



UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES,
UNIVERSITÉ D'EUROPE



Faculté de Pharmacie

Ecole Doctorale en Sciences Pharmaceutiques

Développement d'immunoessais associés aux électrodes sérigraphiées : des particules superparamagnétiques aux nanobodies

Stéphanie PATRIS

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences
Biomédicales et Pharmaceutiques

Promoteur :

Prof. Jean-Michel KAUFFMANN
Laboratoire de Chimie Analytique Instrumentale et de Bioélectrochimie

Composition du jury :

Prof. Véronique FONTAINE (Présidente)
Prof. Stéphanie POCHET (Secrétaire)
Prof. Ghanem GHANEM
Prof. Jean-Louis MARTY (Laboratoire IMAGES, Université de Perpignan)
Dr Pieter DE PAUW (Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, VUB)

Année académique 2014-2015

« Dans les sciences, le chemin est plus important que le but. Les sciences n'ont pas de fin. »

Prof. Erwin Chargaff (1905-2002)

Au terme du long chemin sinueux qu'a été cette thèse, je tiens à adresser mes remerciements à Monsieur le Professeur Jean-Michel Kauffmann, Chef du service de Chimie Analytique Instrumentale et Bioélectrochimie pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Merci de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer votre équipe d'assistants, à mi-temps pour commencer, à la Faculté de Pharmacie et puis enfin, pour un second mi-temps, à la Faculté des Sciences de la Motricité. Je vous remercie très sincèrement pour la confiance que vous m'avez accordée tant dans mon travail de recherches que dans mon travail d'enseignement. Bien entendu je vous remercie très vivement d'avoir été mon promoteur de thèse, de m'avoir encadrée, pour l'attention que vous avez portée à mon travail et vos conseils avisés.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidée pour mon travail de recherche. En particulier, Madame Françoise Prohoroff de l'APB qui m'a guidée à mes débuts et m'a patiemment expliqué son travail sur les anticorps anti-tetani. Mes remerciements vont aussi à Monsieur le Docteur Pieter De Pauw du Laboratory of Cellular and Molecular Immunology de la VUB sans qui ma thèse n'aurait pas été ce qu'elle est. Pieter m'a fait découvrir les nanobodies, me les a produits, purifiés, modifiés, améliorés... et m'a guidée pour la seconde partie de ma thèse. Un tout grand merci. Je remercie également Monsieur le Professeur Serge Muyltermans pour son aide au sujet des nanobodies. J'adresse mes remerciements aux différents membres de mon comité d'accompagnement, Madame le Professeur Véronique Fontaine ainsi que Messieurs les Professeurs Pierre Duez et Yvan Looze. Merci d'avoir pris le temps de m'écouter tout au long de ce parcours et de m'avoir si bien conseillée et orientée. Je remercie également Madame le Professeur Véronique Fontaine de m'avoir accueillie dans son équipe durant une année comme assistante mi-temps. Je suis heureuse que vous m'ayez fait redécouvrir la microbiologie. Merci aussi à Monsieur le Professeur Pierre Van Antwerpen ainsi qu'à son équipe de la plateforme instrumentale et particulièrement Damien Dufour. Merci pour vos analyses au spectromètre de masse. Merci à Madame le Docteur Bieke Dejaegher pour le plan d'analyse. Merci à Aude Engels pour son aide pour les cultures cellulaires et à Wimana Zéna pour ses conseils et le Trastuzumab.

Merci à Mesdames et Messieurs les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Je remercie tous mes professeurs et assistants qui ont contribué à ma formation de pharmacien.

Mon travail de recherche a été mené en même temps que des activités d'enseignement. Je tiens à remercier tous les assistants/docteurs qui ont partagé cette tâche avec moi au cours de

ces années : Bertrand, Carine, Jonathan, Caroline, Marie, Bieke ainsi que Benjamin et Delphine, Abdelkarim, Jean-Yves, Laurent et Saïd. Merci pour ces bons moments.

La vie au labo sans vous n'aurait pas été la même. Merci à toute l'équipe du Service de Chimie Analytique Instrumentale et Bioélectrochimie. Nos techniciens de choc : Didier, Dominique, Jérôme et notre informaticien David. Nos chercheurs en or : Ahmad, Karim et Marie ainsi que tous ceux qui sont passés et déjà partis : Bertrand, Carine, Donghui, Trésor et Véronica. Nos académiques précieux : Monsieur le Docteur Jean-Claude Viré et Madame le Docteur Bieke Dejaegher. Merci à vous tous pour vos conseils, votre soutien, votre aide mais aussi votre amitié et vos farces.

Toutes mes pensées s'envolent vers l'Iran, où ma collègue et amie, Cobra est retenue auprès de son mari injustement privé de liberté pour avoir entrepris une thèse en Belgique. Cobra, reviens vite et merci pour le bon temps que nous avons passé ensemble dans la vie d'avant.

Merci aux nombreux stagiaires et mémorants qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Je pense en particulier à Encarnación, Gersonie, Ridwani, Sara, Francesca, Florina et Ayano.

Un merci particulier à Coraline et Joëlle pour tout ce que nous avons partagé au cours de ces années, ainsi qu'à Nathalie ma compagne de commissions en tout genre et à Naïma pour cette chouette année en microbiologie.

Je tiens à remercier la Société Belge des Sciences Pharmaceutiques ainsi que le FNRS pour leurs soutiens financiers qui m'ont permis de présenter mes travaux de recherche lors de différents congrès internationaux.

Plus personnellement, je tiens à remercier mes amis de toujours et mes amis de l'unif. Merci pour votre soutien mais surtout de m'avoir permis de voir, parler écouter autre chose.

Merci également à ma famille, mes parents et mes frères sans qui je ne serais pas ce que je suis maintenant. Et plus particulièrement à mon papa qui a patiemment relu mon manuscrit et ma maman pour ses explications mathématiques.

Enfin, merci à ma petite famille à moi, mon mari Philippe et mes enfants Clémentine et Guillaume. Merci d'être là, merci pour tout.

Stéphanie Patris

Résumé

Cette thèse a pour vocation de contribuer au développement de différents immunocapteurs ampérométriques associés aux électrodes sérigraphiées (SPE). Les immunocapteurs sont des dispositifs simples associant un anticorps ou un antigène qui assurent la sélectivité à un transducteur (ici une SPE) ; ce dernier transforme la liaison anticorps/antigène en un signal mesurable (ici ampérométrique).

Le travail est divisé en deux volets principaux.

Le premier est consacré à la mise en œuvre de différents modèles d'immunocapteurs ampérométriques pour le dosage d'anticorps anti-*tetani*. La vaccination contre le tétanos est généralisée, toutefois pour maintenir un taux d'anticorps suffisant, il est indispensable d'administrer un rappel tous les 10 ans. Ce schéma vaccinal n'est pas toujours respecté, ce qui a pour conséquence qu'une partie de la population n'est plus protégée. Afin de déterminer le statut immunitaire du patient, il est indispensable de pouvoir déterminer le taux d'anticorps. Les immunocapteurs ampérométriques répondent à cet objectif. Plusieurs stratégies d'immobilisation de l'anatoxine tétanique (antigène) sur une SPE ont été mises en œuvre et comparées. L'une d'elles repose sur l'utilisation de microparticules superparamagnétiques pour la réaction immunologique et d'une SPE rendue magnétique par un support aimanté pour la mesure. D'autres reposent sur l'immobilisation de l'antigène et les réactions immunologiques directement à la surface de la SPE. L'utilisation de plans d'expérience, pour l'optimisation des immunoessais sur SPE est également exploitée dans ce travail. Les immunocapteurs développés ont permis de doser les anticorps anti-*tetani* dans le sérum de cobaye en dessous des valeurs considérées comme protectrices.

Dans le second volet, un immunocapteur basé sur l'utilisation de nanobodies[®] (NB) a été mis au point. Nous avons qualifié ce type d'immunocapteur original de nanoimmunocapteur. Le récepteur de facteur de croissance épidermique humain (HER2) a été utilisé comme cible. La protéine HER2 est considérée comme un biomarqueur important car sa surexpression provoque un type agressif de cancer du sein. Les NB sont des fragments à domaine unique dérivés d'anticorps à chaînes lourdes de camélidés. La stratégie de dosage immunologique en sandwich développée a tiré profit de la petite taille des NB pour la détection du marqueur électroactif d'oxydoréduction. La stabilité élevée des NB immobilisés a permis une durée de stockage des SPE modifiées supérieure à 3 semaines. De très courtes durées d'incubation étaient suffisantes pour obtenir une réponse satisfaisante. Le nanoimmunoessai a permis de déterminer le taux d'HER2 dopé dans des lysats cellulaires.

Table des matières

Liste des abréviations.....	1
Introduction générale.....	6
Introduction.....	8
1. Les immunoessais.....	8
1.1 Les différents anticorps.....	9
1.1.1 Les immunoglobulines G (IgG).....	9
1.1.2 Les immunoglobulines M (IgM).....	10
1.1.3 Les immunoglobulines A (IgA).....	10
1.1.4 Les anticorps « chaînes lourdes ».....	11
1.1.5 Les nanobodies.....	11
1.2 Production d'anticorps.....	12
1.2.1 Anticorps polyclonaux.....	12
1.2.2 Anticorps monoclonaux.....	13
1.2.3 Anticorps recombinants.....	14
1.2.4 Immunisation <i>in vitro</i>	14
1.3 Liaison antigène-anticorps.....	15
1.4 Différents immunoessais.....	15
1.4.1 Sans marquage.....	16
1.4.2 Avec marquage.....	16
2. Approche bioélectrochimique.....	18
2.1 La voltampérométrie.....	18
2.2 La voltampérométrie cyclique (VC).....	22
2.3 La voltampérométrie hydrodynamique.....	25
2.4 Ampérométrie.....	26
2.5 Amplification enzymatique.....	26
2.5.1 Détection électrochimique de l'enzyme.....	28
2.5.2 Cas particulier de la peroxydase de raifort.....	29
3. Les biocapteurs.....	32
3.1 Eléments de reconnaissance biologique.....	33
3.2 Transducteur.....	34
4. Les supports utilisés.....	35
4.1 Les électrodes sérigraphiées.....	35
4.1.1 La sérigraphie.....	35

4.1.2	Les encres	36
4.1.3	Modification de la surface de carbone des électrodes sérigraphiées.....	37
4.1.4	Méthodes d'immobilisation	40
4.2	Les particules superparamagnétiques.....	44
4.2.1	Magnétisme.....	44
4.2.2	Matériel	44
	But du travail	45
	Première partie : les anticorps anti-toxines tétaniques.....	47
1.	Contexte et revue de la littérature.....	47
1.1	Le tétanos	47
1.1.1	La maladie.....	47
1.1.2	La toxine tétanique.....	48
1.1.3	La vaccination	49
1.2	Dosage des anticorps anti- <i>tetani</i> et immunocapteurs SPE	50
2.	Travaux préliminaires	53
2.1	Choix du substrat de HRP	53
2.1.1	Voltampérométrie cyclique.....	53
2.1.2	Voltampérométrie cyclique en présence de HRP et H ₂ O ₂	54
2.2	Détection ampérométrique	54
2.2.1	Choix du potentiel appliqué	55
2.2.2	Influence du pH	55
2.2.3	Concentration de peroxyde d'hydrogène	56
3.	Immunocapteur ampérométrique à billes superparamagnétiques*	57
3.1	Réactifs et matériel	58
3.1.1	Réactifs	58
3.1.2	Instrumentation	59
3.2	Méthode.....	60
3.2.1	Biotinylation de l'anatoxine tétanique.....	60
3.2.2	Immobilisation de l'anatoxine tétanique	60
3.2.3	Procédure de blocage.....	61
3.2.4	Immunoessais.....	61
3.2.5	Détection électrochimique.....	62
3.2.6	Voltampérométrie cyclique en présence d'immunoparticules immobilisées sur SPE.....	63
3.3	Résultats et discussions.....	63

