des variations de la viscosité du film sur  $f_s$  et  $R_{th}$  calculées.

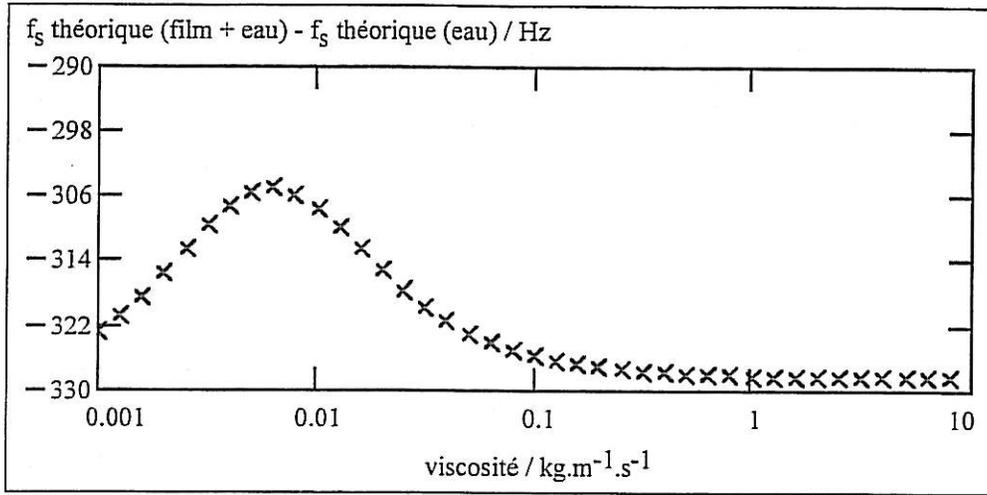


Figure 31 : Evolution de la fréquence série théorique en fonction de la viscosité du film

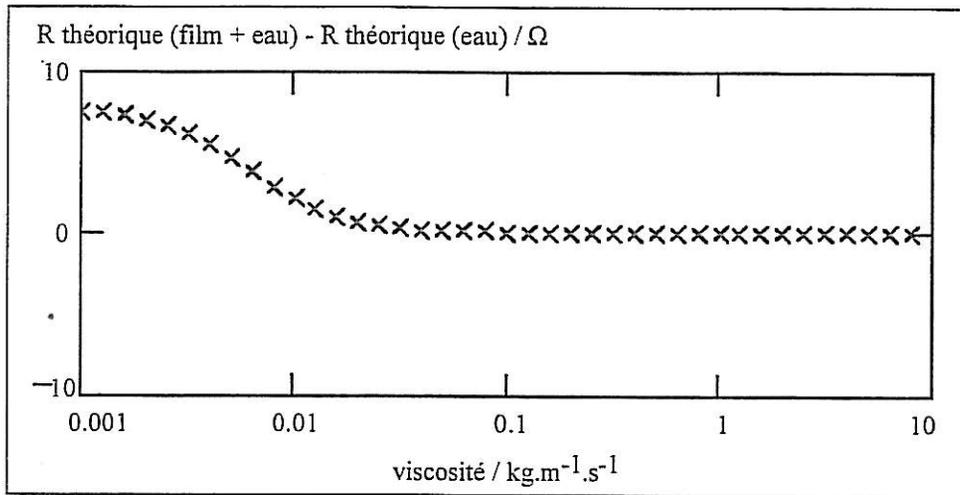


Figure 32 : Evolution de la résistance motionnelle théorique en fonction de la viscosité du film

Concernant la fréquence série, des modifications de la viscosité du film font varier  $f_s$  d'environ 25 Hz ce qui correspondrait à une erreur d'environ 8 % au maximum sur l'estimation de la masse. Sur la résistance motionnelle, des variations de la viscosité provoque une variation de R de l'ordre d'une dizaine de  $\Omega$  ce qui correspond à une variation relative de 2 %. D'après notre modèle, la fréquence série et la résistance sont plus sensibles aux modifications de la viscosité du film qu'aux modifications de son élasticité. Nous pouvons noter que R ne dépend que des propriétés viscoélastiques du film et pas de la masse, alors que  $f_s$  dépend des deux.

## 4. 5. Conclusion

En conclusion, notre modèle montre que les propriétés mécaniques du film, dans les conditions que nous avons fixées (épaisseur du film de 50 Å, densité du film de 1200 kg/m<sup>3</sup>, densité et viscosité du liquide assimilées à celles de l'eau), influencent peu la réponse du résonateur (sur  $f_s$  et R). Par rapport à la réponse obtenue suite à un ajout de matière purement élastique (c'est-à-dire un dépôt qui correspond aux conditions idéales pour la réponse massique de la microbalance à quartz) l'erreur sur l'estimation de la masse calculée à partir de  $f_s$  est, dans le pire des cas, de 8 %. Connaissant l'effet des propriétés viscoélastiques sur le comportement de  $f_s$ , il sera intéressant de comparer son évolution (mesurée par les mesures d'admittance) et l'évolution de la fréquence de la microbalance, afin d'estimer l'importance de ses effets sur la réponse de notre transducteur.

## CONCLUSION

Ce deuxième chapitre était consacré à l'étude théorique des transducteurs piézoélectriques. Ces différents transducteurs peuvent être utilisés pour la réalisation de biocapteurs, la microbalance à quartz nous paraissant comme l'un des mieux adaptés. Cette étude a permis, d'une part, d'orienter notre travail concernant la mise au point d'une microbalance à quartz de haute sensibilité fonctionnant en milieu liquide. D'autre part, nous avons vu qu'il était important de bien caractériser son fonctionnement, en particulier dans le cadre de notre application, c'est pourquoi nous avons développé un dispositif expérimental permettant de réaliser des mesures alternées de fréquence et d'admittance électroacoustique. Nous pourrions ainsi comparer nos résultats expérimentaux et les résultats de la simulation.

*Chapitre III*

***MISE AU POINT ET CARACTERISATION  
DU DISPOSITIF PIEZOELECTRIQUE***

## INTRODUCTION

Nous exposerons dans ce troisième chapitre le travail réalisé concernant le développement et la caractérisation de notre transducteur piézoélectrique. Le but de ce travail était de mettre au point un dispositif piézoélectrique en tenant compte des exigences liées au domaine d'utilisation.

Un des objectifs de cette thèse était de concevoir, et d'étudier, une microbalance à quartz fonctionnant en milieu liquide avec une circulation de solutions, suffisamment sensible pour permettre une immunodétection directe, rapide et spécifique de différents antigènes solubles de poids moléculaires variés.

Plus précisément et en ce qui concerne la microbalance à quartz, nos objectifs étaient les suivants :

- augmenter la fréquence de résonance du quartz afin d'améliorer la sensibilité massique, ce qui nécessite la réalisation de nouveaux oscillateurs,
- réduire le bruit de fond et atteindre une bonne stabilité de la fréquence d'oscillation, en minimisant l'influence de certains paramètres (comme la température) sur la fréquence,
- calibrer le dispositif afin de déterminer le coefficient expérimental de sensibilité massique,
- et étudier le fonctionnement du résonateur dans nos conditions d'utilisation (milieu liquide et avec une couche de protéines) par le biais de mesures d'admittance électroacoustique afin de valider et de modéliser la réponse de la microbalance à quartz.

## 1. LA MICROBALANCE A QUARTZ

### 1. 1. Augmentation de la sensibilité

#### 1. 1. 1. But et principe

Nous avons débuté notre travail avec une microbalance à quartz, disponible au laboratoire, fonctionnant à 6 MHz. Malheureusement ce dispositif s'est vite avéré inadéquat pour notre utilisation (Bizet et *al.*, 1995). Ses performances, en terme de sensibilité massique et de stabilité du signal, ne permettaient pas de l'utiliser comme transducteur pour rendre

compte des faibles variations de masse occasionnées par la formation d'un complexe antigène/anticorps. Nous avons donc décidé d'augmenter la sensibilité du dispositif en travaillant avec des quartz ayant une fréquence de résonance plus élevée.

Comme nous l'avons vu précédemment la sensibilité massique d'une microbalance à quartz augmente avec le carré de la fréquence de résonance du résonateur (équation 11, chapitre II), paramètre qui dépend de l'épaisseur du cristal.

Nous sommes donc passés d'une microbalance à 6 MHz à un dispositif oscillant à 9 MHz sur le mode fondamental. Puis nous avons développé une seconde génération d'oscillateur permettant à ces quartz d'osciller à 27 MHz sur leur troisième harmonique.

Nous avons choisi cette voie alternative car en dessous d'une certaine épaisseur (pour des quartz ayant une taille raisonnable) les quartz sont trop minces et ne sont plus facilement manipulables.

### 1. 1. 2. Caractéristiques des quartz

Les quartz utilisés dans cette étude sont des cristaux de coupe AT fonctionnant en mode de cisaillement d'épaisseur. Cette coupe a été choisie pour que les quartz soient peu sensibles aux variations de température. Ils ont été fournis par la société CQE (Troyes).

Ils sont constitués d'une pastille de quartz de 14 mm de diamètre. L'épaisseur du cristal est de 185  $\mu\text{m}$  pour les quartz ayant une fréquence de résonance fondamentale de 9 MHz et de 278  $\mu\text{m}$  pour les quartz ayant une fréquence de résonance fondamentale de 6 MHz.

Des électrodes métalliques sont déposées sur le cristal (une sur chaque face) pour permettre à l'oscillateur de générer et d'entretenir l'onde ultrasonore au sein du cristal.

Nous avons choisi des électrodes en or, ce métal étant celui le plus couramment utilisé du fait de son inertie vis-à-vis des produits chimiques et de sa faible tendance à s'oxyder. De plus, ce type de surface en or convient bien à nos applications car d'une part, les protéines s'adsorbent facilement sur ce métal et, d'autre part, il est aisé de fonctionnaliser la surface par des alkyl thiols qui s'auto-organisent spontanément en monocouche sur l'or.

L'or n'est pas déposé directement sur le quartz car il n'adhère pas suffisamment sur ce matériau. Une faible couche de chrome est d'abord déposée par évaporation sous vide puis l'or est évaporé sous vide sur cette couche "d'accrochage". Les quartz sont fournis avec une

épaisseur de chrome de 200 Å et une épaisseur d'or de 5000 Å. Une représentation schématique des quartz que nous avons utilisés est donnée figure 33.

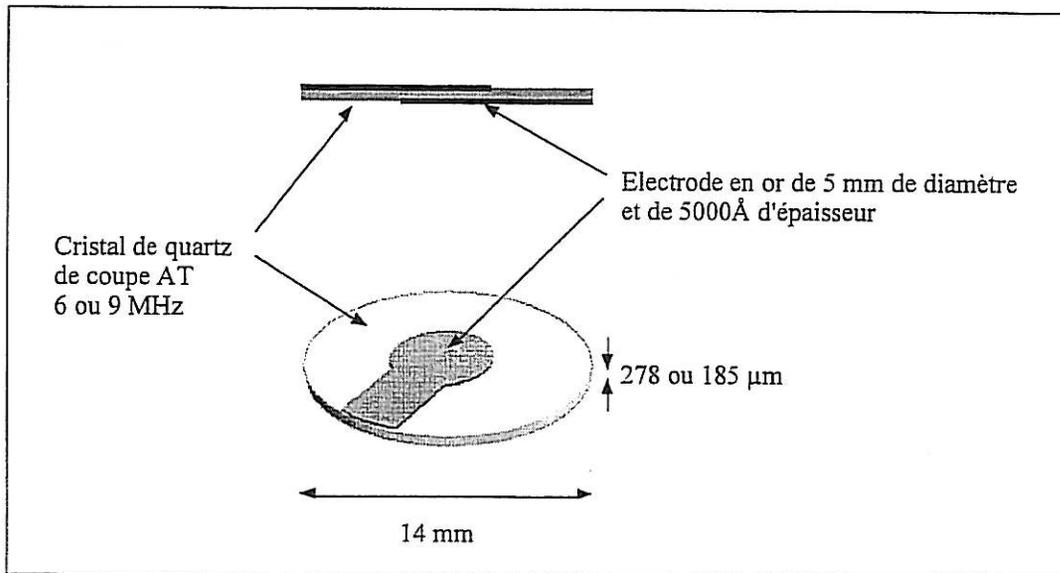


Figure 33 : Représentation schématique des quartz utilisés

Il existe deux qualités de quartz : des quartz qualité "douce" et des quartz qualité "poli-optique". Les premiers sont polis mécaniquement à l'aide d'une pâte à base de poudre de diamant et les seconds ont une finesse de polissage beaucoup plus grande. Une image de la surface d'un quartz de qualité "poli-optique" et de qualité "douce" obtenues par microscopie électronique à balayage sont données figure 34.

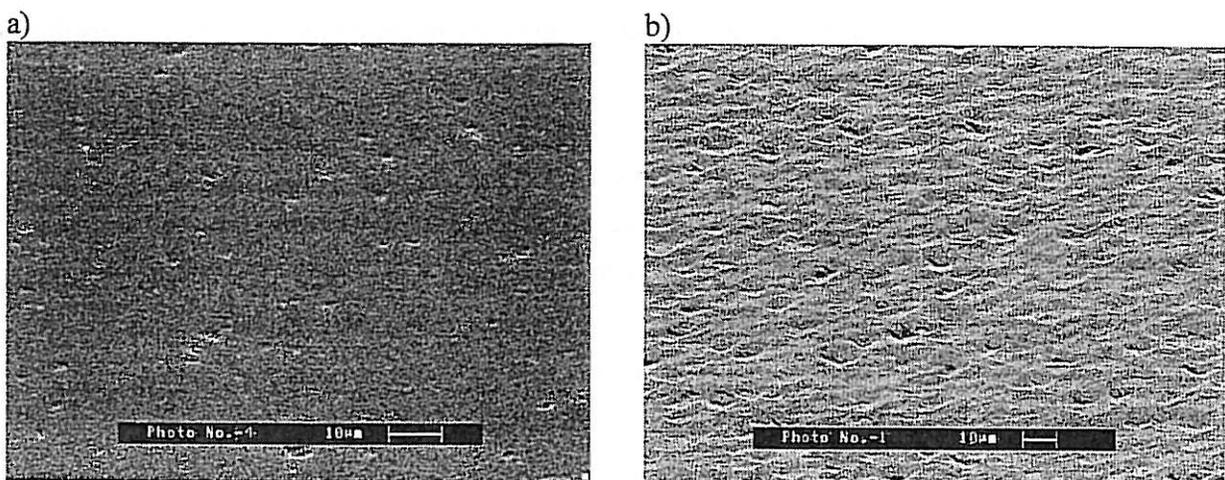


Figure 34 : Images de la surface d'un quartz de qualité "poli-optique" (a) et de qualité "douce" (b) obtenues par microscopie électronique à balayage

La surface des quartz de qualité "poli-optique" est effectivement beaucoup plus plane que la surface des quartz de qualité "douci" mais elle présente de nombreux défauts (trous), la surface des quartz "douci" est plus rugueuse mais plus homogène.

Nous avons utilisé des quartz de qualité "douci" principalement en raison de leur coût nettement inférieur à celui des quartz "poli-optique".

### 1. 1. 3. Les oscillateurs

Comme cela a été vu précédemment, une lame de quartz pourvue d'électrodes métalliques se met à vibrer quand une différence de potentiel alternative est appliquée entre ses électrodes. Dans le cas de la microbalance à quartz, le régime d'oscillation est maintenu par un circuit électronique appelé *oscillateur*. Celui-ci fournit régulièrement de l'énergie en phase avec le déplacement des plans cristallins pour entretenir la vibration du quartz.

Dans notre cas, l'oscillateur doit permettre l'entretien des oscillations au sein du quartz même s'il est en contact avec un liquide et une grande stabilité de ces oscillations sur une importante plage de fréquence devra être obtenue.

Il existe différents types d'oscillateur, celui mis au point pour la microbalance à 6 MHz est un oscillateur de type Miller (Matthys, 1983). Dans un premier temps, un nouvel oscillateur a été développé pour travailler à 9 MHz sur le mode fondamental de quartz prévus à cet effet. Puis, à partir de ce deuxième oscillateur, un troisième modèle a été réalisé pour permettre à des quartz ayant une fréquence de résonance fondamentale de 9 MHz d'osciller à 27 MHz sur leur troisième harmonique (Bizet et *al.*, 1996).

L'oscillateur à 9 MHz a été assez facile à réaliser et a fonctionné d'une manière satisfaisante. Par contre, la conception et la réalisation de l'oscillateur à 27 MHz ont été plus compliquées. Le premier modèle réalisé ne permettait pas à tous les quartz d'osciller : certains oscillaient correctement à la bonne fréquence, d'autres ne "s'accrochaient" pas. Ce modèle a été amélioré par l'ajout d'une capacité variable (varicap) qui permet d'accorder manuellement l'oscillateur au quartz quelles que soient les conditions d'utilisation (air ou milieu liquide). Ainsi, notre oscillateur permet de faire osciller à 27 MHz systématiquement et quelles que soient les conditions expérimentales tout quartz correctement monté.

Il faut savoir que, quand nous avons débuté notre travail, aucune publication, à notre connaissance, ne rendait compte de la mise au point de tels oscillateurs faisant fonctionner des

quartz à cette fréquence, sur un mode harmonique, en milieu liquide et pour une utilisation de type biocapteur.

## 1. 2. Les montages expérimentaux réalisés

Différents montages expérimentaux ont été développés, chacun présente des avantages et des inconvénients et le choix du dispositif dépend du type d'application envisagée. Dans tout les cas, des contacts électriques de bonne qualité doivent être établis entre les électrodes du quartz et l'oscillateur, et ces contacts doivent être isolés du milieu liquide pour éviter tout court circuit. Seule une face du quartz est en contact avec le liquide, l'autre restant à l'air.

Ces différents montages permettent de réaliser aussi bien la mesure de fréquence (mesure de microbalance où le quartz est dit "actif") que la mesure d'admittance électroacoustique (où le quartz est dit "passif").

### 1. 2. 1. Montage sur plaquette

Dans ce cas, le quartz est monté sur un support rectangulaire en verre epoxy muni de pistes de cuivre pour permettre d'établir les connexions électriques (figure 35).

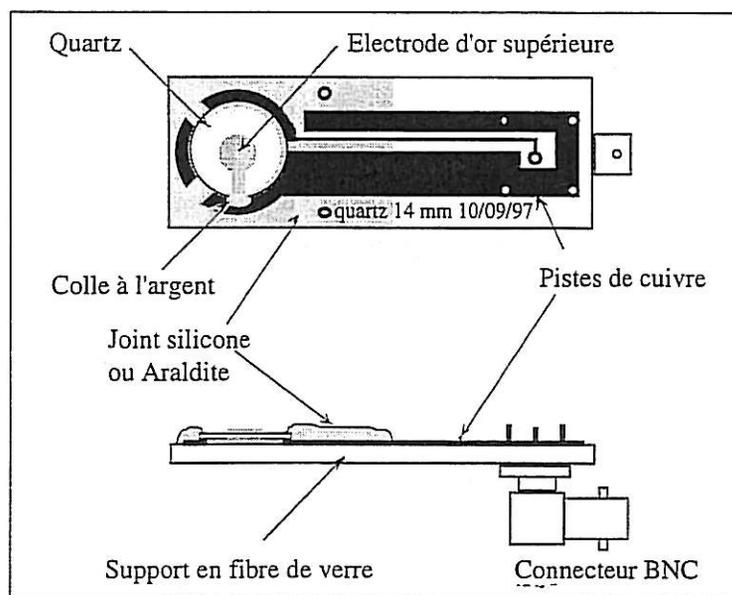


Figure 35 : Représentation schématique d'un quartz monté sur support rectangulaire en verre epoxy

Le quartz est posé sur le support et les contacts électriques entre les électrodes du quartz et les pistes de cuivre sont assurés par un dépôt de laque argent. Le dépôt d'un film de silicone (ou d'araldite) autour du quartz et sur les pistes de cuivre de la plaquette permet d'isoler les contacts, le quartz peut alors être plongé dans un liquide sans qu'il ne se produise de court circuit. L'extrémité de la plaquette est soudée sur un connecteur BNC qui est relié à l'oscillateur, lui-même connecté à un fréquencesmètre. La figure 36 présente le montage expérimental réalisé avec ce type de support.

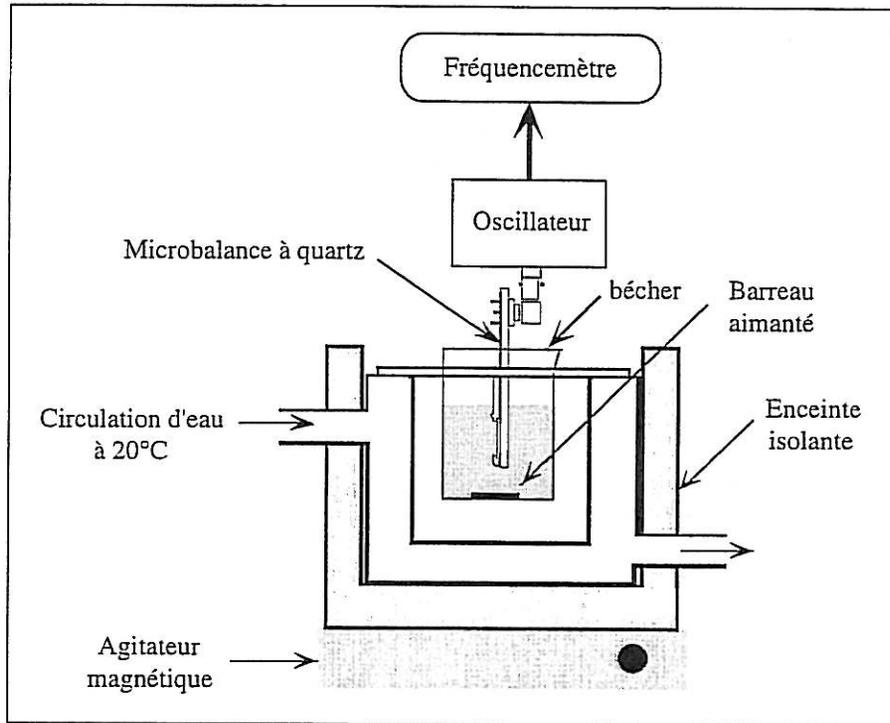


Figure 36 : Dispositif expérimental réalisé avec le montage sur plaquette

Ce type de montage est utilisé pour réaliser des expériences qui ne nécessitent pas une circulation de la solution. Généralement la température de la solution, contenue dans un bécher, dans laquelle plonge le quartz, est maintenue constante grâce à un cryothermostat.

### 1. 2. 2. La cellule à jet immergé

Nous avons utilisé une *cellule à jet immergé* développée au laboratoire à l'origine pour réaliser des expériences d'électrochimie (figure 37). L'intérêt de ce type de cellule est que le quartz, disposé au fond de la cellule, ne subit pas les perturbations du jet. En effet, la buse d'arrivée de la solution est disposée à une hauteur précise de telle sorte que le quartz soit au

niveau de la zone de stagnation du jet, et à cet endroit le flux est en régime laminaire. Dans ce cas, la fréquence du quartz n'est pas perturbée par la circulation de la solution (Bouet, 1994).

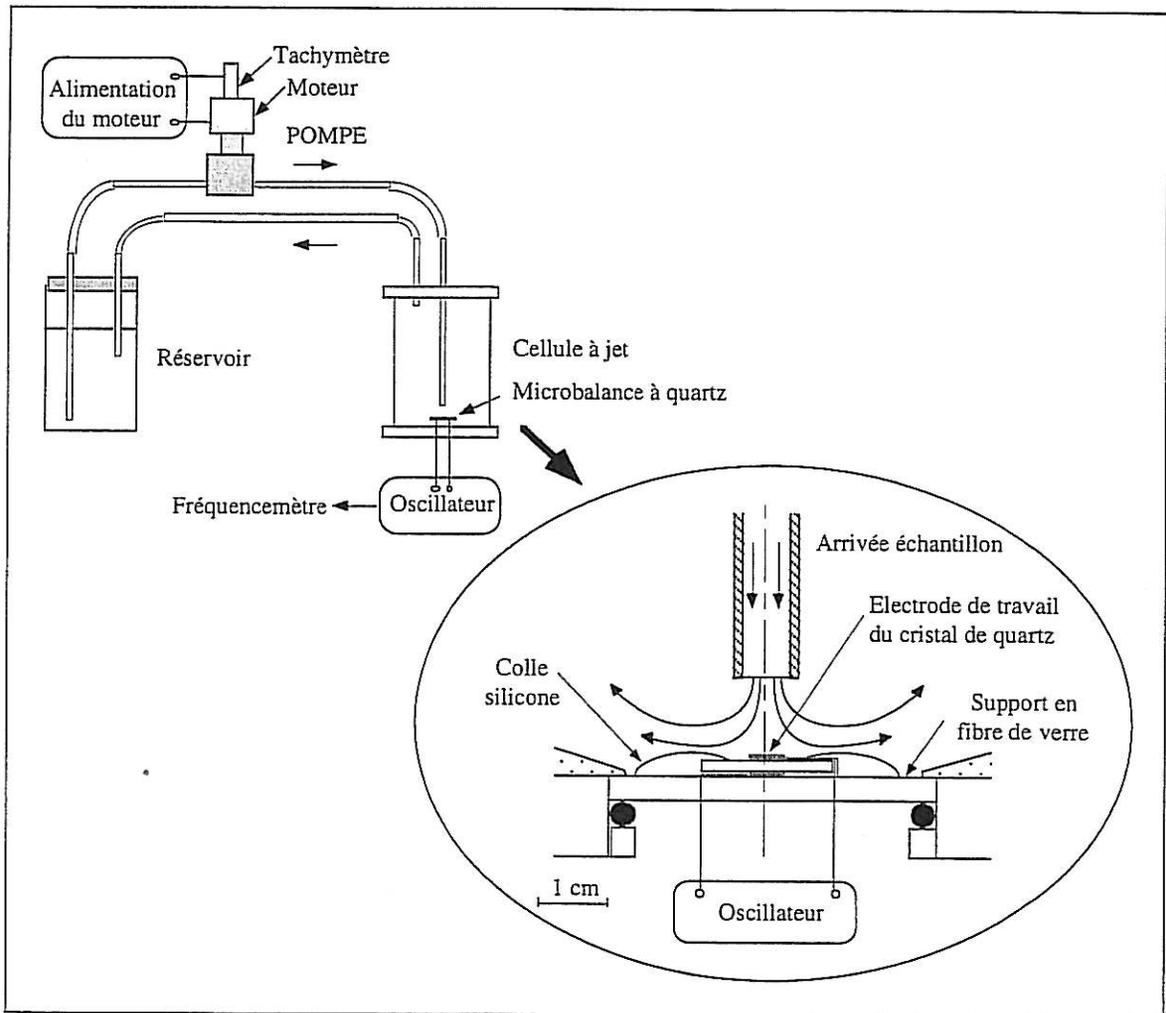


Figure 37 : Dispositif expérimental incorporant la cellule à jet immergée

Le quartz est monté sur un support circulaire en verre époxy qui s'emboîte parfaitement dans le fond de la cellule qui reste étanche. Le support, recouvert de pistes de cuivre, est percé de deux trous dans lesquels sont disposés deux fils électriques (figure 37). Ces fils sont soudés sur le support sur lequel le quartz est posé. Les contacts électriques entre les électrodes du quartz et les fils sont assurés par un dépôt de laque argent. Toutes les connections sont ensuite isolées par la pose d'un joint de silicone. Les fils électriques (sous le support) sont soudés à un connecteur BNC relié à l'oscillateur, lui-même connecté au fréquencesmètre.

Les inconvénients de ce type de montage sont d'une part, l'important volume de solution nécessaire et d'autre part, la pompe utilisée. En effet, dans le domaine des biocapteurs il est préférable de pouvoir tester des faibles volumes d'échantillon. Or la cellule à jet classique

disponible au laboratoire présentait un volume interne d'environ 200 ml. Nous avons donc réduit le volume interne à une vingtaine de ml. Malgré cette réduction, le volume de solution nécessaire pour assurer une circulation reste grand et le débit utilisé doit être important (de l'ordre d'une centaine de ml/min) si nous voulons conserver les propriétés hydrodynamiques et renouveler rapidement la solution de la cellule. La pompe utilisée est une petite pompe à engrenage : elle permet d'assurer des débits importants, elle ne pulse pas et est autoamorçable mais elle présente l'inconvénient d'être "agressive" pour une solution de protéines. En effet, une solution de BSA, concentrée par exemple à 100  $\mu\text{g/ml}$ , mousse quand elle est mise en circulation dans la cellule par le biais de la pompe. Ce type de cellule, a priori bien adapté à la mesure de fréquence, car la circulation de la solution ne se répercute pas sur la fréquence de la microbalance, ne convient pas parfaitement pour notre application.

### 1. 2. 3. La cellule miniature

Nous avons donc mis au point un troisième type de montage du quartz en concevant une cellule à circulation miniature, une représentation schématique et une photographie de celle-ci sont présentées figures 38 et 39.

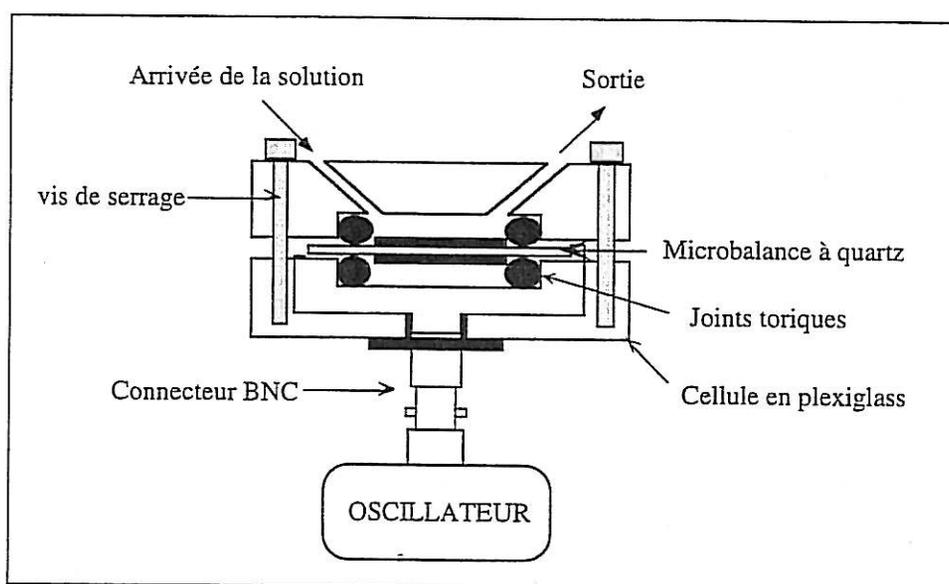


Figure 38 : Représentation schématique de la cellule miniature

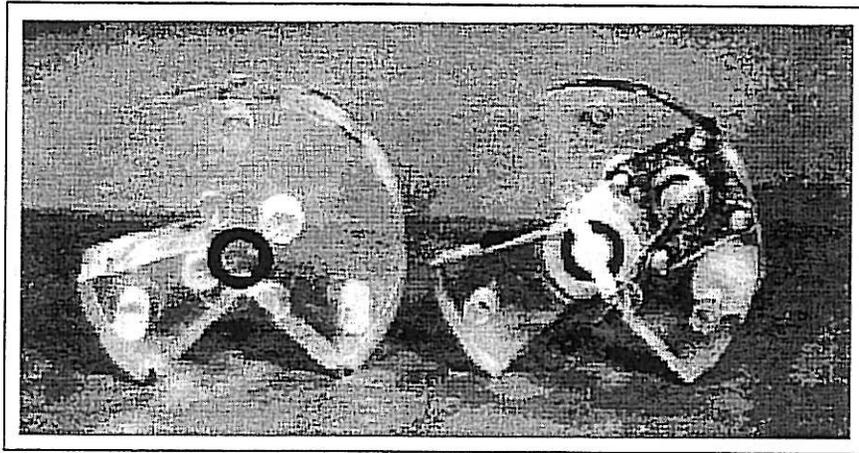


Figure 39 : Photographie de la cellule miniature dans laquelle un quartz est installé

Des embases métalliques sont insérées autour du cristal, au niveau des électrodes, et sont soudées à deux fils électriques directement soudés sur un connecteur BNC. Un dépôt de laque argent permet d'assurer les contacts entre les embases et les électrodes du quartz. Celui-ci est maintenu entre les deux joints toriques de la cellule, le joint supérieur assurant l'étanchéité de la cellule. Seule l'électrode d'or supérieure est en contact avec le liquide. La circulation des solutions est réalisée par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique et des tuyaux de faible diamètre en polyéthylène (diamètre externe de 1,8 mm et interne de 1mm). Le volume interne de la cellule est de 40  $\mu\text{l}$  et le débit utilisé est généralement compris entre 50 et 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Nous avons utilisé une pompe péristaltique car les pompes à engrenages disponibles au laboratoire ne permettaient pas d'assurer des débits aussi faibles et les pompes à piston ne permettaient pas de thermostatier correctement les solutions. Ce type de cellule nous a donné satisfaction alors, qu'a priori, cette configuration (quartz comprimé entre deux joints) n'était pas optimale pour le fonctionnement de la microbalance à quartz.

### 1. 3. Le logiciel "multimes"

Pour automatiser l'acquisition des données des expériences de microbalance (principalement l'enregistrement de la fréquence d'oscillation du quartz en fonction du temps) et pour piloter l'expérience par l'intermédiaire d'un P.C., le laboratoire a développé un logiciel nommé "multimes" fonctionnant sous DOS.

Celui-ci permet de configurer l'expérience en ce qui concerne le choix des mesures à effectuer (fréquence d'oscillation du quartz, température de différentes sondes), la cadence des mesures, la durée totale de l'expérience... Le logiciel permet l'affichage des mesures pendant l'expérience, l'évolution des différents paramètres est donc visualisée en "quasi temps réel".

Les résultats de l'expérience sont stockés dans un fichier, sous forme de colonnes (temps de la mesure, fréquence d'oscillation du quartz, température des sondes...), facilement exploitable.

Concrètement, l'oscillateur, sur lequel est connecté le quartz, est relié par câble BNC au fréquencemètre (PM 6685 Philips) qui mesure la fréquence d'oscillation du quartz. D'autre part, un multimètre (Keithley 2000) est utilisé pour enregistrer d'autres paramètres comme la température de l'oscillateur et des solutions qui circulent sur le quartz. Ces deux appareils de mesures sont reliés, par l'intermédiaire de câbles IEEE, au P.C. qui pilote l'expérience grâce au logiciel cité précédemment.

## **1. 4. Etude de la stabilité et du bruit de fond de la fréquence d'oscillation**

Les premières expériences réalisées pour tester les oscillateurs à 9 et à 27 MHz, avaient pour but d'étudier la stabilité de la fréquence d'oscillation de quartz à l'air et en contact avec un liquide, et d'étudier l'influence de certains paramètres sur cette stabilité comme la température, la circulation des solutions et leur nature. En effet, il est évident que la fréquence d'oscillation de la microbalance (c'est-à-dire le signal de transduction de notre biocapteur) doit être la plus stable possible en l'absence de tout phénomène lié à une variation de masse. De plus, le bruit de fond de la fréquence devra être le plus bas possible afin d'obtenir une plus grande sensibilité.

### **1. 4. 1. Influence de la température**

Même si les quartz utilisés, de coupe AT, sont les moins sensibles aux variations de température, il nous a semblé intéressant de contrôler l'influence de ce facteur sur la stabilité de la fréquence d'oscillation de nos microbalances à quartz.

Nous avons suivi l'évolution de la fréquence de quartz, montés sur plaquette, oscillant à 9 et à 27 MHz dans l'air en mesurant, simultanément, la fréquence d'oscillation et la température au niveau du quartz par l'intermédiaire d'une sonde de température disposée à côté du quartz. Les courbes de la figure 40 et 41 montrent que la température du milieu où est placé le quartz influence sa fréquence d'oscillation, même pour ce type de quartz.