3.3.1	Immobilisation de l'anatoxine tétanique	63
3.3.2	Comparaison entre les différentes phases de blocage et les étapes de lavage.....	64
3.3.3	Influence du temps d'incubation	64
3.3.4	Quantité de microparticules magnétiques à déposer sur l'électrode	65
3.3.5	Electrodes sérigraphiées	65
3.3.6	Applications aux échantillons de sérum.....	67
3.4	Conclusion	68
4.	Immunocapteur ampérométrique SPE	69
4.1	Immobilisations de l'anatoxine : essais- erreurs.....	69
4.1.1	Immobilisation d'affinité via la liaison streptavidine-biotine.....	69
4.1.2	Différentes stratégies d'immobilisation sans modification de l'anatoxine.....	72
4.2	Interférence de l'éthanolamine*	78
4.3	Immobilisation de l'anatoxine par la méthode carbodiimide sans éthanolamine et optimisation de l'immunoessai*	80
4.3.1	Introduction.....	80
4.3.2	Immobilisation.....	81
4.3.3	Sélection des facteurs (paramètres physico-chimiques)	82
4.3.4	Choix du plan d'expérience	83
4.3.5	Choix des niveaux des facteurs	86
4.3.6	Construction du plan	87
4.4	Résultats et discussions.....	88
4.4.1	Evaluation du modèle.....	89
4.4.2	Recherche de l'optimum	89
4.4.3	Confirmation de la réponse trouvée aux conditions optimales.....	94
4.4.4	Courbe de calibration	97
4.5	Conclusion	97
	Seconde partie : le biomarqueur HER2	98
1.	Contexte et revue de la littérature.....	98
1.1	La protéine HER2	98
1.2	Les cancers du sein	99
1.3	Les traitements.....	99
1.4	Méthodes de dosage de HER2	100
2.	Les nanobodies en tant que outil bioanalytique.....	102
3.	Nanoimmunoessai sur SPE*	103

3.1	Réactifs et matériel	103
3.1.1	Réactifs	103
3.1.2	Instrumentation	103
3.2	Méthode.....	104
3.2.1	Production et caractérisation des nanobodies	104
3.2.2	Marquage des nanobodies par HRP	104
3.2.3	Immobilisation des nanobodies de capture sur la SPE.....	108
3.2.4	Nanoimmunoessai.....	109
3.2.5	Application aux échantillons de cellules cancéreuses.....	109
3.3	Résultats et discussions.....	110
3.3.1	Sélection des nanobodies.....	110
3.3.2	Marquage des nanobodies par HRP	110
3.3.3	Immobilisation des nanobodies de capture sur la SPE.....	110
3.3.4	Phase de blocage	112
3.3.5	Temps d'incubation	112
3.3.6	Performances du nanoimmunoessai.....	113
3.3.7	Stabilité des SPE modifiées.....	113
3.3.8	Application aux échantillons de cellules dopées en HER2	113
3.4	Conclusion	114
	Conclusion générale	115
	Perspectives	117
	Références	
	Annexes	

Liste des abréviations

ABTS	2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) de diammonium
ACN	acétonitrile
ANOVA	test d'analyse de la variance / analysis of variance
APB	association pharmaceutique belge
BoNT	neurotoxines botuliques
BSA	albumine sérique bovine / bovine serum albumin
CCD	plan composite centré / central composite design
CDR	régions déterminant la complémentarité avec l'antigène / complementarity determining regions
C _H	domaine constant des chaînes lourdes
C _L	domaine constant des chaînes légères
CNT	nanotube de carbone / carbon nanotube
CPE	électrode de travail en pâte de carbone / carbon paste electrode
cSPE	électrodes sérigraphiées avec l'électrode de travail en carbone / carbon screen printed electrode
D	coefficient de diffusion
Da	Dalton
DCPI	2,6-dichlorophénol indophénol
Ddl	nombre de degrés de liberté
DMSO	diméthylsulfoxyde

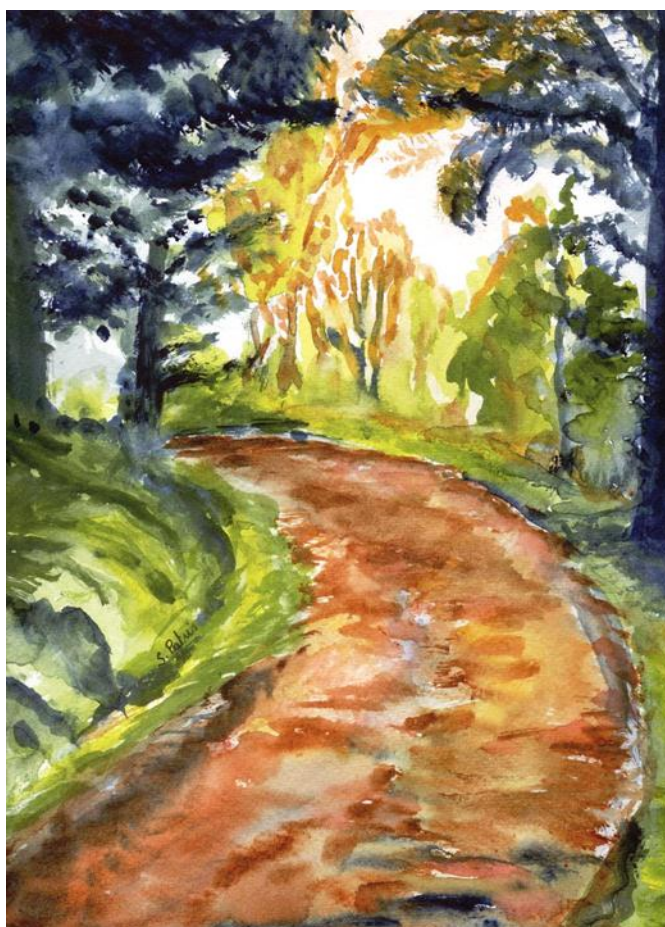
e ⁻	électron
E _{1/2}	potentiel de demi-vague
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EIA	immunoessai avec un marqueur enzymatique / enzyme immunoassay
EIS	spectroscopie d'impédance / electrochemical impedance spectroscopy
ELISA	essai d'immunoabsorption à enzyme conjuguée /enzyme-linked immunosorbent assay
E _{p/2}	potentiel auquel le courant vaut la moitié du potentiel de pic
E _{pa}	potentiel de pic anodique
E _{pc}	potentiel de pic cathodique
ESI	ionisation par électronébulisation (électrospray) / electrospray ionization
FBS	sérum de veau fœtal / fetal bovine serum
Fr	région charpente / framework
H	chaîne lourde / heavy chain
HER2	récepteurs pour les facteurs de croissance épidermique humains 2 / human epidermal growth factor receptor 2
HQ	hydroquinone
HRP	peroxydase de raifort
HRP-anti IgG	anticorps anti-IgG marqué par la peroxydase de raifort
I	intensité de courant
IgA	immunoglobuline A
IgG	immunoglobuline G
IgM	immunoglobuline M

IgNAR	immunoglobuline de chondrichthyens
IMAC	chromatographie d'affinité métallique / metal affinity chromatography
I _{pa}	intensité de courant de pic anodique
I _{pc}	intensité de courant de pic cathodique
L	chaîne légère / light chain
LC-QTOF	chromatographie liquide couplée à un détecteur spectromètre de masse à temps de vol / liquid chromatography quadrupole time of flight
LOD	limite de détection / limit of detection
LOQ	limite de quantification / limit of quantification
MC	moyenne des carrés (somme des carrés des écarts à la moyenne divisée par le nombre de mesures moins 1)
mCPE	électrode de travail magnétique à pâte de carbone / magnetic carbon paste electrode
MES	acide 2-(4-morpholino) éthanesulfonique
MPA	acide mercaptopropionique / mercaptopropionic acid
MPM	microparticules superparamagnétiques
MS/MS	spectroscopie de masse en tandem
MWCNT	nanotube de carbone à parois multiples / multi walled carbon nanotube
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NB	nanobody
NB-HRP	nanobody marqué par la peroxydase de raifort
NHS	N-hydroxysuccinimide

OMS	organisation mondiale de la santé
PBS	tampon phosphate salin
Q	quinone
QCM	microbalance à quartz
R	résistance
RIA	immunoessai avec un marqueur radio-actif / radio immunoassay
RPMI	milieu cellulaire Roswell Park Memorial Institute
RSD	coefficient de variation / relative standard deviation
R-SNARE	récepteur SNAP
SCE	somme des carrés des écarts à la moyenne
SD	écart-type / standard deviation
SNAP	soluble NSF attachment protein
SPE	tigette d'électrodes sérigraphiées / screen printed electrodes
SPR	résonance plasmonique de surface
SWCNT	nanotube de carbone à paroi unique / single-walled carbon nanotube
SWV	voltampérométrie à ondes carrées / square wave voltammetry
TeTx	toxine tétanique
TFA	acide trifluoroacétique / trifluoroacetic acid
ToBI	test d'inhibition de toxine / toxin binding inhibition
TSH	hormone thyroïdostimuline
UI	unité internationale
UV	ultra-violet

v	vitesse de balayage
VAMP	vesicle associated membrane protein
VC	voltampérométrie cyclique
V _H	domaine variable des chaînes lourdes
V _H H	domaine variable de l'anticorps chaîne lourde de camélidé, anticorps à domaine unique
V _L	domaine variable des chaînes légères
VNAR	domaine variable de l'anticorps chaîne lourde de chondrichthyens, anticorps à domaine unique

Introduction générale



Introduction générale

Dans un souci de gain de temps, de place, de cout et de mesure sur le terrain, le développement de techniques analytiques rapides et miniaturisées est en plein essor. C'est dans cette optique, que depuis quelques années, de nombreux biocapteurs ont été mis au point.

Les biocapteurs sont des dispositifs simples qui associent un élément de reconnaissance biologique assurant la sélectivité à un transducteur transformant un signal biologique en un signal mesurable¹. Les biocapteurs électrochimiques sont particulièrement adaptés à la miniaturisation grâce aux électrodes dites sérigraphiées et à la mise sur le marché de potentiostats ayant la taille d'un i-phone. La bioélectrochimie, c'est-à-dire l'électrochimie associée au domaine du vivant et en particulier le couplage ampérométrie/enzyme, permet d'obtenir des signaux particulièrement élevés grâce au principe d'amplification enzymatique au proche contact du transducteur physique et d'avoir ainsi un dispositif alliant sensibilité et sélectivité.

Les biocapteurs sont parfaitement adaptés pour le suivi des procédés en industrie, à l'hôpital et au sein des laboratoires d'analyses médicales. Ils sont principalement dédiés à la mesure de la glycémie mais aussi pour d'autres tests cliniques (lactate, de la créatinine, urée, troponine... mesurés par l'i-STAT[®] de Abbott). Ils conviennent également pour le diagnostic à domicile. Cette voie est un marché en plein essor pour les biocapteurs par exemple pour le suivi de traitements (mesure de la glycémie)² mais pourrait aussi l'être dans le domaine de la procréation médicalement assistée (test d'ovulation, de grossesse)³. Actuellement, des recherches sont menées pour mettre au point différents biocapteurs implantables principalement dédiés au dosage du glucose⁴. Parallèlement au domaine médical, des biocapteurs sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire entre autres pour la détection d'OGM⁵ ou de pesticides^{6,7} ainsi que dans les sciences forensiques⁸, principalement pour l'identification d'ADN^{9,10}, la détection de drogues^{11,12} ou la recherche de composés toxiques¹³.

Les immunocapteurs sont des biocapteurs d'affinité mettant en œuvre une réaction anticorps/antigène. L'élément de reconnaissance biologique peut être l'anticorps tandis que l'antigène est le composé à doser ou inversement, le transducteur servant de support solide à

l'immunoessai¹⁴. L'exploitation d'une reconnaissance immunologique de l'analyte confère, en principe, une grande sélectivité aux biocapteurs d'affinité.

Le travail présenté dans ce manuscrit est une contribution au développement d'immunocapteurs électrochimiques. Différentes stratégies ont été envisagées et y sont présentées. Les électrodes classiques ont été délaissées au profit d'électrodes sérigraphiées en vue d'une miniaturisation et de l'élimination de tout effet mémoire. Tant l'utilisation de particules superparamagnétiques comme support pour l'immunoessai, que la surface de l'électrode elle-même ont été envisagées. Chacune de ces stratégies présente des avantages et des inconvénients. L'exploitation de nanobodies, la plus petite fraction d'anticorps permettant une reconnaissance antigénique, est abordée et constitue une bonne alternative aux anticorps classiques grâce à leur grande stabilité et leur taille réduite.

Deux thématiques de santé publique ont été investiguées : (1) le développement et la mise en œuvre d'immunocapteurs pour la détermination des anticorps anti-toxines tétaniques et (2) le développement et la mise en œuvre d'un immunocapteur pour le dosage de la protéine HER2, un biomarqueur de différents cancers dont le cancer du sein.

Une grande partie de ce travail a pour but de développer des immunocapteurs pour le dosage de l'anticorps antitétanique. Le tétanos, causé par une toxine, est une maladie mortelle. Un moyen efficace de protéger la population est la vaccination. Le dosage sérique des anticorps anti-toxines tétaniques permet de s'assurer que le patient est bien vacciné. Un dosage rapide et facilement utilisable sur le terrain y compris dans les pays en développement, semble important.

Le second volet du travail a pour but de montrer l'intérêt de l'utilisation de nanobodies dans le développement d'immunocapteurs électrochimiques. Le dosage de la protéine HER2 a été pris comme modèle en raison de la disponibilité des nanobodies anti-HER2 et de l'intérêt du suivi de ce biomarqueur.

Introduction



Introduction

1. Les immunoessais

Les procédures de mesure qui utilisent des anticorps comme agents de liaison spécifique sont appelées immunoessais. Elles peuvent être dédiées tant à la mesure de l'antigène que de l'anticorps. Les anticorps sont des protéines complexes d'origine naturelle utilisées par le système immunitaire pour neutraliser des agents pathogènes de manière spécifique. Les anticorps sont produits en masse par les plasmocytes qui sont des lymphocytes B au stade ultime de différenciation¹⁵.

Bien qu'il existe de nombreuses protéines dans la nature qui permettent des liaisons d'affinité spécifiques (les récepteurs membranaires par exemple), les propriétés spéciales des anticorps en font le choix le plus populaire pour les essais de liaison aux protéines. Les avantages des anticorps sont nombreux. Ils sont stables et solubles et des procédures pour leur préparation, leur sélection, isolation et immobilisation sont bien décrites. Ils sont disponibles sous forme soit de mélange d'anticorps reconnaissant différentes parties (épitopes) d'un même antigène (polyclonal) soit pur, reconnaissant un seul épitope (monoclonal). Ils sont bivalents dans le cas par exemple des immunoglobulines G (IgG) ou polyvalents comme dans le cas des immunoglobulines M mais des fragments monovalents sont facilement préparés. En raison de l'extraordinaire affinité, spécificité et variété des réactions de liaison antigène-anticorps, les immunoessais sont couramment utilisés en analyses de routine et de recherche en sciences biologiques et médicales¹⁶.

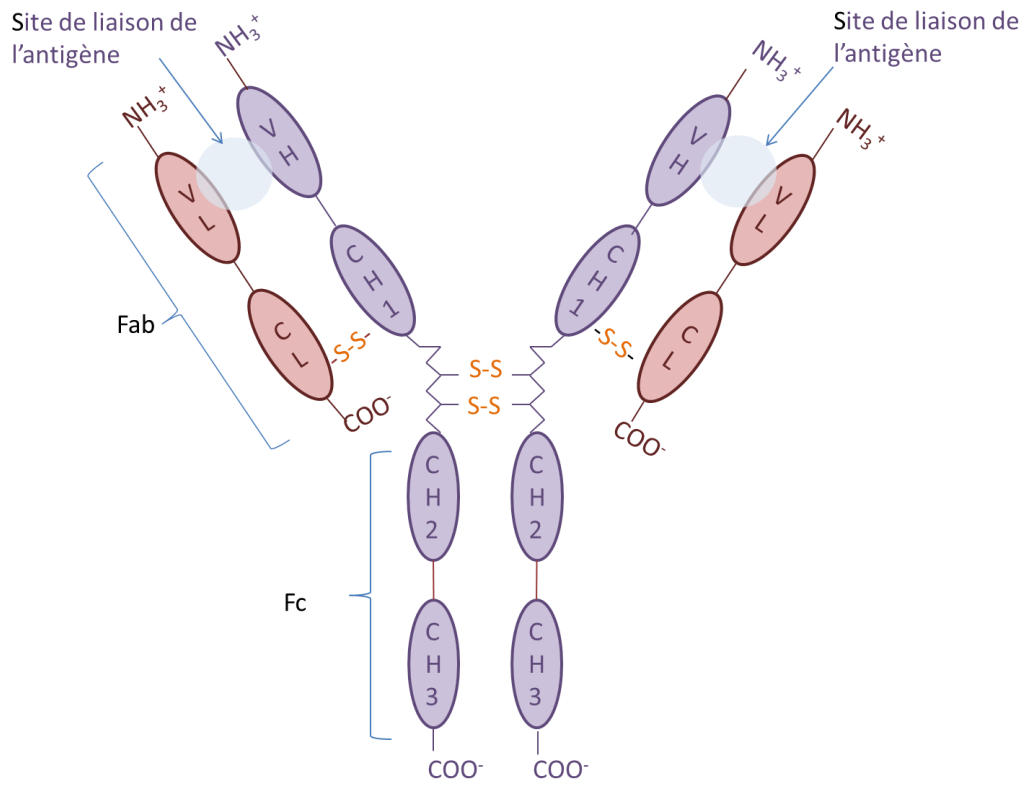


Figure 1 : Immunoglobuline G, E ou D. C: domaine constant ; V: domaine variable ; H: chaine lourde ; L: chaine légère ;

S-S: pont disulfure, Fab: fragment antigen-binding ; Fc: fragment cristallisable

1.1 Les différents anticorps

1.1.1 Les immunoglobulines G (IgG)

Les IgG (Figure 1) constituent la principale classe des anticorps en circulation dans le sang (12 mg par mL de sérum). C'est la classe des anticorps utilisés majoritairement dans les immunoessais. Elles sont synthétisées par les cellules plasmocytaires comme réponse immunitaire humorale à un contact du système immunitaire avec des antigènes. Les IgG sont des glycoprotéines de 150 000 Da contenant deux chaînes lourdes identiques de polypeptides (α ou H environ 420 résidus) et deux chaînes légères identiques (β ou L environ 215 résidus)¹⁵. Les 108 premiers acides aminés des chaînes L (V_L) et des chaînes H (V_H) sont variables alors que le reste des chaînes polypeptidiques est constant (C_L et C_H). La région constante lourde est formée de trois parties pratiquement équivalentes (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}). Chaque chaîne légère contient un ou plusieurs ponts disulfures dans la partie constante et un seul dans la partie variable. L'acide aminé C terminal de ces chaînes est une cystéine (Cys) qui forme un pont disulfure avec un résidu Cys de la chaîne H voisine. Les deux chaînes lourdes possèdent un pont disulfure intrachaine dans chacune des quatre parties. Certains acides aminés des régions variables sont hypervariables. Ce sont les résidus 31 à 35, 50 à 65, 81 à 85 et 91 à 102 de la chaîne lourde et les résidus de 24 à 34, 50 à 55 et 89 à 96 des chaînes légères¹⁷. En structure tridimensionnelle et dans toutes les immunoglobulines, les régions hypervariables tant au niveau de V_H que V_L se présentent sous forme de boucle qui constitue la région déterminant la complémentarité avec l'antigène (complementarity determining regions : CDR). Au niveau des domaines variables, les régions placées entre les CDR qui assurent le squelette de l'immunoglobuline se nomment charpente (framework : Fr). La partie où les bras de l'anticorps forment un Y s'appelle la région charnière, à ce niveau la protéine présente un certain degré de flexibilité¹⁸.

Sous l'action de la papaïne, la protéine est clivée au niveau de la région charnière. Le fragment constitué des bras de l'anticorps comportant les domaines variables des deux chaînes ainsi que les domaines C_{H1} et C_L se nomme **Fab** (deux par anticorps). Par contre, le fragment comportant le reste des chaînes lourdes, c'est à dire les domaines C_{H2} et C_{H3} s'appelle **Fc** pour fragment cristallisable car il est facilement cristallisé. Il ne reconnaît pas l'antigène. La pepsine quant à elle va cliver la protéine sous les ponts disulfures liant les deux

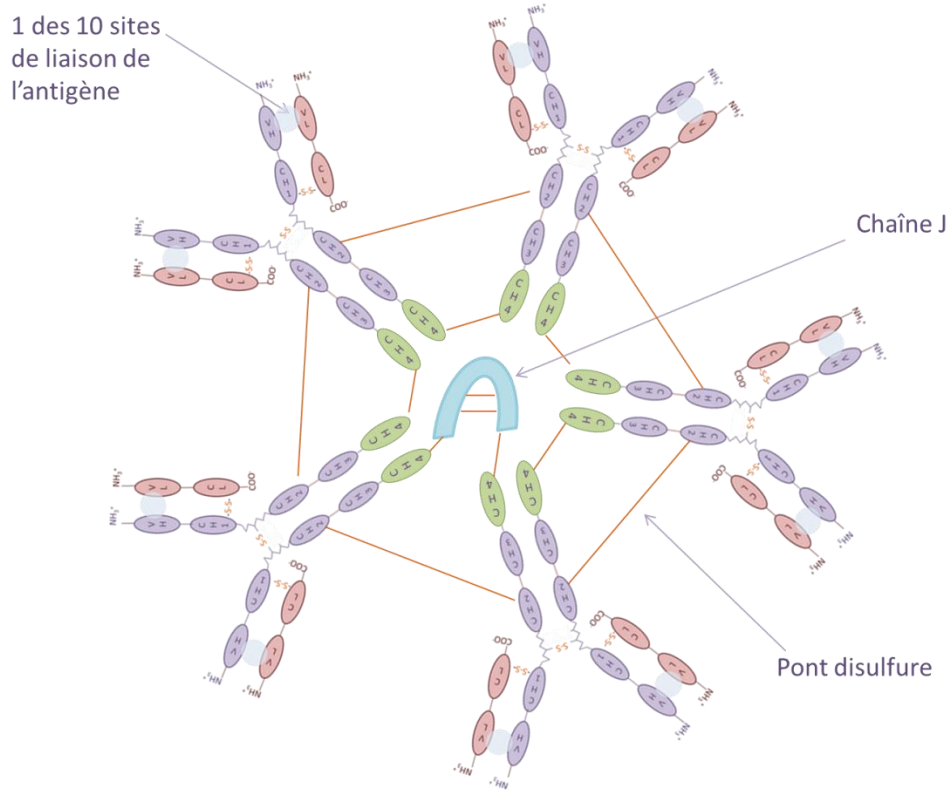


Figure 2 : Immunoglobuline M (forme pentamérique)