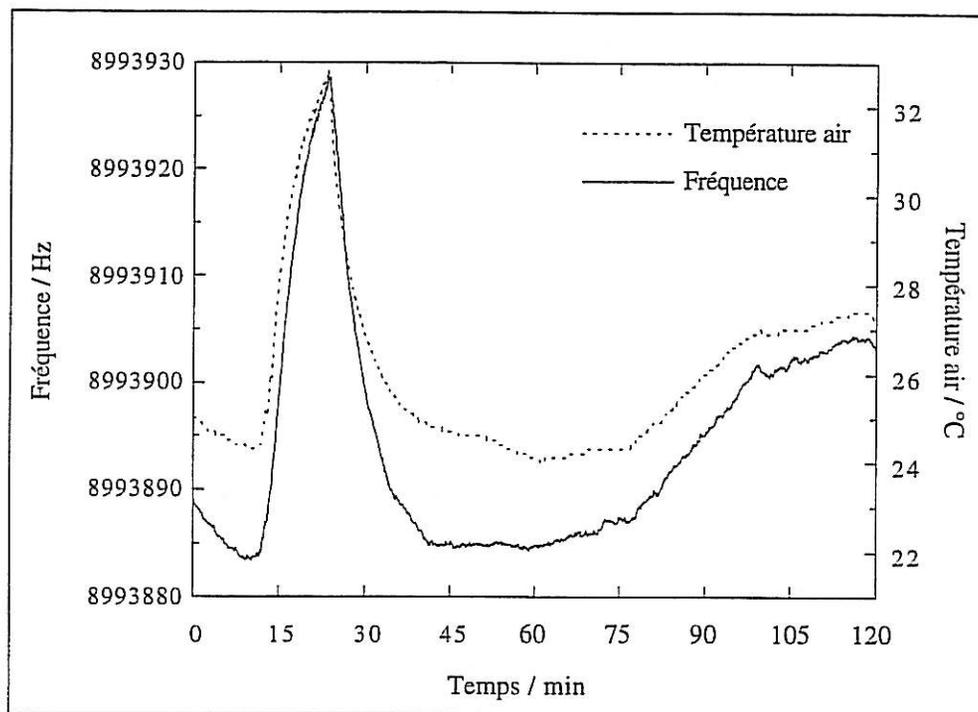


Figure 40 : Evolution simultanée de la fréquence d'oscillation d'un quartz à 9 MHz dans l'air et de la température à proximité de la microbalance

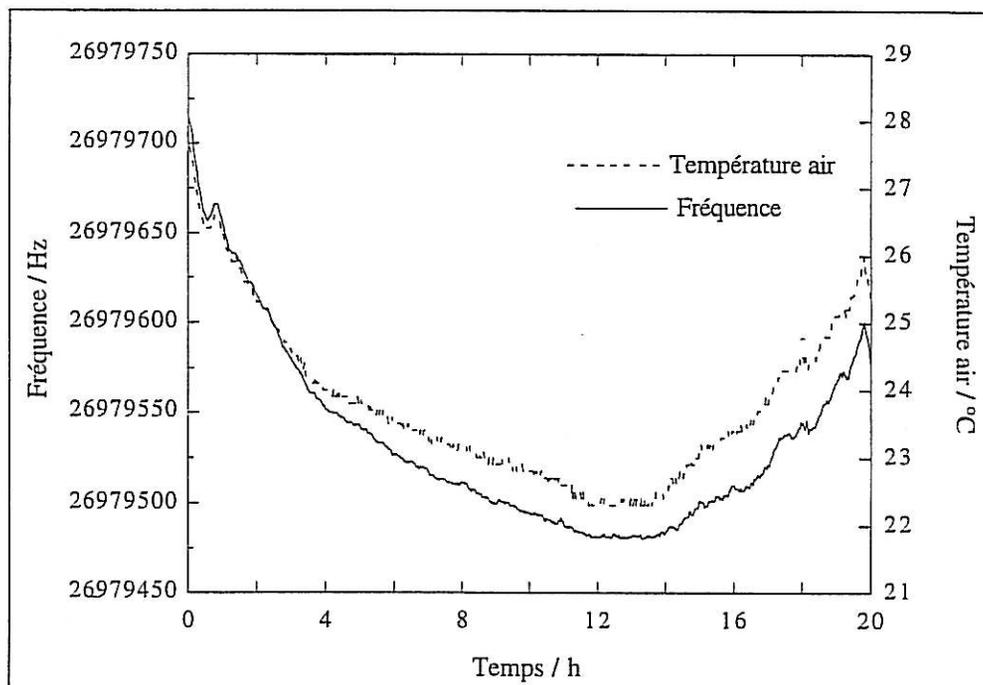


Figure 41 : Evolution simultanée de la fréquence d'oscillation d'un quartz à 27 MHz dans l'air et de la température à proximité de la microbalance

De plus, la sensibilité d'un quartz (aussi bien à 9 qu'à 27 MHz) vis-à-vis de la température varie d'un quartz à l'autre. Pour un même quartz elle varie également en fonction de la plage de température comme le montre la figure 42 pour un quartz à 9 MHz. Ainsi, dans la plage 21-25°C la fréquence varie de 125 Hz/°C. Au-dessus et en dessous de cette plage le coefficient de température est négatif.

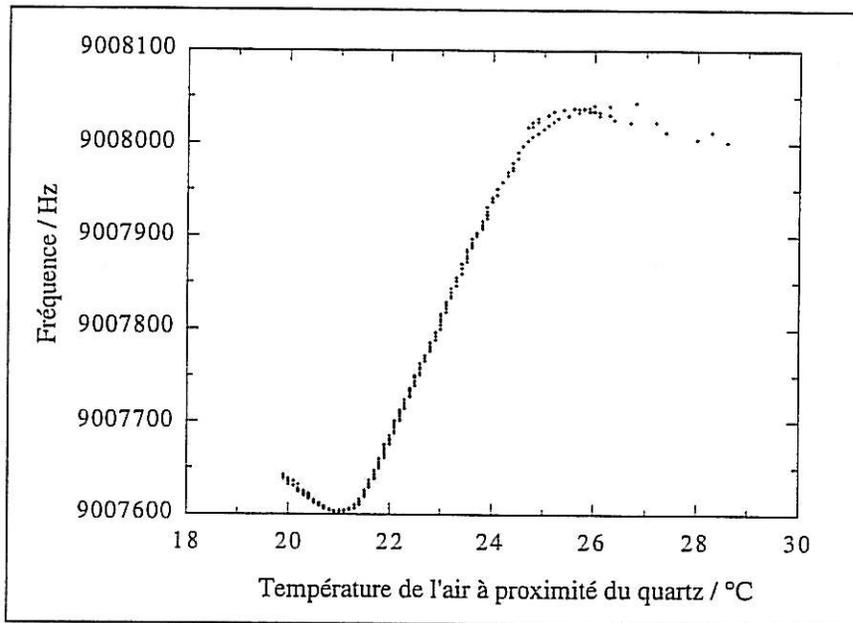


Figure 42 : Evolution de la fréquence d'un quartz à 9 MHz dans l'air en fonction de la température à proximité de celui-ci

Il est donc primordial de thermostatier l'environnement du quartz c'est-à-dire, pour notre application, de thermostatier les solutions qui seront en contact avec le quartz. Nous avons utilisé un cryothermostat à circulation avec une régulation électronique (Ministat Huber, Bioblock) pour maintenir constante (et identique) la température de toutes les solutions. Une température de consigne de 20°C a été choisie et la régulation est efficace au dixième de degré. Lors de chaque expérience, nous enregistrons systématiquement la température du bain thermostaté afin de contrôler sa stabilité. De cette manière nous nous affranchissons totalement du risque de variation de fréquence liée à une variation de température du quartz.

Cependant, l'enregistrement de l'évolution de la fréquence de quartz immergés dans une solution thermostatée a encore révélé des dérives de la fréquence. Nous avons alors pourvu nos oscillateurs d'une sonde de température pour suivre la température à l'intérieur du boîtier de l'oscillateur. La figure suivante présente l'évolution simultanée de la fréquence d'un quartz à 9 MHz monté sur plaquette et plongé dans de l'eau thermostatée à +20°C et de la température de l'oscillateur.

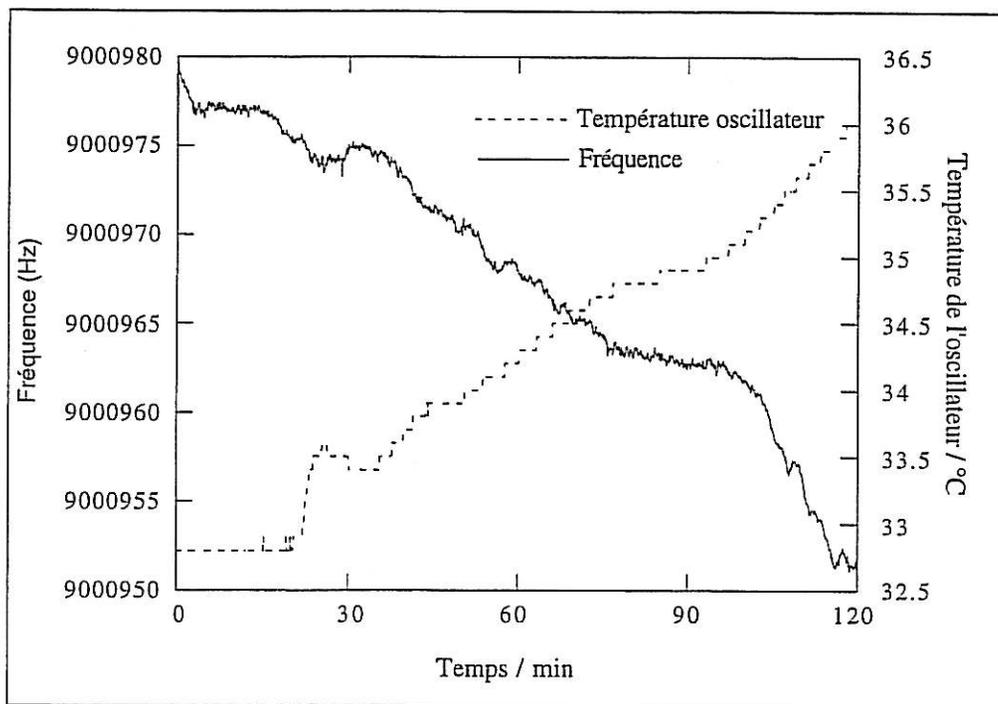


Figure 43 : Evolution simultanée de la fréquence d'oscillation d'un quartz à 9 MHz, monté sur plaquette et immergé dans de l'eau distillée thermostatée à + 20°C, et de la température du boîtier d'oscillateur

Nous pouvons remarquer que les variations de la température à l'intérieur du boîtier de l'oscillateur se répercutent sur la fréquence d'oscillation de la microbalance à quartz. La figure 44 montre que la corrélation entre ces deux paramètres est importante.

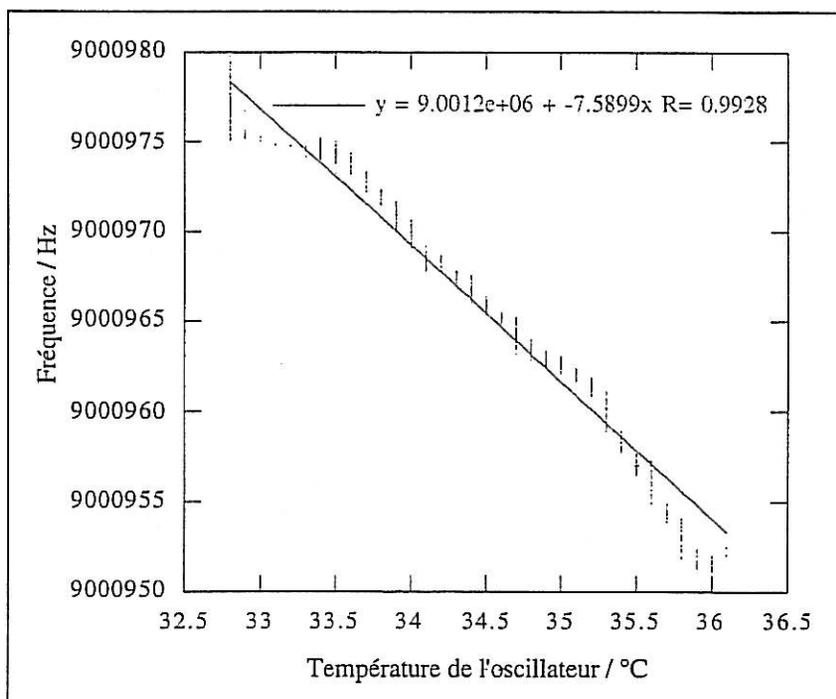


Figure 44 : Variation de la fréquence d'oscillation en fonction de la température du boîtier d'oscillateur

Cet effet a également été observé pour l'oscillateur à 27 MHz. Ces variations de température à l'intérieur du boîtier de l'oscillateur sont dues à la chauffe des composants électroniques eux-mêmes et aux variations de la température ambiante. Nous avons ainsi été conduits à contrôler la température de nos oscillateurs pour nous affranchir de cet effet.

Différents systèmes de thermorégulation ont été mis en œuvre, le plus performant a été retenu. Il s'agit d'un régulateur de type PID (Watlow) constitué d'une sonde de température en platine et de deux résistances chauffantes disposées à l'intérieur du boîtier. La sonde mesure en continu la température du boîtier et contrôle la chauffe des résistances d'une manière très fine. Une température de consigne comprise entre 48 et 52 °C est généralement choisie, l'air de la pièce constituant la source froide.

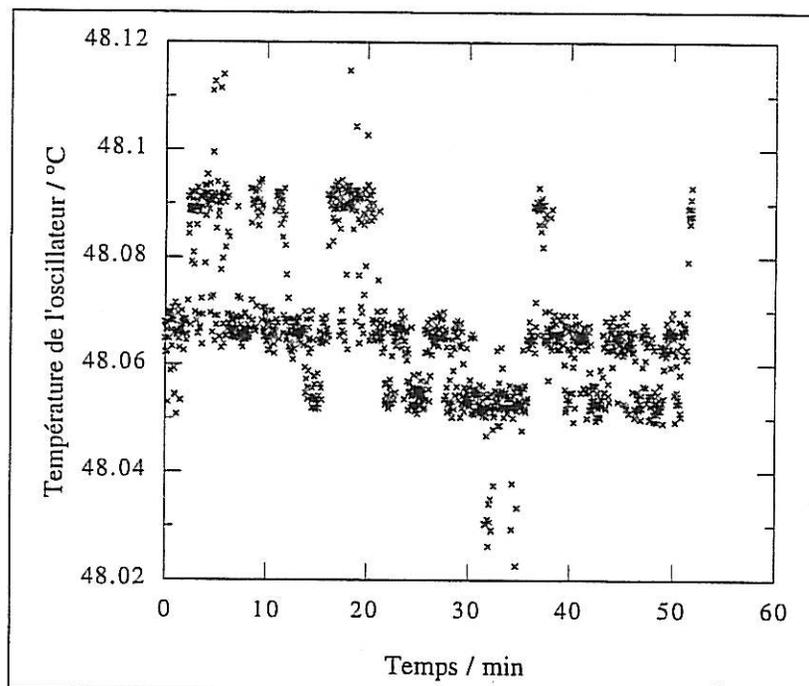


Figure 45 : Evolution de la température de l'oscillateur thermorégulé en fonction du temps

La stabilité de la température de l'oscillateur obtenue par cette méthode est excellente : la température ne variant que dans une fourchette de un dixième de degré (figure 45). Néanmoins, nous prenons la précaution d'enregistrer systématiquement la température de l'oscillateur pendant nos mesures de fréquence (ainsi que la température des solutions) afin de nous assurer de l'absence de perturbations.

Aucun de tous les résultats d'expériences présentés, à partir de ce paragraphe, dans ce manuscrit, ne présentait de variation de température de l'oscillateur et des solutions.

La figure suivante présente l'évolution de la fréquence d'oscillation à 27 MHz d'un quartz monté sur plaquette et immergé dans une solution d'eau distillée thermostatée à +20°C pendant 2h30.

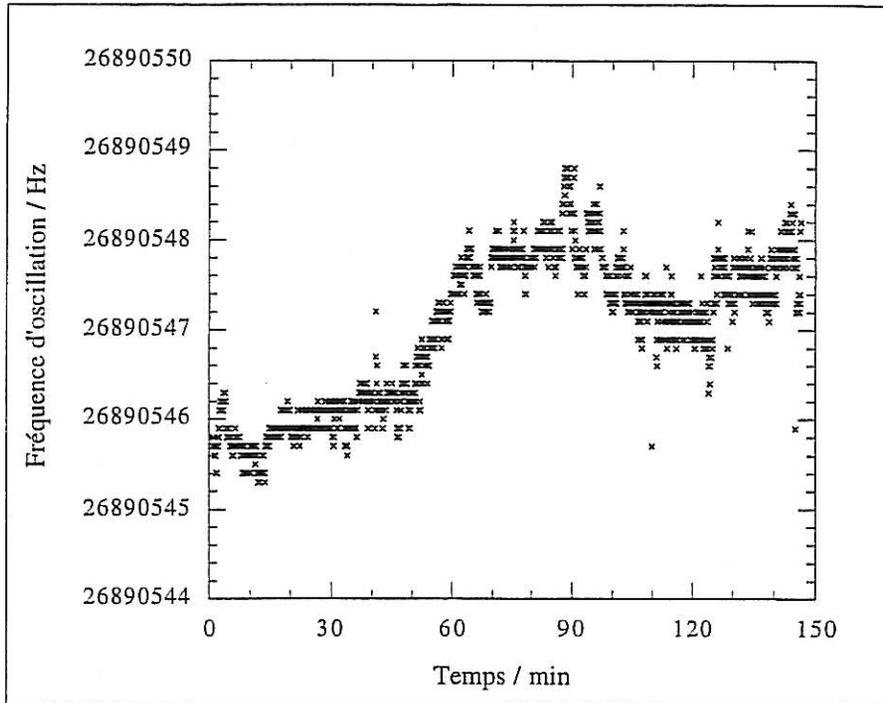


Figure 46 : Evolution de la fréquence d'oscillation d'un quartz monté sur plaquette et immergé dans de l'eau distillée thermostatée à +20°C

Nous pouvons observer que l'amplitude de la fluctuation de la fréquence d'oscillation de la microbalance à quartz est d'environ 2 Hz pour la durée de la mesure. La stabilité et le bruit de fond de la fréquence obtenus sont remarquables pour une mesure à cette fréquence et en milieu liquide.

#### 1. 4. 2. Influence de la circulation des solutions

Comme nous venons de le voir, les oscillateurs mis au point permettent de faire osciller à 27 MHz et en milieu liquide la microbalance à quartz de manière tout à fait satisfaisante. Néanmoins, nous avons choisi d'utiliser ce transducteur dans une cellule à circulation de sorte que nous puissions changer de solution en enregistrant la fréquence d'oscillation en continu sans devoir remettre le quartz à l'air. Nous avons donc étudié l'influence de la circulation de solution dans la cellule miniature que nous avons utilisée, sur la stabilité et le bruit de fond de la fréquence d'oscillation de notre microbalance.

La circulation des solutions est assurée par une pompe péristaltique (modèle P1, Pharmacia). Toutes les solutions, qui doivent circuler sur le quartz, sont maintenues dans des tubes à essai disposés dans un béccher à double paroi rempli d'eau. La température de l'eau dans le béccher est maintenue constante grâce au cryothermostat. Une représentation schématique de ce dispositif expérimental, qui servira pour toutes nos expériences d'immunodétection avec la microbalance à quartz, est présentée figure 47.

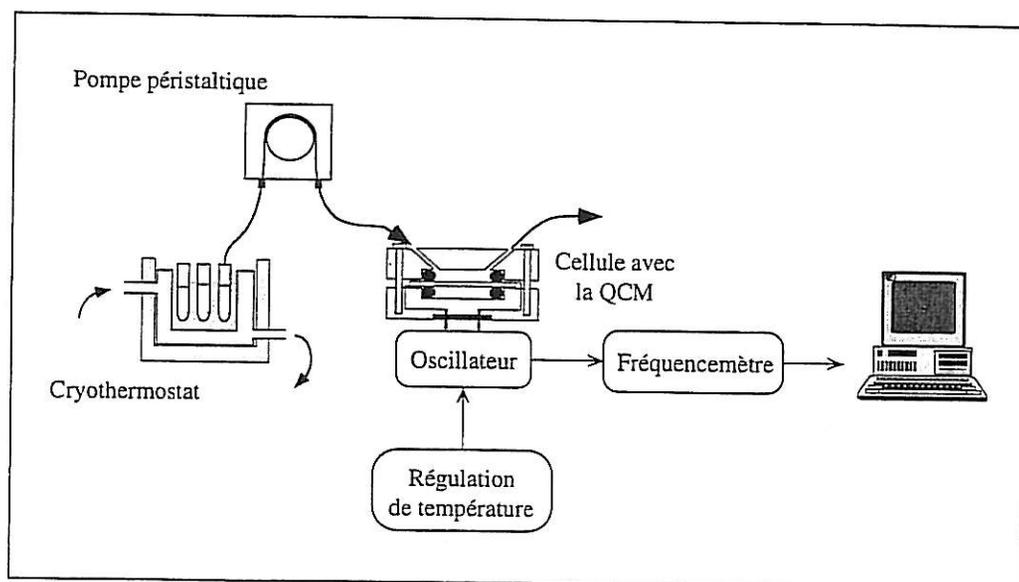


Figure 47 : Représentation schématique du dispositif expérimental

La figure qui suit présente l'évolution de la fréquence d'oscillation d'un quartz installé dans la cellule avec une circulation d'eau distillée thermostatée à un débit de  $50 \mu\text{l}/\text{min}$ .

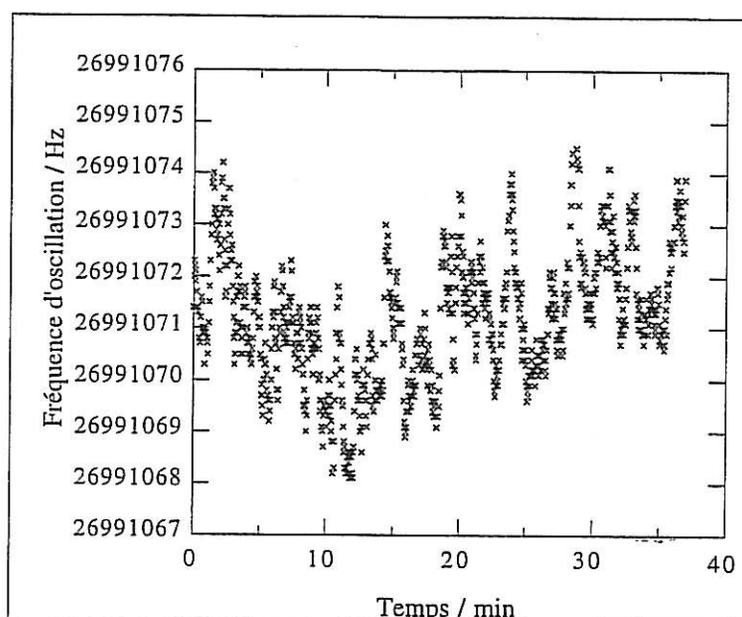


Figure 48 : Evolution de la fréquence d'oscillation d'un quartz installé dans la cellule pendant la circulation d'eau distillée thermostatée à  $+20^\circ\text{C}$  à un débit de  $50 \mu\text{l}/\text{min}$

La stabilité et le bruit de fond de la fréquence d'oscillation sont un peu moins bons que pour un quartz immergé mais restent tout à fait corrects pour ce type de fréquence.

En effet, la circulation d'une solution dans la cellule a une influence sur la fréquence d'oscillation du quartz, et joue surtout sur le bruit de fond de celle-ci. La pompe utilisée est une pompe péristaltique et les pulsations de la pompe se répercutent sur le signal mesuré. Cet effet est nettement visible sur la figure 49 où sont représentées les variations de la fréquence d'oscillation d'un même quartz (remises à zéro) pour deux débits différents.

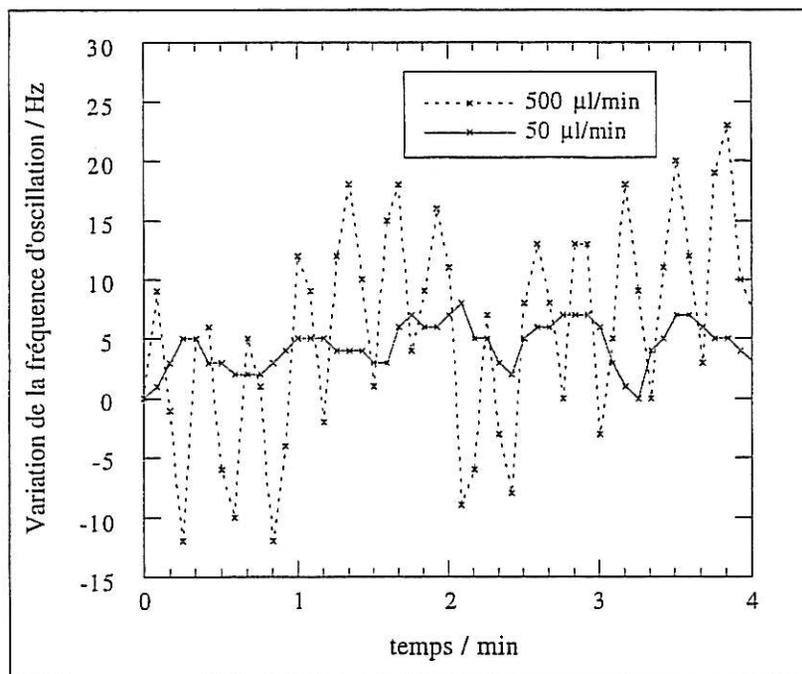


Figure 49 : Variations de la fréquence d'oscillation d'un même quartz installé dans la cellule pendant la circulation d'eau distillée thermostatée à +20°C à deux débits différents

La répercussion de la circulation d'une solution sur la fréquence du quartz varie en fonction du débit utilisé. Le quartz est sensible à la variation de la pression au niveau de la surface du quartz (assimilable à une variation de masse), et plus le débit est fort plus les répercussions sur la fréquence sont importantes. Nous avons choisi d'utiliser un débit faible (50 µl/min) qui perturbe le moins possible la fréquence d'oscillation et qui convient bien pour nos expériences d'immunodétection. Il faut noter que le bruit de fond introduit par la circulation se traduit par une perturbation périodique de la fréquence dont la période est inversement proportionnelle au débit et dont l'amplitude est proportionnelle au débit. Ce bruit de fond pourrait être éliminé par un traitement du signal puisqu'il est périodique pour un débit donné. Nous pourrions considérer un signal significatif quand la variation de fréquence sera supérieure à trois fois ce bruit de fond soit environ 15 Hz pour ce débit.

### 1. 4. 3. Influence de la nature des solutions

Dans cette partie, nous avons examiné l'influence de la nature des solutions qui circulent sur le quartz sur la fréquence d'oscillation de la microbalance.

Nous nous sommes d'abord intéressés à des solutions d'acide chlorhydrique qui sont classiquement utilisées comme solution de désorption. La figure 50 présente la variation de la fréquence d'oscillation d'un quartz pendant la circulation alternée d'eau distillée et de solutions d'HCl à différentes concentrations. Nous pouvons remarquer que la fréquence d'oscillation du quartz augmente lors du passage de la solution d'HCl et diminue pour retrouver son niveau de base lors du passage de l'eau.

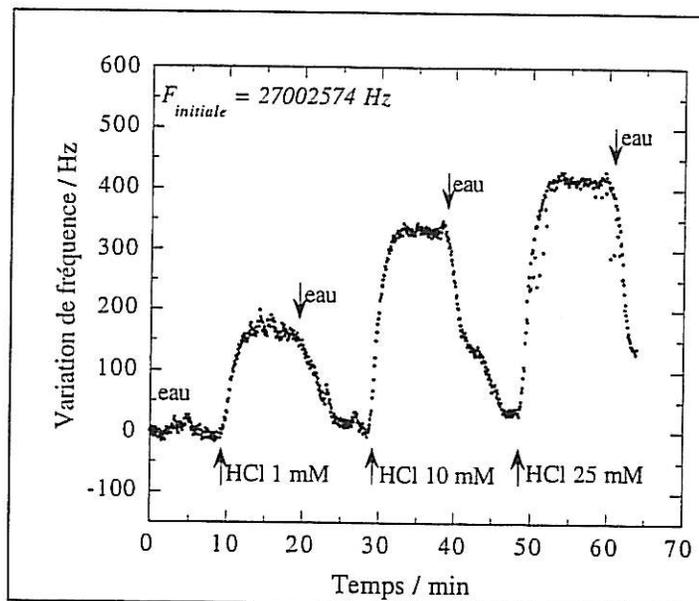


Figure 50 : Variation de la fréquence d'oscillation d'un quartz installé dans la cellule pendant la circulation alternée d'eau et de solutions d'HCl à 1, 10 et 25 mM au débit de 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ , la flèche représente le moment où la solution arrive sur le quartz

L'effet de la circulation d'autres solutions comme le tampon phosphate salin (PBS) et des solutions de KCl par rapport à l'eau distillée a ensuite été étudié. Dans ces cas, la solution provoque aussi une augmentation réversible de la fréquence d'oscillation. La figure 51 présente la variation de fréquence d'oscillation d'un même quartz en fonction de la concentration de la solution de KCl qui circule sur le quartz. La variation de la fréquence d'oscillation provoquée par la solution de KCl augmente avec sa concentration puis se stabilise (le même effet est observé dans le cas de HCl).

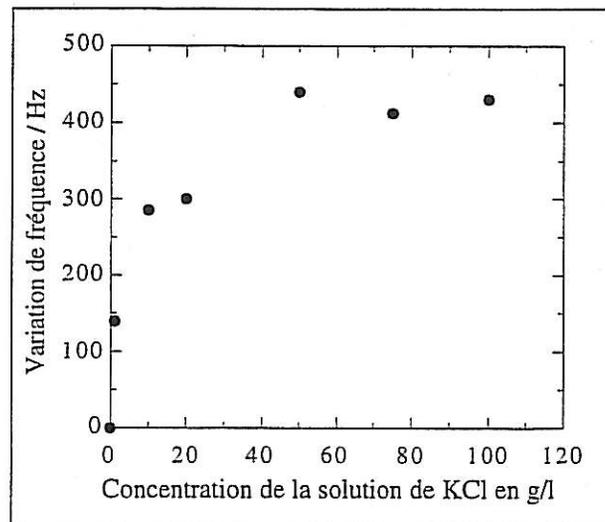


Figure 51 : Variation de la fréquence d'oscillation d'un même quartz en fonction de la concentration de la solution de KCl

Nous avons cherché à expliquer cet effet par la différence des propriétés physico-chimiques entre la solution et l'eau. Le tableau suivant donne les valeurs de certains paramètres correspondant aux différentes concentrations des solutions de KCl utilisées (tirées du Handbook of Chemistry and Physics, Ed 1982).

Concentration g/l	Concentration mol/l	Conductivité mmho/cm	Densité	Viscosité cP
0	0	0	0,9982	1,00219
1	0,013	3,5	0,9992	1,00159
10	0,134	15,6	1,0047	1,00041
20	0,268	29	1,0108	0,9991
50	0,671	69,3	1,0292	0,99516
75	1,006	102,8	1,0445	0,99188
100	1,341	136,3	1,0598	0,98861

Tableau LX : Valeurs de la conductivité, de la densité et de la viscosité pour différentes concentration de KCl

Nous avons vu au deuxième chapitre que la densité et la viscosité des solutions jouaient sur la fréquence d'oscillation (formule de Kanazawa, équation 15, chapitre II) mais ce modèle prévoit une diminution de la fréquence d'oscillation quand le produit densité x viscosité augmente. Ici, le produit densité x viscosité augmente avec la concentration mais nous mesurons une augmentation de la fréquence d'oscillation. Nous avons alors simulé l'effet des variations de la conductivité de la solution par l'intermédiaire de la formule de Josse (Josse et *al.*, 1990) pour contrôler l'influence de ce paramètre sur la fréquence.

La formule de Josse, ci-dessous, prend en compte d'une part, l'effet de la densité et de la viscosité de la solution (premier terme de l'équation) et d'autre part, l'effet de la conductivité de la solution (deuxième terme) :

$$\frac{\Delta f}{f_0} = - \left( \frac{f_0 \rho_L \eta_L}{\pi \rho_q C_{66}} \right)^{\frac{1}{2}} + \frac{\delta}{\pi^2} \frac{\sigma^2 + \omega^2 \epsilon_L (\epsilon_L + \epsilon_{22})}{\sigma^2 + \omega^2 (\epsilon_L + \epsilon_{22})^2} \quad (46)$$

$$\text{avec } \delta = \frac{e_{26}^2}{C_{66} \epsilon_{22}} \quad (47)$$

où :  $f_0$  est la fréquence de résonance du quartz,  $\rho_L$  la densité du liquide,  $\eta_L$  la viscosité du liquide,  $\rho_q$  la densité du quartz,  $C_{66}$  la constante élastique du quartz corrigée de l'effet piézoélectrique,  $\sigma$  la conductivité du liquide,  $\omega$  la fréquence angulaire,  $\epsilon_L$  la constante diélectrique du liquide,  $\epsilon_{22}$  la constante diélectrique du quartz, et  $e_{26}$  la constante piézoélectrique.

La figure 52 présente les variations expérimentales et simulées de la fréquence d'oscillation du quartz en fonction de la concentration de la solution de KCl.

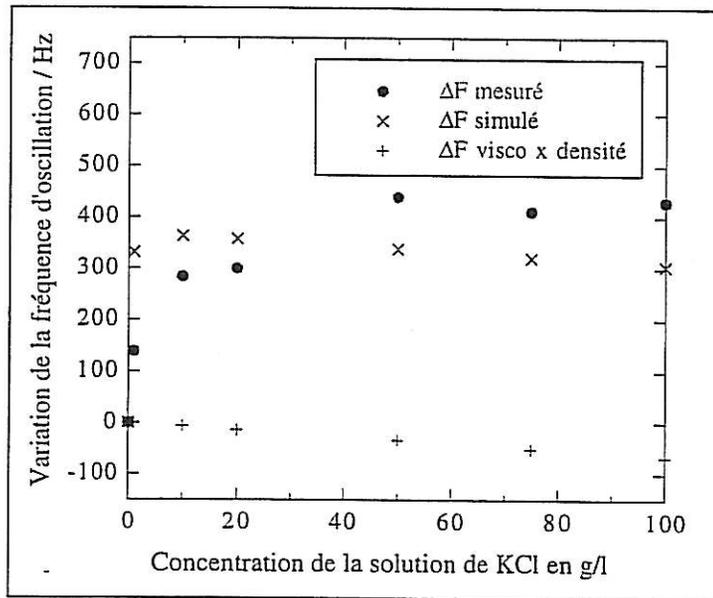


Figure 52 : Variation de la fréquence d'oscillation mesurée, simulée par la formule de Josse et simulée en ne tenant compte que de la densité et de la viscosité de la solution en fonction de la concentration de la solution de KCl qui circule sur le quartz

Les variations de la conductivité des solutions de KCl expliquent, en partie, l'augmentation de la fréquence d'oscillation observée. Nous pouvons aussi voir sur la figure 52

que l'augmentation du produit densité x viscosité de la solution de KCl provoque bien une diminution de la fréquence, mais cet effet, combiné à celui de la conductivité, conduit globalement à une augmentation de la fréquence d'oscillation de la microbalance à quartz.

Ainsi, certains paramètres physico-chimiques des solutions qui circulent sur le quartz jouent sur la fréquence d'oscillation de la microbalance à quartz. Dans le cas de l'utilisation de la microbalance à quartz comme transducteur d'un immunocapteur il est donc indispensable de faire circuler la solution d'antigène sur le quartz dans le même tampon que celui qui circule avant d'introduire la solution à tester. De plus, il est indispensable de vérifier la spécificité du signal mesuré en contrôlant qu'une solution de protéines différentes de l'antigène à détecter, diluées dans le même tampon, ne provoque aucune variation de la fréquence d'oscillation. Dans ce cas, nous sommes certains que la microbalance à quartz ne mesure que les variations de fréquence consécutives à la fixation des antigènes sur la couche d'anticorps immobilisée à la surface de l'électrode d'or de la microbalance à quartz.

## **2. LA MESURE COUPLEE DE LA FREQUENCE DE RESONANCE ET DE L'ADMITTANCE ELECTROACOUSTIQUE**

### **2. 1. Rappels et but**

La microbalance à quartz permet de mesurer des variations de masse, même en milieu liquide, par l'intermédiaire de la variation de sa fréquence d'oscillation, mais, comme nous l'avons vu, les propriétés physico-chimiques des solutions (et aussi celles de la couche déposée) peuvent aussi jouer sur la fréquence d'oscillation du quartz.

La réponse en fréquence de la microbalance à quartz est une réponse globale correspondant à la "somme" des différents effets influençant la fréquence d'oscillation du quartz. Afin d'essayer de discriminer ces différents effets sur la réponse globale de la microbalance nous avons mis au point un dispositif de mesure permettant de réaliser alternativement, sur le même quartz et pendant l'évolution d'un processus, des mesures d'admittance électroacoustique et des mesures de la fréquence d'oscillation de la microbalance. En effet, la mesure de l'admittance électroacoustique permet d'estimer les effets des caractéristiques viscoélastiques d'un dépôt et des propriétés des solutions sur un résonateur à quartz en regardant l'évolution des paramètres du circuit équivalent de ce résonateur.

A partir d'un même transducteur et pour un processus donné (dépôt métallique, adsorption de protéine, interaction antigène/anticorps...) nous pouvons mesurer l'admittance électroacoustique, qui nous permet de déterminer les paramètres du circuit équivalent, et la variation de la fréquence d'oscillation du quartz. Ainsi, nous pouvons comparer la variation de la fréquence d'oscillation du quartz et la variation de la fréquence série déterminée par la mesure d'admittance. Il sera aussi intéressant de comparer ces résultats à ceux obtenus grâce aux simulations du modèle d'admittance théorique développé.

Ce dispositif de mesure a donc été mis au point pour étudier le mécanisme de transduction de la microbalance à quartz en particulier pour notre application afin de valider les résultats dans le cadre de la mise au point d'un immunocapteur. Il s'agit de vérifier que le transducteur piézoélectrique ne mesure que les variations de masse consécutives à la fixation spécifique des antigènes sur les anticorps.

## 2. 2. Mise au point du dispositif de mesure

Le dispositif de mesure est constitué d'un analyseur de réseaux (Hewlett Packard 4194A) qui permet de mesurer l'admittance électroacoustique d'un résonateur à quartz et d'un fréquencemètre (Hewlett Packard 53132A) qui permet de suivre sa fréquence d'oscillation.

Les deux appareils de mesure sont associés à un commutateur électronique permettant de passer séquentiellement d'un type de mesure à l'autre. L'ensemble est piloté par un PC par l'intermédiaire d'une carte D.A. Une représentation schématique de ce dispositif est donnée figure 53.