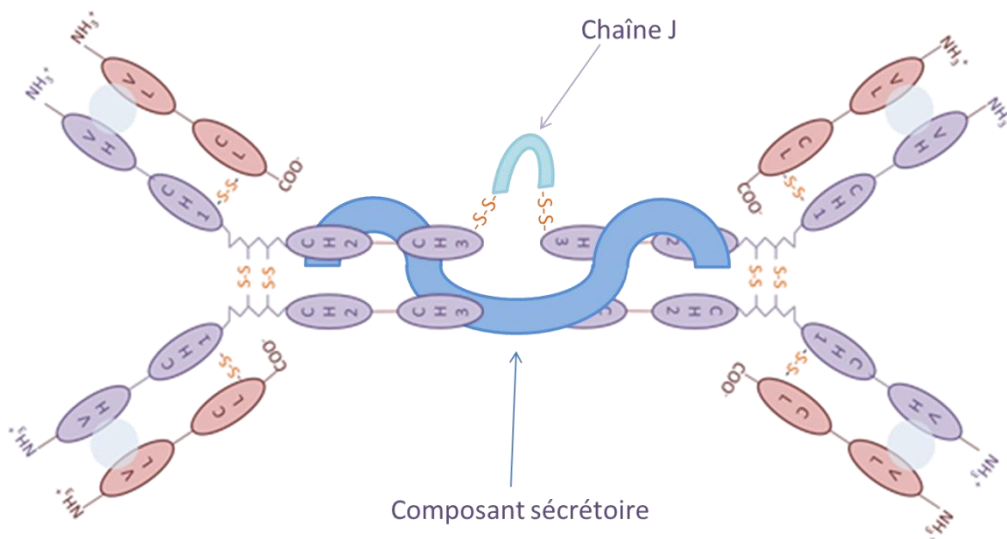


Figure 3 : Immunoglobuline A sécrétaire (forme dimérique)

chaines lourdes. Le fragment comportant les domaines variables est donc divalent et se nomme **F(ab')₂**. Le fragment **Fv** est constitué des domaines V_H et V_L , il fixe l'antigène avec la même affinité que l'Ig complète mais est monovalent. Ces deux domaines reliés par un linker constituent le fragment **scFv**¹⁹.

1.1.2 Les immunoglobulines M (IgM)

En ce qui concerne les autres immunoglobulines, seules les IgM (Figure 2) sont utilisées de manière significative comme réactifs d'immunoessais. Cependant, leur utilisation est limitée par leur faible affinité par rapport aux IgG, pour les antigènes mono-épitopiques et par une plus grande tendance à se lier de manière non spécifique. Les IgM sont pentamériques (5 monomères identiques liés par des ponts disulfures et par la chaîne J) et ont une masse de 950.000 Da, mais peuvent aussi exister sous la forme de monomères. Les chaines lourdes possèdent un domaine surnuméraire C_{H4} . Les IgM sont liées par ponts disulfures à une autre protéine, la chaîne J. Elles ont une grande affinité pour les entités poly-épitopiques. Les IgM sont synthétisées par les cellules plasmocytaires comme réponse immunitaire à un contact avec des antigènes en primo réaction, contrairement aux IgG qui constituent la classe dominante pour les réponses immunitaires suivantes. Les premières IgG se lient aux antigènes généralement avec une affinité plus grande que les IgM et les IgG suivantes ont en moyenne une affinité encore supérieure. Ce phénomène durant lequel les anticorps produits ont une affinité de plus en plus grande suite à une exposition répétée ou prolongée à l'antigène est appelé la maturation d'affinité. Il se produit grâce aux mutations somatiques dans les segments d'ADN codant pour les régions variables des chaines L et H. La maturation d'affinité a lieu uniquement dans les réponses aux antigènes dépendant de lymphocytes T auxiliaires. Les lymphocytes B produisant les anticorps ayant la plus haute affinité sont préférentiellement sélectionnés pour développer la réponse immunitaire^{16,17}.

1.1.3 Les immunoglobulines A (IgA)

Les IgA (Figure 3) sont majoritairement produites au niveau des muqueuses. Elles sont produites par les plasmocytes et sont secrétées, par exemple, au niveau de l'intestin par des récepteurs à immunoglobulines polymériques. Les IgA sont relarguées sous forme dimérique (jonction faite par la chaîne J) avec un morceau du récepteur appelé composant sécrétoire rendant l'IgA sécrétoire résistante à la protéolyse¹⁸.

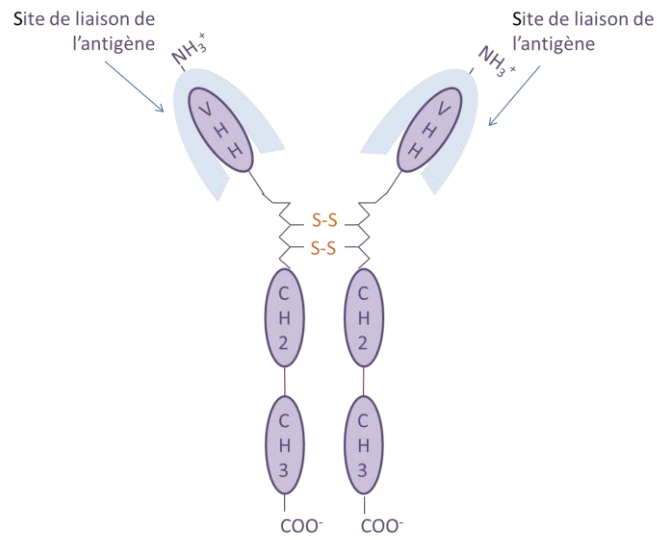


Figure 4 : Anticorps de camélidés (chameau, lama...). VHH: domaine variable des anticorps n'ayant qu'une chaîne lourde

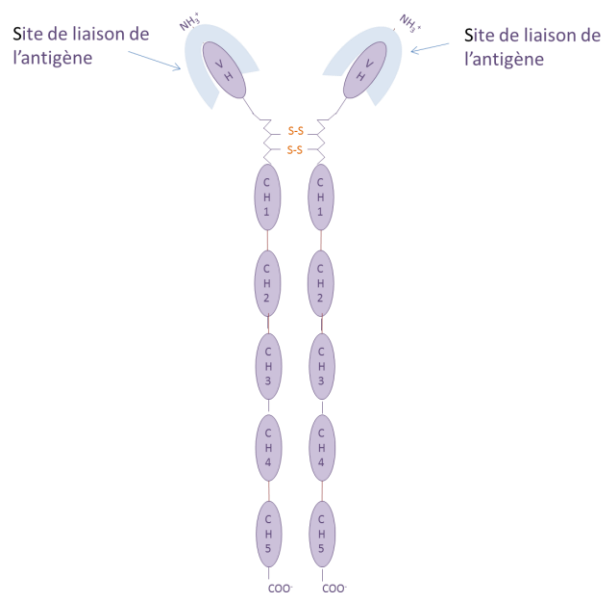


Figure 5 : Anticorps de chondrichthyens (requin, raie...)

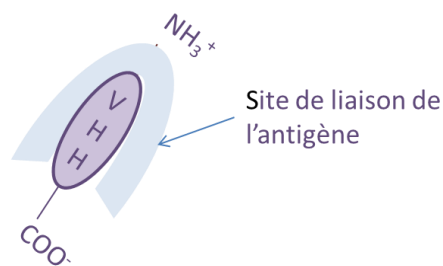


Figure 6 : Nanobody (anticorps à domaine unique)

1.1.4 Les anticorps « chaines lourdes »

En 1993, une équipe de la Vrije Universiteit Brussel (VUB) découvre chez les dromadaires un type particulier d'anticorps ne possédant pas de chaîne légère. Ces anticorps sont constitués uniquement de deux chaînes lourdes dépourvues du domaine C_{H1} et le domaine V_H est différent et appelé V_HH. De plus la région charnière est plus étendue et prend la place du domaine C_{H1} perdu²⁰. Pour le moment, ces anticorps particuliers n'ont été trouvés que chez les camélidés (lama, dromadaire, chameau, alpaga...) (Figure 4). Toutefois, les camélidés possèdent également des anticorps classiques^{21,22}.

Peu de temps après, en 1995, une équipe de l'Université de Miami découvre un autre type d'anticorps constitué uniquement de deux chaînes lourdes chez les chondrichthyens ou poissons cartilagineux, c'est-à-dire la classe des requins et des raies. Ces anticorps particuliers sont appelés IgNAR (immunoglobulin new antigen receptor) et possèdent 5 domaines constants C_{H1}→5 ainsi que plusieurs ponts disulfures dans des positions inhabituelles (Figure 5)²³.

1.1.5 Les nanobodies

Les nanobodies sont des anticorps à domaine unique (single-domain antibody). Ils sont constitués d'un fragment d'anticorps comportant le domaine monomérique variable. Comme un anticorps entier, ils sont capables de se lier spécifiquement à un antigène. Leur poids varie de 12 à 15 kDa soit dix fois moins qu'un anticorps composé de deux chaînes lourdes et deux légères, ils sont constitués d'environ 110 acides aminés²⁴.

Les premiers anticorps à domaine unique ont été créés à partir du domaine V_HH des anticorps de camélidés décrits ci-dessus (Figure 6). Les anticorps à domaine unique issus des IgNAR sont des VNAR. Les domaines V_H ou V_L des IgG classiques peuvent aussi constituer des anticorps à domaine unique mais ils sont moins stables que ceux issus d'anticorps « chaines lourdes »²⁵.

Les anticorps à domaine unique ont une affinité pour leur antigène similaire à celle des anticorps classiques mais sont beaucoup plus résistants aux protéases, aux pH extrêmes, à la chaleur. Ils sont également plus stables par exemple en présence de détergeant²¹.

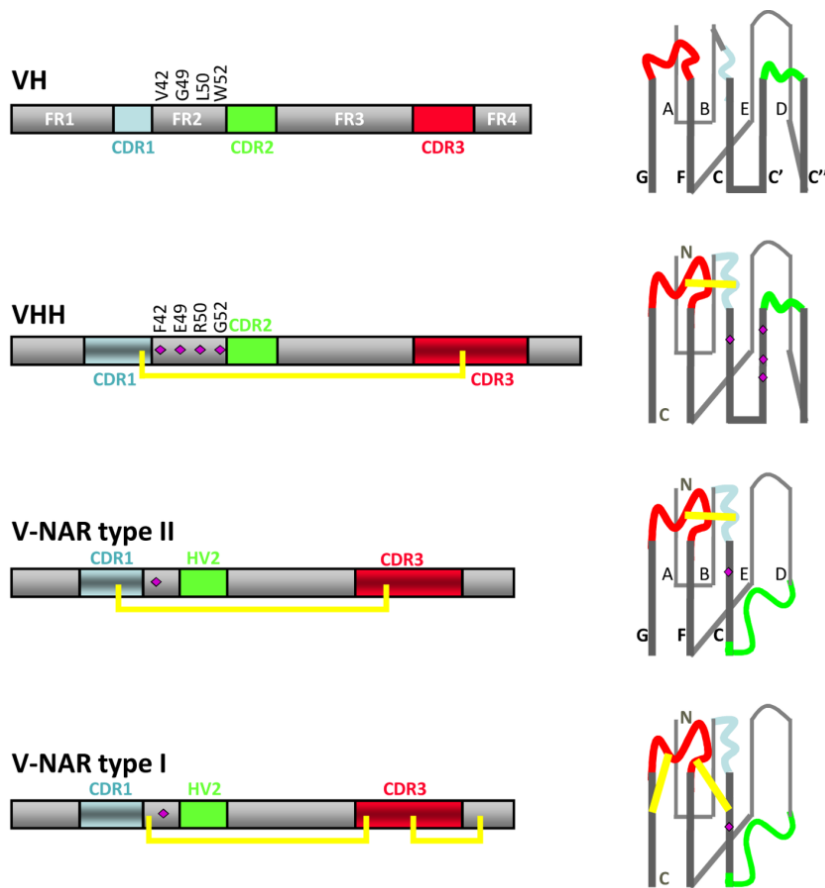


Figure 7 : VH, VHH, VNAR type II et type I : à gauche, schémas des caractéristiques des séquences linéaires avec en gris les régions charpentes (FR), les régions hypervariables déterminant la complémentarité (CDR) en bleu CDR1, en vert CDR2 et rouge CDR3. Les ponts disulfures reliant CDR3 et CDR1 (VHH et VNAR type II) ou CDR3 et FR2 ou CDR3 et FR4 (VNAR type I) sont représentés en jaune. Les losanges mauves représentent les acides aminés hydrophiles présents au niveau de FR2 (4 pour VHH et 1 pour VNAR). A droite, les structures des protéines repliées avec les 7 (VNAR) ou 9 (VH et VHH) brins bêta notés (A à G pour les VNAR et A à G avec C' et C'' entre les boucles C et D pour les VHH et VH) formant deux feuillets

Les anticorps à domaine unique peuvent accéder à des antigènes cachés non accessibles aux anticorps classiques. En effet, grâce à leur petite taille, ils peuvent pénétrer, tel un doigt, des protéines pour accéder aux sites de liaison, contrairement aux anticorps classiques qui vont plutôt envelopper l'antigène comme un bol.

L'enchaînement des différentes régions formant le domaine variable des chaînes lourdes des anticorps classiques (V_H) et des anticorps « chaînes lourdes » (V_{HH} et VNAR) est très proche. Cependant, quelques différences sont à noter. Ce sont ces différences qui permettent au V_{HH} d'être stable et de conserver ses propriétés de reconnaissance antigénique. Le V_{HH} est plus grand que le V_H . En effet, le CDR1 est plus étendu et la boucle constituant le domaine CDR3 est plus longue dans le V_{HH} que dans le V_H humain et ce chez le dromadaire mais pas chez le lama. Les CDR1 et CDR3 du V_{HH} (et du VNAR type II) contiennent une cystéine, ce qui engendre la formation d'un pont disulfure entre ces régions hypervariables stabilisant la structure. Le VNAR type I contient deux ponts disulfures, situés entre le CDR3 et les régions charpentes 2 et 4. Une autre différence importante entre le V_H et le V_{HH} se situe au niveau de la région charpente 2 (Fr2). Normalement, c'est une région hautement conservée dans les V_H , contenant de nombreux acides aminés hydrophobes et servant d'ancrage pour le domaine V_L . En revanche dans les V_{HH} , au niveau de la région correspondante, les acides aminés sont plus hydrophiles, ce qui explique l'absence d'association avec une chaîne légère des anticorps « chaînes lourdes » et la possibilité de solubiliser le V_{HH} et d'en faire une entité à domaine unique (Figure 7). Ces modifications par rapport aux V_H permettent aux anticorps « chaînes lourdes » de résister aux conditions physiologiques extrêmes auxquelles ils sont exposés, comme des concentrations en urée élevées dans le sang de requin ou un environnement aride avec des températures extrêmes pour les camélidés^{25,26}.

1.2 Production d'anticorps

1.2.1 Anticorps polyclonaux

Les anticorps s'obtiennent par inoculation de l'antigène à un animal de laboratoire ce qui va entraîner après une période d'incubation, la production de plasmocytes. Les plasmocytes vont libérer des anticorps polyclonaux dans le sang. La quantité d'anticorps produite peut être augmentée par l'utilisation d'adjuvants et ou par l'injection à l'animal de doses successives de l'antigène. Ensuite, le sang de l'animal est prélevé et le sérum est isolé. Dans certains cas, l'antisérum peut être utilisé tel quel, sinon les anticorps sont purifiés. Généralement, cette

purification se fait par chromatographie d'affinité en utilisant la protéine A ou G comme ligand de la partie constante des anticorps, suivie d'une chromatographie d'affinité utilisant l'antigène spécifique pour ne garder, après élution, que les anticorps dirigés contre cet antigène. Des billes magnétiques couvertes de l'antigène peuvent aussi être utilisées. Les billes sont facilement récupérées sous l'action d'un champ magnétique. Il existe également des techniques de précipitation sélective de protéines utilisant des solvants organiques comme, par exemple, l'éthanol, des sels (sulfate d'ammonium ou de sodium) et des acides gras à chaîne courte. En fonction de la technique utilisée, les Ig se retrouvent soit dans le surnageant soit dans le précipité¹⁵.

1.2.2 Anticorps monoclonaux

Pour produire des anticorps monoclonaux, il faut parvenir à multiplier le plasmocyte donnant l'anticorps visé. Malheureusement, les cultures cellulaires de lymphocytes ne sont pas possibles. En 1975, Georges Köhler et César Milstein ont publié une technique de production d'anticorps monoclonaux, qui leur a valu le prix Nobel de médecine en 1988. Cette technique est basée sur la fusion du lymphocyte B d'intérêt avec une cellule cancéreuse (myélome) de telle sorte que l'hybride obtenu (appelé hybridome) peut produire les anticorps tout en étant immortel ce qui rend sa culture possible.

Après immunisation de l'animal de laboratoire, celui-ci est sacrifié. Les lymphocytes sont prélevés au niveau de la rate et sont fusionnés avec une culture cellulaire de myélome. La population est transférée dans un milieu cellulaire sélectif où seules les cellules hybrides (hybridomes) prolifèrent. Les hybridomes sont testés avec l'antigène cible afin de sélectionner l'hybridome donnant le bon anticorps. Enfin, soit l'hybridome est injecté à un animal et les anticorps sont produits en masse dans le sang, soit les anticorps sont isolés au niveau du surnageant de la culture cellulaire¹⁵. La technologie d'hybridome permet de produire massivement des anticorps monoclonaux qui sont invariables en termes de spécificité et sélectivité, et ceci de façon infinie parce qu'une fois obtenus, les hybridomes sont toujours disponibles (ils peuvent être conservés à -80 °C et remis en culture au besoin). La production d'hybridomes requiert cependant beaucoup de temps et de travail, une infrastructure adaptée, des animaux, et une expertise avancée pour préparer et sélectionner un grand nombre d'hybridomes.

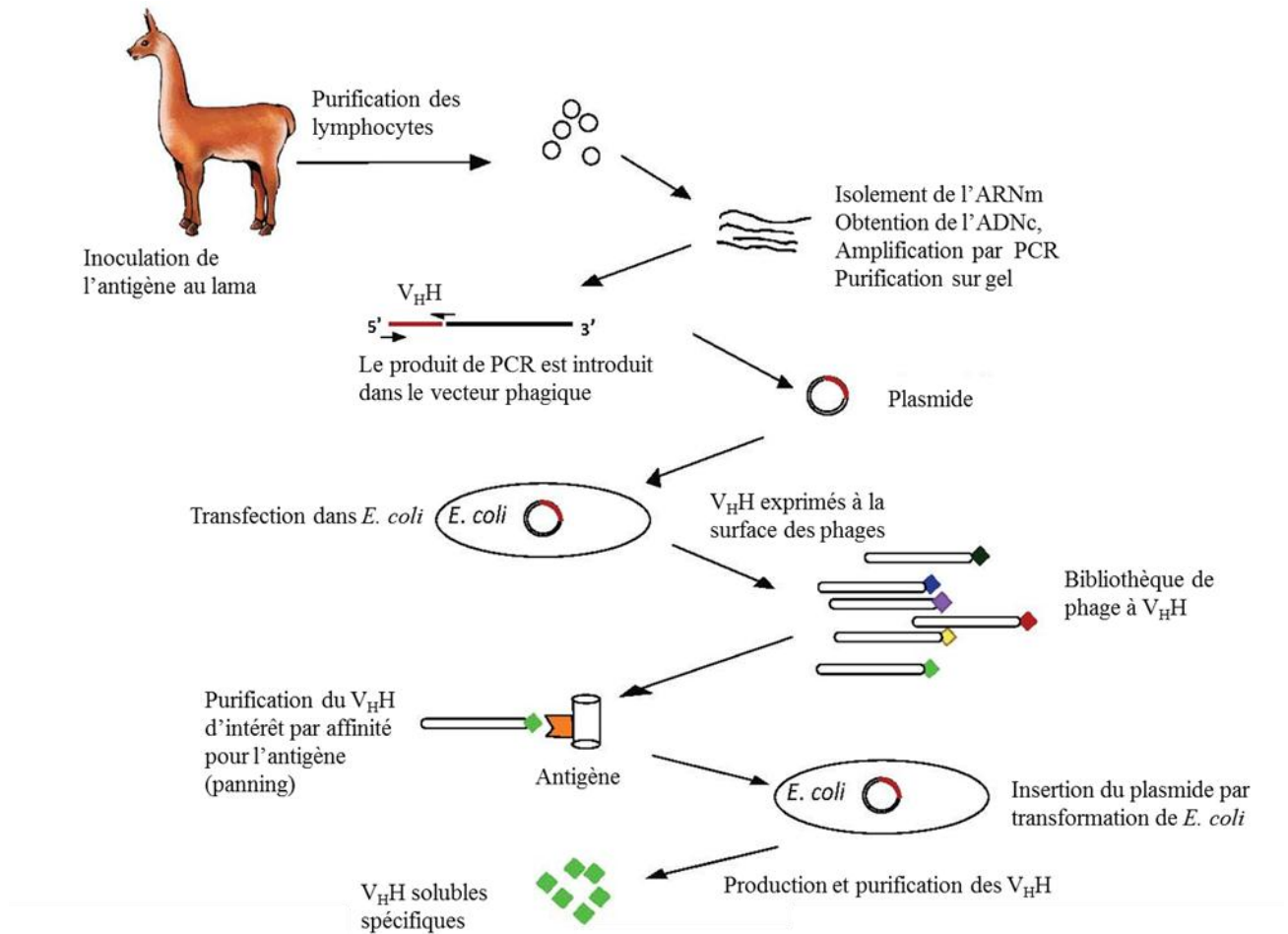


Figure 8 : Représentation schématique de la stratégie de constitution d'une bibliothèque de phage à V_{HH} (traduit de ²⁷)