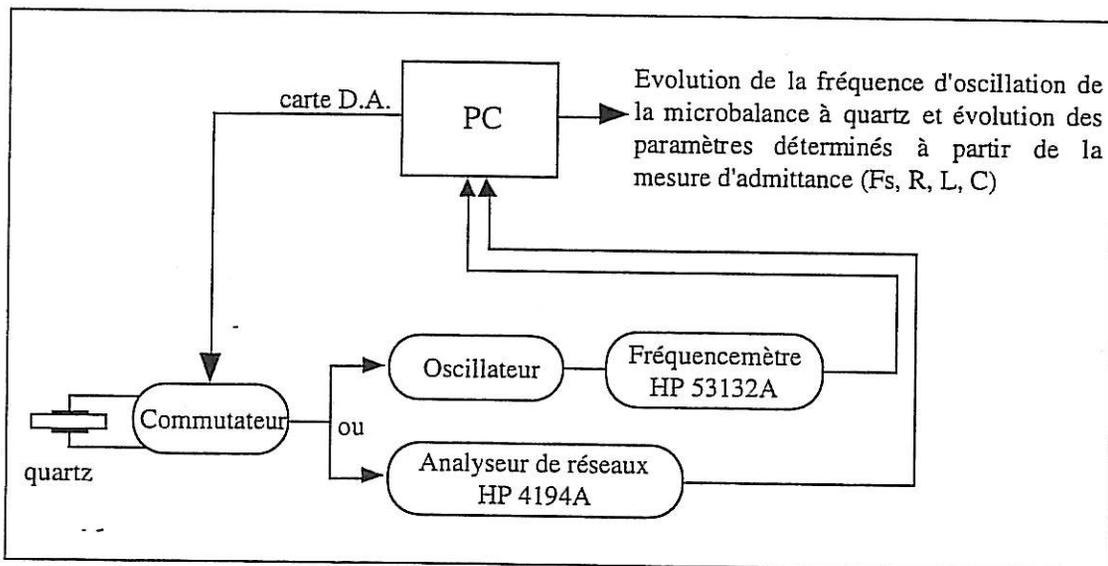


Figure 53 : Représentation schématique du dispositif expérimental permettant de réaliser des mesures alternées d'admittance électroacoustique et de fréquence d'oscillation sur un même quartz

Le logiciel permet de configurer la durée totale de la mesure, la plage du balayage en fréquence (la plage de fréquence étant déterminée automatiquement de façon optimale), la période de la mesure d'admittance (par exemple une mesure toutes les cinq minutes) et le cadencement du fréquencemètre (par exemple une mesure de fréquence toutes les deux secondes).

Une mesure couplée se déroule de la façon suivante : une première mesure d'admittance est réalisée au temps zéro, puis quand la mesure est finie le commutateur est activé et la fréquence d'oscillation du quartz est mesurée avec le cadencement choisi jusqu'au temps déterminé par la période de la mesure d'admittance (par exemple temps zéro plus cinq minutes) moment où la deuxième mesure d'admittance est réalisée etc... La mesure est totalement automatisée.

Les résultats sont stockés dans deux types de fichiers distincts. Dans une première série de fichiers sont stockés les résultats de la mesure d'admittance (partie réelle et imaginaire de l'admittance pour chaque fréquence de perturbation) pour chaque mesure. Le deuxième type de fichier stocke les résultats de la fréquence d'oscillation en fonction du temps.

Un logiciel développé au laboratoire ("Fratraq") permet d'estimer les valeurs approchées des paramètres du circuit équivalent pour chaque mesure d'admittance. Les valeurs de ces paramètres ( $R$ ,  $L$ ,  $C$ ,  $F_s$  et  $f_\phi$ ) sont obtenues d'une manière géométrique à l'aide du modèle de Butterworth van Dyke (Bouché-Pillon, 1996). Puis, ces valeurs sont affinées par l'intermédiaire d'un programme d'ajustement, développé en Fortran ("Ariane"), basé sur la méthode du simplex (ce programme minimise la somme des déviations relatives entre les mesures expérimentales de l'admittance et les valeurs calculées). La valeur des paramètres du circuit équivalent est donc obtenue pour chaque mesure d'admittance, de sorte que nous puissions suivre l'évolution dans le temps de tous les paramètres ainsi que l'évolution de la fréquence d'oscillation du quartz.

### 2. 3. Mise au point de la mesure

L'influence de l'amplitude du signal de perturbation, du temps d'intégration et du moyennage sur la mesure d'admittance réalisée à l'aide de l'analyseur de réseau ont été examinées (Grada, 1996).

Le meilleur niveau de perturbation doit être choisi pour travailler dans la zone linéaire de fonctionnement du résonateur en fonction du milieu de mesure (air, eau et tampon PBS). Un trop faible niveau d'amplitude de perturbation ne permet pas d'obtenir une bonne précision de

mesure et avec un niveau trop fort la linéarité du système piézoélectrique n'est plus assurée. L'analyseur de réseaux dispose d'un générateur interne dont le niveau de perturbation peut varier de  $126\mu\text{V}$  à  $1,26\text{V}$ . Les figures suivantes montrent l'influence du niveau de perturbation sur la partie réelle et imaginaire de l'admittance électroacoustique d'un quartz monté sur plaquette à  $27\text{ MHz}$  dans l'air et plongé dans du tampon PBS thermostaté.

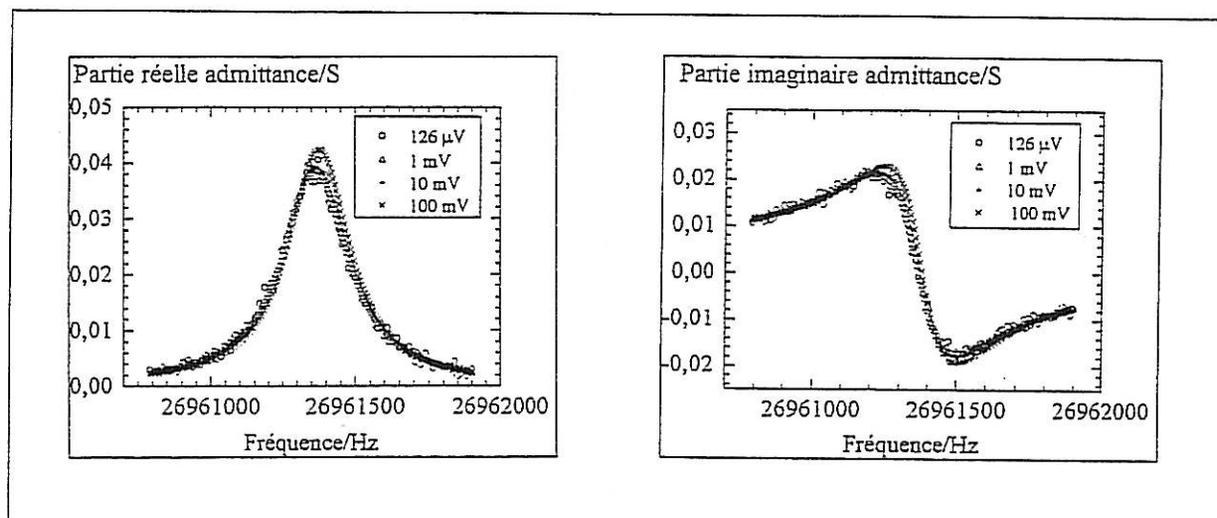


Figure 54 : Influence du niveau de perturbation sur la partie réelle et imaginaire de l'admittance électroacoustique mesurée pour un quartz à  $27\text{ MHz}$  dans l'air

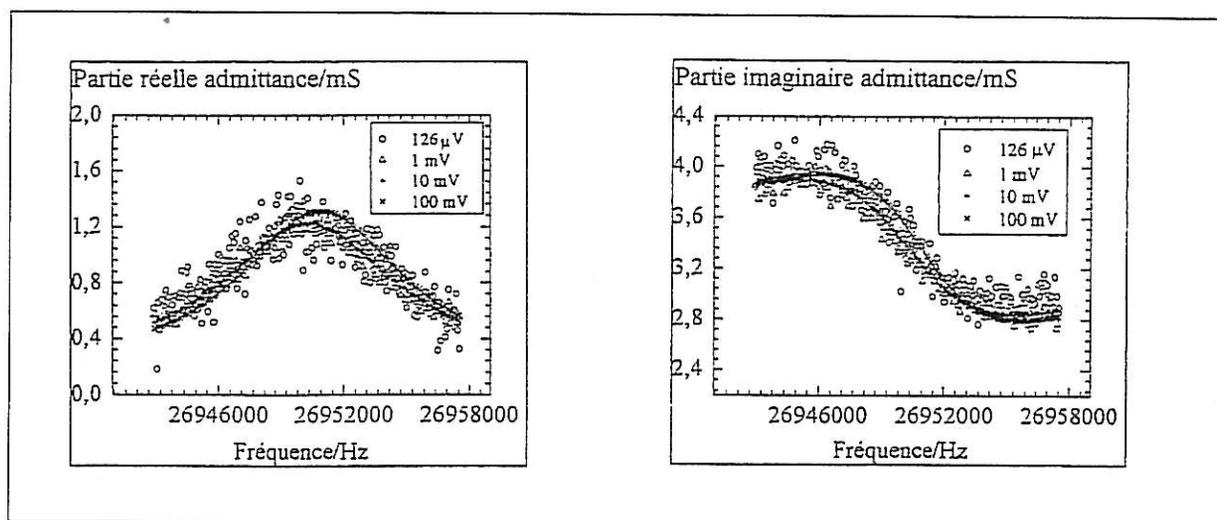


Figure 55 : Influence du niveau de perturbation sur la partie réelle et imaginaire de l'admittance électroacoustique mesurée pour un quartz à  $27\text{ MHz}$  dans le PBS

Dans l'air comme dans le PBS, un faible niveau de perturbation conduit à un signal bruité ; le rapport signal sur bruit s'améliore en augmentant ce niveau mais à  $100\text{ mV}$  le domaine de linéarité n'est plus respecté. Dans ces conditions, le choix d'un niveau de perturbation de  $10\text{ mV}$  semble le plus judicieux.

L'influence de ce niveau de perturbation a aussi été étudiée en ce qui concerne la dispersion des valeurs des paramètres estimées à partir de la mesure de l'admittance d'un quartz à 27 MHz. La figure suivante montre l'influence du niveau de perturbation sur la dispersion des valeurs de la résistance, de l'inductance et de la capacité motielle déterminées à partir de la mesure de l'admittance d'un quartz à 27 MHz dans du PBS.

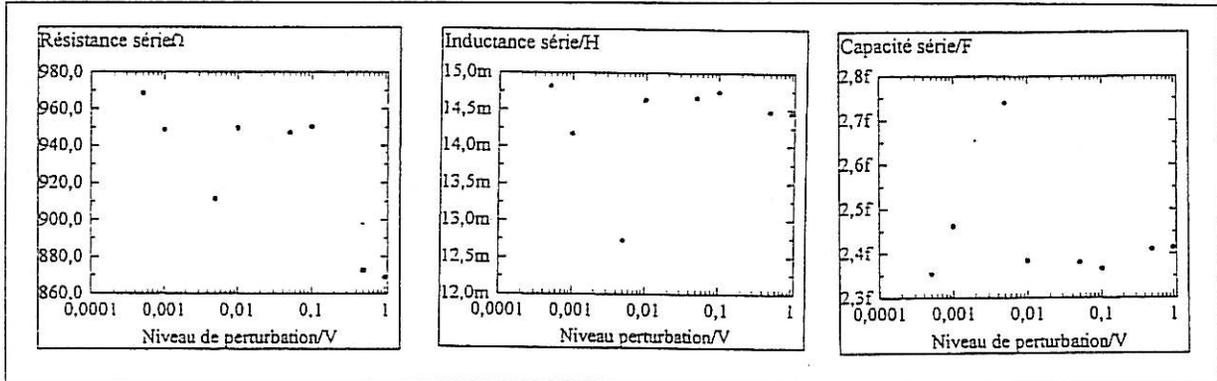


Figure 56 : Influence du niveau de perturbation sur la dispersion des valeurs de la résistance, de l'inductance et de la capacité motielle déterminées à partir des mesures d'admittance électroacoustique réalisées sur un quartz à 27 MHz dans du PBS

Les valeurs des paramètres sont dispersées aléatoirement pour les niveaux de perturbations faibles (inférieurs à 5 mV). Pour des niveaux de perturbation importants (supérieurs à 500 mV) ces valeurs dévient de la valeur trouvée en régime linéaire. Par conséquent un niveau de 10mV apparaît comme un bon choix aussi bien pour la qualité de la mesure d'admittance que pour la détermination des éléments du circuit équivalent.

La précision de la mesure d'admittance peut être modulée par deux paramètres choisis lors de la configuration de l'analyseur de réseaux : le temps d'intégration (c'est-à-dire la durée d'une mesure, à choisir entre temps court, moyen et long) et le "moyennage" (c'est-à-dire le nombre de mesures qui sera moyenné, à choisir entre 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 et 256 mesures). Pour obtenir une bonne précision de la mesure dans un temps relativement court, un temps d'intégration moyen et un moyennage sur 16 mesures ont été choisis. De cette façon une mesure d'admittance électroacoustique sur un quartz à 27 MHz prend environ 90 secondes.

### 3. ETUDES PRELIMINAIRES - ANALYSE DE LA REPONSE DU TRANSDUCTEUR

#### 3. 1. Expériences réalisées avec la microbalance à quartz

Après avoir mis au point la microbalance à quartz fonctionnant à 27 MHz en milieu liquide, nous l'avons calibrée afin de contrôler que la sensibilité massique de notre transducteur était augmentée comme le prévoyait la théorie de Sauerbrey. Puis, nous avons étudié la réponse en fréquence de la microbalance à quartz pendant l'adsorption de protéines sur l'électrode d'or.

##### 3. 1. 1. Calibration par dépôt électrochimique de cuivre

Nous avons déterminé le coefficient expérimental reliant la variation de masse à la variation de fréquence de la microbalance à quartz afin de contrôler l'augmentation de la sensibilité massique de notre nouveau transducteur. Ceci a été réalisé pour trois types de microbalances : la microbalance à 6 MHz en mode fondamental, à 9 MHz en mode fondamental et à 27 MHz (c'est-à-dire avec des quartz à 9 MHz sur le partiel 3).

Les coefficients de sensibilité expérimentaux ont été déterminés en mesurant l'évolution de la fréquence de résonance pendant un dépôt électrochimique de cuivre (dépôt élastique) sur l'électrode d'or.

En appliquant un courant au niveau de l'électrode de travail en or d'un quartz en contact avec une solution de  $\text{CuSO}_4$  0,5 M /  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M, le cuivre présent en solution, sous la forme  $\text{Cu}^{2+}$ , va se réduire et se déposer sur l'électrode ( $\text{Cu}^{2+} + 2 e^- \rightarrow \text{Cu}$  sur l'électrode). Le dépôt qui s'accumule sur l'électrode de la microbalance va donc faire diminuer sa fréquence d'oscillation. La vitesse du dépôt et donc la quantité de cuivre fixée est proportionnelle au courant appliqué. Grâce à la loi de Faraday, il est aisé de calculer la quantité d'électrons mis en jeu dans la réaction, donc de déterminer la quantité de molécules de cuivre ayant réagi pour déterminer la masse du dépôt en supposant un rendement de 100 % :

$$i = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \rightarrow \Delta Q = i \times \Delta t$$

$$1 \text{ mole } e^- \rightarrow 96500 \text{ C}$$

$$x \text{ moles } e^- \rightarrow \Delta Q = i \times \Delta t$$

$$\text{soit } x \text{ moles } e^- = \frac{i \times \Delta t}{96500}$$

dans la réaction nous avons 2 électrons pour 1 atome de cuivre

$$\text{soit } y \text{ moles de cuivre} = \frac{i \times \Delta t}{96500} \times \frac{1}{2}$$

$$\text{la masse de cuivre déposée est donc : } \Delta m = \frac{i \times \Delta t}{96500} \times \frac{1}{2} \times M_{\text{Cu}}$$

En connaissant la masse de cuivre déposée et la variation relative de la fréquence d'oscillation au bout d'un certain temps, nous pouvons calculer le coefficient de sensibilité massique expérimental  $k_{\text{ex}}$  :

$$k_{\text{ex}} = \frac{\Delta F}{\Delta m} \times A$$

où :  $\Delta F$  représente la variation relative de la fréquence d'oscillation en Hz,  $\Delta m$  la masse de cuivre déposée sur l'électrode en g et  $A$  la surface de l'électrode en  $\text{cm}^2$ .

Les quartz sont nettoyés à l'acétone et rincés à l'éthanol avant d'être montés sur les supports en fibre de verre époxy (montage sur plaquette). Les plaquettes pourvues d'un connecteur BNC sont disposées sur un boîtier d'oscillateur (contenant un oscillateur à 6, 9 ou 27 MHz) relié au fréquencemètre.

Les courants appliqués à l'aide d'un galvanostat (Sotalem) sont compris entre 0,1 mA et 4 mA. En effet, les courants ne doivent pas être trop importants pour ne pas faire des dépôts de cuivre trop lourds ce qui aurait pour effet de faire "décrocher" la microbalance à cause d'un amortissement trop important. Cependant, les dépôts doivent être suffisamment réguliers et homogènes ce qui est difficile à obtenir avec des courants très faibles (inférieurs à 0,5 mA). Pour résoudre ce problème, nous imposons une impulsion de courant élevé (10 mA) pendant 1 seconde à l'aide d'un générateur (Wavetek, model 187), le courant constant de dépôt est ensuite appliqué. Ceci permet d'obtenir des dépôts homogènes sur toute la surface de l'électrode.

Les trois figures suivantes présentent l'évolution des variations de fréquence des trois microbalances testées (6, 9 et 27 MHz), en fonction du temps, pendant l'électrodéposition du cuivre réalisée à différents courants.

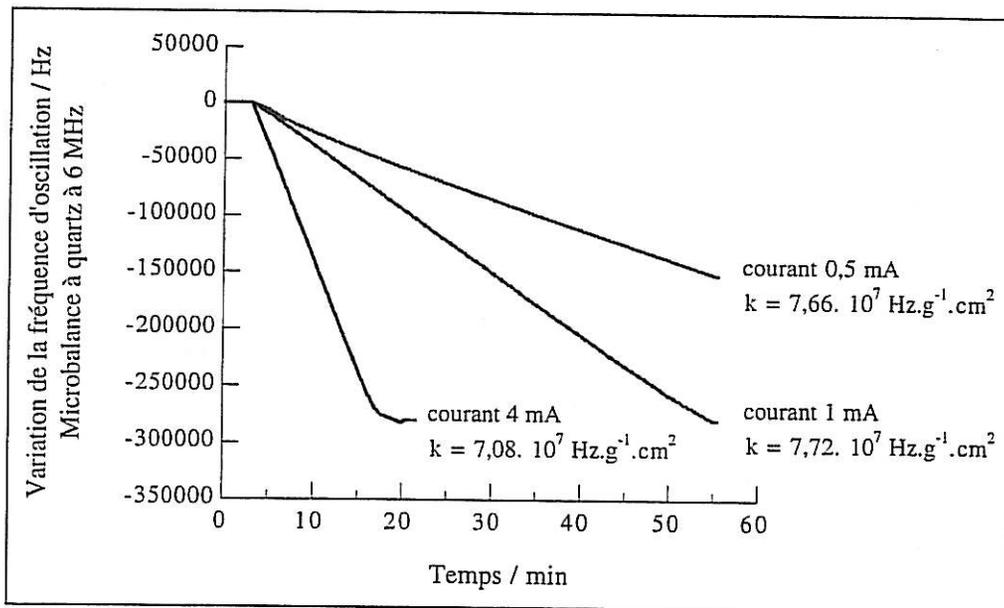


Figure 57 : Evolution de la variation de la fréquence de trois quartz oscillant à 6 MHz en fonction du temps pendant l'électrodéposition du cuivre réalisée à différents courants

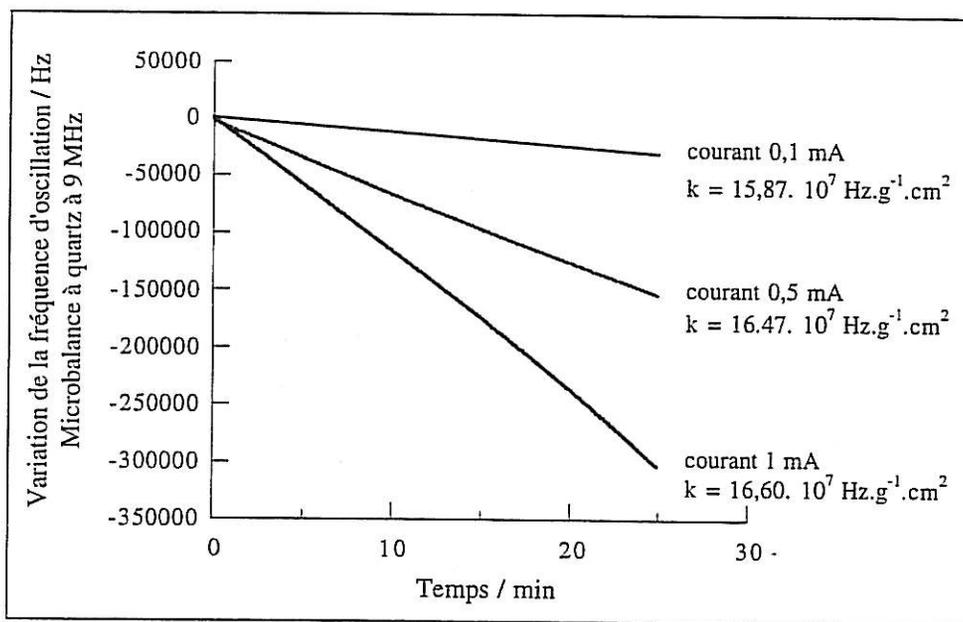


Figure 58 : Evolution de la variation de la fréquence de trois quartz oscillant à 9 MHz en fonction du temps pendant l'électrodéposition du cuivre réalisée à différents courants

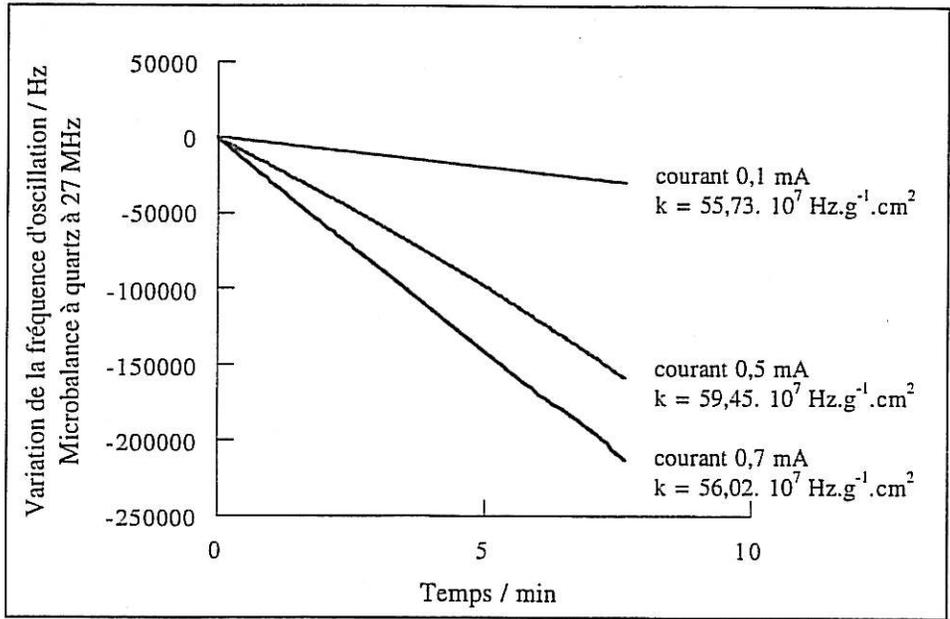


Figure 59 : Evolution de la variation de la fréquence de trois quartz oscillant à 27 MHz en fonction du temps pendant l'électrodéposition du cuivre réalisée à différents courants

La fréquence d'oscillation des quartz pendant le dépôt diminue de manière linéaire en fonction du temps (figures 57, 58 et 59). Cette variation est proportionnelle à la masse de cuivre déposé. Les coefficients de sensibilité massique expérimentaux (calculés et moyennés pour les différents courants) et théoriques (calculés à partir de l'équation de Sauerbrey) sont présentés dans le tableau X.

Fréquence de résonance en MHz	Coefficient de sensibilité massique expérimental moyen en $\text{Hz.g}^{-1}.\text{cm}^2$ ( $\times 10^7$ )	Coefficient de sensibilité théorique (Sauerbrey) en $\text{Hz.g}^{-1}.\text{cm}^2$ ( $\times 10^7$ )
6	7,49 +/- 0,29 RSD = 4 %	8,15
9	16,31 +/- 0,32 RSD = 2 %	18,3
27 (9 partiel 3)	57,07 +/- 1,69 RSD = 3 %	54,9

Tableau X : Coefficients de sensibilité expérimentaux et théoriques pour différentes fréquences de résonance

Les coefficients expérimentaux déterminés pour les différentes fréquences de résonance sont très proches des coefficients théoriques calculés à partir de l'équation de Sauerbrey. Les différences observées peuvent s'expliquer par le fait que la théorie de Sauerbrey a été validée pour des mesures de fréquence dans l'air et que nos mesures ont été réalisées en milieu liquide.

Pour estimer cette différence, le tableau suivant présente la masse correspondant à une variation de fréquence de 1 Hz pour une électrode de 0,2 cm<sup>2</sup> calculée à partir du coefficient de sensibilité expérimental et théorique pour les différentes microbalances. En terme de masse, ces différences sont très faibles surtout concernant le dispositif à 27 MHz.

Masse correspondant à une variation de fréquence de 1 Hz pour une électrode de 0,2 cm <sup>2</sup> de surface calculée à partir :			
Fréquence de résonance	du coefficient de sensibilité expérimental	du coefficient de sensibilité théorique	Différence
6 MHz	2670 pg	2454 pg	216 pg
9 MHz	1226 pg	1093 pg	133 pg
27 MHz (p3)	350 pg	364 pg	14 pg

Tableau XI : Comparaison des masses correspondant à une variation de fréquence de 1 Hz pour une électrode de 0,2 cm<sup>2</sup> calculées à partir du coefficient de sensibilité expérimental et théorique pour différentes fréquences de résonance

Nous avons donc vérifié que la sensibilité massique de la microbalance à quartz à 27 MHz (9 MHz sur le partiel 3) est bien augmentée dans les proportions prévues par l'équation de Sauerbrey. Pour ce type de dépôt quasi élastique et assez épais, la réponse de nos microbalances peut être considérée comme purement massique et la sensibilité atteint 350 pg/Hz pour le dispositif à 27 MHz développé.

### 3. 1. 2. Mesure de l'adsorption de protéines

L'étude de l'adsorption des protéines est particulièrement importante dans le cadre, par exemple, de la recherche de matériaux biocompatibles (et en particulier pour des matériaux en contact avec le sang), mais aussi dans le domaine de la pharmacie pour étudier l'influence du conditionnement d'un médicament sur ces propriétés actives... (Andrade, 1985). L'adsorption d'une protéine sur un support met en jeu des interactions électrostatiques et hydrophobes, des ponts hydrogène et des forces de van der Waals entre la protéine et le support. La microbalance à quartz est dans ce cadre un outil tout à fait intéressant car elle permet de suivre les cinétiques d'adsorption en temps réel (Rodahl et al., 1997).

Nous avons utilisé notre microbalance à quartz pour suivre les cinétiques d'adsorption de différentes protéines sur l'électrode d'or et pour étudier le comportement de notre transducteur avec une couche de protéine. Nous avons choisi d'utiliser trois protéines douées

d'activité enzymatique spécifique, de poids moléculaire et de structure différents. Il s'agit de la peroxydase, de la phosphatase alcaline et de la  $\beta$ -D-galactosidase (Sigma). Quelques caractéristiques de ces trois enzymes sont données dans le tableau suivant.

Nom de l'enzyme	Classification	Poids moléculaire et structure	substrat et solution substrat	n° lot
Peroxydase	EC 1. 11. 1. 7	44000 g/mol monomérique	tampon citrate phosphate pH 4,3 avec 0,01% d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à 30% et 1 mM d'ABTS	62H95051
Phosphatase alcaline	EC 3. 1. 3. 1	140000 g/mol dimérique	tampon TRIS 0,2 M avec 1 mg/ml de pNPP	24H7090
$\beta$ -D-galactosidase	EC 3. 2. 1. 23	470000 g/mol tétramérique	tampon phosphate 0,1 M pH 7,3 avec 1 mM de MgCl <sub>2</sub> , 112 mM de $\beta$ mercaptoéthanol et 2,3 mM d'ONPGalactopyranoside	55H6851

Tableau XII : Caractéristiques des enzymes utilisées

Nous avons choisi d'utiliser des enzymes afin de pouvoir déterminer la quantité de protéines, enzymatiquement actives, adsorbées sur l'électrode d'or (après le suivi de la cinétique d'adsorption à l'aide de la microbalance à quartz) grâce à la mesure de l'activité enzymatique spécifique au niveau de l'électrode du quartz. En effet, en ajoutant la "solution substrat" adéquate au niveau de l'électrode, les enzymes actives dégradent leur substrat ce qui génère l'apparition d'un produit coloré, l'intensité de la coloration étant directement proportionnelle à la quantité d'enzyme active. La densité optique de la solution peut être mesurée et comparée à la densité optique mesurée d'une gamme d'enzyme en solution. Ceci doit nous permettre de calculer la quantité d'enzyme active sur l'électrode d'or. Cette valeur pourra ensuite être comparée à la valeur estimée par la réponse en fréquence de la microbalance et à la valeur théorique de la masse d'une monocouche d'enzymes. Les protocoles expérimentaux de la préparation des enzymes et de la mesure de leur activité enzymatique au niveau des électrodes est donnée en annexe (annexes I, II et III).

La figure 60 présente l'évolution de la variation de la fréquence d'oscillation d'un-quartz en fonction du temps pendant la circulation d'une solution de PBS suivie d'une solution de peroxydase concentrée à 100  $\mu$ g/ml (le débit utilisé est de 50  $\mu$ l/min et les deux solutions sont thermostatées).

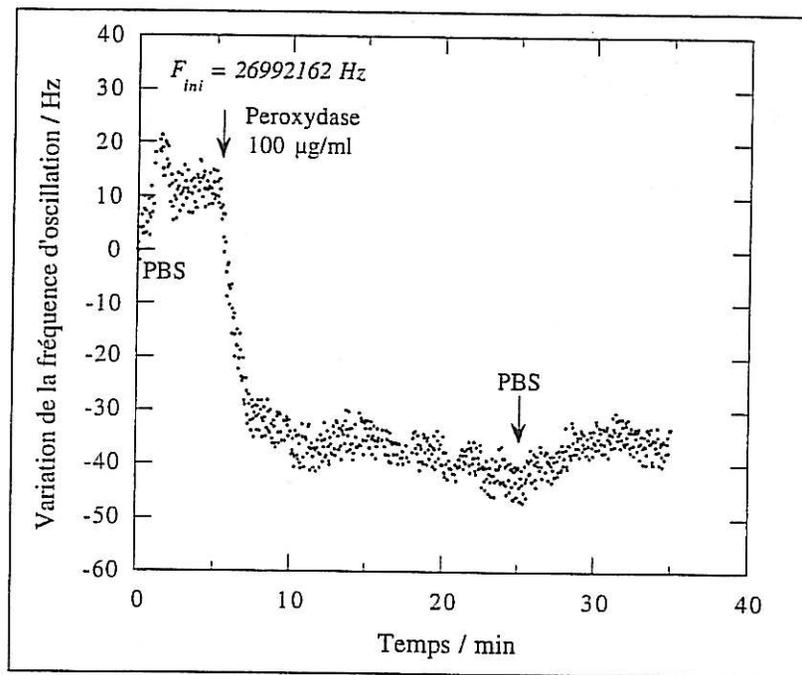


Figure 60 : Evolution de la fréquence en fonction du temps pendant la circulation d'une solution de PBS et d'une solution de peroxydase concentrée à 100 µg/ml au débit de 50 µl/min

L'arrivée de la solution de peroxydase provoque une diminution rapide de la fréquence d'oscillation du quartz d'une cinquantaine de Hz, celle-ci étant attribuée à l'augmentation de masse liée à l'adsorption de la protéine sur l'électrode d'or. Le rinçage effectué par le tampon PBS provoque une légère remontée de la fréquence pouvant être attribuée à une légère désorption de la peroxydase.

Nous pouvons faire le calcul théorique de la masse d'une monocouche de peroxydase en faisant l'hypothèse que la molécule est globulaire et en tenant compte de son poids moléculaire. Le diamètre de la peroxydase peut alors être estimé à 6,685 nm (Collino, 1997) et son poids est de  $7,31 \cdot 10^{-20}$  g. En supposant que les molécules forment une monocouche, que chaque molécule occupe la surface d'un carré et en prenant comme coté la valeur du diamètre de la molécule, la densité surfacique pour la peroxydase peut être estimée à  $163 \text{ ng/cm}^2$ . En tenant compte de la surface de notre électrode, la masse théorique d'une monocouche de peroxydase correspond à 32,7 ng ce qui équivaut, pour notre dispositif, à une variation de fréquence de 93 Hz. La variation de fréquence mesurée (48 Hz) correspond à une masse de 16,8 ng (en utilisant le coefficient reliant la masse à la fréquence déterminé expérimentalement), il semble donc que la peroxydase ne forme pas une monocouche sur la surface de l'électrode.

De plus, la masse de peroxydase estimée par la mesure de l'activité peroxydasique au niveau de l'électrode de ce quartz est de 1,24 ng, nous observons donc un écart (x 13,5) entre la

masse estimée par la microbalance à quartz et la masse estimée avec la mesure de l'activité enzymatique; c'est-à-dire que la masse estimée par la microbalance est 13,5 fois plus importante que celle estimée par le dosage enzymatique.

Nous avons alors estimé le comportement d'autres protéines pour voir si cette différence entre la masse estimée par la microbalance et par le dosage enzymatique était aussi observée.

La figure 61 présente l'évolution de la variation de la fréquence d'oscillation de deux quartz (les deux fréquences sont remises à zéro) en fonction du temps pendant la circulation d'une solution de PBS puis d'une solution de phosphatase alcaline concentrée à 1 et 10  $\mu\text{g/ml}$ . Les solutions circulent au débit de 50  $\mu\text{l/min}$  et sont toutes thermostatées.

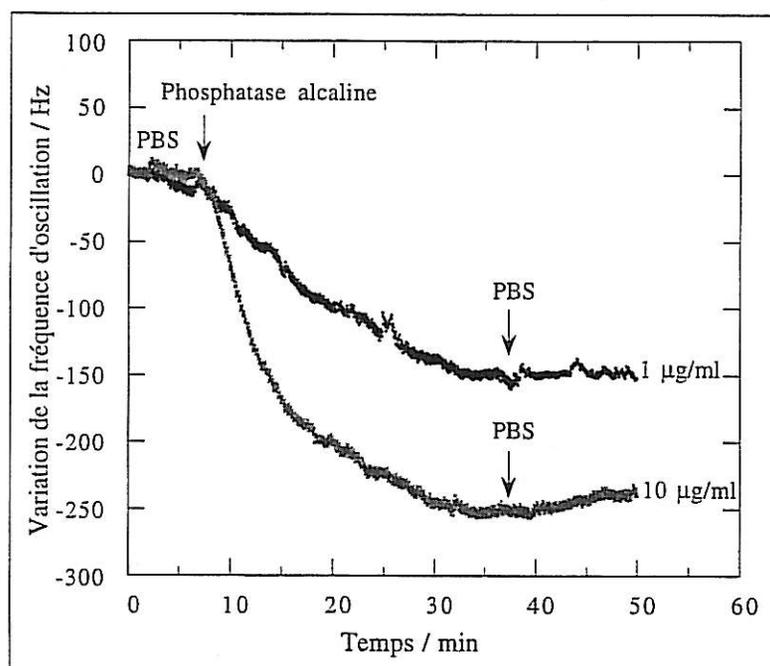


Figure 61 : Evolution de la variation de la fréquence d'oscillation de deux quartz en fonction du temps pendant la circulation d'une solution de PBS et d'une solution de phosphatase alcaline concentrée à 1 et 10  $\mu\text{g/ml}$

L'arrivée de la solution de phosphatase alcaline sur les quartz provoque une diminution de la fréquence d'oscillation. Les profils d'adsorption sont différents pour les deux concentrations, l'adsorption est plus lente pour la plus faible concentration (le profil de la cinétique d'adsorption d'une solution plus concentrée que 10  $\mu\text{g/ml}$  coïncide avec celui obtenu pour la concentration de 10  $\mu\text{g/ml}$  et le plateau atteint, après rinçage, est identique). Pour la concentration de 1  $\mu\text{g/ml}$ , la variation de la fréquence d'oscillation après rinçage au PBS est de 137 Hz alors que pour la concentration de 10  $\mu\text{g/ml}$  celle-ci atteint 241 Hz (en tenant compte

de la légère désorption). Ces deux variations de fréquence correspondent respectivement à 47,9 et 84,3 ng d'enzymes adsorbées sur l'électrode.

Le diamètre d'une molécule de phosphatase alcaline peut être estimé à 10 nm en faisant l'hypothèse que la molécule est sphérique (Collino, 1997) et son poids est de  $2,326 \cdot 10^{-19}$ g. Le calcul théorique de la densité surfacique d'une monocouche de phosphatase alcaline donne 233 ng/cm<sup>2</sup> (en suivant le même raisonnement que pour la peroxydase), soit une masse de 46,6 ng pour la surface de nos électrodes, ce qui correspond à une variation de fréquence de 133 Hz. La variation de fréquence occasionnée par la circulation de la solution de phosphatase alcaline concentrée à 1 µg/ml (137 Hz) est comparable à la variation de fréquence théorique associée à la formation d'une monocouche d'enzyme sur l'électrode (133 Hz). Pour la solution plus concentrée (10 µg/ml), la variation de fréquence mesurée (241 Hz) est supérieure à celle correspondant à la formation d'une monocouche. Pour cette concentration, il est possible que la phosphatase alcaline forme une première monocouche puis, presque, une seconde (266 Hz pour deux monocouches avec le calcul théorique) ou bien que les protéines s'agrègent sur cette première couche.

La masse de phosphatase alcaline estimée par la mesure de l'activité enzymatique spécifique au niveau des quartz est de 3,2 ng pour le quartz en contact avec la solution concentrée à 1 µg/ml (contre 47,9 ng estimés par la réponse de la microbalance à quartz) et de 10,6 ng pour l'autre quartz en contact avec la solution concentrée à 10 µg/ml (contre 84,3 ng estimés par la réponse de la microbalance à quartz). Nous observons donc, encore, un écart entre les deux estimations de la masse. D'une part, les deux écarts observés pour la phosphatase alcaline (x 15 pour la solution à 1 µg/ml et x 8 pour celle à 10 µg/ml) sont différents de celui observé pour la peroxydase et d'autre part, pour la même molécule, l'écart varie en fonction de la concentration de la solution qui circule sur le quartz (donc en fonction de la quantité de protéines adsorbées).

La figure suivante présente l'évolution de la variation de la fréquence d'oscillation de deux quartz (les deux fréquences sont remises à zéro) en fonction du temps pendant la circulation d'une solution de PBS et d'une solution de β-D-galactosidase concentrée à 1 et 10 µg/ml. Les solutions circulent au débit de 50 µl/min et sont toutes thermostatées.

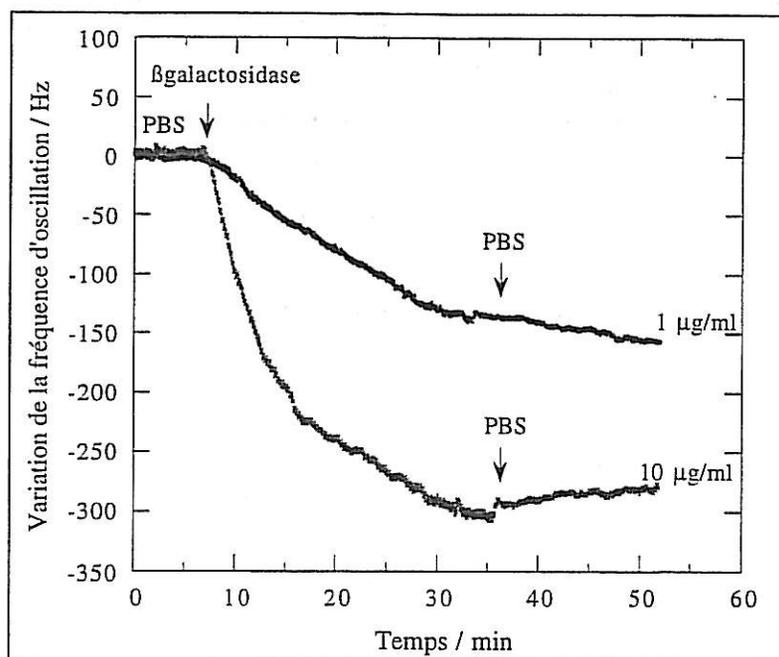


Figure 62 : Evolution de la variation de la fréquence d'oscillation de deux quartz en fonction du temps pendant la circulation d'une solution de PBS et d'une solution de  $\beta$ -D-galactosidase concentrée à 1 et 10  $\mu\text{g/ml}$

L'arrivée de la solution de  $\beta$ -D-galactosidase sur les quartz provoque une chute de la fréquence d'oscillation des quartz, la cinétique d'adsorption de la protéine en faible concentration est plus lente que celle mesurée pour la solution plus concentrée. Comme dans le cas de la phosphatase alcaline, le profil de la cinétique d'adsorption obtenu pour une solution encore plus concentrée (100  $\mu\text{g/ml}$  par exemple) est similaire à celui obtenu pour une solution de  $\beta$ -D-galactosidase concentrée à 10  $\mu\text{g/ml}$  et le même plateau est atteint après rinçage. La variation de la fréquence d'oscillation mesurée est de 150 Hz pour la circulation de la solution concentrée à 1  $\mu\text{g/ml}$  et de 300 Hz pour la solution concentrée à 10  $\mu\text{g/ml}$ . Ces variations correspondent respectivement à 52,5 et 105 ng d'enzyme adsorbées sur les électrodes.

Le diamètre d'une molécule de  $\beta$ -D-galactosidase peut être estimé à 14,9 nm et son poids est de  $7,807 \cdot 10^{-19}\text{g}$ . Le calcul théorique de la densité surfacique d'une monocouche de  $\beta$ -D-galactosidase donne  $350 \text{ ng/cm}^2$ , soit une masse de 70 ng pour la surface de nos électrodes, ce qui correspond à une variation de fréquence de 200 Hz. Les variations de la fréquence d'oscillation mesurées se situent en dessous de la variation de fréquence théorique associée à la formation d'une monocouche de  $\beta$ -D-galactosidase pour la solution concentrée à 1  $\mu\text{g/ml}$  et au dessus pour la solution concentrée à 10  $\mu\text{g/ml}$ .

La masse de  $\beta$ -D-galactosidase estimée par la mesure de son activité enzymatique au niveau des électrodes est de 5,9 ng pour le quartz en contact avec la solution concentrée à 1

$\mu\text{g/ml}$  (contre 52,5 ng estimés par la réponse en fréquence de la microbalance) et de 15 ng pour le quartz en contact avec la solution concentrée à 10  $\mu\text{g/ml}$  (contre 105 ng estimés par la réponse en fréquence de la microbalance). Ici encore, nous observons un écart entre les deux estimations. Les écarts observés pour la  $\beta$ -D-galactosidase (x 9 pour la solution à 1  $\mu\text{g/ml}$  et x 7 pour celle à 10  $\mu\text{g/ml}$ ) sont différents de ceux déjà observés pour les deux autres enzymes. Et comme dans le cas de la phosphatase alcaline, l'écart varie en fonction de la concentration de la solution qui circule sur la microbalance à quartz.

Deux hypothèses non exclusives peuvent être avancées pour expliquer ce problème de non concordance de l'estimation de la masse que nous retrouvons pour les trois types d'enzymes :

- soit la microbalance à quartz fournit une réponse surévaluée de la quantité de protéines adsorbées sur l'électrode,
- soit la mesure de l'activité enzymatique donne une quantité de protéine sous-évaluée.

Les résultats de nos expériences laissent suggérer que l'écart entre les deux estimations viendrait plutôt d'un problème concernant la mesure de l'activité enzymatique. En effet, d'une part, nous comparons l'activité enzymatique d'une enzyme adsorbée à l'activité enzymatique d'une enzyme en solution. Ceci peut introduire un biais dans le dosage mais cela n'explique pas pourquoi l'écart varie avec la concentration d'enzyme (donc avec la quantité d'enzyme adsorbée sur le quartz). D'autre part, ce dernier point est important car les enzymes en s'adsorbant peuvent se dénaturer ce qui diminue leur activité spécifique et le taux de dénaturation peut dépendre de la quantité d'enzyme sur la surface et de leur environnement. En effet, le fait de former plusieurs monocouches, ou une monocouche et des agrégats, peut protéger les enzymes de la dénaturation. Les enzymes adsorbées sur la première couche peuvent ainsi rester plus actives et dans ce cas la différence est alors moins grande entre les deux estimations de la masse. Néanmoins, nous ne pouvons pas non plus rejeter l'hypothèse d'une surestimation de la masse mesurée par la microbalance à quartz car nous utilisons pour calculer la masse déposée le coefficient masse/fréquence déterminé expérimentalement avec le dépôt d'une couche métallique. Les propriétés viscoélastiques du film formé par les protéines sont différentes de celle de la couche de métal et ce paramètre peut influencer la fréquence. Afin d'étudier ces phénomènes nous avons réalisé des mesures couplées d'admittance électroacoustique et de fréquence d'oscillation durant l'adsorption de protéines.

Il faut rappeler que dans le but de développer l'immunocapteur, ce n'est pas la réponse "absolue" de la microbalance à quartz (c'est-à-dire la masse d'antigènes fixés spécifiquement sur les anticorps immobilisés) qui est utilisée puisque nos résultats seront comparés à une gamme d'étalonnage réalisée avec la microbalance (variation de la fréquence d'oscillation en

fonction de la concentration en antigène). Néanmoins, il est important de bien comprendre le fonctionnement de la microbalance avec de tels films de protéines et dans un environnement aqueux, afin de valider son utilisation.

### 3. 2. Mesures couplées pendant l'adsorption de protéines

Ces expériences ont été réalisées à l'aide du dispositif de mesures couplées décrit précédemment. Nous avons mesuré alternativement la fréquence et l'admittance électroacoustique d'un résonateur à quartz avant (dans l'air) et pendant la circulation sur le quartz (installé dans la cellule miniature) d'une solution de PBS et d'une solution de protéine. Ces expériences ont été réalisées pendant l'adsorption des trois enzymes (peroxydase, phosphatase alcaline et  $\beta$ -D-galactosidase), mais nous ne décrivons que les résultats concernant l'adsorption de  $\beta$ -D-galactosidase car c'est l'adsorption de cette enzyme qui provoque la plus grande variation de fréquence. Les observations et les conclusions sont toutefois identiques pour les deux autres protéines.

Toutes les solutions sont thermostatées à + 20°C et circulent à un débit de 50  $\mu$ l/min. La période entre deux mesures d'admittance est de 5 minutes et le cadencement du fréquencemètre est de 5 secondes. Après chaque expérience, les résultats de la mesure d'admittance sont ajustés par les programmes Fratrac puis Ariane afin de déterminer les paramètres du circuit équivalent du résonateur à quartz. Le tableau XIII présente la valeur des paramètres du circuit équivalent et de la fréquence d'oscillation du quartz pour des mesures dans l'air et dans le tampon PBS.

Mesure	R / $\Omega$	L / mH	Cp / pF	Fs / Hz	Fmicrobalance / Hz
dans l'air	17,78	13,04543	20,871	27018937	27020444
dans le PBS	510,11	13,05478	22,755	27013585	27015250

*Tableau XIII : Valeurs des paramètres du circuit équivalent déterminés à partir de la mesure d'admittance électroacoustique et valeur de la fréquence d'oscillation du quartz pour des mesures dans l'air et dans le PBS*

Les figures qui suivent présentent l'évolution en fonction du temps de la fréquence d'oscillation du quartz, de la fréquence série et de la résistance pendant la circulation des solutions. Sur les figures, les flèches indiquent le moment où la solution de protéine arrive sur le quartz et le moment où le rinçage au tampon PBS est effectué.

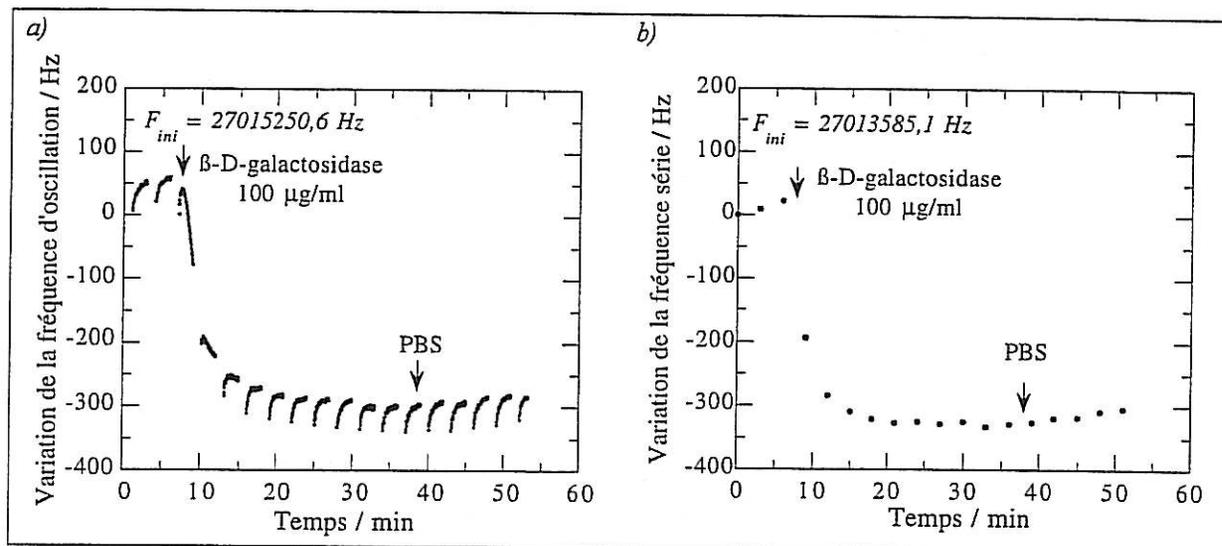


Figure 63 : Evolution de la variation de la fréquence de la microbalance (a) et de la fréquence série (b) déterminée à partir des mesures d'admittance électroacoustique pendant la circulation d'une solution de PBS et de  $\beta$ -D-galactosidase

L'arrivée de la solution de  $\beta$ -D-galactosidase provoque une diminution de la fréquence d'oscillation du quartz de 335 Hz consécutive à l'adsorption de la protéine (figure 63 a), les intervalles observés sur cette figure correspondent aux instants où la mesure de l'admittance est réalisée. Quand la mesure de la fréquence d'oscillation est de nouveau réalisée, à la fin d'une mesure d'admittance, la fréquence se stabilise après un régime transitoire qui dure une trentaine de secondes. La fréquence série expérimentale, déterminée à partir des mesures d'admittance (équation 24, chapitre II), est aussi sensible à l'adsorption des protéines et la diminution en valeur relative de cette fréquence est similaire à celle de la fréquence de la microbalance à quartz (figure 63 b).

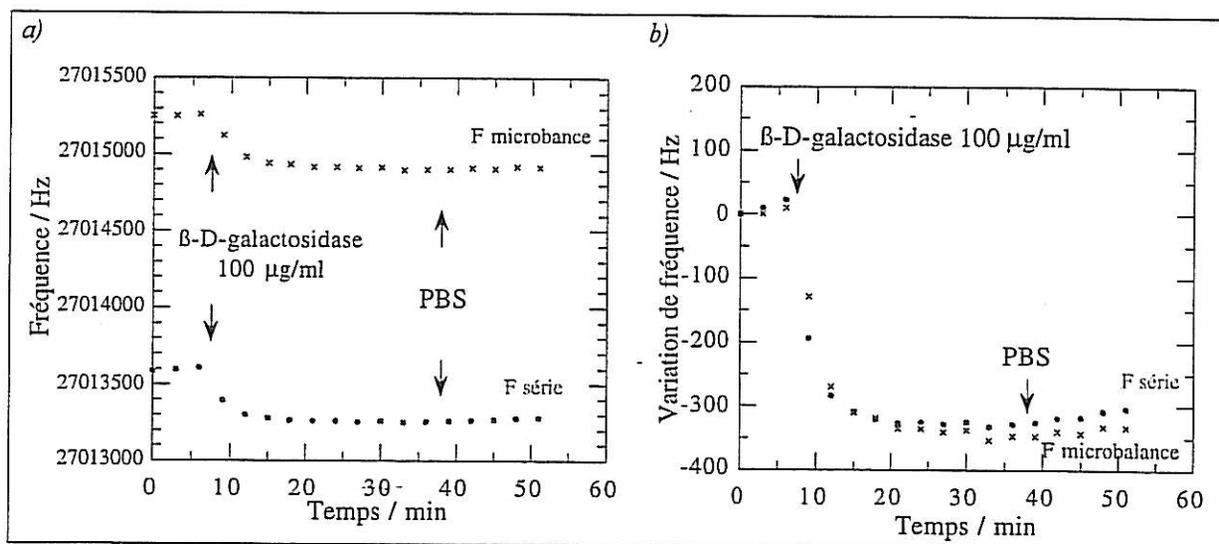


Figure 64 : Evolution de la fréquence absolue de la microbalance à quartz et de la fréquence série absolue (a) et évolution des variations des deux fréquences remises à zéro (b) pendant la circulation d'une solution de PBS et de  $\beta$ -D-galactosidase

En valeur absolue, les deux fréquences sont différentes (figure 64 a) et la valeur de la fréquence d'oscillation de la microbalance est systématiquement plus grande que celle de la fréquence série (dans l'air comme en milieu liquide). Si nous représentons sur le même graphique (figure 64 b) la variation des deux fréquences remises à zéro (pour la fréquence d'oscillation, nous avons pris la dernière mesure de fréquence avant la mesure d'admittance qui suit) nous pouvons voir que ces variations sont pratiquement confondues. Ainsi, même si en valeur absolue les deux fréquences sont différentes, leurs variations sont identiques.

La mesure de l'activité enzymatique au niveau de l'électrode du quartz réalisée à la fin de l'expérience a permis d'estimer la masse à 20 ng de  $\beta$ -D-galactosidase enzymatiquement active. La réponse en fréquence (335 Hz) équivaut à une masse 117 ng pour notre électrode, nous observons donc un écart de 6 entre les deux estimations.

L'évolution de la résistance motionnelle pendant l'expérience est représentée figure 65. L'arrivée de la protéine provoque une augmentation de la valeur de la résistance de 6  $\Omega$ , puis la résistance diminue lors du rinçage au PBS.

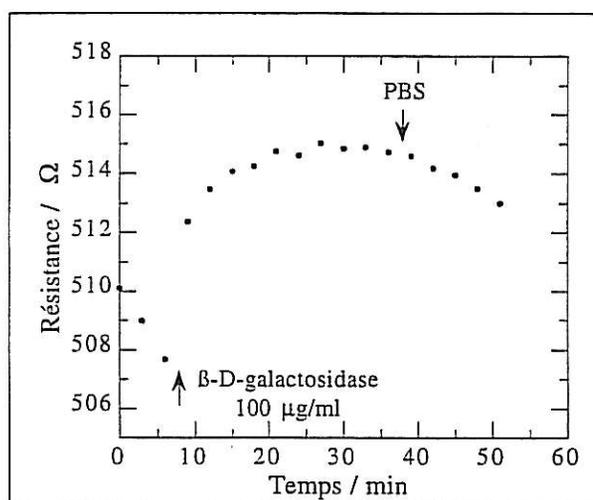


Figure 65 : Evolution de la résistance déterminée à partir des mesures d'admittance électroacoustique pendant la circulation d'une solution de PBS et de  $\beta$ -D-galactosidase

La résistance caractérise l'amortissement du quartz et ce paramètre est sensible aux propriétés viscoélastiques de la couche, comme les simulations à l'aide de notre modèle l'ont montrées (chapitre II, paragraphe 4.4). L'arrivée de la protéine provoque une variation de la résistance et l'effet du lavage est aussi visible. Celui-ci peut entraîner un remaniement de la couche de protéine pouvant s'expliquer par un changement de conformation des protéines et/ou par la légère désorption observée sur la réponse en fréquence. Ces phénomènes (formation de la couche et remaniement) sont accompagnés de changements de la viscoélasticité au niveau du quartz que la résistance distingue.

Notre modèle nous a montré que des variations de la viscoélasticité de la couche déposée sur l'électrode de la microbalance à quartz pouvait induire une erreur de 8 % (au maximum) sur l'estimation de la masse du dépôt à partir de la variation de la fréquence série. Nous mesurons expérimentalement de telles variations des propriétés viscoélastiques par l'intermédiaire de la résistance. Comme les variations relatives de la fréquence d'oscillation de la microbalance à quartz et celles de la fréquence série sont identiques, nous pouvons penser que la réponse en fréquence de la microbalance est aussi influencée par les changements viscoélastiques, en parallèle de l'effet massique, et dans les mêmes proportions. Une erreur de 8 % sur l'estimation de la masse déterminée à partir de la réponse en fréquence de la microbalance correspond à 9 ng pour les 117 ng correspondant aux 335 Hz de variation de fréquence. Ces résultats confirment l'hypothèse que la mesure de l'activité enzymatique des enzymes adsorbées sur l'or correspond à un dosage par défaut. En effet, même en tenant compte de l'erreur, l'estimation de la masse par la microbalance reste très différente des 20 ng estimés par le dosage.

Il semble que les mesures de masse effectuées à l'aide de la microbalance à quartz dans le cas d'une couche de protéine et en milieu liquide soient fiables avec une erreur maximale de 8 % dans le cas où la viscoélasticité de la couche au niveau de l'électrode varie.

## CONCLUSION

Ce chapitre avait pour but d'exposer le travail réalisé concernant la mise au point de notre microbalance à quartz et des techniques permettant son étude dans le cadre de son utilisation comme transducteur d'un immunocapteur.

Nous avons augmenté la sensibilité massique de notre dispositif en développant un oscillateur pour la microbalance permettant de faire osciller des quartz à 27 MHz en milieu liquide. Nous avons conçu et développé une cellule miniature permettant de faire circuler un faible volume de solution sur le quartz et nous avons optimisé l'ensemble du dispositif, notamment en ce qui concerne l'influence de la température, afin de réduire les dérives et le bruit de fond de la fréquence d'oscillation. La microbalance a ensuite été calibrée et son fonctionnement en milieu liquide, avec un dépôt de protéines, a été étudié et validé par le biais de la mise au point de mesures couplées de la fréquence d'oscillation et de l'admittance électroacoustique du résonateur. Ce dispositif, dorénavant bien caractérisé, est tout à fait exploitable comme transducteur pour la réalisation d'un immunocapteur.

*Chapitre IV*

***ELABORATION ET CARACTERISATION  
DE LA COUCHE IMMUNOSENSIBLE***

## INTRODUCTION

L'immobilisation d'anticorps à la surface d'un transducteur est une étape primordiale dans la mise au point d'un immunocapteur car la qualité de la couche bioréceptrice conditionnera l'efficacité du capteur, entre autres, en termes de sensibilité et de spécificité. Le but à atteindre lors de cette étape n'est pas forcément une grande quantité d'immunoglobulines immobilisées mais plutôt le maintien d'une bonne immunoréactivité de ces anticorps quelle que soit la technique d'immobilisation utilisée.

Nous exposerons dans ce chapitre les techniques mises en œuvre pour immobiliser les anticorps du couple antigène/anticorps choisi. Nous présenterons les différentes méthodes utilisées pour contrôler cette immobilisation afin de pouvoir comparer les différentes techniques d'immobilisations testées. Enfin, nous étudierons l'influence du flux et de la vibration du quartz sur l'efficacité de la réaction antigène/anticorps.

## 1. IMMOBILISATION DES ANTICORPS SUR LES ELECTRODES EN OR DE LA MICROBALANCE A QUARTZ

### 1. 1. Choix du couple antigène/anticorps

Nous avons choisi un couple expérimental antigène/anticorps qui nous permet de contrôler facilement l'immunoréactivité des immunoglobulines. Il s'agit d'anticorps monoclonaux de souris anti-peroxydase et notre antigène est la peroxydase. Grâce à l'activité enzymatique spécifique de notre antigène, nous pouvons contrôler la quantité de peroxydase, enzymatiquement active, fixée spécifiquement sur les anticorps immobilisés et donc estimer la quantité d'anticorps *immunoréactifs* immobilisés.

Il faut noter que la détection de la peroxydase n'est d'aucun intérêt dans le domaine de la biologie médicale ni dans le secteur militaire, mais que ce couple antigène/anticorps constitue un modèle pour caractériser l'immobilisation des anticorps et étudier l'influence de la microbalance à quartz sur la réaction antigène/anticorps. Nous utiliserons, comme nous le verrons dans le dernier chapitre, deux autres couples antigène/anticorps plus représentatifs dans le cadre de la détection. Il s'agit d'anticorps anti-entérotoxine B de Staphylocoque (SEB) pour la détection de la SEB, et d'anticorps anti-immunoglobulines G (IgG) pour la détection d'IgG.

Les anticorps monoclonaux de souris (IgG1) et la peroxydase ont été fournis par la société Sigma. Le protocole de la préparation des anticorps est donné en annexe IV.

## 1. 2. Les différentes techniques d'immobilisation utilisées

Les techniques utilisables pour immobiliser des anticorps à la surface des électrodes (en or le plus souvent) d'une microbalance à quartz sont variées (cf tableau II, chapitre I). Nous retrouvons des techniques d'adsorption simple sur l'électrode, des techniques de greffage covalent par l'intermédiaire de réactifs pontants après fonctionnalisation de la surface (réaction d'organosilanes ou d'alkyl thiols sur l'or), des techniques d'inclusion dans un polymère déposé sur l'électrode et de revêtement de protéine A... Nous avons testé trois méthodes d'immobilisation différentes reposant sur différents principes. Notre but était d'optimiser cette étape en terme de quantité d'antigène fixé spécifiquement sur les anticorps immobilisés afin de pouvoir obtenir une réponse en fréquence la plus grande possible.

### 1. 2. 1. Greffage covalent

Les techniques de greffage covalent font intervenir un agent de couplage qui va relier chimiquement la protéine au "support" par l'établissement de liaisons covalentes entre une fonction chimique de la protéine à immobiliser et une fonction chimique du support. Le greffage covalent est, en théorie, un phénomène irréversible qui permet la régénération de la surface (par la désorption spécifique des antigènes, sans retirer les anticorps greffés), ce qui par conséquent la rend réutilisable. Toutefois certains auteurs estiment que 75 % des protéines liées de façon covalente sont simplement adsorbées (Williams et Blanch, 1994). De plus, il faut savoir que c'est l'adsorption qui va "initier" le greffage covalent dans le sens où les protéines doivent se rapprocher de la surface pour que les réactions chimiques aient lieu et que ce rapprochement est gouverné par les interactions électrostatiques entre la protéine en solution et le support. Les méthodes d'immobilisation faisant intervenir le greffage covalent restent très utilisées (notamment pour immobiliser des anticorps sur les surfaces transductrices des biocapteurs optiques comme le BIAcore et l'IASys) et sont souvent inspirées des techniques décrites pour marquer des anticorps avec des enzymes. L'avantage principal des couches de protéines obtenues par greffage covalent est leur grande stabilité vis-à-vis des variations de pH et de force ionique.

Les surfaces en or ne permettent pas de réaliser un greffage direct et il est nécessaire de fonctionnaliser, préalablement, la surface pour introduire des groupements fonctionnels

susceptibles de réagir par la suite avec les agents de couplage. Nous avons utilisé la propriété des alkyl thiols qui s'auto-assemblent spontanément sur l'or pour former une monocouche (technique des "SAM : Self Assembled Monolayer") afin de fonctionnaliser la surface des électrodes en or de la microbalance. En effet, les thiols à chaîne saturée ( $\text{SH}-(\text{CH}_2)_n\text{-X}$ ) en solution, mais aussi les disulfures, s'auto-organisent spontanément sur l'or pour former une monocouche dense et ordonnée, par l'établissement de liaisons pseudo-covalentes entre les atomes de soufre et d'or (Yamamoto *et al.*, 1993; Cheng et Brajter-Toth, 1992). Les chaînes alkyles se compactent dans une conformation "zig-zag" et forment une structure inclinée de type cristallin (Nuzzo *et al.*, 1990). Il a été montré que tout groupement fonctionnel compatible avec un alkyl thiol est susceptible d'être introduit à la surface d'un support en or par la formation de ces monocouches, bien que des groupement terminaux volumineux puissent gêner la densification des chaînes hydrocarbonées (Bain *et al.*, 1989). Une représentation schématique d'une monocouche obtenue par cette technique est donnée figure 66.

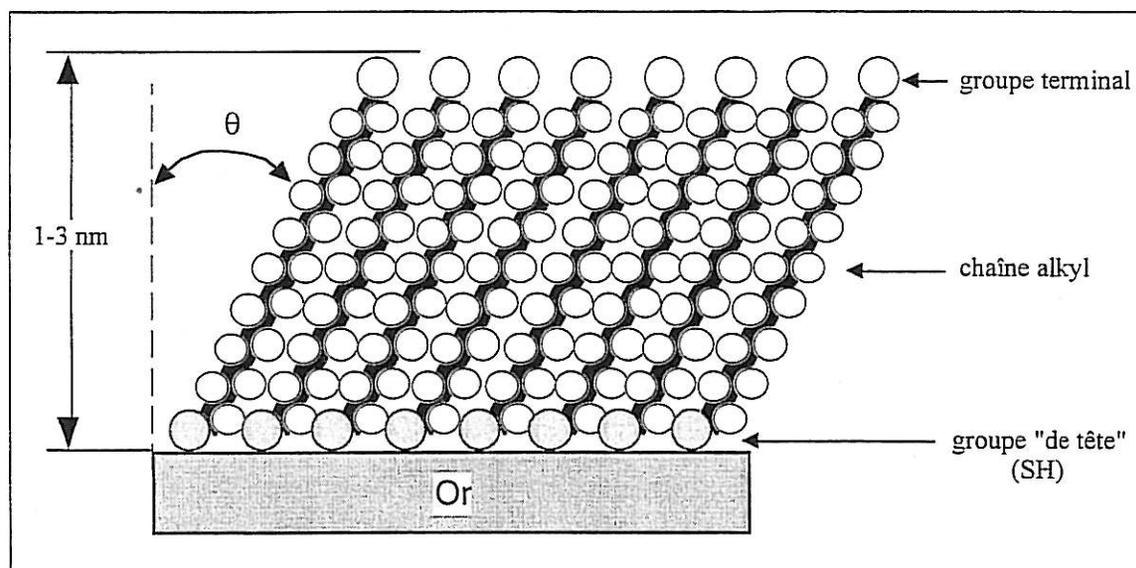


Figure 66 : Représentation schématique d'une monocouche d'alkyl thiol qui s'auto-organise spontanément sur l'or (d'après Allara 1995)

Nous avons utilisé un disulfure, l'acide thioctique ( $\text{S}_2-(\text{CH}_2)_7\text{-COOH}$ ) et un alcanethiol, la cystéamine ( $\text{SH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ ) pour fonctionnaliser nos électrodes. L'extrémité carboxylique de la monocouche formée par l'acide thioctique nous permet de greffer les anticorps (sur une fonction aminée) par l'intermédiaire des réactifs suivants : le 1-éthyl-3-(diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) et la N-hydroxysuccinimide (NHS). L'extrémité aminée de la monocouche formée par la cystéamine nous permet de greffer les anticorps (sur une fonction aminée) par l'intermédiaire du glutaraldéhyde.

### Fonctionnalisation

Avant chaque traitement, les quartz sont nettoyés extemporanément par immersion pendant 7 secondes dans un mélange chaud d'acide sulfurique concentré (4 volumes) et d'eau oxygénée à 30% (1 volume). Ce nettoyage est suivi de rinçages à l'eau désionisée, puis à l'éthanol absolu. Les quartz sont ensuite immergés dans une solution d'acide thioctique (Aldrich, T2806-6) ou de cystéamine (Aldrich, 12292-0) à 0,1 % (masse/masse) diluée dans l'éthanol absolu, durant 24 heures. Les quartz sont ensuite rincés à l'éthanol absolu et séchés sous un flux d'azote.

Les quartz, ainsi fonctionnalisés, sont alors installés entre deux plaques en plexiglas (figure 67). La plaque supérieure est percée de six puits, de sorte que seules les électrodes supérieures des quartz soient en contact avec la solution déposée dans le puits. Un joint torique à la base du puits et de même diamètre que l'électrode assure l'étanchéité au niveau de l'électrode. Jusqu'à 300  $\mu$ l de solution peuvent être déposés dans chaque puits.

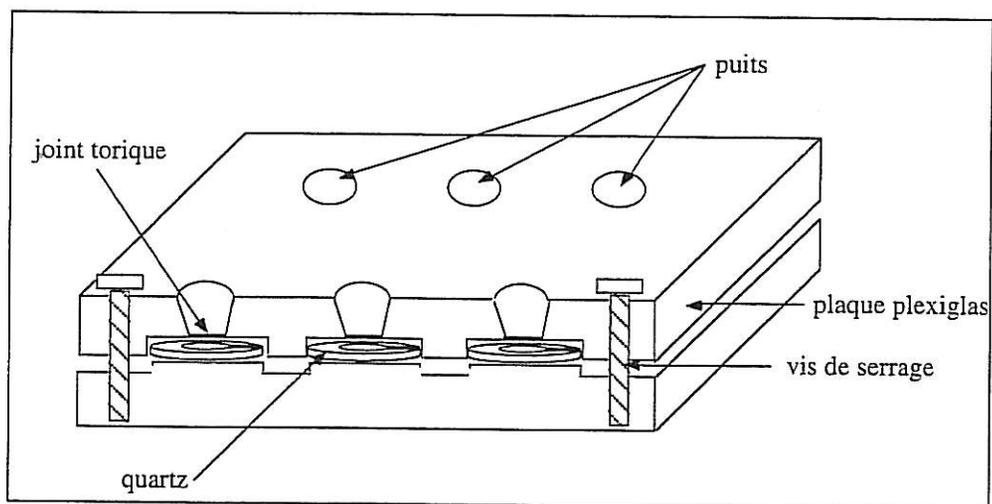


Figure 67 : Représentation schématique en coupe de la "plaque 6 puits" utilisée pour réaliser les greffages

### Greffage covalent au carbodiimide et à la N-hydroxysuccinimide après fonctionnalisation de l'électrode d'or par une monocouche d'acide thioctique

Le protocole du greffage a été établi à partir du protocole d'immobilisation d'immunoglobulines sur le gel de dextran carboxylé déposé sur la surface transductrice du BIAcore (Johnsson et al., 1991). Le principe de ce couplage est schématisé sur la figure suivante.

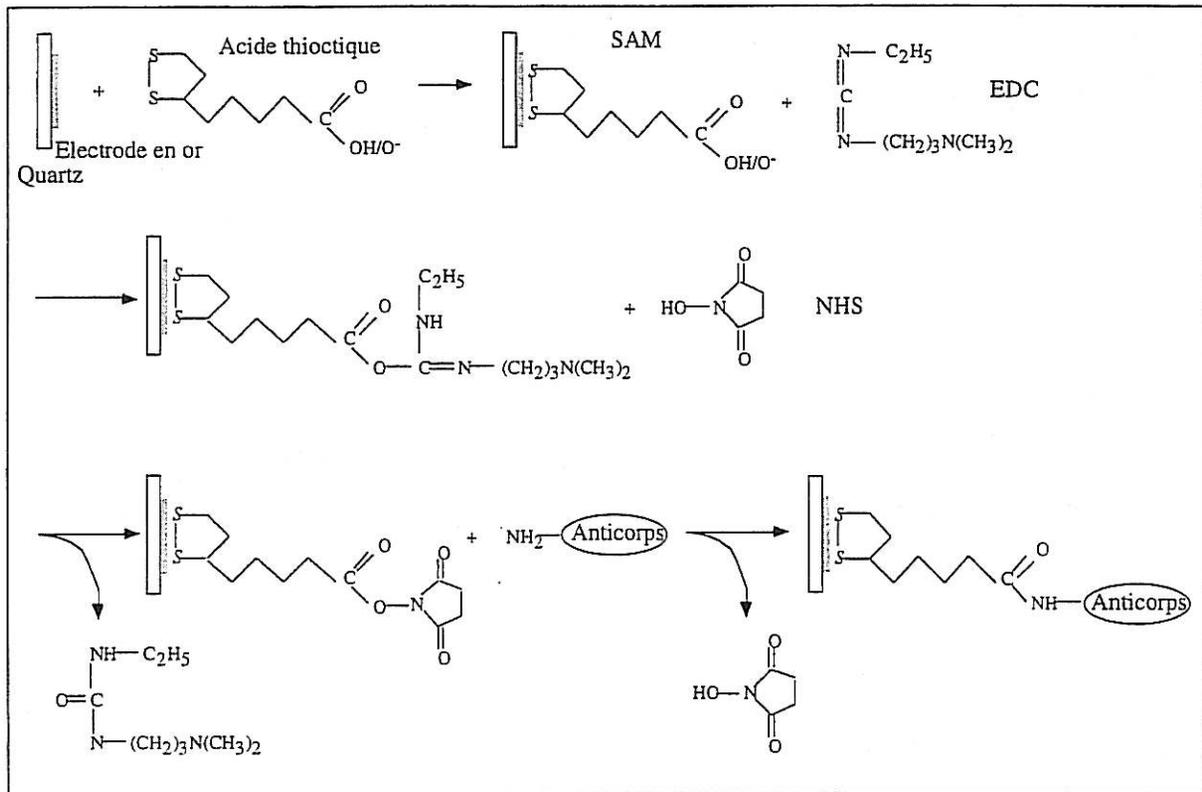


Figure 68 : Principe du greffage covalent d'immunoglobulines par la méthode au carbodiimide et à la N-hydroxysuccinimide sur une monocouche d'acide thioïque formée sur l'électrode de la microbalance à quartz

Une fraction des fonctions carboxyliques de l'extrémité de la monocouche d'acide thioïque réagit avec le carbodiimide (1-éthyl-3-(diméthylaminopropyl) carbodiimide) et la N-hydroxysuccinimide pour former des esters succinimidiques très réactifs. Ces sites réagissent ensuite avec les fonctions  $\alpha$ -aminées des protéines (et aussi avec les fonctions  $\epsilon$ -aminées des lysines). Les protéines sont ainsi retenues sur le support par liaison covalente. Les sites ester qui n'ont pas réagi sont ensuite désactivés par l'action de l'éthanolamine. Pour optimiser le greffage il faut préconcentrer au maximum les protéines à la surface. Pour cela, nous pouvons jouer avec le pH et la force ionique du tampon dans lequel est solubilisée la protéine. En effet, plus la différence de charge entre la surface et les protéines en solution sera grande, plus les interactions électrostatiques seront importantes et plus les protéines auront tendance à se rapprocher de la surface. L'idéal est d'utiliser un tampon de faible force ionique et ayant un pH inférieur au point isoélectrique de la protéine et supérieur au pKa des molécules à la surface. De cette façon, les protéines, plutôt chargées positivement, se rapprochent de la surface, plutôt chargée négativement, sans qu'il y ait trop de compétition avec les ions du tampon.