1.2.3 Anticorps recombinants

La modulation génétique des anticorps est actuellement possible grâce à la combinaison de différentes techniques modernes de mutagenèse et de réplication de bactériophages. La méthode se déroule en plusieurs étapes. L'antigène est administré à l'animal ; après une période d'incubation, les plasmocytes ou des cellules B sont prélevés du sang ou de la rate de l'animal. L'ARNm est extrait et par l'action d'une transcriptase réverse, l'ADNc est obtenu. Dans le cas d'un anticorps monoclonal déjà existant, l'ARNm peut être extrait de l'hybridome. L'ADN est ensuite amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction), amplification pendant laquelle seuls les gènes codants pour les chaînes lourdes et légères sont sélectionnés grâce à l'utilisation d'amorceurs spécifiques. Chaque séquence est alors reprise dans un phage qui va permettre d'introduire le plasmide dans une bactérie ou une levure qui est ensuite mise en culture. Les phages s'y multiplient et sont libérés et expriment à leurs surfaces différentes chaînes d'anticorps. Le(s) phage(s) exprimant l'anticorps d'intérêt est (sont) purifié(s) par affinité pour l'antigène, ce qu'on appelle la sélection par « panning », et le plasmide en est extrait. La séquence de ce plasmide peut, éventuellement, être modifiées avant de continuer. Celui-ci est introduit dans une bactérie ou une levure par transformation pour qu'elle exprime l'anticorps. La dernière étape consiste en l'extraction des anticorps sécrétés^{15,28}. Cette technique est également utilisée pour produire des nanobodies et est illustrée sur la Figure 8.

1.2.4 Immunisation *in vitro*

Il est également possible de produire des anticorps *in vitro* en immunisant une suspension de cellule de rate. La procédure comporte trois étapes. Premièrement une monocouche de cellules de support est établie et amorcée avec l'antigène. Ensuite, une suspension de cellules de rate est incubée dans un milieu avec l'antigène et les cellules pré-amorcées. Après 5 jours, les cellules spléniques sont fusionnées avec des myélomes pour former des hybridomes qui sont mis en culture et les anticorps sont prélevés du surnageant. Les avantages sont la rapidité du processus et une faible quantité d'antigène est nécessaire par rapport à la méthode *in vivo*. De plus, la technique peut être utilisée pour produire des anticorps dirigés contre des antigènes toxiques *in vivo* mais qui ont une faible toxicité *in vitro*¹⁶.

1.3 Liaison antigène-anticorps

La partie de l'anticorps qui assure la fonction de reconnaissance de l'antigène s'appelle le paratope. La partie de l'antigène qui est reconnu par un paratope est l'épitope. Un antigène possède plusieurs épitopes reconnus par un anticorps spécifique. Le paratope se trouve aux extrémités des chaînes lourdes et légères, partie variable, de l'anticorps. Les haptènes sont des molécules de poids moléculaire limité, qui ne sont pas naturellement antigéniques mais, quand ils sont conjugués à une protéine (BSA par exemple, avec 20-30 molécules d'haptène par molécule de BSA) deviennent un immunogène. L'haptène lié à la protéine peut être utilisé pour générer des anticorps qui se lieront spécifiquement à l'haptène libre avec une haute affinité. Quand un paratope est complexé avec l'haptène correspondant, celui-ci est généralement localisé dans une poche, cavité ou un sillon, entouré de groupes fonctionnels de résidus peptidiques qui sont structurellement complémentaires à des portions adjacentes de la molécule d'haptène. Les boucles CDR peuvent bouger pour améliorer la liaison, les paratopes de haute affinité donnent fréquemment des complexes dans lesquels l'haptène est inclus à plus de 80-90 %. Quand un paratope est complexé avec un épitope de sa protéine antigénique, l'aire apparente de contact est habituellement relativement grande, 700-900 Å², avec environ 20 résidus d'acide aminé par réactif impliqué. Dans cette zone de contact il peut y avoir des cavités pour accueillir des chaînes latérales de l'antigène et vice versa. Dans tous les complexes antigène-anticorps ou haptène-anticorps, divers ajustements structuraux aussi bien des épitopes que des paratopes peuvent se produire : c'est ce qui s'appelle l'ajustement induit. L'anticorps et l'antigène sont en contact étroit. Toutefois, il est possible d'accueillir entre les deux, des molécules d'eau ou des ions^{15,19,29}.

1.4 Différents immunoessais

De nombreux immunoessais ont été mis au point en particulier des immunoessais sur support solide utilisant un marqueur ou non. Cette technique de dosage basée sur la reconnaissance d'un antigène par un anticorps permet de quantifier dans un échantillon des anticorps ou des antigènes. L'immunoessai peut soit être couplé à une réaction enzymatique avec un substrat chromogène ou fluorogène (EIA : enzyme immunoassay) soit utiliser comme marqueur un radioélément (RIA : radio-immunoassay) ou une molécule fluorescente (fluorescence immunoassay), soit ne pas utiliser de marquage comme dans la technique de résonance plasmonique de surface (SPR) ou des microbalances à cristal de quartz (QCM)^{30,31}.

Changements des propriétés de la surface du transducteur (SPR, impédance, piézoélectrique...).

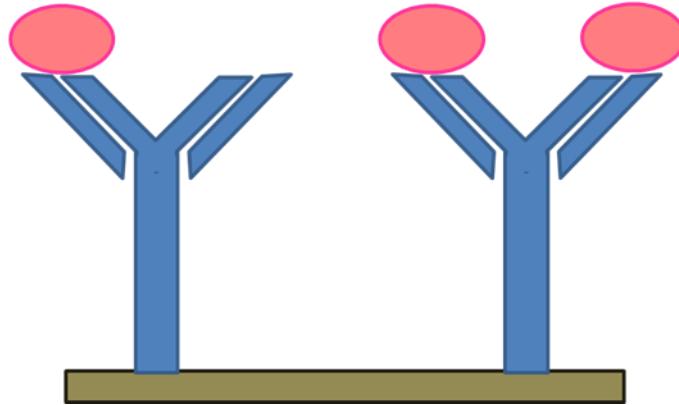
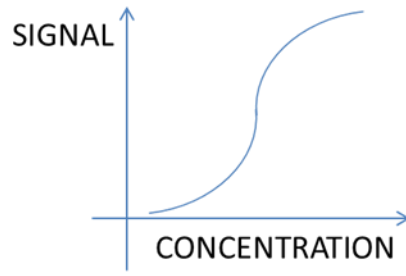


Figure 9 : Immunoessai sans marquage

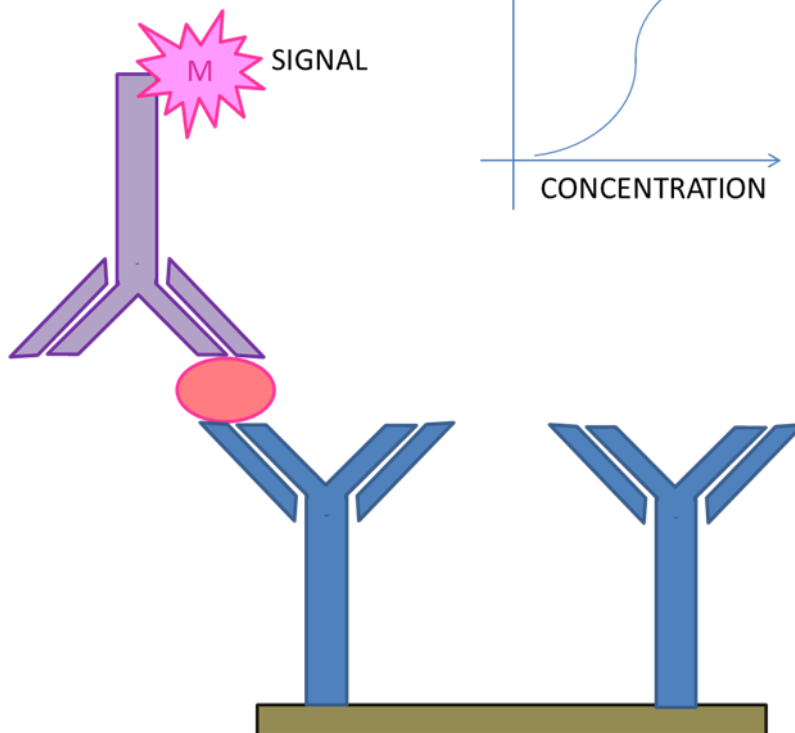
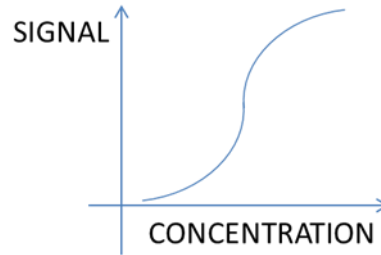


Figure 10 : Immunoessai de type sandwich (M= marqueur)

1.4.1 Sans marquage.

L'anticorps est immobilisé sur un support solide et la liaison de l'antigène présent dans l'échantillon va provoquer une variation locale au niveau du support (Figure 9). L'antigène peut également être immobilisé pour le dosage de l'anticorps. Dans le cas de l'utilisation d'une électrode comme support, des changements de conductivité peuvent être détectés lors de la formation du complexe anticorps/antigène. Une modification de l'impédance peut être mesurée. La variation de masse que provoque la liaison antigénique peut être détectée grâce à une microbalance à quartz. Un changement de l'angle de réfraction d'un faisceau laser incident peut être mesuré par résonance plasmonique de surface (SPR) suite au changement de propriétés (permittivité) à l'interface métal-solution d'une fine couche d'or après liaison de l'antigène à son anticorps. Ce type d'immunoessai convient bien pour les grosses molécules à doser.

1.4.2 Avec marquage

1.4.2.1 *De type sandwich*

Pour sa quantification, l'antigène est mis en contact avec un anticorps immobilisé sur le support solide (Figure 10). Après incubation et rinçage pour éliminer ce qui n'a pas été lié à l'anticorps, un second anticorps lié au marqueur (enzyme, réactif fluorescent ou radioactif) est incubé. L'antigène est alors pris en sandwich entre deux anticorps. Après élimination de l'excès d'anticorps marqués, la quantité d'immunocomplexe formé est déterminée grâce à la présence du marqueur. Si celui-ci est une enzyme, son substrat est ajouté et la quantité de produit formé est déterminée soit par spectrophotométrie soit par électrochimie. Si le marqueur est luminescent, il peut être facilement dosé par une mesure de la fluorescence, tandis qu'avec un marqueur radioactif, le dosage mesure un nombre de désintégrations par seconde³¹. Inversement, pour le dosage d'un anticorps, l'antigène est immobilisé sur le support solide et le second anticorps marqué sera une anti-immunoglobuline. Les immunoessais de type sandwich sont adaptés aux grosses molécules possédant deux épitopes.