Le protocole d'immobilisation retenu est le suivant. Six quartz nettoyés et fonctionnalisés sont installés entre les deux plaques en plexiglas. 200  $\mu$ l de tampon HEPES

(contenant 10 mM d'hépes, 0,15 M de NaCl, 3,4 mM d'EDTA et 0,05% de surfactant P20, pH 7,4) sont déposés dans chaque puits et sont laissés 1 minute. Le tampon est ensuite retiré (par aspiration) et 200 µl d'un mélange extemporané, volume à volume, d'une solution de N-hydroxysuccimide 0,05 M et d'une solution de 1-éthyl-3-(diméthylaminopropyl) carbodiimide 0,2 M sont déposés dans chaque puits et sont laissés pendant 10 minutes. La solution est ensuite retirée et remplacée par 100 µl d'une solution d'anticorps anti-peroxydase concentrée à 100 µg/ml diluée en tampon acétate 10 mM à pH 5. Pour chaque série de six quartz, nous réalisons systématiquement un quartz témoin d'adsorption non spécifique, c'est-à-dire un quartz fonctionnalisé et activé mais sur lequel nous déposons 100 µl de tampon hépes à la place de la solution d'anticorps. Celui-ci nous servira à vérifier que notre antigène, la peroxydase, ne s'adsorbe pas d'une manière non spécifique sur la surface de l'électrode dépourvue d'anticorps. Après 1 heure d'incubation, la solution (anticorps et tampon pour le quartz témoin) est retirée et remplacée par 200 µl d'une solution d'éthanolamine 1 M à pH 8,5 laissée pendant 10 minutes. La solution est ensuite retirée et 100 µl d'HCl 10 mM sont déposés dans chaque puits et sont laissés pendant 3 minutes. Cette étape permet de désorber les immunoglobulines non fixées de manière covalente. Les électrodes sont ensuite rincées 5 fois par l'ajout de 200 µl de tampon hépes laissés 1 minute. La surface est enfin saturée par l'ajout de 200 µl d'une solution d'albumine sérique bovine concentrée à 1 % diluée dans le tampon hépes. Cette étape de saturation dure 1 heure, temps au bout duquel la surface est rincée 5 fois par 200 µl de tampon.

#### *Greffage covalent par l'intermédiaire du glutaraldéhyde après fonctionnalisation de l'électrode d'or par une monocouche de cystéamine*

Les fonctions aminées de l'extrémité de la monocouche formée par la cystéamine sur les électrodes des quartz permettent de réaliser un greffage covalent des anticorps anti-peroxydase par l'intermédiaire du glutaraldéhyde. Le glutaraldéhyde,  $\text{CHO}-(\text{CH}_2)_3-\text{CHO}$ , est un réactif de couplage homobifonctionnel des protéines très couramment utilisé pour relier deux groupements aminés. La réaction du glutaraldéhyde avec les protéines implique principalement la fonction ε aminée de la lysine, mais aussi les fonctions α aminées, et les fonctions thiols des cystéines (Van Regenmortel et al., 1988). Le glutaraldéhyde se présente sous différentes formes en fonction du pH (Billard, 1991). A pH 7-8 (pH auquel nous l'avons utilisé) il semble que la forme dimérique soit prépondérante. La figure 69 présente schématiquement le principe du greffage.

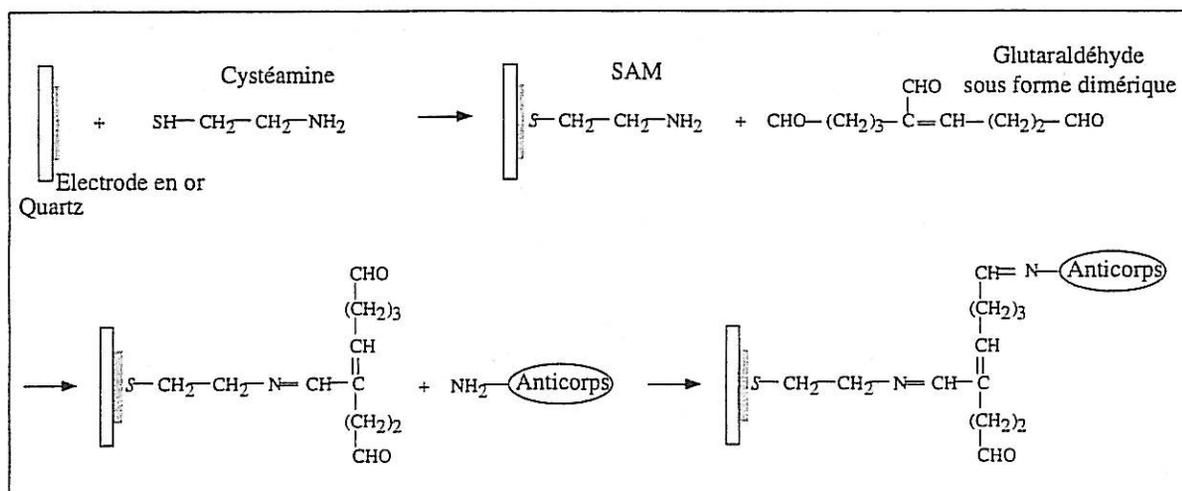


Figure 69 : Principe du greffage covalent d'immunoglobulines par l'intermédiaire du glutaraldéhyde sur une monocouche de cystéamine formée sur l'électrode de la microbalance à quartz

Le protocole du greffage a été établi à partir de la littérature (Ternynck et Avrameas, 1987), il s'agit d'un couplage en deux étapes. Six quartz nettoyés et fonctionnalisés par la cystéamine sont installés entre les deux plaques en plexiglas. Après un rinçage au tampon phosphate 0,1 M pH 6,8, 100  $\mu$ l de glutaraldéhyde (Sigma) à 1 % dilué en tampon phosphate 0,1 M pH 6,8 sont déposés dans chaque puits et sont laissés pendant 24 heures. Les quartz sont ensuite rincés avec le tampon phosphate : 5 fois 200  $\mu$ l pendant 1 minute. 100  $\mu$ l de la solution d'anticorps concentrée à 100  $\mu$ g/ml et diluée en tampon phosphate sont déposés et laissés pendant 24 heures, pour le quartz témoin la solution d'anticorps est remplacée par du tampon. Après 5 rinçages, la réaction est stoppée par l'addition de 200  $\mu$ l d'une solution de lysine 1 M diluée en tampon phosphate 0,1 M pH 7,4, laissés pendant 1 heure. Après 5 rinçages avec le tampon phosphate 0,1 M pH 7,4, une étape de saturation des sites de fixation non spécifique est réalisée par l'ajout de 200  $\mu$ l d'une solution d'albumine sérique bovine concentrée à 1 % diluée dans du tampon PBS. Cette étape de saturation dure 1 heure, temps au bout duquel la surface est rincée 5 fois par 200  $\mu$ l de tampon PBS.

### 1. 2. 2. Adsorption

La technique d'immobilisation d'anticorps par adsorption physique est extrêmement simple puisqu'elle consiste seulement à mettre en contact les immunoglobulines en solution avec le support. Un grand nombre de liaisons faibles (interactions hydrophobes, ioniques, forces de van der Waals, liaisons hydrogène) entre la surface et la protéine peuvent s'établir, et l'ensemble de ses forces peut aboutir à un assemblage très stable. Néanmoins, une variation importante du pH, de la force ionique ou de la température peut provoquer une désorption

des anticorps du support. Et contrairement aux techniques de greffage covalent, la technique d'adsorption ne permet pas de régénérer la surface en désorbant seulement les antigènes liés aux anticorps, puisque ces derniers comme les antigènes vont se désorber de la surface en présence d'un tampon de désorption. Ce type d'immobilisation convient bien pour un usage unique, ou pour tester différents couples anticorps/antigène sur un même transducteur.

L'immobilisation des anticorps par adsorption simple a été réalisée directement sur les électrodes d'or des quartz nettoyés et sur des quartz dont l'électrode a été fonctionnalisée par une monocouche de mercaptan. Le mercaptan est un alcanethiol ( $\text{SH}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$ ) qui nous permet de modifier la surface de l'électrode en la rendant plus hydrophobe. En effet, nous pourrions ainsi comparer l'effet de l'état de la surface sur l'adsorption des anticorps. En général, les protéines s'adsorbent mieux sur un support hydrophobe et leur désorption du support par modification du pH ou de la force ionique est très difficile (Andrade, 1985). Pour fonctionnaliser les électrodes par le mercaptan, les quartz nettoyés sont immergés pendant 24 heures dans une solution de mercaptan (Aldrich, O-185-8) concentrée à 0,1 % diluée dans l'hexane. Les quartz sont ensuite rincés à l'hexane et séchés sous un flux d'azote. Pour chaque série de six quartz, un témoin négatif est réalisé. Le protocole d'immobilisation des anticorps anti-peroxydase par adsorption est le suivant (que ce soit pour des quartz fonctionnalisés par le mercaptan ou non). Les quartz sont installés entre les deux plaques en plexiglas et 100  $\mu\text{l}$  d'une solution d'anticorps concentrée à 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  diluée dans le tampon PBS sont déposés sur les électrodes et sont laissés durant une nuit à la température du laboratoire. Pour le témoin d'adsorption non spécifique, la solution d'anticorps est remplacée par du PBS. Le lendemain, les électrodes sont rincées 5 fois par 200  $\mu\text{l}$  de PBS laissés pendant 1 minute. Les sites de fixation non spécifique sont alors saturés par l'ajout de 200  $\mu\text{l}$  d'une solution d'albumine sérique bovine concentrée à 1 % diluée dans du tampon PBS. Cette étape de saturation dure 1 heure, temps au bout duquel la surface est rincée 5 fois par 200  $\mu\text{l}$  de tampon PBS.

## 2. CONTROLE DE L'IMMOBILISATION

Nous avons mis en œuvre différentes techniques pour contrôler l'immobilisation des anticorps et notamment pour vérifier leur immunoréactivité après leur immobilisation.

### 2. 1. Mesure de l'activité peroxydasique

L'antigène de notre couple anticorps/antigène expérimental, la peroxydase, est douée d'activité enzymatique ce qui nous permet de mesurer la quantité d'enzymes (enzymatiquement active) fixées spécifiquement sur les anticorps immobilisés et donc

d'estimer la quantité d'anticorps immunoréactifs. Pour ce faire, les quartz sur lesquels les anticorps ont été immobilisés (et quelle que soit la technique utilisée) sont mis en contact avec une solution de peroxydase pendant un temps déterminé. Après rinçages, nous révélons l'activité peroxydasique, au niveau de l'électrode des quartz, par l'ajout du substrat de l'enzyme et d'un chromogène. Au bout d'un certain temps, la densité optique de la solution (qui s'est colorée par l'apparition des produits de la réaction enzymatique proportionnellement à la quantité d'enzyme active présente) est mesurée et est comparée à la densité optique d'une gamme d'enzyme réalisée en solution mesurée dans les mêmes conditions et au bout du même temps de réaction. Le principe de cette mesure est donné schématiquement sur la figure 70.

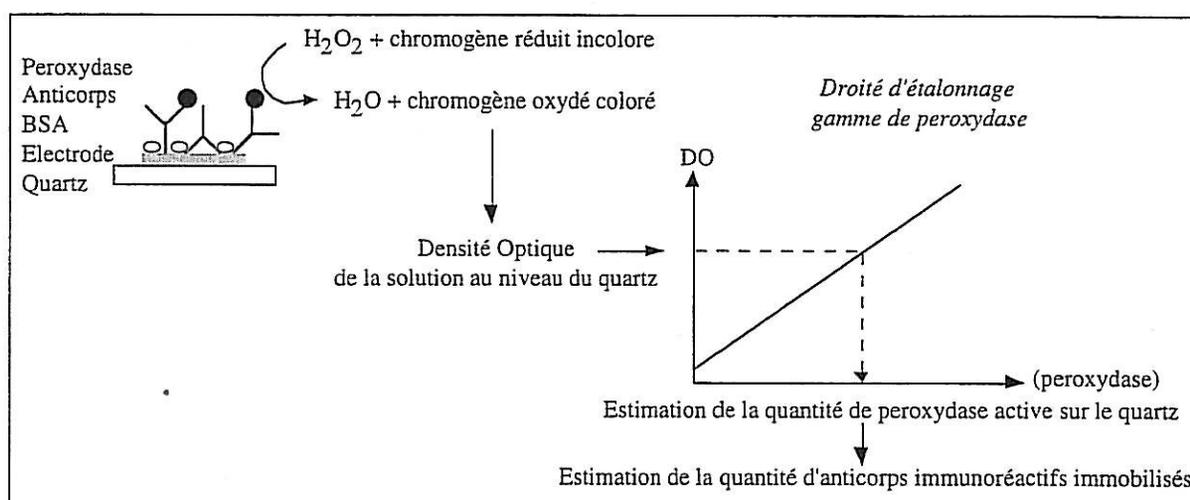


Figure 70 : Représentation schématique du principe du dosage de la peroxydase fixée sur les anticorps immobilisés sur l'électrode d'or de la microbalance à quartz

Ce dosage n'est pas absolu car nous comparons l'activité enzymatique de la peroxydase fixée sur les anticorps immobilisés à l'activité de l'enzyme en solution. De plus, l'activité spécifique de l'enzyme, en solution, incubée avec les anticorps dans un rapport molaire, est légèrement diminuée (Bizet, 1994). Ce dosage sous-estime donc la quantité de peroxydase fixée mais si nous faisons l'hypothèse que l'activité de l'enzyme est toujours modifiée de la même façon, nous pouvons comparer cette quantité pour les différentes méthodes d'immobilisation. Ceci nous permet d'estimer facilement et rapidement la quantité d'anticorps immunoréactifs immobilisés afin de comparer les différentes techniques d'immobilisation et d'étudier l'influence du flux et de la vibration des quartz sur l'interaction antigène/anticorps. De plus, nous pouvons, grâce à ce test, vérifier la spécificité de la fixation des antigènes (c'est-à-dire l'absence d'adsorption non spécifique après la saturation de la surface) en dosant la quantité d'enzyme sur les quartz témoins sans anticorps.

Le protocole du dosage est le suivant. Après avoir réalisé l'immobilisation des anticorps, nous déposons sur les quartz, installés entre les deux plaques de plexiglas, 100 µl d'une solution de peroxydase concentrée à 10 µg/ml et diluée dans du tampon PBS. Une incubation standard de 30 minutes a été choisie. Pendant ce temps, une gamme de dilution à partir d'une solution mère de peroxydase est réalisée en tampon PBS de 1 µg/ml à 1,4 ng/ml (dilutions géométriques de raison 3). 10 µl de chaque dilution et 10 µl de tampon PBS pour le blanc sont déposés dans les puits d'une plaque de microtitration. Au temps zéro, 100 µl d'une solution d'ABTS (2,2'-azino-di-(3-éthylbenzthiazoline)acide sulfonique) concentrée à 1 mM, diluée en tampon citrate phosphate pH 4,3 et contenant 0,01 % d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30% ajoutés extemporanément, sont déposés dans chaque puits. Au bout de 10 minutes, la réaction enzymatique est stoppée par l'ajout de 50 µl d'une solution d'azide de sodium concentrée à 0,1 g/l et la densité optique de chaque puits est mesurée à 405 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (Metertek, ε960). Cette gamme est réalisée en triple exemplaire. Nous pouvons ensuite tracer la droite d'étalonnage (moyenne des DO en fonction de la concentration de peroxydase par puits). Après les 30 minutes d'incubation avec la solution de peroxydase, les quartz sont rincés (200 µl de PBS par puits pendant 1 minute) et sont installés entre deux plaques propres (car la peroxydase peut se fixer dans les puits en plexiglas). 200 µl de la solution d'ABTS sont alors déposés sur chaque électrodes. Au bout de 10 minutes, 110 µl de solution sont prélevés et déposés dans un puits d'une plaque de microtitration contenant 50 µl d'une solution d'azide de sodium concentrée à 0,1 g/l, et la densité optique est immédiatement mesurée. La concentration de peroxydase (C), correspondant à la DO du quartz, déterminée graphiquement grâce à la droite d'étalonnage, permet d'estimer la quantité de peroxydase active fixée sur le quartz ( $Q = C \times V_{ABTS}$ ).

## 2. 2. Techniques d'imagerie

Nous avons essayé d'utiliser des techniques d'imagerie, disponibles au laboratoire, pour "visualiser" la surface des électrodes des quartz avant et après l'immobilisation des anticorps. Ces études sont assez peu courantes dans le domaine des biocapteurs et notre but était principalement d'apprécier le recouvrement de la surface des électrodes d'or par les immunoglobulines. Nous avons observé la surface des électrodes par microscopie électronique à balayage (MEB) et par microscopie à force atomique (AFM).

Le microscope électronique à balayage permet l'observation directe de la morphologie d'une surface. L'analyse est réalisée sous vide et les échantillons non conducteurs, comme les protéines, doivent être préalablement métallisés. La résolution atteinte avec ces dispositifs est de l'ordre de 5 nm. Le microscope disponible au laboratoire est un modèle S 440 (Leica).

La microscopie à force atomique repose sur les interactions d'une pointe avec la surface de l'échantillon analysé. Les forces mises en jeu sont le plus souvent de type van der Waals. Le signal recueilli par le dispositif permet de reconstruire une image de la surface à l'échelle atomique. Le microscope AFM utilisé est de marque Topometrix.

### 3. RESULTATS

#### 3. 1. Mesure de l'activité peroxydasique

##### 3. 1. 1. Comparaison de la quantité de peroxydase mesurée pour les différentes méthodes d'immobilisation

Nous avons comparé la quantité de peroxydase révélée par la mesure de l'activité peroxydasique au niveau des électrodes après l'immobilisation des anticorps par les différentes méthodes décrites. Après chaque immobilisation, les électrodes sont laissées en présence d'une solution d'antigène concentrée à 10 µg/ml pendant 30 minutes. L'activité peroxydasique est alors mesurée après le rinçage des électrodes (et leur changement de plaque). Les résultats de la quantité de peroxydase déterminée sont donnés en masse pour la surface de l'électrode sur la figure 71. Ces résultats correspondent à la moyenne de deux séries de six quartz (10 quartz sur lesquels les anticorps ont été immobilisés et 2 quartz témoins sans anticorps) pour les trois méthodes d'immobilisation.

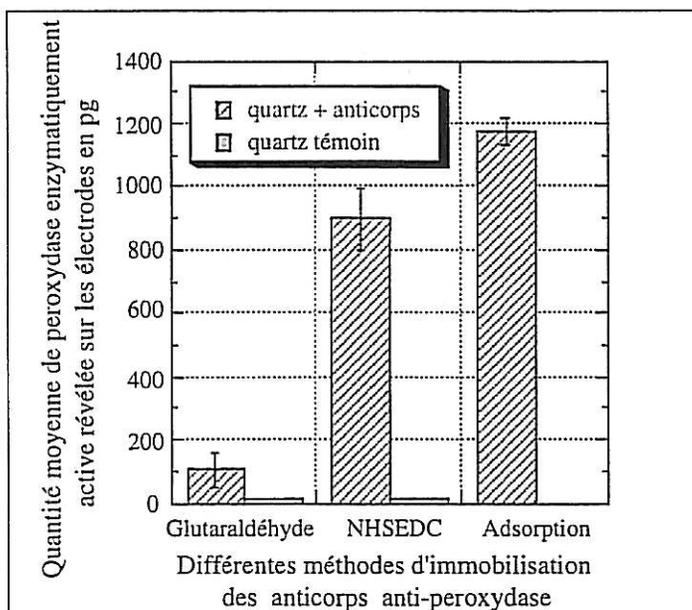


Figure 71 : Quantité moyenne de peroxydase révélée sur les quartz pour les différentes méthodes d'immobilisation testées

Le tableau suivant regroupe les résultats en masse de peroxydase mesurée sur l'électrode et en nombre de molécules correspondant par  $\text{cm}^2$  pour les quartz revêtus d'anticorps pour les trois méthodes d'immobilisation.

	Glutaraldéhyde	NHS-EDC	Adsorption
Quantité de peroxydase moyenne sur l'électrode après l'immobilisation des anticorps en pg	109 +/- 53 RSD = 49 %	902 +/- 93 RDS = 10 %	1179 +/- 42 RSD = 3,5 %
Nombre moyen de molécules de peroxydase par $\text{cm}^2$ après l'immobilisation des anticorps	$7,5 \cdot 10^9$	$61,7 \cdot 10^9$	$80,6 \cdot 10^9$

Tableau XIV : Comparaison de la quantité de peroxydase mesurée par le test enzymatique après l'immobilisation des anticorps anti-peroxydase par les différentes méthodes.

Nous pouvons, tout d'abord, remarquer la très faible adsorption non spécifique de la peroxydase pour les deux techniques de greffage covalent et son absence dans le cas de l'adsorption des anticorps. L'étape de saturation réalisée pour les trois méthodes (100  $\mu\text{l}$  de BSA à 1 % pendant 1 heure) est efficace. La peroxydase mesurée sur les quartz où nous avons immobilisés les anticorps est donc bien fixée spécifiquement sur les anticorps immunoréactifs.

D'autre part, les trois techniques donnent des résultats différents à la fois en terme de quantité mesurée et en terme de reproductibilité. Nous avons fait l'hypothèse que l'activité enzymatique de la peroxydase fixée sur ses anticorps était modifiée, mais constante quelle que soit la méthode d'immobilisation, nous pouvons donc conclure que la méthode qui donne les meilleurs résultats, à la fois en terme de quantité maximale d'antigène fixé et de reproductibilité, est la technique d'adsorption. Les mauvais résultats obtenus pour le greffage au glutaraldéhyde peuvent venir d'un problème au niveau de la fonctionnalisation de l'électrode d'or par la cystéamine. En effet, cette molécule est petite ( $\text{SH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ ) et la monocouche formée par la technique des SAM est vraisemblablement mal organisée et peu dense ce qui expliquerait la mauvaise qualité du greffage et la dispersion de la quantité de peroxydase mesurée.

Notre objectif concernant l'élaboration de la couche d'anticorps était d'obtenir une quantité maximale d'antigènes fixés spécifiquement afin d'optimiser la réponse de la microbalance, c'est-à-dire d'obtenir une masse d'antigènes fixés spécifiquement la plus grande possible pour pouvoir détecter directement les antigènes sans avoir recours à un système d'amplification comme une technique "sandwich". Nous avons donc décidé d'élaborer notre couche immunosensible par la technique d'adsorption qui, de plus, est la plus simple et la plus

rapide, même si elle ne nous permet pas de réutiliser les quartz. En effet, nous ne réaliserons qu'un seul test sur chaque quartz préparé et nous ferons l'hypothèse que tous les quartz présentent la même quantité d'anticorps immunoréactifs (l'écart type relatif de la quantité de peroxydase mesurée est de 3,5 %) sans tenir compte d'un éventuel vieillissement de la couche. Ces résultats sont en accord avec la littérature, en utilisant la technique d'adsorption d'anticorps sur une électrode d'or d'une microbalance à quartz, certains auteurs (Caruso *et al.*, 1996) ont mesuré un accroissement de 30 % du nombre de molécules d'anticorps immobilisés par rapport à différentes techniques de greffage covalent. La plus grande quantité d'anticorps présents sur l'électrode doit expliquer la plus grande quantité d'antigènes fixés spécifiquement.

### 3. 1. 2. Choix de la concentration optimale en anticorps

Nous avons, par la suite, vérifié que la concentration d'anticorps choisie (100  $\mu\text{g/ml}$ ) et utilisée classiquement, correspondait bien à une quantité saturante pour l'électrode. Nous avons donc adsorbé des anticorps en concentrations différentes en suivant le protocole expérimental décrit plus haut (100  $\mu\text{l}$  de solution d'anticorps pendant 1 nuit suivi par l'étape de saturation). Puis, nous avons révélé par le test enzymatique la quantité de peroxydase fixée spécifiquement après une incubation de 30 minutes avec une solution d'enzyme à 10  $\mu\text{g/ml}$ . Les résultats obtenus sont présentés figure 72.

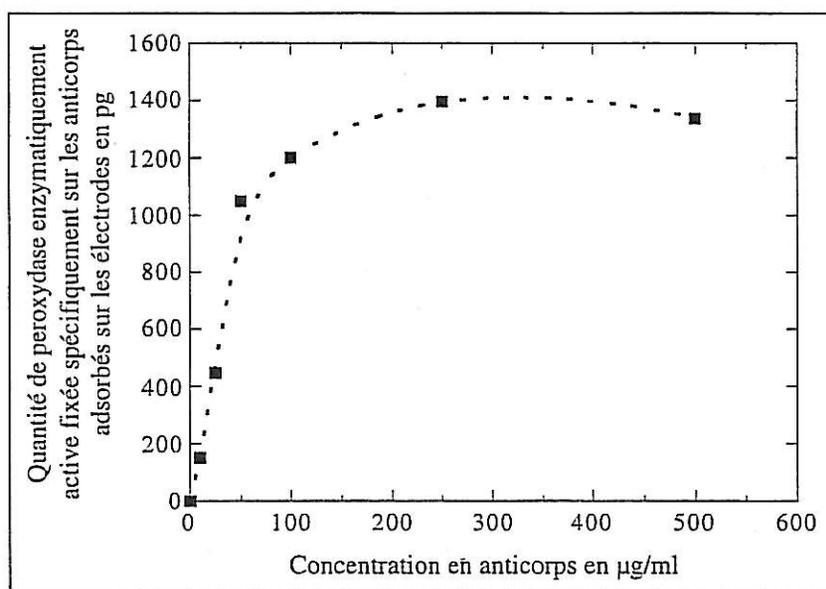


Figure 72 : Quantité de peroxydase mesurée sur les électrodes après l'adsorption d'anticorps à différentes concentration

La quantité de peroxydase révélée croît d'abord avec la concentration d'anticorps utilisée pour revêtir les électrodes puis atteint un plateau à partir d'une concentration en anticorps à 100  $\mu\text{g/ml}$  traduisant une saturation des sites d'adsorption de la surface pour les anticorps à

cette concentration. Une concentration en anticorps de 100  $\mu\text{g/ml}$  est donc optimale et raisonnable pour immobiliser les immunoglobulines sur la surface de nos électrodes.

### 3. 1. 3. Influence de l'hydrophobicité de la surface des électrodes

Dans le but d'optimiser la quantité d'antigènes fixés nous avons étudié l'influence de l'hydrophobicité de la surface sur l'adsorption des anticorps. Pour ce faire, nous avons fonctionnalisé les électrodes par une monocouche de mercaptan ( $\text{SH}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$ ) afin de rendre la surface plus hydrophobe. Les quartz natifs et fonctionnalisés ont été préparés avec une solution d'anticorps à 100  $\mu\text{g/ml}$ . La solution de peroxydase à différentes concentrations a été laissée 30 minutes sur les électrodes et l'activité peroxydasique au niveau des électrodes a été mesurée. La figure 73 présente les résultats de ces expériences.

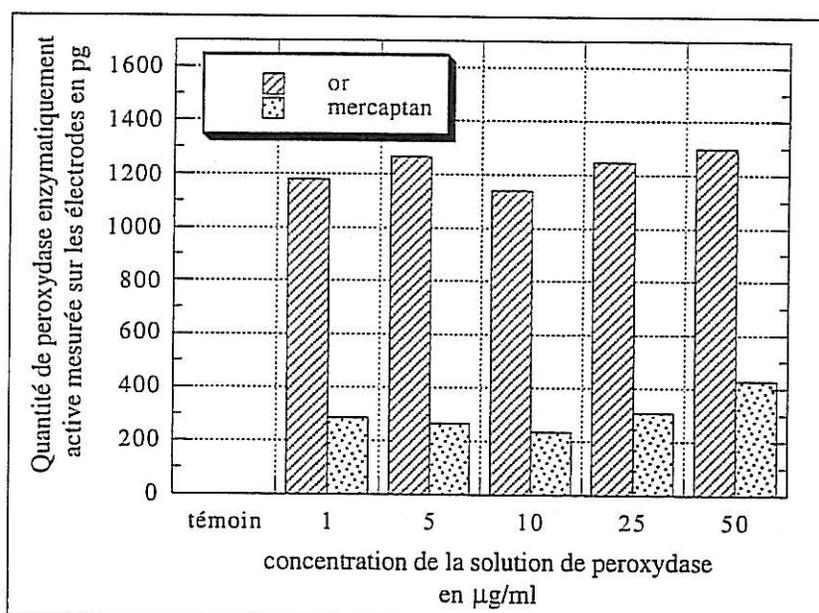


Figure 73 : Comparaison de la quantité de peroxydase mesurée pour différentes concentrations de la solution d'antigène déposée sur des quartz préalablement traités ou non par le mercaptan avant l'adsorption des anticorps

D'une part, nous pouvons observer qu'une concentration en antigène de 1  $\mu\text{g/ml}$  sature tous les sites de fixation des anticorps immunoréactifs présents sur la surface. D'autre part, la quantité de peroxydase fixée spécifiquement sur les anticorps adsorbés sur une surface hydrophobe est considérablement diminuée. Nous pouvons faire deux hypothèses pour expliquer cette observation. Soit les anticorps se fixent en moins grande quantité sur la surface rendue hydrophobe ; soit ils se fixent dans les mêmes proportions ou en quantité plus importante mais leur immunoréactivité est très diminuée à cause d'un encombrement stérique trop important ou d'une orientation préférentielle des anticorps sur la surface hydrophobe par

les extrémités Fab. Ce traitement de surface n'améliore pas la quantité d'antigènes fixés spécifiquement sur la couche immunosensible élaborée, il a donc été abandonné.

### 3. 2. Etude de la surface des électrodes immunosensibilisées par les techniques d'imagerie

Des observations en microscopie électronique à balayage ont été réalisées sur les quartz avec et sans anticorps adsorbés sur les électrodes. Notre but était d'apprécier le recouvrement de la surface par les immunoglobulines adsorbées. Il faut savoir, cependant, que les images réalisées au MEB ne reflètent pas l'état réel du dépôt car ces observations sont réalisées sous vide et la conformation des protéines est, dans ce cas, certainement modifiée. Avant chaque observation, la surface des quartz est métallisée par l'évaporation sous vide d'une épaisseur de 150 Å d'or (même pour les quartz témoins sans anticorps).

La figure suivante présente une image (obtenue avec le plus fort grossissement possible) de la surface d'un quartz au niveau de l'électrode d'or, incubé une nuit avec une solution de tampon PBS et rincé à l'eau distillée.

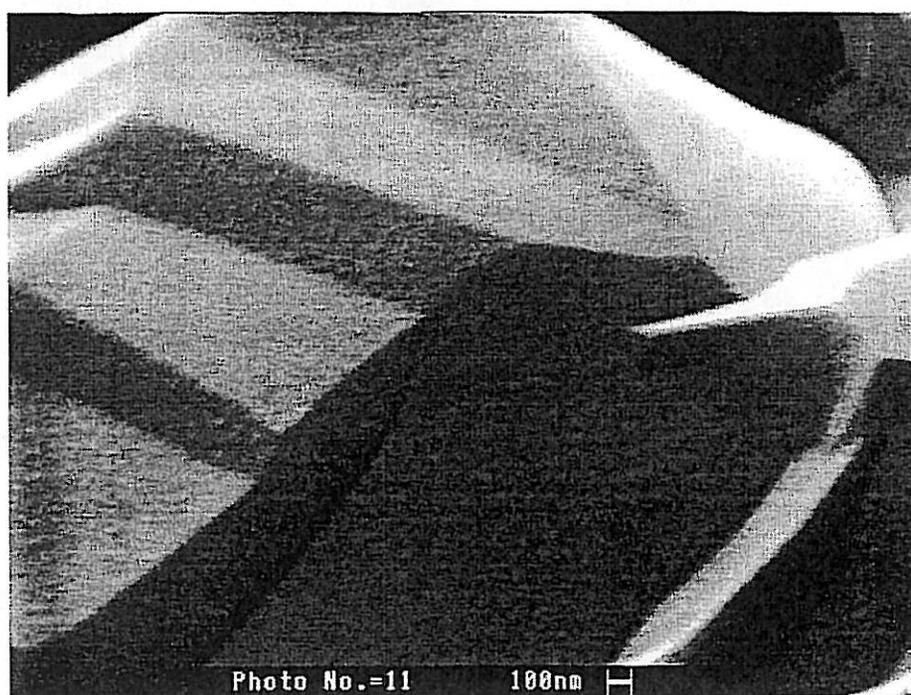


Figure 74 : Image de la surface d'une électrode d'or d'un quartz incubé une nuit dans du PBS et rincé à l'eau distillée

Nous pouvons observer à cette échelle la forte rugosité de la surface qui ne présente toutefois pas de défauts majeurs. La surface de l'électrode d'or incubée avec du PBS et rincée à l'eau distillée (pour retirer les dépôts de NaCl) présente le même aspect qu'une électrode d'un

quartz nettoyé. Nous retrouvons quelquefois des impuretés ou des cristaux déposés qui présentent des tailles avoisinant le  $\mu\text{m}$ .

Les figures 74 et 75 présentent une image de la surface de l'électrode d'un même quartz incubé pendant une nuit avec une solution d'anticorps anti-péroxydase à 1 mg/ml et rincé à l'eau distillée.

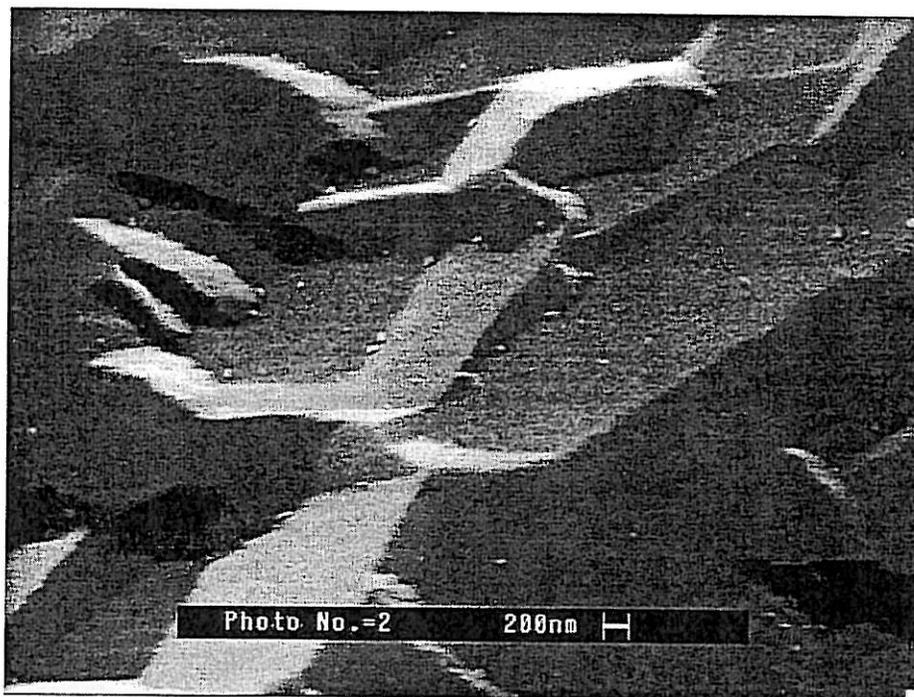


Figure 74 : Image de la surface d'une électrode d'or d'un quartz incubé avec une solution d'anticorps pendant une nuit et rincé à l'eau distillée

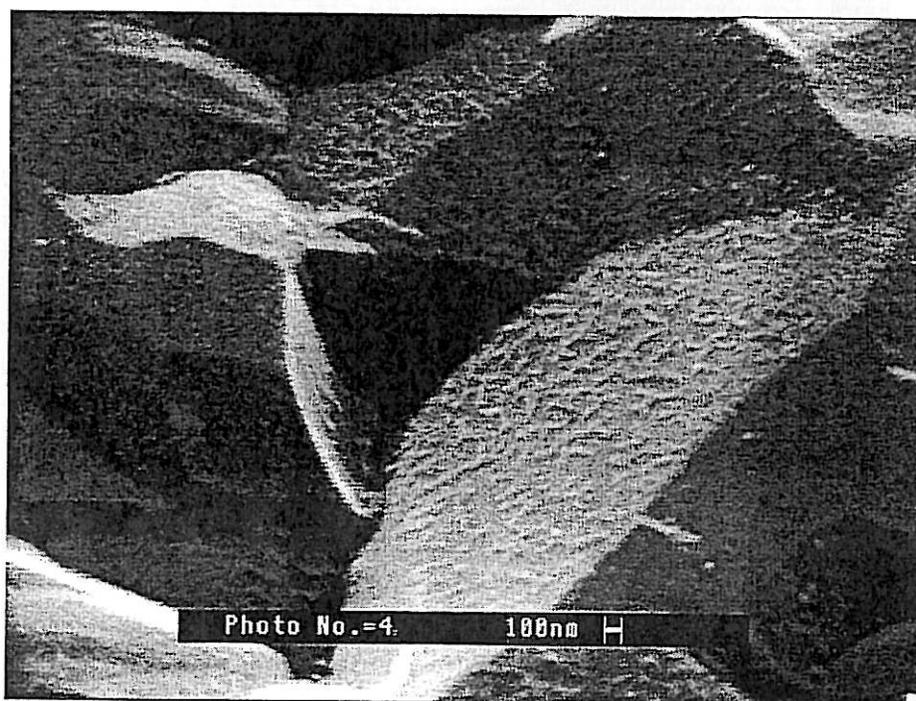


Figure 75 : Image de la surface de l'électrode d'or du même quartz à un autre endroit

Nous pouvons observer sur la figure 74 la présence éparse de particules sphériques d'une centaine de nm de diamètre. Il semble qu'elles se disposent préférentiellement au niveau des arêtes présentant des angles rentrants. Sur l'image de la figure 75 qui présente la surface du même quartz à un autre endroit sur l'électrode, nous pouvons observer un tapis de particules sous forme de bâtonnets d'une longueur d'une centaine de nm, dont certains présentent des formes caractéristiques en Y. Il pourrait s'agir de nos immunoglobulines. Sur l'image, nous pouvons voir que ce tapis n'est pas retrouvé sur toute la surface, certains endroits (par exemple sur la partie gauche de l'image et en bas à droite) ne sont pas recouverts. Comme sur la photo précédente, nous retrouvons sur la surface les formes sphériques notamment au niveau des angles de la surface.