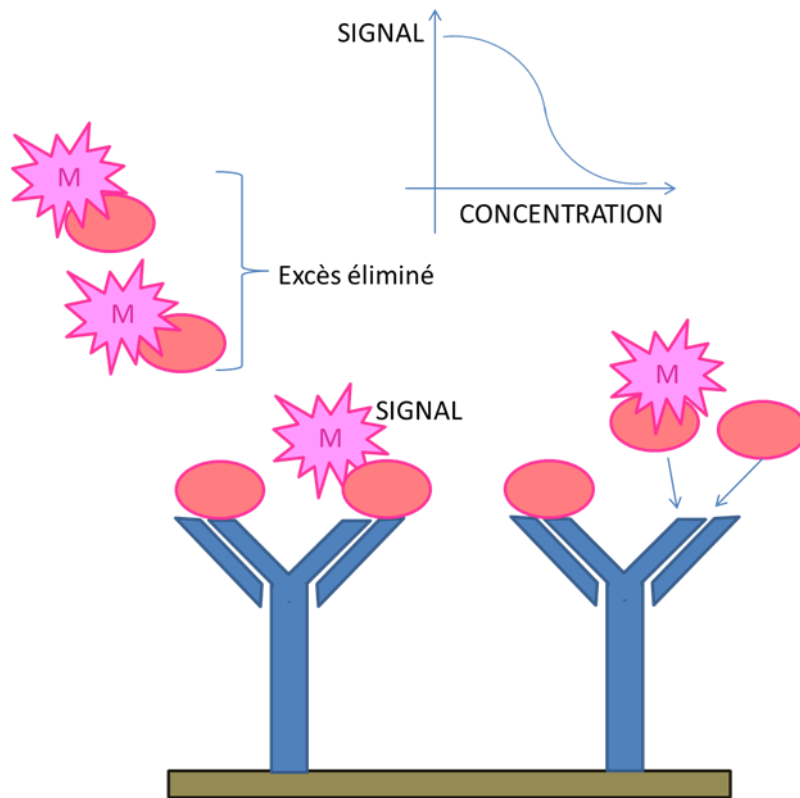


Figure 11 : Immunoessai compétitif (M= marqueur)

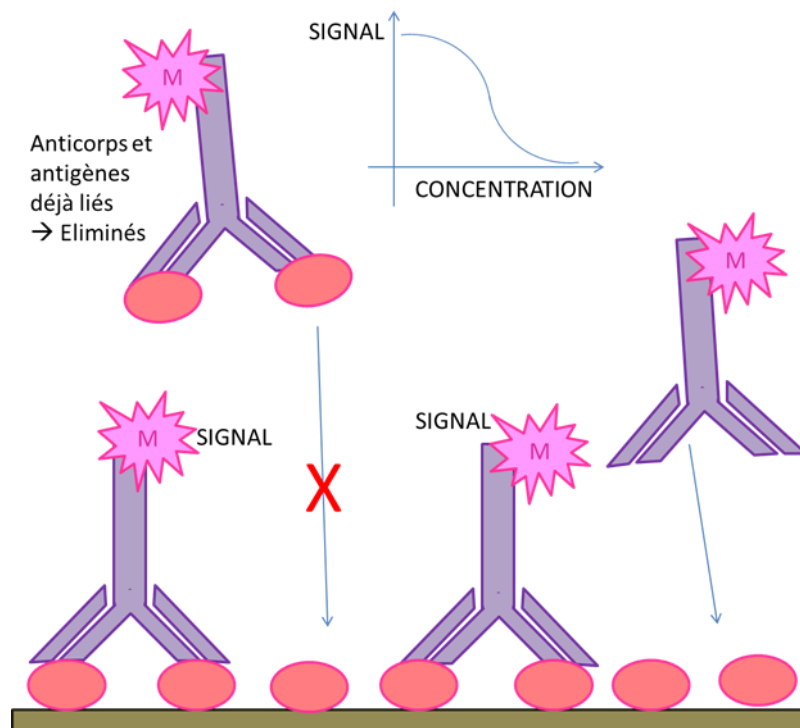


Figure 12 : Immunoessai de type compétitif indirect (M= marqueur)

1.4.2.2 De type compétitif

Dans le dosage compétitif d'un antigène, l'anticorps dirigé contre cet antigène est immobilisé sur le support (Figure 11). Un mélange contenant l'antigène à doser et l'antigène marqué (enzyme, radioélément, marqueur fluorescent) est mis en contact avec l'anticorps immobilisé. Après une période d'incubation, l'excès d'antigènes non lié aux anticorps est éliminé. La compétition se joue entre les antigènes à doser et ceux marqués pour leur liaison à l'anticorps immobilisé.

Plus la quantité d'antigène à doser est grande, plus le signal sera faible car moins d'antigènes marqués pourront se lier aux anticorps³¹. Le même scénario peut être envisagé pour doser des anticorps. L'antigène est alors immobilisé et l'anticorps à doser est en compétition avec des anticorps marqués. Les dosages par compétition sont privilégiés par rapport aux sandwichs dans le cas de petites molécules. En effet si la molécule est petite, il sera plus difficile de la faire réagir avec deux anticorps à cause de l'encombrement stérique.

1.4.2.3 De type compétitif indirect

Les dosages compétitifs indirects consistent à faire réagir les antigènes à doser avec des anticorps marqués en solution (Figure 12). Ensuite, cette solution est mise en contact avec des antigènes immobilisés sur le support. Les anticorps marqués en excès par rapport aux antigènes de l'échantillon vont réagir avec les antigènes immobilisés. Après la période d'incubation, le support est rincé pour éliminer ce qui n'a pas réagi avec les antigènes immobilisés. La compétition a donc lieu entre les antigènes à doser et les antigènes immobilisés pour leur liaison à un anticorps marqué. Ce type de dosage correspond à un dosage en retour avec un excès d'anticorps marqués^{32,33}.

Le dosage des anticorps peut également être réalisé en les mettant en contact avec un excès d'antigènes marqués. Les antigènes marqués non liés aux anticorps pourront dans un second temps réagir avec les anticorps immobilisés sur le support.

Les immunoessais avec un marquage enzymatique sont classiquement détectés par spectrophotométrie en utilisant un système avec génération d'un produit coloré. L'immunocomplexe formé est finalement quantifié grâce à l'ajout du substrat qui va donner, après la réaction enzymatique, une substance colorée mesurable à une longueur d'onde définie. Toutefois, il est également possible de mesurer la quantité de marqueurs enzymatiques présents grâce aux techniques bioélectrochimiques.

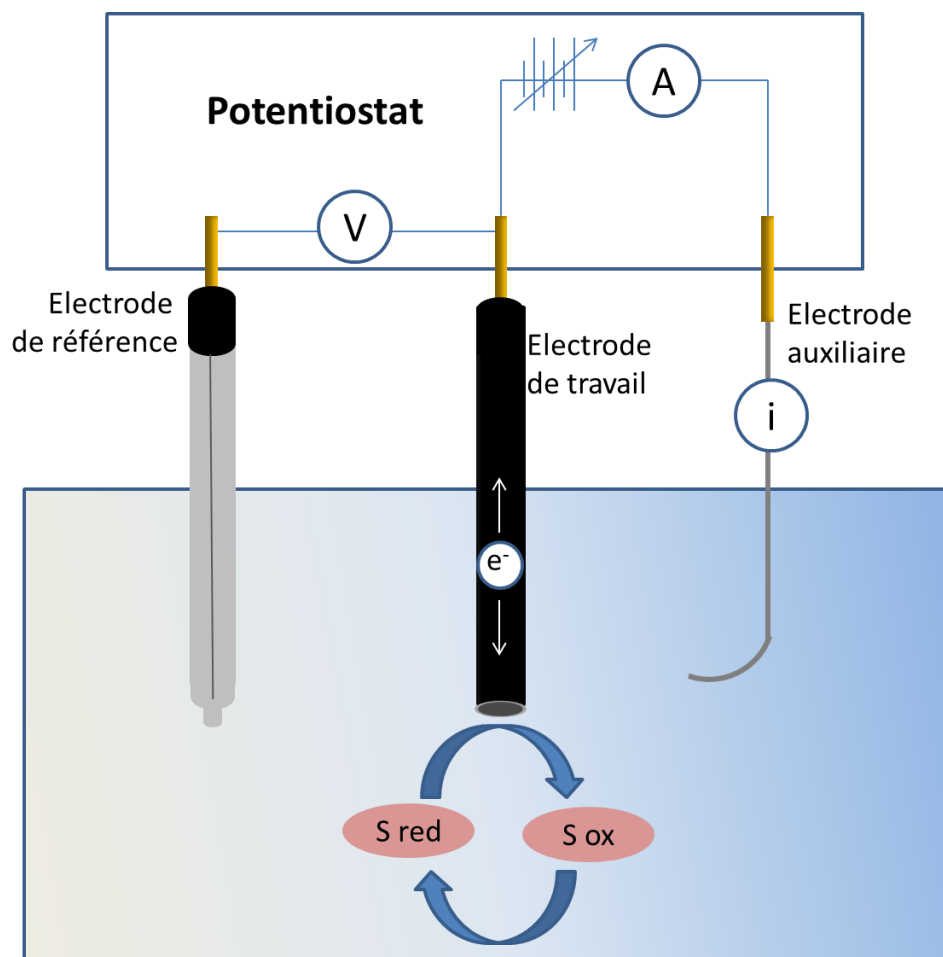


Figure 13: Cellule électrochimique à trois électrodes, I : intensité, e⁻ : électron, S ox : substrat oxydé, S red substrat réduit

2. Approche bioélectrochimique

2.1 La voltampérométrie

La voltampérométrie regroupe les techniques électrochimiques consistant à mesurer le courant électrique en fonction de la différence de potentiel appliquée entre deux électrodes. La polarographie, à l'origine des techniques de voltampérométrie, utilise comme électrode de travail une électrode de mercure à goutte tombante. La polarographie a été découverte en 1922 par Jaroslav Heyrovsky, professeur de chimie physique à l'Université Charles de Prague. En effet, le 10 février 1922, J. Heyrovsky remarqua pour la première fois que le courant circulant dans une électrode à goutte tombante de mercure varie en fonction du potentiel appliqué. Il a dessiné dans son cahier de laboratoire le graphique correspondant à ce courant en fonction du potentiel. Ce tracé constitue le premier voltampéromètre. J. Heyrovsky fut, en 1959, lauréat du prix Nobel de Chimie pour récompenser la découverte et le développement des méthodes polarographiques^{34,35}.

Cependant, les débuts de la voltampérométrie n'ont pas été faciles. En effet, pour maintenir l'électrode de travail à un potentiel donné, il faut éviter de faire passer un courant par l'électrode de référence. Si un courant passe par l'électrode de référence, son potentiel change selon la loi d'Ohm.

$$E = I \times R \quad \text{(Équation 1)}$$

E : potentiel

I : intensité de courant

R : résistance

En 1942, pour éviter que le courant passe par la référence qui possède une résistance très élevée A. Hickling a mis au point le premier potentiostat à trois électrodes : électrodes de travail, de référence et auxiliaire (contre électrode) (Figure 13). Le courant circule alors à 99,9 % entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire ; le potentiel est imposé entre l'électrode de travail et l'électrode de référence. La mise au point de ce potentiostat à trois électrodes a permis l'essor de la voltampérométrie³⁶.