Les images de ces formes sphériques sont toujours retrouvées sur des quartz ayant subi le même traitement d'adsorption des anticorps (même pour des concentrations plus basses comme 100  $\mu\text{g/ml}$ ), mais nous n'avons jamais revu ce tapis de formes plus caractéristiques... Quoi qu'il en soit, si ces sphères représentent bien les anticorps, il s'avère que la surface de l'électrode n'est pas entièrement recouverte (pas de monocouche).

Les images obtenues en microscopie à force atomique permettent d'obtenir une meilleure résolution et cette technique présente l'avantage de fonctionner en milieu liquide et à la pression atmosphérique. La surface d'une électrode d'un quartz recouverte d'une solution de PBS, analysée par cette technique montre que l'or se présente sous forme de grains présentant un diamètre d'environ 10 nm. A partir du moment où la solution d'anticorps est déposée, la surface de l'électrode, au même grossissement, apparaît différente mais les images sont difficilement interprétables car la pointe du microscope balaie littéralement la surface en entraînant les protéines avec lesquelles elle interagit trop. Des expériences réalisées avec des quartz sur lesquels ont été immobilisés les anticorps par un greffage covalent (technique NHSEDC) ont donné les mêmes résultats. La technique d'AFM, dans nos conditions, ne permet "d'imager" fidèlement la surface de nos électrodes à cause des fortes interactions entre la pointe du microscope et la couche d'immunoglobulines telle que nous l'élaborons. Des études de la surface en microscopie à effet tunnel (STM) pourraient nous donner de meilleurs résultats et nous permettre d'estimer plus sûrement le recouvrement de l'électrode par les anticorps ainsi que le type de dépôt formé (agrégats ou molécules isolées).

## 4. ETUDE DE L'INFLUENCE DU FLUX DE LA SOLUTION DE PEROXYDASE ET DE LA VIBRATION DES QUARTZ SUR L'INTERACTION PEROXYDASE/ANTICORPS ANTI-PEROXYDASE

### 4. 1. But

Nous avons réalisé une série d'expériences afin d'étudier l'influence de deux paramètres sur l'interaction antigène/anticorps de notre couple expérimental, à savoir l'influence de la *vibration des quartz* et l'influence de la *circulation* de la solution d'antigène. Nous comparerons les résultats de l'interaction antigène/anticorps en terme de quantité de peroxydase, enzymatiquement active, fixée sur les anticorps immobilisés sur les électrodes pour les différents modes opératoires suivants :

- système sans flux et sans vibration (quartz installé entre les deux plaques de plexiglas, cf figure 67),
- système avec flux et sans vibration (quartz installé dans la cellule à circulation miniature sans connexion à l'oscillateur),
- et système avec flux et avec vibrations (quartz installé dans la cellule à circulation miniature et connecté à l'oscillateur).

Dans tous les cas, le revêtement des anticorps sur les électrodes des quartz est réalisé de la même façon, les temps de réaction des différentes solutions (PBS et solution de peroxydase) sont identiques ainsi que la procédure de dosage de la quantité de peroxydase fixée. Nous aurions pu ajouter un quatrième cas de figure correspondant à un système sans flux et avec vibration (quartz monté sur un support en verre époxy et immergé dans la solution d'antigène) mais nous n'avons pas réussi à mettre au point, pour ce cas, un dispositif expérimental nous permettant de doser la peroxydase uniquement au niveau de l'électrode du quartz.

### 4. 2. Matériel et méthodes

#### 4. 2. 1. Préparation des quartz et mesure de la quantité de peroxydase

Tous les quartz sont nettoyés avant d'immobiliser les anticorps sur les électrodes par adsorption simple sur la surface d'or. Le protocole d'adsorption est le même que celui décrit précédemment, il est aussi suivi de l'étape de saturation par la BSA. En attendant d'être utilisés,

les quartz préparés sont laissés recouverts de PBS. Pour chaque système un quartz témoin sans anticorps est réalisé.

Pour chaque expérience et dans toutes les configurations expérimentales, la solution de peroxydase (différentes concentrations ont été utilisées) est laissée 30 minutes en contact avec les électrodes et un rinçage au PBS durant 5 minutes est ensuite réalisé. La quantité de peroxydase fixée au niveau des électrodes est alors mesurée.

#### **4. 2. 2. Système sans flux et sans vibration**

Les quartz immunosensibilisés sont installés dans un jeu de plaques 6 puits. 100  $\mu$ l de solution de peroxydase concentrée à 1, 5, 10, 25 et 50  $\mu$ g/ml sont déposés sur cinq quartz. Sur le quartz témoin sans anticorps nous déposons 100  $\mu$ l de la solution d'antigène la plus concentrée (50  $\mu$ g/ml). La solution de peroxydase est laissée 30 minutes, puis les électrodes sont rincées au PBS (200  $\mu$ l/puits pendant 1 minute, 5 fois). La quantité de peroxydase au niveau des électrodes est alors mesurée par notre test enzymatique.

#### **4. 2. 3. Système avec flux et sans vibration**

Les quartz immunosensibilisés sont installés dans la cellule à circulation miniature (sans pose préalable d'embases métalliques car les quartz ne vibrent pas). La solution de PBS est mise à circuler au débit de 50  $\mu$ l/min suivie de la solution de peroxydase (différentes concentrations pour chaque quartz) qui circule pendant 30 minutes. Pour le quartz témoin sans anticorps, c'est la solution de peroxydase la plus concentrée (50  $\mu$ g/ml) qui circule. Nous devons noter que la solution antigénique qui circule sur le quartz est toujours renouvelée (circulation en circuit ouvert). Un rinçage au PBS est ensuite effectué pendant 5 minutes. Les quartz sont alors récupérés et installés dans un jeu de plaques 6 puits pour doser la peroxydase au niveau de l'électrode.

#### **4. 2. 4. Système avec flux et avec vibrations**

Les quartz immunosensibilisés sont installés dans la cellule miniature après la pose d'embases métalliques qui sont soudées aux fils électriques de la cellule, elle-même connectée à l'oscillateur. Ainsi, les quartz vibrent à une fréquence d'oscillation de 27 MHz. Comme pour le système précédent, le tampon PBS circule au débit de 50  $\mu$ l/min puis est suivi de la solution de peroxydase (différentes concentrations pour chaque quartz) qui circule, en circuit ouvert, pendant 30 minutes. Un rinçage au PBS, pendant 5 minutes, est ensuite effectué, puis les quartz sont récupérés (les embases sont ôtées) pour être installés dans un jeu de plaques 6 puits où le dosage de la quantité de peroxydase au niveau des électrodes est réalisé.

### 4. 3. Résultats

Les résultats de la quantité de peroxydase mesurée sur les électrodes pour les trois systèmes et en fonction de la concentration de la solution de peroxydase mise en contact avec les quartz sont représentés sur la figure 76.

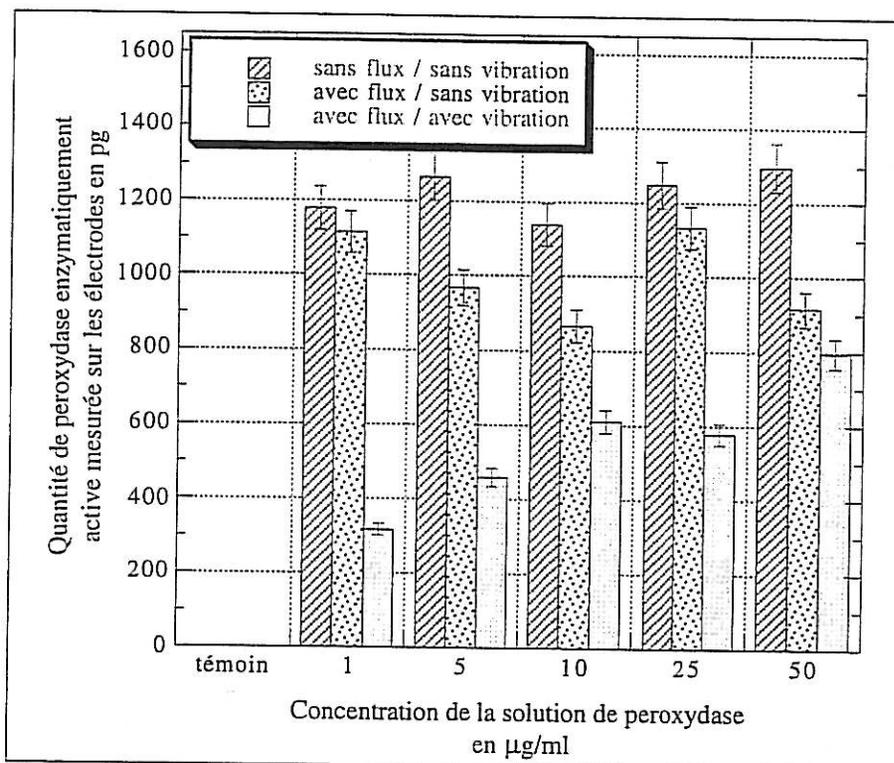


Figure 76 : Quantité de peroxydase mesurée sur les électrodes des quartz pour les trois systèmes et en fonction de la concentration de la solution de peroxydase mise en contact avec les quartz

Chaque colonne de l'histogramme correspond à une expérience sur un seul quartz. Les barres d'erreurs ajoutées correspondent à une erreur fixée arbitrairement à 5 % (nous n'avons pas étudié la reproductibilité de la quantité de peroxydase mesurée pour chaque système et pour chaque concentration). Pour le système statique (c'est-à-dire sans flux et sans vibration) et pour le système avec circulation et sans vibration, une concentration de 1  $\mu\text{g/ml}$  est déjà saturante pour les sites de fixation des anticorps immunoréactifs adsorbés sur les électrodes. Les différences observées en fonction de la concentration de peroxydase pour le système non oscillant et avec une circulation, comme pour le système statique, ne sont pas considérées comme significatives.

Nous pouvons, tout d'abord, observer l'absence de fixation non spécifique de la peroxydase sur les électrodes des quartz témoins (sans anticorps mais avec l'étape de

saturation). Ni la circulation de la solution de peroxydase, ni la vibration du quartz n'augmentent l'adsorption non spécifique de la peroxydase par rapport à un système statique.

L'effet de la circulation sur la quantité de peroxydase mesurée par rapport au système statique est difficile à distinguer. En effet, pour trois quartz (ceux mis en contact avec une solution de peroxydase à 5, 10 et 50  $\mu\text{g/ml}$ ) les différences semblent significatives et la quantité de peroxydase mesurée, dans le cas du système avec flux, s'avère diminuée ; mais pour les deux autres quartz (1 et 25  $\mu\text{g/ml}$ ) la quantité de peroxydase mesurée est semblable pour les deux systèmes.

L'effet de la vibration des quartz est quant à lui nettement visible. La quantité de peroxydase mesurée sur les quartz qui vibrent et sur lesquels la solution d'antigène circule est toujours diminuée par rapport au système sans vibration et avec circulation (et par rapport au système statique). La vibration du quartz modifie l'état de la couche d'anticorps et/ou l'interaction antigène/anticorps, ce qui conduit finalement à une moins grande quantité d'antigène fixée spécifiquement à la surface du transducteur. Nous voyons donc que le principe même de transduction de la microbalance à quartz n'est pas sans effet sur le phénomène que l'on veut mesurer (c'est-à-dire l'interaction antigène/anticorps). Cette diminution peut s'expliquer par différentes hypothèses :

- la vibration des quartz provoque la désorption des anticorps adsorbés sur l'or, le nombre moins important de molécules d'anticorps présents à la surface expliquant la quantité moins importante de molécules de peroxydase mesurée,
- le nombre de molécules d'anticorps à la surface reste stable mais l'immunoréactivité de ces immunoglobulines est diminuée par la vibration du quartz (changements de conformation des sites de fixation des anticorps),
- la vibration du quartz ralentit simplement la cinétique de l'interaction antigène/anticorps (sans diminuer l'immunoréactivité des anticorps).

Nous pouvons parmi ces hypothèses rejeter la première. En effet, si la vibration des quartz entraînait une désorption des anticorps, nous devrions observer, en mesurant la fréquence des quartz, une remontée de la fréquence d'oscillation du quartz témoignant du relargage des molécules de la surface (diminution de la masse sur l'électrode). Or ce phénomène n'est pas remarqué. De plus, si cette hypothèse était vraie, la BSA devrait aussi se désorber, ce qui devrait conduire à une augmentation de l'adsorption non spécifique de la peroxydase, ce que nous n'observons pas non plus. Restent valables les deux autres hypothèses qui ne sont pas exclusives. Ce phénomène de "ralentissement" ou de "gêne" d'un processus sur des quartz en oscillation a déjà été observé par rapport à des quartz sans oscillation. Concernant l'adsorption de BSA sur une électrode d'or d'un quartz par exemple (Lacour et *al.*, 1992), il a

été montré, par des mesures de capacité interfaciale, que la vibration du quartz (à 6 MHz) diminuait à la fois la cinétique d'adsorption de la protéine et la quantité maximale de protéine adsorbée.

Le principe de fonctionnement de la microbalance à quartz modifie donc l'interaction antigène/anticorps ce qui n'empêche pas d'utiliser ce transducteur pour mesurer en temps réel les variations de masse consécutives à la fixation spécifique des antigènes sur les anticorps immobilisés. Néanmoins, les études concernant l'interaction antigène/anticorps, comme la mesure des constantes d'affinité, sont, pour l'instant, plus délicates à réaliser étant données les modifications introduites par l'appareil de mesure.

## CONCLUSION

Cette étude a permis de montrer que parmi les différentes méthodes d'immobilisation testées, la technique d'adsorption simple des anticorps sur la surface d'or native des électrodes des quartz donnait les meilleurs résultats en terme de quantité d'antigène fixé spécifiquement (et enzymatiquement actif). Suivent ensuite la technique de greffage covalent par le carbodiimide et la N-hydroxysuccinimide sur les électrodes fonctionnalisées par une monocouche d'acide thioctique et la technique de greffage covalent par la méthode au glutaraldéhyde sur les électrodes fonctionnalisées par une monocouche de cystéamine. L'adsorption des anticorps sur l'électrode rendue plus hydrophobe n'améliore pas la quantité d'antigène fixé par rapport à une électrode native.

Les études réalisées au microscope électronique à balayage et en microscopie à force atomique nous ont permis d'estimer l'état de la surface des électrodes. Les images réalisées de la surface sans anticorps et de la surface avec anticorps montrent systématiquement des différences pour les deux techniques. Le MEB permet de visualiser, sur les quartz avec les anticorps, des formes sphériques d'une centaine de nm de diamètre. Le recouvrement de l'électrode par ces formes est assez faible. Une seule image plus convaincante au niveau de la forme des particules a été obtenue mais n'a pas pu être reproduite.

L'influence de la circulation de la solution d'antigène et de la vibration des quartz sur la quantité de peroxydase mesurée par rapport à une configuration statique a été étudiée. Concernant la vibration des quartz, nous avons clairement montré que l'oscillation des quartz à 27 MHz diminuait la quantité d'antigènes fixés en diminuant l'immunoréactivité des anticorps adsorbés et/ou en modifiant l'interaction antigène/anticorps. Néanmoins, la couche d'anticorps

élaborée est tout à fait utilisable pour mesurer à l'aide de la microbalance à quartz les variations de masse consécutives à la fixation spécifique des antigènes sur cette couche.

*Chapitre V*

***DETECTION SPECIFIQUE D'ANTIGENES  
EN MILIEU LIQUIDE A L'AIDE DE LA  
MICROBALANCE A QUARTZ***

## INTRODUCTION

Ce dernier chapitre sera consacré à l'application du dispositif de microbalance à quartz que nous avons mis au point pour la détection *directe, spécifique* et en *temps réel* d'antigènes en *milieu liquide*. Notre but était de montrer la faisabilité d'une telle immunodétection à l'aide de la microbalance à quartz développée. Nous avons utilisé trois couples antigène/anticorps différents :

- les anticorps monoclonaux de souris anti-peroxydase et la peroxydase,
- et des anticorps de chèvre anti-immunoglobulines G de lapin (IgG) et des IgG de lapin,
- des anticorps monoclonaux de souris anti-entérotoxine B de Staphylocoque (SEB) et la SEB.

Les antigènes à détecter ont des masses molaires différentes allant de 28000 g/mol pour la SEB, à 44000 g/mol pour la peroxydase et à 150000 g/mol pour les IgG.

Dans les trois cas de figures, les quartz sont préparés par adsorption simple des anticorps sur l'électrode en or suivie d'une étape de saturation par la BSA. Chaque quartz préparé est utilisé une seule fois pour une seule expérience, nous faisons donc l'hypothèse que la couche immunosensible est stable et identique pour chaque quartz.

## 1. DETECTION DE LA PEROXYDASE

### 1. 1. But

Le couple anticorps anti-peroxydase/peroxydase, que nous avons utilisé pour élaborer et caractériser la couche d'immunoglobulines, a été le premier à être utilisé dans le cadre de ces expériences de détection à l'aide de la microbalance à quartz. Nous avons réalisé les premières expériences d'immunodétection en utilisant des quartz immunofonctionnalisés par ces anticorps anti-peroxydase, en enregistrant leur fréquence d'oscillation pendant la circulation de solutions de PBS et de peroxydase à différentes concentrations.

### 1. 2. Matériel et méthodes

Les quartz ont été préparés comme nous l'avons vu précédemment par adsorption simple sur l'électrode d'or après nettoyage. Les électrodes des quartz installés dans un jeu de plaques 6 puits sont incubées pendant une nuit à la température du laboratoire avec 100 µl d'une solution d'anticorps à 100 µg/ml. Après 5 rinçages au PBS (200 µl/puits pendant 1

minute), les électrodes sont saturées par l'ajout de 200  $\mu\text{l}$ /puits d'une solution de BSA à 1 % (masse/masse) pendant 1 heure. Les quartz sont ensuite rincés et sont laissés recouverts de PBS jusqu'à ce qu'ils soient utilisés.

Le protocole expérimental suivi pour ces expériences va maintenant être rappelé. Avant d'installer chaque quartz (un par un) dans la cellule miniature, des embases métalliques sont insérées autour du quartz, au niveau des électrodes, et un dépôt de laque argent est réalisé (1 goutte) pour assurer les contacts électriques entre les électrodes et les embases. La laque est laissée sécher pendant 15 minutes. Les embases sont alors soudées aux fils électriques de la cellule, eux-mêmes connectés à l'oscillateur. La cellule est refermée, en centrant l'électrode au niveau des deux joints toriques, et sans trop comprimer le quartz.

Toutes les solutions qui vont circuler sur le quartz (PBS et solution de peroxydase diluée en PBS) sont thermostatées. Pour ce faire, les solutions sont déposées dans des tubes à hémolyse qui contiennent un barreau aimanté. Ces tubes sont disposés dans un bécher à double paroi, rempli d'eau, dans lequel circule de l'eau thermostatée à + 20 °C par un cryothermostat. Ce bécher est posé sur un agitateur magnétique de sorte que les solutions contenues dans les tubes soient agitées grâce aux barreaux aimantés. Les solutions circulent sur le quartz au débit de 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  grâce à une pompe péristaltique (P1, Pharmacia). Une représentation de ce dispositif expérimental est donné sur la figure 47 du chapitre III. Le tuyau d'entrée de la pompe est plongé dans la solution de PBS ou de peroxydase. Pour changer de solution, sans introduire de bulle dans le circuit, la circulation est stoppée, le tuyau est rapidement changé de solution et la circulation est de nouveau mise en route. Ce changement, bien qu'assez rapide, provoque souvent une variation de fréquence de quelques Hz. Avec les tuyaux utilisés et le débit de 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ , les solutions mettent 5 minutes pour atteindre l'électrode du quartz. En général, quand le quartz a été installé, sa fréquence d'oscillation est enregistrée à l'air, puis pendant le remplissage de la cellule et pendant la circulation de PBS. Durant les premières minutes de la circulation de PBS, la fréquence peut dériver sur une dizaine de Hz mais elle se stabilise généralement en l'absence de variation de température. Cette dérive n'est pas attribuée à une désorption massive de la couche (anticorps et/ou BSA) car ces variations de fréquences sont trop faibles et semblent aléatoires car elles vont dans les deux sens (augmentation et diminution de la fréquence). Quand la fréquence d'oscillation s'est stabilisée pendant la circulation de PBS, la solution de peroxydase est mise à circuler. Le principal problème du dispositif est l'apparition inopinée de bulles qui se "collent" sur l'électrode et qui introduisent alors un bruit de fond important sur la fréquence enregistrée.

Après chaque expérience, la cellule et tous les tuyaux sont soigneusement nettoyés par une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 M et sont rincés à l'eau distillée.

### 1. 3. Résultats

#### 1. 3. 1. Evaluation de la spécificité

Nous avons tout d'abord étudié la spécificité de la réaction antigène/anticorps. En effet, nous voulions vérifier que la peroxydase ne se fixe pas non spécifiquement sur une électrode sans anticorps mais saturée par la BSA.

La figure suivante présente la variation de la fréquence d'oscillation d'un quartz témoin sans anticorps et saturé par la BSA, en fonction du temps, pendant la circulation successive d'une solution de PBS, de peroxydase à 10  $\mu\text{g/ml}$  et de PBS. La solution de peroxydase est diluée dans du tampon PBS. Les solutions circulent au débit de 50  $\mu\text{l/min}$  et la fréquence du quartz est mesurée toutes les 3 secondes. Les flèches correspondent aux moments où les solutions arrivent sur l'électrode. La figure 77 présente les résultats bruts de la fréquence d'oscillation enregistrée.

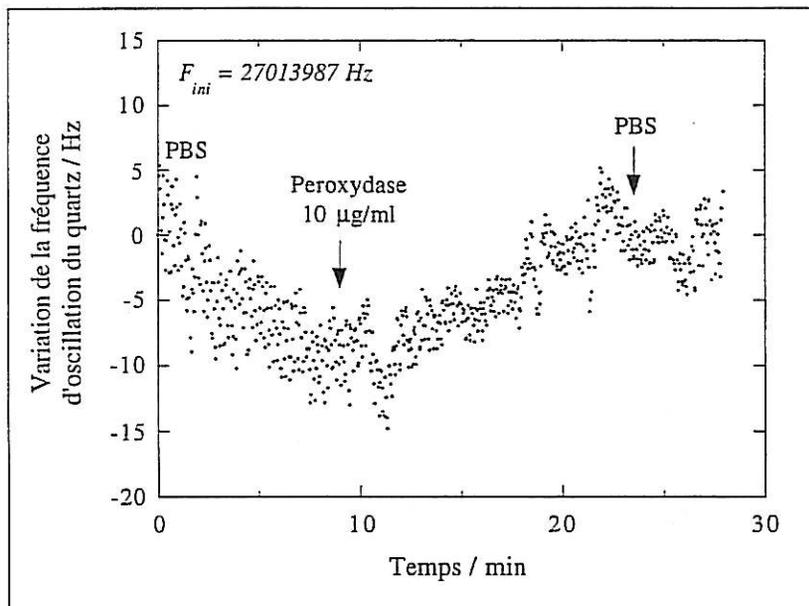


Figure 77 : Variation de la fréquence d'oscillation d'un quartz témoin (sans anticorps mais saturé par la BSA) en fonction du temps pendant la circulation d'une solution de PBS, de peroxydase et de PBS

Nous pouvons observer que la fréquence d'oscillation de ce quartz présentait une légère dérive avant de se stabiliser au moment où la solution de peroxydase arrivait sur l'électrode. L'arrivée de cette solution ne provoque pas de diminution de la fréquence d'oscillation qui reste stable puis remonte légèrement pour se stabiliser à son niveau de base pendant le rinçage au PBS. Pendant la durée de cette expérience la fréquence du quartz a varié sur une douzaine

de Hz, cette variation de la fréquence d'oscillation étant de l'ordre de grandeur du bruit de fond de la mesure.

Nous pouvons conclure, d'une part, que pendant la circulation du tampon PBS, la BSA ne se désorbe pas de l'électrode et d'autre part, nous observons que la peroxydase ne se fixe pas non spécifiquement sur la couche saturée en l'absence d'anticorps, comme nous l'avions mesuré par le dosage enzymatique (cf chapitre IV, paragraphe 3. 1. 1.).

De plus, nous voyons que la variation des propriétés physico-chimiques de la solution de peroxydase (notamment les variations de sa densité, de sa viscosité et de sa conductivité) par rapport au tampon PBS seul, ne se répercutent pas sur la fréquence d'oscillation de la microbalance à quartz. Cette observation est fondamentale pour la réalisation de l'immunocapteur. En effet, nous montrons que des variations significatives de la fréquence d'oscillation (en l'absence de variation de température et sans tenir compte des modifications viscoélastiques de la couche) peuvent être attribuées de manière sûre à des variations de masse. Le signal mesuré est donc bien caractéristique de ce que nous voulons mesurer, c'est-à-dire les variations de masse consécutives à la fixation des antigènes sur les anticorps immobilisés.

### 1. 3. 2. Réponse de la microbalance à quartz à l'antigène

La figure 78 présente la variation de la fréquence d'oscillation mesurée d'un quartz immunofonctionnalisé pendant la circulation successive d'une solution de PBS, de peroxydase concentrée à 10  $\mu\text{g/ml}$  et de PBS.

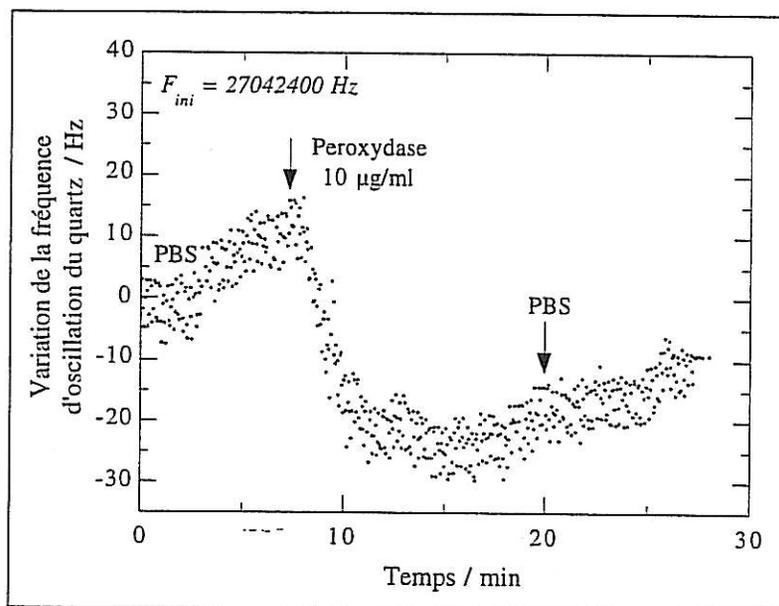


Figure 78 : Variation de la fréquence d'oscillation d'un quartz immunofonctionnalisé (anticorps anti-peroxydase adsorbés et saturation par la BSA) pendant la circulation successive d'une solution de PBS, de peroxydase à 10  $\mu\text{g/ml}$  et de PBS

La fréquence du quartz présentait une légère dérive positive pendant la circulation de la solution de PBS. L'arrivée de la solution de peroxydase concentrée à 10  $\mu\text{g/ml}$  au niveau du quartz provoque immédiatement une diminution rapide de la fréquence d'oscillation du quartz qui atteint un plateau. La fréquence remonte ensuite légèrement puis se stabilise pendant le rinçage au PBS. La diminution de la fréquence correspond à la fixation spécifique des antigènes sur les anticorps immobilisés. La variation globale de la fréquence consécutive à la fixation des antigènes est de 30 Hz ce qui correspond à une masse de 10,5 ng de protéine fixée sur l'électrode (en utilisant le coefficient expérimental de sensibilité égal à 350  $\text{pg/Hz}$ ).

La figure 79 présente les variations de la fréquence d'oscillation brute de plusieurs quartz immunofonctionnalisés, pendant la circulation de solutions de peroxydase à différentes concentrations. Pour plus de clarté, les fréquences ont été remises à zéro à partir du moment où la solution d'antigène arrive sur les électrodes.

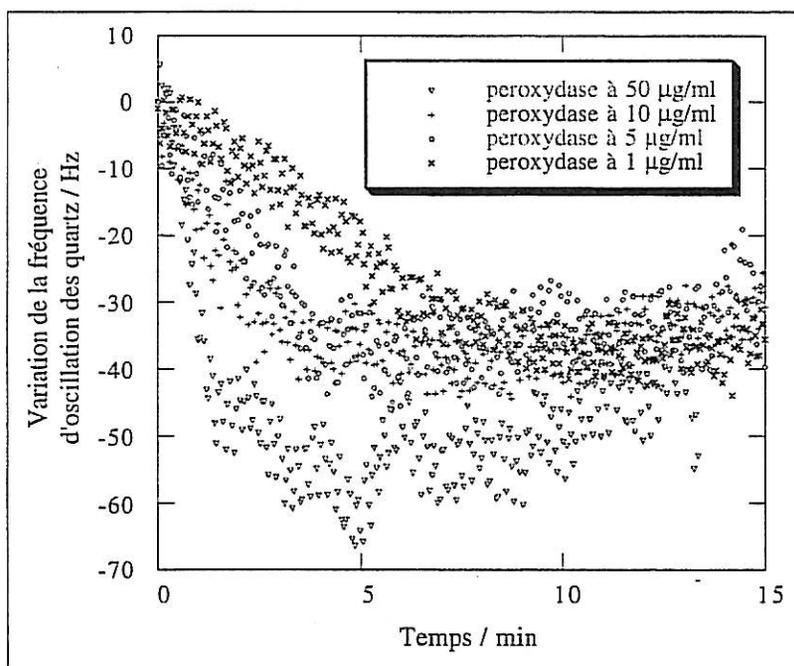


Figure 79 : Variation de la fréquence d'oscillation brute de différents quartz pendant la circulation de différentes solutions de peroxydase à différentes concentrations

Sur cette figure, les différences concernant l'évolution de la fréquence brute des différents quartz sont assez difficiles à distinguer étant donnée la faible amplitude des réponses et le bruit de fond assez important de la fréquence.

La figure 80 présente l'évolution de la fréquence des quartz filtrée numériquement à l'aide de la fonction "transformée de Fourier" (les moments correspondant au rinçage au PBS ne sont pas indiqués car ils n'ont pas tous été réalisés au même temps).

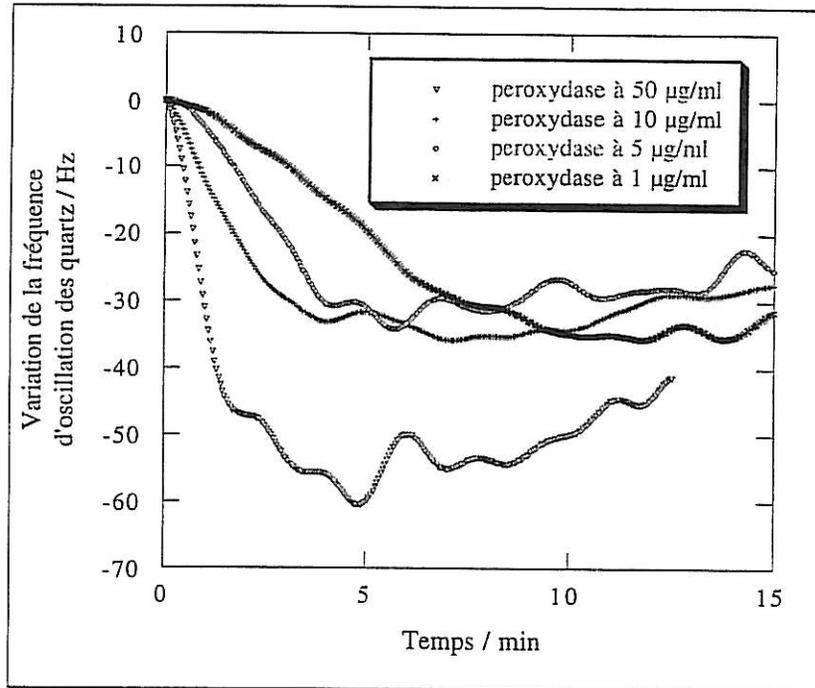


Figure 80 : Evolution de la fréquence lissée des quartz pendant la circulation de différentes solutions de peroxydase à différentes concentrations

Nous pouvons alors plus nettement distinguer la réponse de la microbalance pour les différentes concentrations en antigènes. Pour les quatre concentrations testées, l'arrivée de la solution au niveau du quartz provoque une diminution rapide de la fréquence d'oscillation. Les cinétiques de la variation de fréquence dépendent de la concentration en peroxydase de la solution : plus la solution d'antigène qui circule est concentrée, plus la cinétique est rapide. Les fréquences atteignent rapidement (environ 5 minutes) un plateau, traduisant la saturation de la surface par les antigènes. La valeur du plateau pour les différentes concentrations est pratiquement identique. Pour la concentration la plus élevée, la réponse est d'abord plus importante puis la fréquence remonte pour atteindre quasiment la même valeur de plateau (environ -30 Hz). Il est possible que pour cette concentration, la peroxydase se fixe sur les anticorps sous forme d'agrégats qui se relarguent pendant le rinçage au PBS.

La réaction antigène/anticorps à l'équilibre (régie par les constantes d'association et de dissociation) aboutit théoriquement à une quantité de complexes antigène/anticorps formés croissante en fonction de la concentration en antigène pour des valeurs non saturantes de cette

concentration et pour une quantité fixe d'anticorps. Pour des concentrations en antigène correspondant à un large excès par rapport à la quantité de sites anticorps présents à la surface, la quantité de complexes formés (traduisant la saturation de la surface) devient théoriquement constante.

Bien que nous ne soyons pas dans un réel état d'équilibre, mais plutôt dans un état de pseudo-équilibre (car la solution en antigène est constamment renouvelée), nos résultats montrent que la plus faible concentration de peroxydase détectable (1  $\mu\text{g/ml}$ ) est déjà saturante. Cette observation peut s'expliquer par une trop faible quantité de sites anticorps immunoréactifs présents sur la surface du transducteur. Nous ne pouvons donc pas, dans ce cas, réaliser une courbe d'étalonnage à partir de la valeur des plateaux. Néanmoins, nous pouvons effectuer une telle calibration sur les pentes des différents cinétiques (c'est-à-dire au niveau des vitesses initiales de la réaction antigène/anticorps).

La figure 81 présente la variation de la fréquence d'oscillation de la microbalance à quartz 2 minutes après l'arrivée de la peroxydase sur l'électrode en fonction de la concentration en peroxydase.

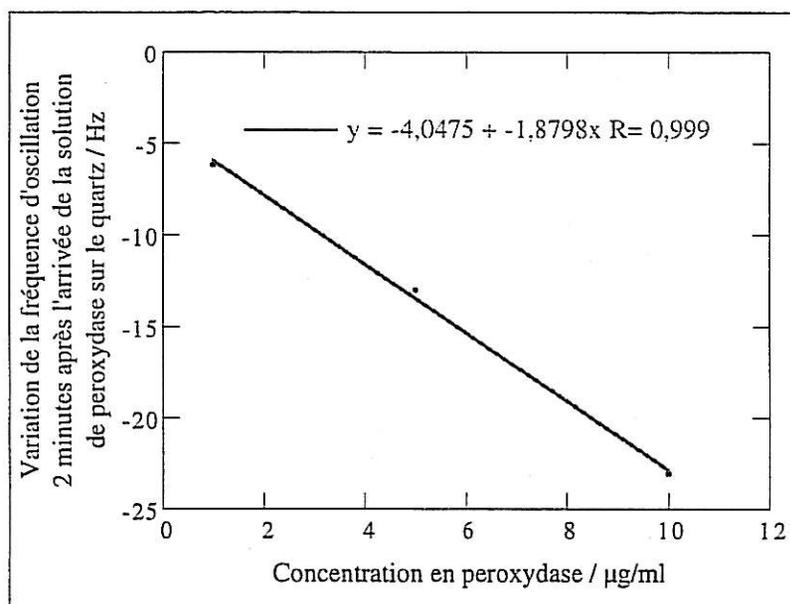


Figure 81 : Variation de la fréquence d'oscillation de la microbalance à quartz 2 minutes après l'arrivée de la solution de peroxydase sur l'électrode en fonction de la concentration de la solution de peroxydase

Nous pouvons observer une bonne corrélation entre la variation de la fréquence au bout de ce temps et la concentration de peroxydase, dans une gamme de 1 à 10  $\mu\text{g/ml}$ . La linéarité

de la réponse est moins bonne pour une gamme de 1 à 50  $\mu\text{g/ml}$ . La limite de détection pour la solution de peroxydase est dans ce cas de 1  $\mu\text{g/ml}$  soit une concentration molaire de 22,7 nM.

Pour comparaison, la même limite de détection a été déterminée avec un dispositif optique (BIAcore) en greffant directement sur la surface de dextran carboxylé du transducteur, les anticorps anti-péroxydase par la méthode NHSEDC. Ce résultat montre que la sensibilité atteinte par les deux dispositifs (optique basé sur la résonance des plasmons de surface et piézoélectrique basé sur la microbalance à quartz) pour un même couple antigène/anticorps est identique comme l'ont montré certains auteurs (Köblinger et *al.*, 1995).

## 2. DETECTION D'IMMUNOGLOBULINES G

### 2. 1. But

La détection et le dosage d'immunoglobulines G (IgG) peuvent s'avérer utiles dans certaines pathologies. Nous avons donc essayé d'utiliser notre microbalance à quartz pour la détection d'IgG à l'aide d'un couple anticorps de chèvre anti-IgG de lapin et des IgG de lapin. De plus, ce système Ig anti-IgG/IgG devrait nous permettre d'obtenir des réponses de plus grande amplitude en microbalance car la masse molaire importante (150000 g/mol) des IgG doit provoquer une plus importante variation de masse sur l'électrode immunofonctionnalisée.

### 2. 1. Matériel et méthodes

Les anticorps polyclonaux de chèvre anti IgG de lapin ont été fournis par la société Immunotech et les IgG polyclonales de lapin par la société Jackson Immunoresearch Labs. La préparation des électrodes concernant l'immobilisation des anticorps de chèvre a été effectuée comme pour les anticorps anti-péroxydase. Le même dispositif expérimental que celui décrit précédemment a été utilisé pour réaliser les expériences de microbalance.

## 2. 3. Résultats

### 2. 3. 1. Evaluation de la spécificité

La figure 82 présente l'évolution de la fréquence d'oscillation d'un quartz témoin sans anticorps, mais saturé par la BSA, pendant la circulation de PBS et d'une solution d'IgG de lapin concentrée à 25  $\mu\text{g/ml}$ .

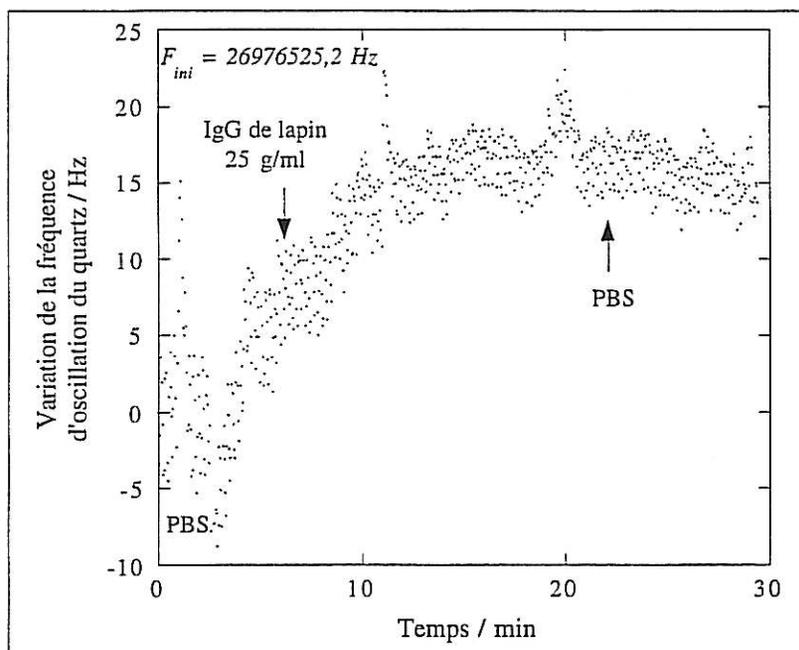


Figure 82 : Evolution de la fréquence d'oscillation d'un quartz témoin sans anticorps pendant la circulation de PBS et d'une solution d'IgG de lapin concentrée à 25  $\mu\text{g/ml}$

L'arrivée de la solution d'IgG de lapin au niveau de l'électrode du quartz témoin sans anticorps ne provoque pas de diminution de la fréquence de la microbalance qui se stabilise pendant le rinçage au PBS. Les IgG de lapin ne s'adsorbent donc pas non spécifiquement sur la surface saturée et la variation des propriétés physico-chimiques de la solution, par rapport au PBS, ne se répercutent pas sur la fréquence de la microbalance.

Toute diminution de fréquence consécutive à la circulation de la solution d'IgG de lapin sur une surface présentant les anticorps anti-IgG de lapin pourra donc être considérée comme spécifique.

La figure suivante présente l'évolution de la fréquence d'oscillation d'un quartz revêtu d'anticorps anti-IgG de lapin et saturé par la BSA pendant la circulation d'une solution de

phosphatase alcaline (c'est-à-dire une protéine différente de celle que nous voulons détecter) concentrée à 25  $\mu\text{g/ml}$ .

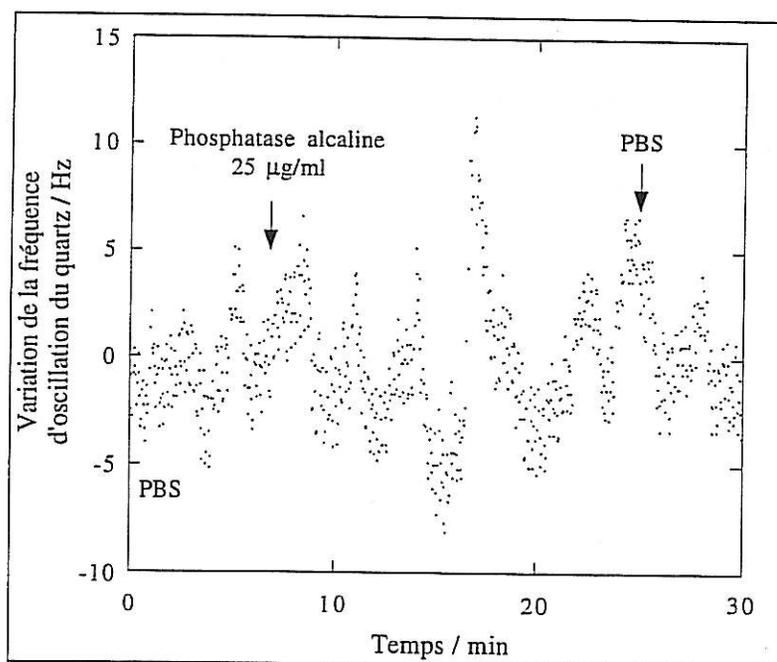


Figure 83 : Evolution de la fréquence d'oscillation d'un quartz revêtu d'anticorps anti-IgG de lapin pendant la circulation d'une solution de phosphatase alcaline concentrée à 25  $\mu\text{g/ml}$

L'arrivée de la solution de phosphatase alcaline sur la surface de l'électrode du quartz revêtu d'anticorps anti-IgG de lapin et saturée par la BSA ne provoque aucune variation concomitante de la fréquence d'oscillation du quartz.

Cette expérience nous permet de confirmer la spécificité de la réponse de notre immunocapteur et en particulier l'absence d'effet de la viscosité, de la densité et de la conductivité des solutions de protéines que nous utilisons sur la fréquence de la microbalance à quartz recouverte d'une couche d'immunoglobulines.

De plus, nous pouvons aussi conclure que ni les anticorps adsorbés sur l'électrode d'or, ni la BSA ne se désorbent pendant la circulation de tampon.

### 2. 3. 2. Réponse de la microbalance à quartz à l'antigène

La figure 84 présente l'évolution de la fréquence d'oscillation d'un quartz immunofonctionnalisé pendant la circulation d'une solution d'IgG de lapin concentrée à 25  $\mu\text{g/ml}$ .

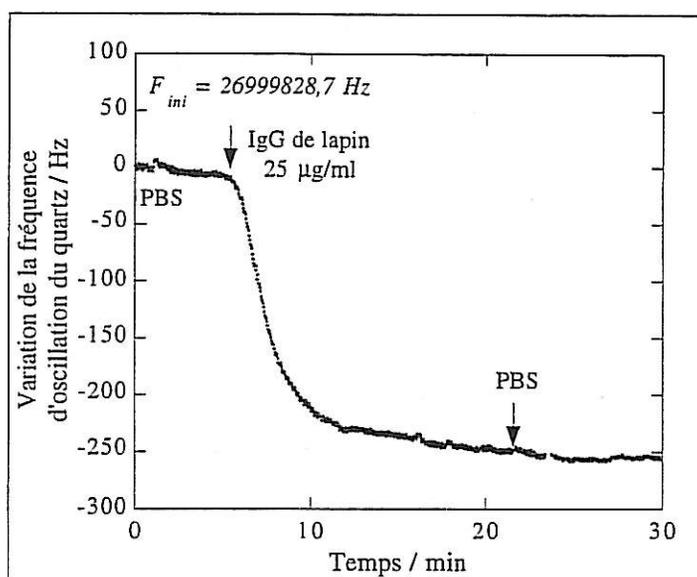


Figure 84 : Evolution de la fréquence d'oscillation d'un quartz immunofonctionnalisé par des anticorps anti-IgG de lapin pendant la circulation d'une solution d'IgG de lapin concentrée à 25 µg/ml

La fréquence du quartz diminue rapidement lors du passage de la solution d'antigène sur l'électrode, puis se stabilise pour atteindre un plateau (en environ 10 minutes) lors du rinçage au PBS. Cette variation de fréquence correspond à la fixation spécifique des IgG de lapin sur la couche d'anticorps de chèvre. Nous pouvons voir que le poids moléculaire des antigènes à détecter est un paramètre important dans la réponse de la microbalance à quartz. L'immunodétection d'un analyte par la microbalance à quartz sera d'autant facile à réaliser que son poids moléculaire sera important.

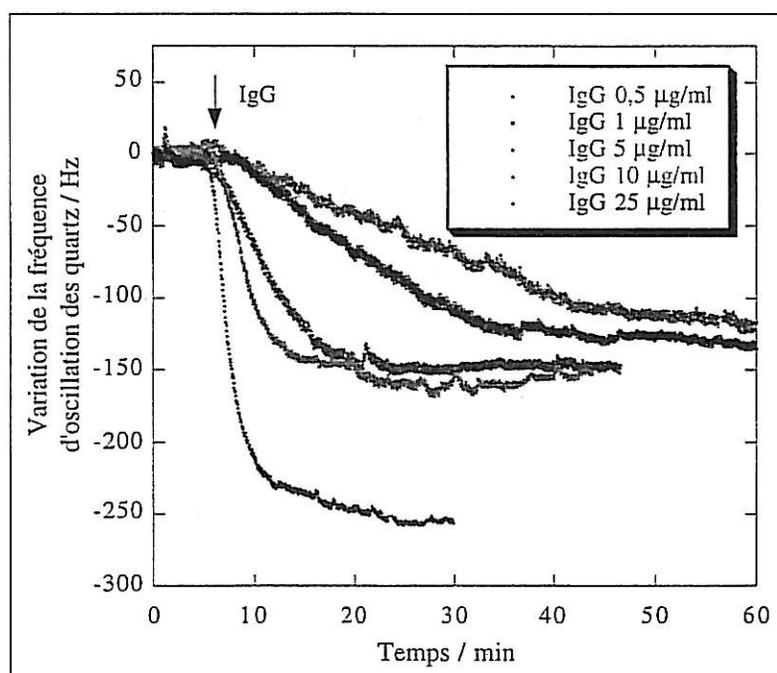


Figure 85 : Evolution de la fréquence brute des quartz immunofonctionnalisés pendant la circulation de différentes solutions d'IgG de lapin à différentes concentrations

Nous observons sur la figure 85 les différentes cinétiques de la réponse de la microbalance en fonction de la concentration de la solution d'antigène qui circule (les moments correspondant au rinçage au PBS ne sont pas indiqués car ils n'ont pas tous été réalisés au même temps).

Comme dans le cas de la peroxydase, les différentes réponses se rejoignent pratiquement pour une même valeur de plateau. Ceci traduit la saturation des anticorps immunoréactifs présents à la surface même pour la plus faible concentration détectable. La variation maximale de la fréquence d'oscillation est d'environ - 150 Hz (sauf pour la solution la plus concentrée) ce qui équivaut à 52,5 ng de protéine fixée. Pour la réponse de la solution la plus concentrée, nous pouvons supposer que pour cette concentration, les IgG forment des agrégats, ce qui provoque une diminution de fréquence plus importante. Les cinétiques correspondant aux plus faibles concentrations sont très lentes, mais nous distinguons nettement une réponse spécifique pour la solution concentrée à 0,5 µg/ml. En dessous de cette concentration, nous n'avons pas observé de variation significative de la fréquence d'oscillation des quartz. La limite de détection pour les IgG est donc de 0,5 µg/ml ce qui correspond à une concentration molaire de 3,33 nM.

Une droite d'étalonnage de la réponse en fréquence de l'immunocapteur pour ce couple anticorps anti-IgG/IgG a été tracée en prenant la variation de fréquence brute mesurée 3 minutes après l'arrivée de la solution d'IgG sur la microbalance (figure 86).

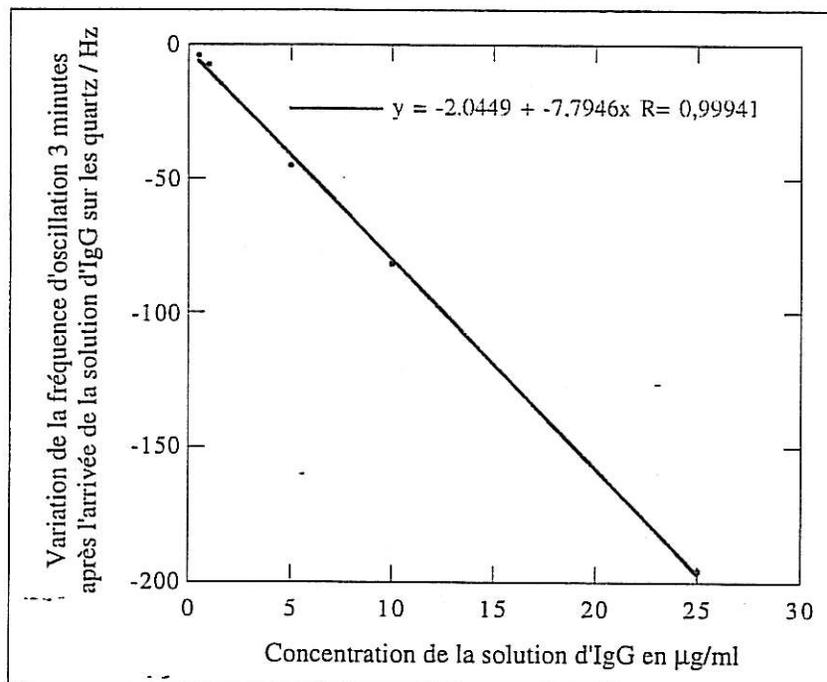


Figure 86 : Variation de la fréquence d'oscillation de la microbalance à quartz 3 minutes après l'arrivée de la solution d'IgG sur l'électrode en fonction de la concentration de la solution d'IgG

Cette droite d'étalonnage montre une bonne corrélation entre le signal mesuré et la concentration en antigène. La réponse du dispositif s'avère, dans ce cas, linéaire pour une gamme de concentration en immunoglobulines G allant de 0,5 à 25 µg/ml.

### 3. DETECTION DE L'ENTEROTOXINE B DE STAPHYLOCOQUE

#### 3. 1. But

La bactérie *Staphylococcus aureus* est un coque gram + qui prolifère facilement dans certains aliments mal conservés en produisant différentes toxines. La plus importante en terme de toxicité est l'entérotoxine B (SEB pour Staphylococcal Enterotoxin B) qui provoque de graves intoxications alimentaires. Nous avons donc appliqué notre microbalance à quartz à l'immunodétection de cette toxine. Cet antigène est celui qui présente la masse molaire la plus faible des trois molécules que nous avons testées, en effet la SEB est formée d'une chaîne polypeptidique de 28000 g/mol.

#### 3. 1. Matériel et méthodes

Les anticorps anti-SEB utilisés ont été produits par culture cellulaire au laboratoire des Biotechnologies du Centre d'Etudes du Bouchet. Il s'agit d'anticorps monoclonaux de souris (F<sub>11</sub>) de classe G et sous classe 1. Leur affinité pour la SEB a été déterminée en ELISA et est de  $2,5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ . Le point isoélectrique de ces IgG<sub>1</sub> déterminé par isoélectrofocalisation est de 5,8. La SEB utilisée dans ces expériences a été fournie par la société Sigma.

La préparation des électrodes concernant l'immobilisation des anticorps a été effectuée comme pour les anticorps anti-peroxydase. Le même dispositif expérimental, que celui décrit précédemment, a été utilisé pour réaliser les expériences de microbalance.

#### 3. 3. Résultats

##### 3. 3. 1. Evaluation de la spécificité

La figure 87 présente l'évolution de la fréquence d'un quartz témoin sans anticorps, mais saturé par la BSA, pendant la circulation d'une solution de SEB à 20 µg/ml.

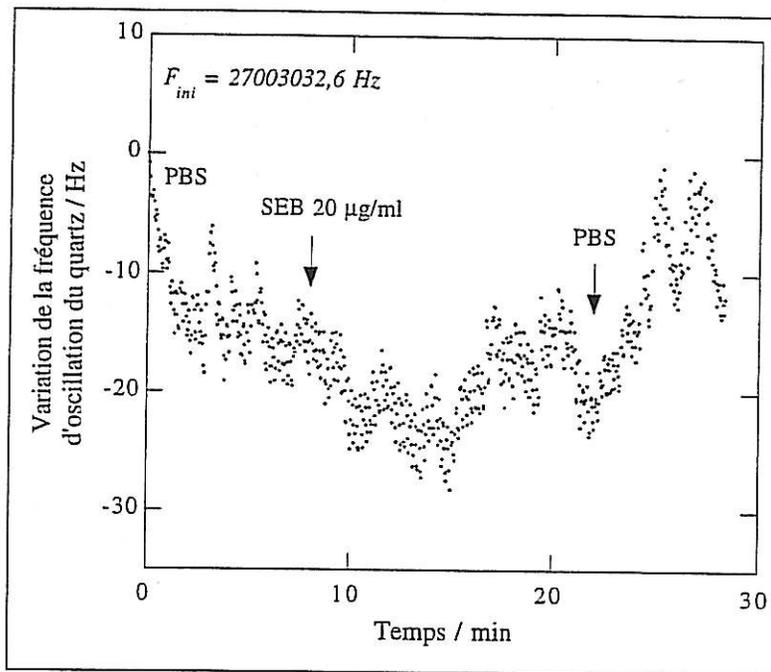


Figure 87 : Evolution de la fréquence d'oscillation d'un quartz témoin sans anticorps pendant la circulation de PBS et d'une solution de SEB concentrée à 20 µg/ml

La fréquence du quartz présentait une légère dérive négative pendant la circulation de la solution de PBS. L'arrivée de la solution de SEB, sur la surface de l'électrode sans anticorps, ne provoque pas une diminution caractéristique de la fréquence d'oscillation qui continue légèrement à dériver. Lors du rinçage au PBS, la fréquence remonte pour atteindre son niveau de base.

Comme dans le cas des deux molécules précédentes, la SEB ne se fixe pas de manière non spécifique sur la surface de l'électrode saturée, et la BSA ne se désorbe pas de l'électrode.

La figure 88 présente l'évolution de la fréquence d'oscillation d'un quartz immunofonctionnalisé par les anticorps anti-SEB pendant la circulation successive d'une solution de PBS, de SEB à 10 µg/ml, de PBS, de peroxydase à 10 µg/ml et de PBS.

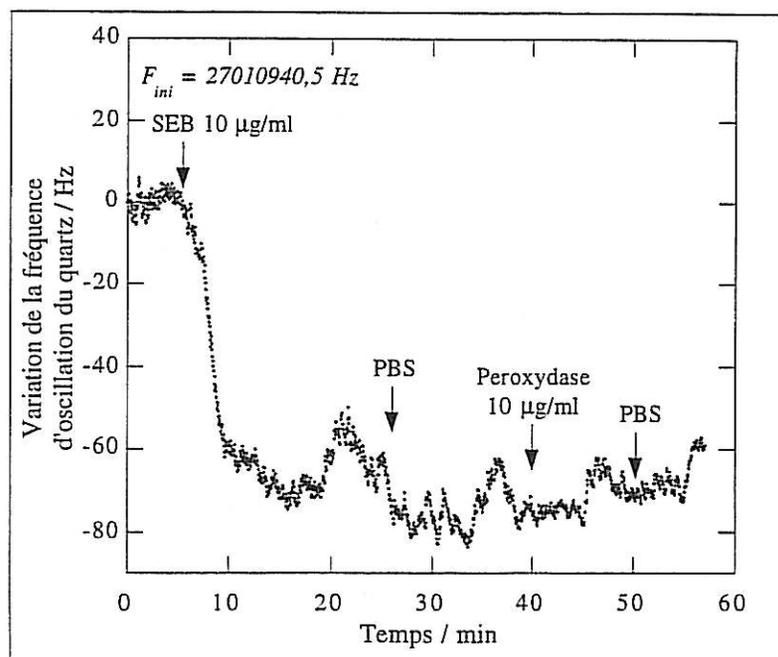


Figure 88 : Evolution de la fréquence d'oscillation d'un quartz revêtu d'anticorps anti-SEB pendant la circulation successive d'une solution de PBS, de SEB à 10 µg/ml, de PBS, de peroxydase à 10 µg/ml et de PBS

L'arrivée de la solution de SEB sur le quartz revêtu d'anticorps spécifiques provoque immédiatement une diminution rapide de la fréquence d'oscillation qui était stable pendant la circulation préalable de PBS. Cette variation de fréquence correspond à la fixation spécifique de la SEB sur les anticorps adsorbés (qui ne se désorbent pas pendant la circulation de PBS). La fréquence du quartz se stabilise pendant le rinçage au PBS, la variation relative de la fréquence est d'environ -70 Hz.

La solution de peroxydase qui circule, après le rinçage au PBS, ne provoque aucune variation de la fréquence d'oscillation qui reste stable durant le deuxième rinçage. Comme nous l'avons vu précédemment, la circulation d'une solution de protéine, autre que la protéine à détecter, n'a aucun effet sur la fréquence des quartz immunofonctionnalisés et saturés par la BSA.

La figure 89 présente l'évolution de la fréquence d'oscillation d'un quartz immunofonctionnalisé par les anticorps anti-SEB pendant la circulation successive d'une solution de PBS, de peroxydase à 20 µg/ml, de PBS, de SEB à 20 µg/ml et de PBS. Il s'agit de la même expérience que celle montrée précédemment mais l'ordre des solutions qui circulent est inversé (les concentrations sont aussi différentes).

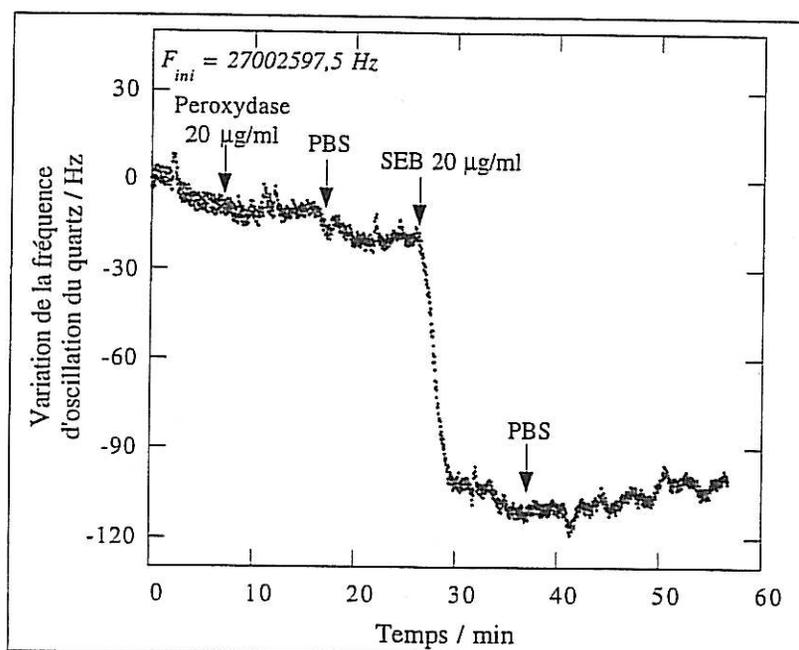


Figure 89 : Evolution de la fréquence d'oscillation d'un quartz revêtu d'anticorps anti-SEB pendant la circulation successive d'une solution de PBS, de peroxydase à 20 µg/ml, de PBS, de SEB à 20 µg/ml et de PBS

L'arrivée de la solution de peroxydase sur le quartz immunofonctionnalisé par des anticorps anti-SEB ne provoque pas de diminution caractéristique de la fréquence du quartz qui dérivait légèrement pendant la circulation préalable de PBS. Pendant le rinçage de la surface par le PBS, la fréquence d'oscillation se stabilise, puis celle-ci diminue rapidement à l'arrivée de la solution de l'antigène à détecter. Lors du dernier rinçage au PBS, la fréquence se stabilise et la variation relative de la fréquence correspondant à la fixation spécifique de la SEB sur les anticorps est d'environ -80 Hz.

Cette expérience nous permet de confirmer que la circulation d'une solution de protéines différentes de l'antigène à détecter ne provoque pas de variation de fréquence et nous montrons, de plus, que la surface de l'électrode immunofonctionnalisée reste active pour fixer spécifiquement ses antigènes dans un second temps.

### 3. 3. 2. Réponse de la microbalance à l'antigène

La figure 90 présente les variations de la fréquence d'oscillation brute de plusieurs quartz immunofonctionnalisés, pendant la circulation de solutions de SEB à différentes concentrations (les fréquences ont été remises à zéro à partir du moment où la solution d'antigènes arrive sur les électrodes).

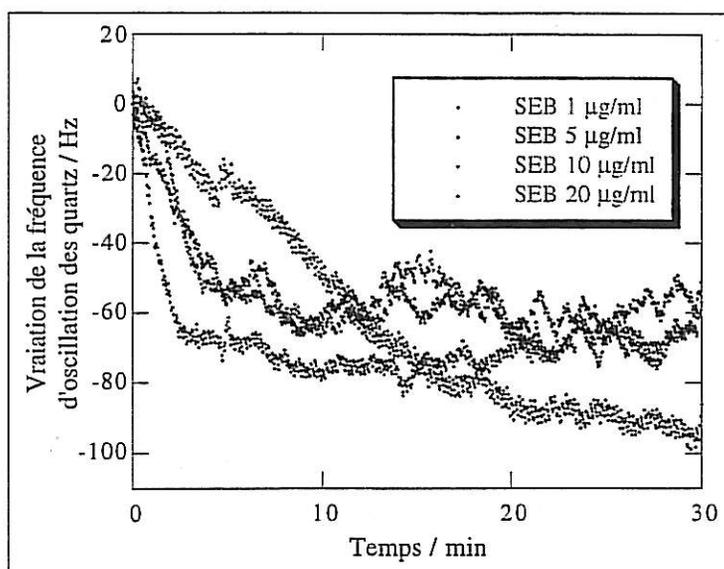


Figure 90 : Evolution de la fréquence brute des quartz immunofonctionnalisés par les anticorps anti-SEB pendant la circulation de différentes solutions de SEB à différentes concentrations

Nous observons sur cette figure les différentes réponses de la microbalance en fonction de la concentration de la solution de SEB qui circule.

Comme dans le cas de la détection de la peroxydase et des immunoglobulines G, les différentes réponses se rejoignent pratiquement pour une même valeur de plateau. La variation maximale de la fréquence d'oscillation est d'environ -70 Hz ce qui correspond à une masse de 24,5 ng de protéine fixée. Comme précédemment, la cinétique des réponses dépend des concentrations testées. Néanmoins, les différences concernant la réponse en fréquence pour les concentrations à 5 et 10 µg/ml sont faibles et les deux courbes se confondent rapidement. Nous avons, tout de même, établi une droite d'étalonnage sur la période qui précède la réunion des deux courbes.

Concernant la limite de détection, la réponse spécifique de la microbalance pour une solution de SEB de 1 µg/ml est clairement observable, en dessous de cette valeur la fréquence des quartz ne varie pas de façon suffisante pour se distinguer du bruit de fond. Cette concentration de 1 µg/ml correspond à une concentration molaire de 35 nM. Pour comparaison, la limite de détection de la SEB par mesure directe à l'aide du BIAcore est de 0,5 µg/ml.

La droite d'étalonnage de la réponse en fréquence de l'immuncapteur pour ce couple anticorps anti-SEB/SEB est présentée sur la figure 91. Elle a été tracée en prenant la variation de fréquence brute mesurée 3 minutes après l'arrivée de la solution de SEB sur la microbalance.

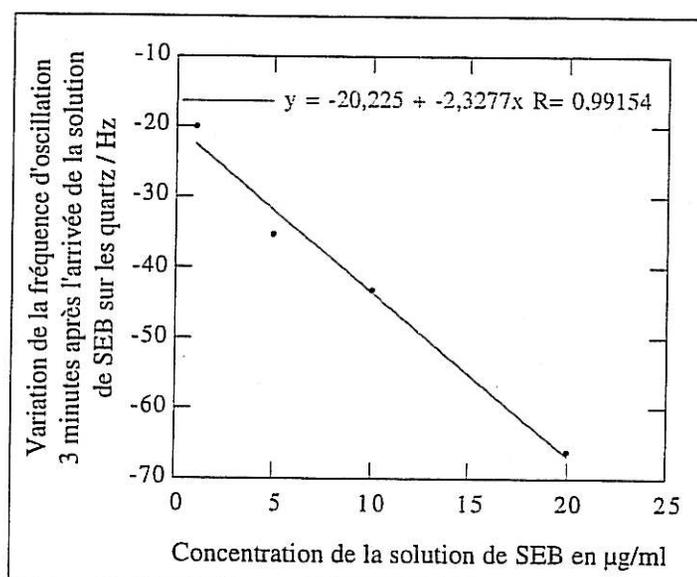


Figure 91 : Variation de la fréquence d'oscillation de la microbalance à quartz 3 minutes après l'arrivée de la solution de SEB sur l'électrode en fonction de la concentration de la solution de SEB

Une bonne corrélation entre la fréquence des quartz et la concentration de la solution de SEB est observée. La réponse de l'immunocapteur est, dans ce cas, linéaire pour des concentrations allant de 1 à 20 µg/ml.

## CONCLUSION ET DISCUSSION

L'immunodétection spécifique, rapide et en milieu liquide des trois antigènes que nous avons utilisés est possible grâce à la mesure en continu de la fréquence d'oscillation de quartz fonctionnant à 27 MHz. La sensibilité massique de notre microbalance à quartz s'avère suffisante pour détecter directement les trois antigènes ayant des masses molaires allant de 28000 à 150000 g/mol, avec des limites de détection de l'ordre du µg/ml pour les plus faibles masses molaires.

Toutefois, ces limites de détection pourraient être améliorées, sans modification du transducteur, en réalisant des tests en "sandwich". La fixation d'un second anticorps sur les antigènes fixés sur les premiers anticorps immobilisés sur la microbalance permettrait d'amplifier la réponse et donc d'abaisser les limites de détection. Les variations de fréquence non distinguables directement du bruit de fond "sortiraient" de ce bruit de fond. La sensibilité

de la mesure (c'est-à-dire le rapport signal sur bruit) serait donc augmentée (par augmentation du signal pour le même bruit de fond).

Concernant la spécificité de la réponse en fréquence de la microbalance, nous avons clairement montré que la variation des propriétés physico-chimiques d'une solution de protéine diluée dans du PBS par rapport au tampon seul n'a aucun effet sur la fréquence d'oscillation des quartz dont l'électrode est saturée par la BSA (en présence ou en l'absence d'anticorps). Par conséquent, la réponse en fréquence de la microbalance à quartz ne dépend pas des variations physico-chimiques des solutions, dans nos conditions d'utilisation.

Nous avons également montré, pour chaque couple antigène/anticorps, la spécificité de la fixation des antigènes sur les anticorps : aucune des molécules testées ne s'adsorbe non spécifiquement sur la surface de l'électrode saturée et les variations de la fréquence d'oscillation des quartz immunofonctionnalisés consécutives à la circulation de la solution d'antigène sont dues à la fixation spécifique des antigènes sur les anticorps immobilisés.

Nous n'avons pas, dans cette étude de faisabilité, tenu compte de la reproductibilité des résultats obtenus en microbalance à quartz. Pour des molécules ayant un poids moléculaire élevé, comme dans le cas des IgG, celle-ci est meilleure que pour des plus petites protéines. Ce paramètre devra impérativement être étudié et amélioré. Cependant, la configuration actuelle de notre dispositif, c'est-à-dire avec des anticorps simplement adsorbés sur l'électrode, n'est certainement pas la meilleure pour optimiser ce paramètre. L'idéal serait de réaliser un greffage covalent des anticorps pour pouvoir calibrer la réponse des quartz pour les différentes concentrations en antigène sur le même transducteur, et réaliser le test de détection avec la solution inconnue sur ce même quartz.

Nous avons vu, pour les trois antigènes, que la variation de la fréquence des quartz immunofonctionnalisés pendant la circulation des solutions d'antigènes atteint rapidement un plateau. Ce plateau correspond à la saturation des sites anticorps présents à la surface et dépend théoriquement (pour des conditions d'équilibre et en fonction de l'affinité du couple antigène/anticorps) de la concentration en antigène. Or, la valeur de ces plateaux est pratiquement identique pour les différentes concentrations testées, y compris pour les plus basses concentrations détectables. Ce phénomène de saturation rapide de la surface laisse penser que le nombre d'anticorps actifs à la surface est faible, ce qui limite la réponse du capteur à la fois au niveau de la limite de détection et au niveau de la gamme de linéarité. En optimisant cette quantité d'anticorps immunoréactifs sur la surface, nous pourrions augmenter à la fois la limite de détection et la plage de linéarité de la réponse de la microbalance. D'autre part, cette observation signifie aussi que la sensibilité de notre dispositif n'est pas suffisante pour mesurer, directement, les plus faibles variations de masse provoquées par des

concentrations en antigène non saturantes pour la quantité de sites anticorps présents à la surface du transducteur.

Néanmoins, la microbalance à quartz que nous avons mise au point, fonctionnant à 27 MHz et dont l'électrode en or est revêtue d'anticorps spécifiques, est utilisable pour détecter de manière spécifique, directe et rapide un antigène soluble de poids moléculaire moyen, avec une limite de détection de l'ordre du  $\mu\text{g/ml}$ .

## *Conclusion*

Cette étude avait pour but de contribuer à la mise au point d'un immunocapteur piézoélectrique. Notre objectif était de développer un transducteur piézoélectrique reposant sur une microbalance à quartz (QCM) fonctionnant en milieu liquide, celle-ci devant être suffisamment sensible pour nous permettre de détecter directement et spécifiquement les variations de masse occasionnées par la fixation d'antigènes sur une couche d'anticorps correspondants élaborée à la surface du quartz.

La microbalance à quartz permet de mesurer, par l'intermédiaire de sa fréquence d'oscillation, les variations de masse ayant lieu au niveau d'une des électrodes métalliques qui recouvrent le cristal. L'équation de Sauerbrey, qui relie les variations de masse aux variations de la fréquence d'oscillation du quartz, montre que la sensibilité massique des QCM augmente avec le carré de leur fréquence de résonance. Ce paramètre dépend de l'épaisseur du cristal et plus le cristal est mince, plus sa fréquence de résonance est élevée. L'augmentation de la sensibilité massique d'une microbalance est donc, physiquement, limitée car en dessous d'une certaine épaisseur le cristal n'est plus manipulable. Pour contourner cette limite, nous avons développé une microbalance à quartz oscillant à 27 MHz sur le partiel trois de quartz à 9 MHz. Ce transducteur présente alors une sensibilité massique théorique de 364 pg/Hz.

Nous avons mis au point l'ensemble du dispositif expérimental constitué d'un oscillateur, permettant d'entretenir les vibrations du quartz à 27 MHz même en milieu liquide, et d'une cellule miniature dans laquelle est installée la microbalance. Celle-ci permet de faire circuler des faibles volumes de solutions au niveau de l'électrode de travail. Une étude de l'influence de différents paramètres sur la stabilité et le bruit de fond de la fréquence d'oscillation à 27 MHz a été menée. Nous avons montré que la répercussion des variations de la température sur la fréquence de la microbalance était importante. Nous avons donc adapté notre dispositif expérimental, pour s'affranchir de cet effet, en thermorégulant finement l'oscillateur et en thermostatant les solutions en contact avec le quartz. Un bruit de fond de la fréquence inférieur à 10 Hz et une bonne stabilité dans le temps ont été obtenus, ces résultats sont très satisfaisants étant donnée la fréquence d'oscillation élevée de notre transducteur.

La microbalance à quartz a ensuite été calibrée par l'intermédiaire de dépôts électrochimiques de cuivre sur l'électrode. Un coefficient de sensibilité massique expérimental de  $57.10^7 \text{ Hz.g}^{-1}.\text{cm}^2$  a été obtenu ce qui correspond, pour la surface de nos électrodes, à une sensibilité de 350 pg/Hz (pour un dépôt élastique). Nous avons donc bien augmenté la sensibilité massique de notre transducteur dans les proportions prévues par la théorie de Sauerbrey et la réponse de la microbalance est, dans le cas d'un dépôt métallique, purement massique. La microbalance à quartz a ensuite été utilisée pour mesurer les cinétiques d'adsorption de différentes enzymes. L'idée était de comparer la masse de protéine adsorbée estimée par la mesure de son activité enzymatique et estimée à partir de la variation de la

fréquence d'oscillation occasionnée par l'adsorption (en prenant le coefficient masse/fréquence déterminé à partir des dépôts de cuivre). La microbalance s'est révélée être un outil performant pour mesurer ces processus d'adsorption mais un écart entre les deux estimations de la masse de protéine déposée a été observé. Cet écart pouvait être attribué d'une part, à un problème lié à la mesure de l'activité enzymatique des enzymes adsorbées et d'autre part, à une mauvaise estimation de la masse à partir de la réponse en fréquence de la microbalance. En effet, la réponse, globale, de la microbalance à quartz, prend en compte la masse du dépôt mais aussi ses propriétés viscoélastiques ainsi que les propriétés physico-chimiques des solutions de protéine en contact avec le quartz.

C'est dans ce cadre que nous avons étudié le mécanisme de transduction de la microbalance à quartz pour valider les pesées réalisées dans le cas d'un dépôt non élastique comme les dépôts de protéines. Néanmoins, il n'est pas possible de calculer simplement l'évolution de la fréquence d'oscillation de la microbalance en fonction des différents paramètres : masse déposée, viscosité/densité de la solution et viscoélasticité de couche de protéine. Par conséquent, une autre approche, basée sur le principe de l'admittance électroacoustique, a été envisagée pour discriminer les différents effets pouvant interférer sur la réponse purement massique du transducteur. Le résonateur à quartz peut être modélisé par un circuit équivalent, caractérisé par certains paramètres et notamment par la fréquence série. Cette fréquence série, caractéristique du résonateur, est une grandeur, contrairement à la fréquence d'oscillation, facilement calculable. Un nouveau modèle, développé par Gabrielli *et al.*, adapté à nos conditions permet de simuler l'admittance électroacoustique du résonateur et d'estimer numériquement l'influence des paramètres cités précédemment (viscosité/densité de la solution, viscoélasticité et masse de la couche de protéines) sur le circuit équivalent du résonateur et par conséquent sur la fréquence série. Une simulation a permis de calculer l'influence des propriétés viscoélastiques du film sur les variations de la fréquence série pour une masse de protéines adsorbées constante tout en fixant les propriétés de la solution. Nous avons pu montrer que, pour ce type de film mince et dans ces conditions, l'erreur sur l'estimation de la masse, en utilisant classiquement Sauerbrey, est inférieure à 10 %. Cette erreur est attribuée aux changements des propriétés viscoélastiques de la couche et se traduit par une variation de la résistance. Afin de vérifier expérimentalement ce résultat, nous avons couplé la mesure de la fréquence d'oscillation de la microbalance à une mesure d'admittance électroacoustique sur le même résonateur afin de comparer l'évolution de la fréquence série et de la fréquence d'oscillation de la microbalance. Les mesures couplées, réalisées pendant l'adsorption de protéine, ont montré que les variations des deux fréquences étaient identiques. Par conséquent, il semble que les mesures de masse effectuées à l'aide de la microbalance à quartz, dans le cas d'une couche de protéine et en milieu liquide, sont fiables avec une erreur maximale de 10 % dans le cas où la viscoélasticité de la couche varie. La différence observée entre les deux estimations de la masse de protéine adsorbée sur l'électrode de la microbalance à

quartz s'expliquerait plutôt par un problème au niveau de la mesure de l'activité enzymatique qui aboutit à une sous-estimation de la quantité de protéine déposée.

Après avoir mis au point et étudié notre transducteur, nous nous sommes intéressés à l'élaboration de la couche d'anticorps qui rend la surface de l'électrode spécifique. Tout d'abord, nous avons choisi un couple antigène/anticorps modèle constitué d'anticorps monoclonaux de souris anti-peroxydase et de la peroxydase. Ce couple nous a permis de contrôler l'immunoréactivité des anticorps immobilisés par la mesure de l'activité enzymatique de la peroxydase fixée spécifiquement sur les anticorps correspondants immobilisés. Différentes techniques d'immobilisation des immunoglobulines sur l'or ont été réalisées et comparées en terme de quantité de peroxydase, enzymatiquement active, fixée spécifiquement sur les anticorps. La technique de l'adsorption simple sur l'or a été privilégiée par rapport aux techniques de greffage covalent après fonctionnalisation de l'électrode d'or car c'est celle qui donne la plus grande quantité de peroxydase active fixée (ce qui optimise la réponse directe du capteur). L'influence de l'hydrophobicité de la surface de l'électrode, de la circulation de la solution d'antigène et de la vibration de la microbalance a été étudiée. Nous avons montré qu'augmenter l'hydrophobicité de la surface de l'électrode n'améliorait pas la quantité d'antigène fixé spécifiquement sur les anticorps immobilisés. Concernant la vibration du quartz, son influence sur la réaction antigène/anticorps s'est révélée nette : la quantité d'antigène fixé sur une couche d'anticorps adsorbés est significativement diminuée quand le quartz vibre par rapport à un quartz sans vibration ; cet effet a été attribué à une diminution de l'immunoréactivité des anticorps immobilisés due à la vibration du quartz. Afin de caractériser l'électrode des quartz et la couche d'anticorps, nous avons réalisé des études en microscopie électronique à balayage et en microscopie à force atomique. Les images réalisées de la surface de l'électrode avec et sans anticorps montrent des différences, mais il est difficile de conclure sur la nature des observations réalisées. Il semble que le recouvrement de l'électrode par les immunoglobulines ne soit pas total.

Les quartz immunofonctionnalisés, par l'adsorption simple d'anticorps, ont ensuite été utilisés pour mesurer, directement, les variations de masse consécutives à la fixation spécifique des antigènes correspondants. Des essais d'immunodétection à l'aide du dispositif expérimental mis au point ont été réalisés pour trois antigènes différents : la peroxydase, des immunoglobulines G et l'entérotoxine B de Staphylocoque. Les expériences que nous avons réalisées ont montré que la microbalance à quartz revêtue par une couche d'anticorps permet de détecter directement, spécifiquement et rapidement (en moins de 10 minutes) les antigènes solubles correspondants. La sensibilité massique de notre transducteur s'avère suffisante pour détecter directement les trois antigènes testés ayant des masses molaires allant de 28000 à 150000 g/mol, avec des limites de détection de l'ordre du  $\mu\text{g/ml}$ .

## *Références bibliographiques*

- Allara, D. (1995). Critical issues in applications of self-assembled monolayers. *Biosens. Bioelectron.*, **10**, 771-783.
- Andrade, J. (1985). "Principles of protein adsorption" in Surface and interfacial aspects of biomedical polymers, vol 2. Andrade, J. (eds), Plenum press, New York.
- Avnir, D., Braun, S., Ottolenghi, M. (1992). Encapsulation of organic molecules and enzymes in sol-gel glasses. *Supramolecular Architecture*, ed. Bein (American Chemical Society, Washington), 384-404.
- Bain, C., Troughton, E., Tao, Y., Evall, J., Withesides, G., Nuzzo, R. (1989). Formation of monolayer films by spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *J. Am. Chem. Soc.*, **11**, 321-335.
- Barraud, A., Perrot, H., Billard, V., Martelet, C., Therasse, J. (1993). Study of immunoglobulin G thin layers obtained by the Langmuir-Blodgett method : application to immunosensor. *Biosens. Bioelectron.*, **8**, 39-48.
- Billard, V. (1991). Elaboration d'une couche sensible incorporant des anticorps : application aux immunocapteurs pour la détection directe de toxines bactériennes. *Thèse de Doctorat, Ecole Centrale de Lyon*, N° d'ordre : ECL 91-38.
- Bizet, K. (1994). La microbalance à quartz : perspectives d'application en biologie médicale. *Rapport de DEA de Biotechnologies, Université René Descartes*.
- Bizet, K., Gabrielli, C., Perrot, H., Therasse, J. (1995). La microbalance à quartz électrochimique : perspectives d'application en biologie médicale. *Immunoanal. Biol. Spéc.*, **10**, 205-211.
- Bizet, K., Gabrielli, C., Perrot, H., Therasse, J. (1996). A new approach for ultra-sensitive piezoelectric transducers used for immunodetection. Poster présenté au 4ème congrès mondial sur les biocapteurs, *Biosensors 96*, tenu du 29 au 31 mai 1996 en Thaïlande.
- Bouché-Pillon, D. (1996). Etude et mise au point de transducteurs piézoélectriques ultrasensibles fonctionnant en milieu liquide. *Thèse de Doctorat d'électronique, Université Pierre et Marie Curie - Paris V*.

- Bouet, V. (1994). Interaction particules isolantes / électrodes : mise en oeuvre de méthodes électrochimiques. Application aux revêtements composites électrolytiques. *Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI*.
- Brecht, A., Gauglitz, G. (1995). Optical probes and transducers. *Biosens. Bioelectron.*, **10**, 923-936.
- Bruckenstein, S., Shay, M. (1985). Experimental aspects of use of the quartz crystal microbalance in solution. *Electrochim. Acta*, **30**, 1295-1300.
- Cady, W. G. (1964). Piezoelectricity : an introduction to the theory and applications of electromechanical phenomena in crystals, vol. I et vol. II, Dover publications, Inc, New-York.
- Caruso, F., Rodda, E., Furlong, D. N., Niikura, K., Okahata, Y. (1997). Quartz crystal microbalance study of DNA immobilization and hybridization for nucleic acid sensor development. *Anal. Chem.*, **69**, 2043-2049.
- Caruso, F., Rodda, E., Furlong, N. (1996) Orientational aspects of antibody immobilization and immunological activity on quartz crystal microbalance electrodes. *J. Colloid and Interface Sci.*, **178**, 104-115.
- Cheng, Q., Brajter-Toth, A. (1992). Selectivity and sensitivity of self-assembled thioctic acid electrodes. *Anal. Chem.*, **64**, 1998-2000.
- Chu, X., Lin, Z., Shen, G., Yu, R. (1995). Piezoelectric immunosensor for the detection of immunoglobulin M. *Analyst*, **120**, 2829-2832.
- Clark, L. C., Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. NY Acad. Sci.*, **102**, 29-45.
- Collino, R. (1994). Contribution à la conception et à la mise au point d'un immunocapteur optique à guide d'onde planaire élaboré par le procédé sol-gel. *Thèse de Doctorat, Université de Technologie de Compiègne*.
- Collino, R. (1997). Document de travail, Affinity Sensors.
- Coulet, P. (1991). "What is a biosensor ?" in Biosensor Principles and Applications. Blum, L. & Coulet, P. (eds), Marcel Dekker, New York.

- Curie, P., Curie, J. (1880). Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, **91**, 294.
- Davis, K. A., Leary, T. R. (1989). Continuous liquid-phase piezoelectric biosensor for kinetic immunoassays. *Anal. Chem.*, **61**, 1227-1230.
- Duan, C., Meyerhoff, M. (1994). Separation-free sandwich enzyme immunoassays using microporous gold electrodes and self-assembled monolayer / immobilized capture antibodies. *Anal. Chem.*, **66**, 1369-1377.
- Filiâtre, C. (1994). Analyse et modélisation de la microbalance à quartz en phase liquide en vue de l'étude de dépôts épais. *Thèse de Doctarat, Université de Franche-Comté*.
- Gabrielli, C., Keddam, M., Perrot, H. Characterization of a quartz crystal microbalance in liquid. Soumis à *Anal. Chem.*
- Gardies, F., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Perrot, H., Valleton, J.M., Alegret, S. (1990). Micro-enzyme field effect transistor sensor using direct covalent bonding of urease. *Anal. Chim. Acta*, **231**, 305-308.
- Geddes, N., Paschinger, E., Furlong, D., Ebara, Y., Okahata, Y., Than, K., Edgar, J. (1994). Piezoelectric crystal for the detection of immunoreactions in buffer solutions. *Sens. Actuators B*, **17**, 125-131.
- Göpel, W., Heiduschka, P. (1995). Interface analysis in biosensor design. *Biosens. Bioelectron.*, **10**, 853-883.
- Grada, M. (1996). Réalisation d'une procédure de mesure sur des résonateurs à quartz et automatisation d'une chaîne de mesure avec le logiciel HP VEE. Rapport de stage de fin d'études de l'école ENSEA.
- Granstaff, V., Martin, S. (1994). Characterization of a thickness-shear mode quartz resonator with multiple nonpiezoelectric layers. *J. Appl. Phys.*, **75**, 1319-1329.
- Guilbault, G., Hock, B., Schmid, R. (1992). A piezoelectric immunobiosensor for atrazine in drinking water. *Biosens. Bioelectron.*, **7**, 411-419.
- Guilbault, G., Montalvo, J. (1969). A urea specific enzym electrode. *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2164.

- Heusler, K., Grzegorzewski, A., Jäckel, L., Pietrucha, J. (1988). Measurement of mass and surface stress at one electrode of a quartz oscillator. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **92**, 1218-1225.
- Hoummady, M. (1991). Ondes élastiques transverses horizontales émises par des transducteurs interdigités déposés sur des plaques minces de quartz. Applications aux capteurs de viscosité et aux détecteurs de gaz. *Thèse de Doctorat, Université de Franche-Comté*.
- Johnsson, B., Löfas, S., Lindquist, G. (1991). Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Analytical biochemistry*, **198**, 268-277.
- Josse, F., Shana, Z., Radtke, D., Haworth, D. (1990). Analysis of piezoelectric bulk acoustic wave resonators as detectors in viscous conductive liquids. *IEEE Trans. Ultrason.*, **37**, 359-367.
- Kanazawa, K., Gordon, J. (1985). The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with a liquid. *Anal. Chim. Acta*, **175**, 1295-1300.
- Kiefer, H., Klee, B., John, E., Stierhof, Y., Jähnig, F. (1991). Biosensors based on membrane transport proteins. *Biosens. Bioelectron.*, **6**, 233-237.
- Köβlinger, C., Drost, S., Aberl, F., Wolf, H., Koch, S., Woias, P. (1992). A quartz crystal biosensor for measurement in liquids. *Biosens. Bioelectron.*, **7**, 397-404.
- Köβlinger, C., Uttenthaler, E., Drost, S., Aberl, F., Wolf, H., Brink, G., Stanglmaier, A., Sackmann, E. (1995). Comparison of the QCM and the SPR method for surface studies and immunological applications. *Sens. Actuators A*, **24-25**, 107-112.
- Köhler, G., Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495-497.
- König, B., Grätzel, M. (1993). Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of human erythrocytes. *Anal. Chim.-Acta*, **276**, 329-333.
- König, B., Grätzel, M. (1994). A novel immunosensor for herpes viruses. *Anal. Chem.*, **66**, 341-344.

- Kronick, M. N., Little, W. A. (1975). A new immunoassay based on fluorescence excitation by internal reflection spectroscopy. *J. Immunol. Methods*, **8**, 235-242.
- Lacour, F., Torresi, R., Gabrielli, C., Caprani, A. (1992). Comparison of the quartz crystal microbalance and double layer capacitance methods for measuring the kinetics of the adsorption of bovine serum albumin onto gold electrode. *J. Electrochem. Soc.*, **139**, 1619-1622.
- Martin, S., Granstaff, V., Frye, G. (1991). Characterization of a quartz crystal microbalance with simultaneous mass and liquid loading. *Anal. Chem.*, **63**, 2272-2281.
- Mason, W. P. (1964). Physical acoustic principles and methods, vol 1, part A, Academic Press, New-York.
- Matthys, R. (1983). Crystal oscillator circuits. *John Wiley & Sons, Inc.*
- Maupas, H., Soldatkin, A., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N., Mandrand, B. (1997). Direct immunosensing using differential electrochemical measurements of impedimetric variations. *J. Electroanal. Chem.*, **421**, 165-171.
- Miura, N., Higobashi, H., Sakai, G., Takeyasu, A., Uda, T., Yamazoe, N. (1993). Piezoelectric crystal immunosensor for sensitive detection of methamphetamine (stimulant drug) in human urine. *Sens. Actuators B*, **13-14**, 188-191.
- Muramatsu, H., Kajiwara, K., Tamiya, E., Karube, I. (1986). Piezoelectric immuno sensor for the detection of *Candida albicans* microbes. *Anal. Chim. Acta*, **188**, 257-261.
- Muratsugu, M., Ohta, F., Miya, Y., Hosokawa, T., Kurosawa, S., Kamo, N., Ikeda, H. (1993). Quartz crystal microbalance for the detection of microgram quantities of human serum albumin: relationship between the frequency change and the mass of protein adsorbed. *Anal. Chem.*, **65**, 2933-2937.
- Ngeh-Ngwainbi, J., Foley, P. H., Kuan, S. S., Guilbault, G. G. (1986). Parathion antibodies on piezoelectric crystals. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 5444-5447.
- Noël, M., Topart, P. (1994). High frequency impedance analysis of quartz crystal microbalance - General considerations. *Anal. Chem.*, **66**, 484-491.

- Nomura, T., Minemura, A. (1980). Behaviour of a piezoelectric quartz crystal in an aqueous solution and the application to the determination of minute amount of cyanide. *Nippon Kagaku Kaishi*, **1980**, 1621.
- Nomura, T., Okuhara, M. (1982). Frequency shifts of piezoelectric quartz crystals immersed in organic liquids. *Anal. Chim. Acta*, **142**, 281-284.
- Nuzzo, R., Dubois, L., Allara, D. (1990). Fundamental studies of microscopic wetting on organic surfaces. Formation and structural characterization of a self-consistent series of polyfunctional organic monolayers. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 558-569.
- O'Donnell, M., Busse, L., Miller, J. (1981). Methods of experimental physics, Ultrasonics, Piezoelectric transducers. Academic Press.
- Plomer, M., Guilbault, G. G., Hock, B. (1992). Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of enterobacteria. *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 230-235.
- Reese, K., Kanazawa, K. (1986). Compensating for the effects of viscous loss on the quartz/liquid compound resonator. *IBM research report*, **RJ 5104**.
- Rodahl, M., Höök, F., Fredriksson, C., Keller, C., Krozer, A., Brzezinski, P., Voinova, M., Kasemo, B. (1997). Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion. *Faraday Discuss.*, **107**, n°12.
- Rosenbaum, J. (1988). Bulk acoustic wave theory and device. Artech House.
- Sakai, G., Saiki, T., Uda, T., Miura, N., Yamazoe, N. (1995). Selective and repeatable detection of human serum albumin by using piezoelectric immunosensor. *Sens. Actuators B*, **24-25**, 134-137.
- Sauerbrey, G. (1959). Verwendung von schwing-quarzen zur wägung dünner schichten und zur mikrowägung. *Z. Phys.*, **155**, 206.
- Schumacher, R., Borges, G., Kanazawa, K. (1985). The quartz microbalance : a sensitive tool to probe surface reconstructions on gold electrodes in liquid. *Surf. Sci.*, **163**, L621-L626.
- Sethi, R. S. (1994). Transducers aspects of biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, **9**, 243-264.

- Shons, A., Dorman, F., Najarian J. (1972). An immunospecific microbalance. *J. Biomed. Mater. Res.*, **6**, 565.
- Spinke, J., Liley, M., Guder, H.J., Angermaier, L., Knoll, W. (1993). Molecular recognition at self-assembled monolayers: the construction of multicomponent multilayers. *Langmuir*, **9**, 1821-1825
- Steebhorn, C., Skladal, P. (1997). Construction and characterization of the direct piezoelectric immunosensor for atrazine operating in solution. *Biosens. Bioelectron.*, **12**, 19-27.
- Su, H., Chong, S., Thompson, M. (1997). Kinetics of hybridization of interfacial RNA homopolymer studied by thickness-shear mode acoustic wave sensor. *Biosens. Bioelectron.*, **12**, 161-173.
- Ternynck, Th., Avrameas, S. (1987). Techniques en immunologie. Techniques immuno-enzymatiques. Société Française d'Immunologie, ed. INSERM.
- Updike, S. J., Hicks, G. P. (1967). The enzyme electrode. *Nature*, **214**, 986.
- Van Regenmortel, M., Briand, J., Muller, S., Plaué, S. (1988). Synthetic polypeptides as antigens. Ed ; Elsevier.
- Ward, M. D., Buttry, D. A. (1990). In situ interfacial mass detection with piezoelectric transducers. *Science*, **249**, 1000-1007.
- Welsch, W., Klein, C., von Schickfus, M., Hunklinger, S. (1996). Development of surface acoustic wave immunosensor. *Anal. Chem.*, **68**, 2000-2004.
- Williams, R., Blanch, H. (1994). Covalent immobilization of protein monolayers for biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.*, **9**, 159-167.
- Wulff, G. (1996). Molecularly imprinted polymers as the basis of chemosensors. Conférence donnée au 4ème congrès mondial sur les biocapteurs, *Biosensors 96*, tenu du 29 au 31 mai 1996 en Thaïlande.
- Yamamoto, Y., Nishihara, H., Aramaki, K. (1993). Self-assembled layers of alkanethiols on copper for protection against corrosion. *J. Electrochem. Soc.*, **140**, 436-441.
- Yao, S., Zhou, T. (1988). Dependence of the oscillation frequency of a piezoelectric crystal on the physical parameters of liquids. *Anal. Chim. Acta*, **212**, 61-72.

## *Annexes*

## Annexe I : Préparation de la peroxydase et mesure de l'activité peroxydasique au niveau de l'électrode d'un quartz

La peroxydase est une enzyme qui catalyse la réduction d' $H_2O_2$  en  $H_2O$ , elle a été fournie par la société Sigma (P-6782, lot 62H95051). Les 50 mg d'enzyme, sous forme lyophilisée, contenus dans le flacon, ont été repris dans 2 ml de PBS (NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l,  $KH_2PO_4$  0,2 g/l,  $Na_2HPO_4$  1,45 g/l, pH 7,4). Une électrophorèse en conditions dénaturantes a été réalisée (Phast System, Pharmacia) afin de vérifier sa pureté et son poids moléculaire. La concentration protéique de la solution a été déterminée par la technique du Lowry (protein assay kit P5656, Sigma), celle-ci est de 22,47 mg/ml. L'activité spécifique de l'enzyme en UI/mg d'enzyme représente le nombre de micromoles de substrat (ou de chromogène comme ici l'A.B.T.S. : 2,2'-azino-di-(3-éthylbenzthiazoline)acide sulfonique) transformées par minute et par mg de protéine. L'activité spécifique a été calculée en mesurant la densité optique d'un mélange réactionnel, contenant une quantité connue d'enzyme, à partir de l'introduction du substrat et du chromogène (en respectant les conditions Michaéliennes telle que : concentration de substrat supérieure à 10 fois le  $K_m$  de l'enzyme pour son substrat). Dans ces conditions l'activité spécifique, AS, se calcule de la manière suivante :

$$AS = \frac{DO}{\varepsilon \times l} \times v \times \frac{1}{t} \times \frac{1}{Q_{enzyme}}$$

avec :  $DO$  représentant la densité optique lue à 405 nm,  $\varepsilon$  le coefficient d'extinction molaire des produits d'oxydation de l'ABTS soit  $3,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $l$  le trajet optique soit 1 cm,  $v$  le volume du mélange réactionnel soit 1 ml,  $t$  le temps au bout duquel la mesure de  $DO$  est effectuée en minute et  $Q_{enzyme}$  la quantité d'enzyme en mg.

L'activité spécifique de la peroxydase préparée est de 2200 UI/mg.

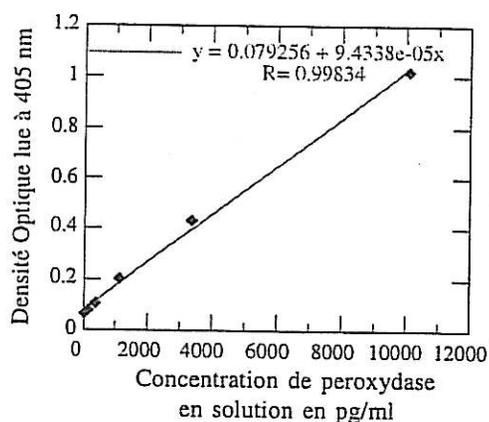
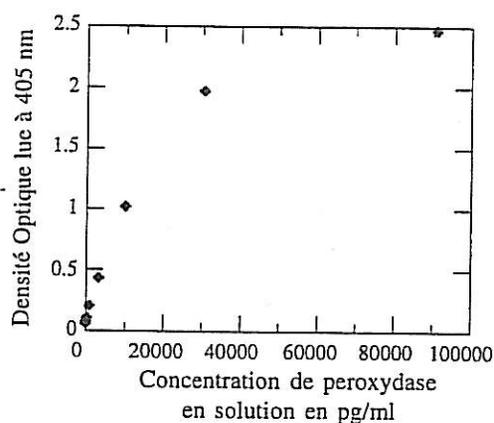
Après chaque expérience de microbalance (suivi de la cinétique d'adsorption), les quartz sont rincés au PBS et sont installés entre deux plaques de Plexiglas, dont la partie supérieure est percée de puits se situant juste au niveau des électrodes. Ceci permet de déposer jusqu'à 300  $\mu\text{l}$  de solution au dessus de l'électrode (l'étanchéité est assurée par un joint torique de même diamètre que celui de l'électrode, disposé à la base du puits). 200  $\mu\text{l}$  de la solution substrat (tampon citrate phosphate pH4,3 contenant 1 mM d'ABTS et en rajoutant extemporanément 0,01% d' $H_2O_2$  à 30%) sont déposés sur les électrodes et sont laissés pendant 10 min. 110  $\mu\text{l}$  de la solution "substrat/produit" sont alors prélevés et déposés dans un puits d'une plaque de microtitration contenant 50  $\mu\text{l}$  d'une solution d'arrêt d'azide de sodium. La densité optique de la solution est alors mesurée, à 405 nm, à l'aide d'un lecteur de

plaque (Metertek,  $\epsilon 960$ ). Cette DO est alors reportée dans la courbe d'étalonnage :  $DO = f$  (concentration de peroxydase) établie à partir d'une gamme de peroxydase en solution réalisée à partir de la même solution que celle utilisée pour le test en microbalance. Ceci nous permet de déterminer la concentration d'enzyme active dans les 200  $\mu\text{l}$  de la solution substrat ajoutée sur l'électrode et donc de déterminer la quantité de peroxydase active adsorbée sur l'électrode. La gamme d'étalonnage se réalise de la façon suivante, la peroxydase est diluée en PBS de façon à obtenir les concentrations indiquées : d1 = 1  $\mu\text{g/ml}$ , d2 = 333  $\text{ng/ml}$ , d3 = 111  $\text{ng/ml}$ , d4 = 37  $\text{ng/ml}$ , d5 = 12  $\text{ng/ml}$ , d6 = 4  $\text{ng/ml}$  et d7 = 1,33  $\text{ng/ml}$ . Dans les puits d'une plaque de microtitration, on dépose 10  $\mu\text{l}$  de chaque dilution et 100  $\mu\text{l}$  de la solution substrat, les concentrations obtenues, qui nous serviront de référence, sont alors de :

10  $\mu\text{l}$  d1 + 100  $\mu\text{l}$  ABTS = 90909  $\text{pg}$  de peroxydase/ml  
 10  $\mu\text{l}$  d2 + 100  $\mu\text{l}$  ABTS = 30303  $\text{pg}$  de peroxydase/ml  
 10  $\mu\text{l}$  d3 + 100  $\mu\text{l}$  ABTS = 10101  $\text{pg}$  de peroxydase/ml  
 10  $\mu\text{l}$  d4 + 100  $\mu\text{l}$  ABTS = 3367  $\text{pg}$  de peroxydase/ml  
 10  $\mu\text{l}$  d5 + 100  $\mu\text{l}$  ABTS = 1122  $\text{pg}$  de peroxydase/ml  
 10  $\mu\text{l}$  d6 + 100  $\mu\text{l}$  ABTS = 374  $\text{pg}$  de peroxydase/ml  
 10  $\mu\text{l}$  d7 + 100  $\mu\text{l}$  ABTS = 122  $\text{pg}$  de peroxydase/ml  
 10  $\mu\text{l}$  PBS + 100  $\mu\text{l}$  ABTS = 0  $\text{pg}$  de peroxydase/ml (blanc)

La DO est lue au bout de 10 minutes d'incubation après l'ajout de 50  $\mu\text{l}$  de solution d'arrêt d'azide de sodium. La DO mesurée sur la solution prélevée au niveau du quartz, après le même temps d'incubation, nous permet de déterminer la concentration en enzyme dans les 110  $\mu\text{l}$  de la solution prélevée. Ce résultat est alors multiplié par le volume de solution substrat ajouté sur le quartz (0,2 ml) afin d'estimer la masse d'enzymes actives présentes sur l'électrode.

Un exemple de résultat obtenu pour la gamme est donnée dans les deux figures suivantes.

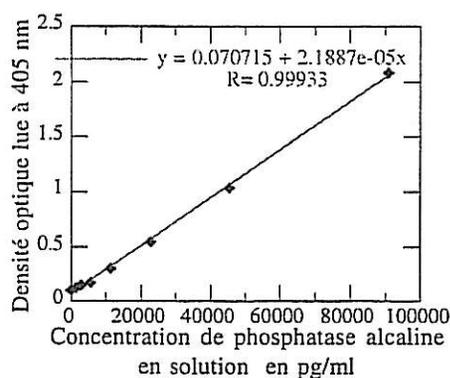


## Annexe II : Préparation de la phosphatase alcaline et mesure de son activité enzymatique au niveau de l'électrode d'un quartz

La phosphatase alcaline est une enzyme dimérique qui catalyse l'hydrolyse du p-nitrophényl phosphate (pNPP) en p-nitrophénol, elle a été fournie par la société Sigma (P-5778, lot 24H7090). L'enzyme contenue dans le flacon sous forme lyophilisée (1 mg) a été reprise dans 1 ml d'eau désionisée. Une électrophorèse en conditions dénaturantes a été réalisée (Phast System, Pharmacia) afin de vérifier sa pureté et le poids moléculaire de ses sous-unités. La concentration protéique de la solution a été déterminée par la technique du Lowry (protein assay kit P5656, Sigma), celle-ci est de 0,724 mg/ml.

Après chaque expérience de microbalance (suivi de la cinétique d'adsorption), les quartz sont rincés au PBS et sont installés entre deux plaques à puits. 200  $\mu$ l de la solution substrat (tampon TRIS 0,2 M contenant 1 mg/ml de pNPP, Sigma fast pNPP, N-2770) sont déposés sur les électrodes et sont laissés pendant 20 min. 110  $\mu$ l de la solution "substrat/produit" sont alors prélevés et déposés dans un puits d'une plaque de microtitration contenant 50  $\mu$ l de solution d'arrêt (NaOH 3N). La densité optique de la solution est alors mesurée, à 405 nm, à l'aide du lecteur de plaque. Cette DO est alors reportée dans la courbe d'étalonnage :  $DO = f(\text{concentration de phosphatase alcaline})$  établie à partir d'une gamme de phosphatase alcaline en solution réalisée à partir de la même solution que celle utilisée pour le test en microbalance. Ceci nous permet de déterminer la concentration d'enzyme active dans les 200  $\mu$ l de la solution substrat ajoutée sur l'électrode et donc de déterminer la quantité de phosphatase alcaline active adsorbée sur l'électrode. La gamme d'étalonnage de phosphatase alcaline est réalisée selon le même principe que pour la peroxydase. Ici, la solution d'enzyme est diluée de 2 en 2 à partir de 1  $\mu$ g/ml jusqu'à 15,62 ng/ml et 10  $\mu$ l de chaque dilution sont déposés dans les puits d'une plaque de microtitration et 100  $\mu$ l de la solution substrat sont ajoutés. Les concentrations obtenues vont alors de 90909 pg/ml à 1420 pg/ml (plus un blanc). La DO est lue au bout de 20 min d'incubation après l'ajout de 50  $\mu$ l de NaOH. La DO mesurée sur la solution prélevée au niveau du quartz nous permet de calculer la concentration d'enzyme dans cette solution et donc de déterminer la masse d'enzymes actives présentes sur l'électrode.

Un exemple de résultat obtenu pour la gamme d'étalonnage est donné ci-contre.

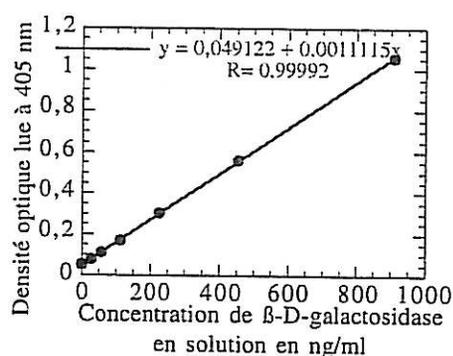


### Annexe III : Préparation de la $\beta$ -D-galactosidase et mesure de son activité enzymatique au niveau de l'électrode d'un quartz

La  $\beta$ -D-galactosidase est une enzyme tétramérique qui catalyse l'hydrolyse de l'o-nitrophenyl  $\beta$  D galactopyranoside (oNPGal) en o-nitrophénol, elle a été fournie par la société Sigma (G-5635, lot 55H6851). Les 2 mg enzyme ont été repris dans 1 ml de tampon phosphate 0,1 M à pH 7,3. Une électrophorèse en conditions dénaturantes a été réalisée (Phast System, Pharmacia) afin de vérifier sa pureté et le poids moléculaire de ses sous-unités. La concentration protéique de la solution a été déterminée par la technique du Lowry (protein assay kit P5656, Sigma), celle-ci est de 1,883 mg/ml.

Après chaque expérience de microbalance (suivi de la cinétique d'adsorption), les quartz sont rincés au PBS et sont installés entre deux plaques à puits. 200  $\mu$ l de la solution substrat (tampon phosphate 0,1 M pH 7,3 avec 1 mM de  $MgCl_2$ , 112 mM de  $\beta$ mercaptoéthanol et 2,3 mM d'ONPGalactopyranoside) sont déposés sur les électrodes et sont laissés pendant 15 min. 110  $\mu$ l de la solution "substrat/produit" sont alors prélevés et déposés dans un puits d'une plaque de microtitration. La densité optique de la solution est alors mesurée, à 405 nm, à l'aide du lecteur de plaque. Cette DO est alors reportée dans la courbe d'étalonnage :  $DO = f(\text{concentration de } \beta\text{-D-galactosidase})$  établie à partir d'une gamme de  $\beta$ -D-galactosidase en solution réalisée à partir de la même solution que celle utilisée pour le test en microbalance. Ceci nous permet de déterminer la concentration d'enzyme active dans les 200  $\mu$ l de la solution substrat ajoutée sur l'électrode et donc de déterminer la quantité de phosphatase alcaline active adsorbée sur l'électrode. La gamme d'étalonnage de  $\beta$ -D-galactosidase est réalisée selon le même principe que pour la peroxydase. Ici, la solution d'enzyme est diluée de 2 en 2 à partir de 20  $\mu$ g/ml jusqu'à 312 ng/ml et 10  $\mu$ l de chaque dilution sont déposés dans les puits d'une plaque de microtitration et 100  $\mu$ l de la solution substrat sont ajoutés. Les concentrations obtenues vont alors de 1818 ng/ml à 28,4 ng/ml (plus un blanc). La DO de la gamme est lue au bout de 15 min d'incubation. La DO mesurée sur la solution prélevée au niveau du quartz nous permet de calculer la concentration d'enzyme dans cette solution et donc de déterminer la masse d'enzymes actives présentes sur l'électrode.

Un exemple de résultat obtenu pour la gamme d'étalonnage est donné ci-contre.



## **Annexe IV : Préparation des anticorps monoclonaux de souris anti-peroxydase**

Les anticorps monoclonaux (IgG<sub>1</sub>) contenus dans les ascites (P-2419, lot n° 041H4845) ont été purifiés sur colonne de protéine A (Prot A superose FPLC, Pharmacia). Les fractions éluées ont été dialysées une nuit contre du PBS puis concentrées après vérification de leur pureté par électrophorèse en gel de polyacrylamide et en conditions dénaturantes (PAGE SDS, Phast System, Pharmacia). L'immunoréactivité de chaque fraction a été contrôlée par ELISA avant de les pooler. La concentration protéique de la solution a été déterminée par la technique du Lowry (protein assay kit P5656, Sigma), celle-ci était de 1,86 mg/ml. Le point isoélectrique des anticorps purifiés a été déterminé par isoélectrophorèse (IEF, Phast System, Pharmacia), il est compris entre 5,88 et 6,55. Nous avons vérifié l'isotypie des anticorps à l'aide d'un BIAcore, les immunoglobulines sont des IgG<sub>1</sub>. L'immunoréactivité des anticorps a été contrôlée par ELISA et l'affinité des anticorps pour la peroxydase a été déterminée à l'aide d'un BIAcore, celle-ci est de  $4,9 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ . La solution d'immunoglobulines a ensuite été aliquotée et les aliquots ont été conservés au congélateur à - 20°C.