Les techniques de voltampérométrie sont basées sur la mesure du courant qui se développe dans une cellule électrochimique dans des conditions qui entraînent l'apparition d'un gradient de concentration. Une infime proportion d'analyte est consommée, contrairement à la coulométrie ou à l'électrogravimétrie pour lesquelles tout l'analyte est transformé^{37,38}.

Comme cet échange électronique a lieu au niveau de la surface de l'électrode de travail, il faut que les espèces électroactives mises en jeu se trouvent au voisinage de cette surface. Au fur et à mesure de la réaction, la substance consommée doit être renouvelée, de même, la substance produite s'éloigne. Les flux des molécules oxydées et réduites sont opposés puisque l'une se transforme en l'autre et vice versa.

Trois modes de transport des matières sont à considérer :

- la diffusion : mouvement des espèces dû au gradient de concentration
- La migration : mouvement des espèces chargées dû au gradient de potentiel qui peut être minimisé par l'ajout d'un électrolyte de support
- la convection : mouvement des espèces provoqué par des forces mécaniques (agitation, gradient de température, nuls en mode stationnaire)

Dans le cas de la voltampérométrie cyclique (VC) en mode stationnaire, seule la diffusion doit être prise en compte³⁹.

- Lois de diffusion de Fick

Les lois de Fick étudient le flux d'une espèce et sa concentration en fonction du temps t et de la distance x . Pour étudier la diffusion linéaire, la surface de l'électrode va être considérée comme parfaitement plane et infinie de telle sorte que la variation de concentration ne peut avoir lieu que perpendiculairement à la surface. Le flux correspond au nombre de moles de substance traversant un plan à une distance x par unité de surface.

La **première loi de Fick** stipule que le flux (ϕ) est proportionnel au gradient de concentration :

$$\phi = -D \frac{\delta c(x)}{\delta x} \quad (\text{Équation 2})$$

D = coefficient de diffusion de l'espèce électroactive (m^2s^{-1}), dépend de la chaleur, du milieu et de la molécule

ϕ = flux de l'espèce à la concentration c en solution

x = distance entre le point considéré et la surface de l'électrode

La réaction à l'électrode convertit l'oxydant en réducteur (et vice versa en fonction du potentiel) ; en appliquant la loi de conservation des masses, cela conduit à l'égalité des flux de l'oxydant et du réducteur mais en sens inverse. La densité de courant (intensité (I)/surface (S)) peut être reliée aux flux des espèces électroactives en solution. Comme la conversion d'une mole d'oxydant en réducteur s'accompagne du transfert de n électrons, on a :

$$\frac{I}{nFS} = \varphi_{ox}(o, t) = -\varphi_{red}(o, t) \quad (\text{Équation 3})$$

La seconde loi de Fick permet de déterminer la variation de concentration de l'espèce considérée dans l'espace et le temps :

$$\frac{\delta c(x)}{\delta t} = D \frac{\delta^2 c}{\delta x^2} \quad (\text{Équation 4})$$

La résolution de cette équation différentielle donne la variation de la concentration en oxydant ou en réducteur dans l'espace et le temps, ce qui renseigne sur le flux de diffusion dont on veut connaître la valeur à la surface de l'électrode donc pour $x=0$ ³⁹.

Système réversible et système irréversible

La réaction d'oxydation du réducteur en oxydant est contrôlée par deux phénomènes :

- Le transfert de charge à la surface de l'électrode (échange électronique) régi par la constante de vitesse standard k^0 du transfert d'électrons (= courant faradique)
- Le transfert de masse qui permet le renouvellement en réactif à la surface de l'électrode et l'évacuation du produit régi par les constantes de vitesse de diffusion k^d des espèces électroactives

Deux cas limites et un cas intermédiaire existent :

Le système électrochimique est dit **rapide (réversible)** quand l'étape cinétiquement limitante est celle de transport de matière (dépendant de D et δ) et non pas le transfert électronique. Dans ce cas, $k^0 \gg k^d = D/\delta$ ($k^0 > 20 k^d$) avec δ correspondant à l'épaisseur de la couche de diffusion qui croît avec le temps.

Le potentiel de l'électrode de travail, imposé par le potentiostat, peut être calculé à tout instant t selon l'équation :

$$E_t = E_i + v \cdot t \quad (\text{Équation 5})$$

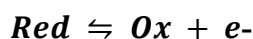
E_t : potentiel à l'instant t (V)

E_i : potentiel initial (V)

v : vitesse de balayage (V/s)

t : temps (s)

Un système réversible répond à l'équation de Nernst, le potentiel E_t impose le rapport des formes oxydées et réduites au niveau de la surface de l'électrode de travail^{39,40}.



$$E_t = E'_0 - \frac{0,059}{n} \log \frac{[\text{red}]_t}{[\text{ox}]_t} \quad (\text{Équation 6})$$

$$0,059 = \frac{\ln(10) \cdot R \cdot T}{F} \quad (\text{Équation 7})$$

E_t : potentiel à l'instant t (V)

E'_0 : potentiel standard apparent du couple redox (V)

n : nombre d'électrons échangés

R : constante des gaz parfaits ($8,3144621 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$)

T : température en Kelvin (25°C soit $298,15 \text{ K}$)

F : constante de Faraday (96485 Coulombs)

Une valeur particulière de E_t est à noter :

Pour $[\text{ox}] = [\text{red}]$ à un instant t , alors $E_t = E'_0$, ce potentiel particulier est appelé potentiel de demi vague ($E_{1/2}$).

Par contre, le système est qualifié **de lent (irréversible)** si le transfert de charge est limitant.

Dans ce cas $k^0 \ll k^d$. La relation de Nernst n'est pas applicable telle quelle.

Le courant anodique (oxydation) apparait pour $E > E'_0$ (et négligeable pour $E < E'_0$) et le courant cathodique pour $E < E'_0$ (et négligeable pour $E > E'_0$).

Il existe des systèmes intermédiaires dits **quasi-rapides (quasi réversibles)**.

Cependant, la réversibilité est une notion relative et dépend du temps d'observation. En effet, le flux de matière diminue à la surface de l'électrode lorsque le temps augmente. La réversibilité dépend à la fois de la constante de vitesse standard d'échange d'électron (k^0) et du temps. Il est commun, pour un système lent, d'observer un comportement du type « rapide » lorsque les vitesses du balayage sont faibles^{39,40}.

2.2 La voltampérométrie cyclique (VC)

Le potentiel appliqué varie linéairement en fonction du temps jusqu'à un maximum où le balayage est inversé pour revenir au point de départ selon un cycle. Durant ce balayage, lorsque le potentiel d'oxydation de la molécule étudiée est atteint, l'électrode de travail a la capacité de lui arracher un ou plusieurs électrons. Le courant d'oxydation est alors enregistré. Dans un système réversible, lors du balayage de potentiel inverse, au moment où le potentiel de réduction de la molécule oxydée est atteint, l'électrode va lui rendre l'électron, un courant de réduction dû au mouvement inverse des électrons est enregistré et la molécule reprend son état initial. Dans un système irréversible, l'électrode n'a pas la capacité de rendre l'électron à la molécule ; il n'y a donc pas de courant de réduction. De la même façon, une molécule réductible peut être réduite et ensuite réoxydée en son état initial en appliquant un cycle de balayage de potentiel approprié. A chaque changement de potentiel de l'électrode de travail, une surtension (η) apparait, l'équilibre est bouleversé, ce qui provoque la modification de la composition de la solution au contact de l'électrode pour revenir à un état d'équilibre. Un mouvement d'électrons entre la solution et l'électrode apparait, ce qui entraine le passage d'un courant. Si le potentiel augmente, alors le rapport [oxydant]/[réducteur] doit augmenter pour revenir à un état d'équilibre ; une partie du réducteur passe à l'état oxydé en perdant n électrons. Cela se réalise par le transfert d'électrons de la solution vers l'électrode qui joue alors le rôle d'anode. A contrario, si le potentiel diminue, alors le rapport [red]/[ox] doit augmenter, une partie de l'oxydant va se réduire en captant n électrons. Les électrons vont vers la solution à partir de l'électrode qui se comporte en cathode^{37,39,41}.

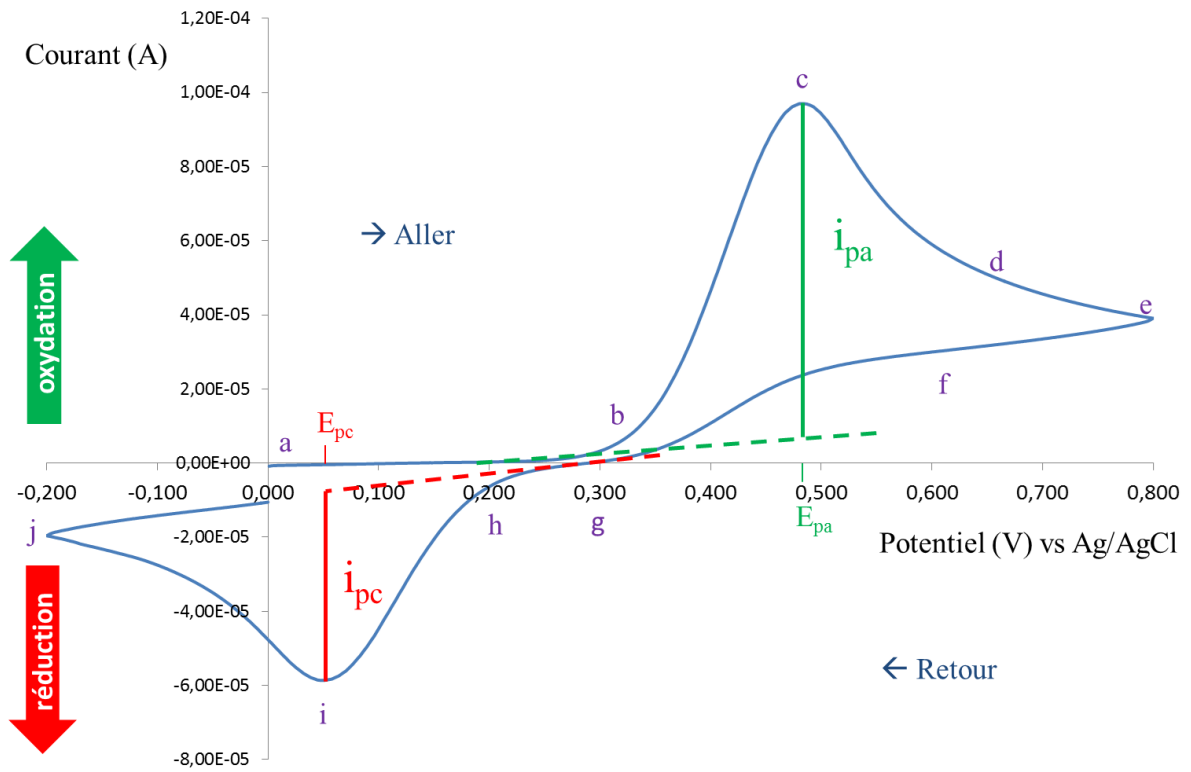
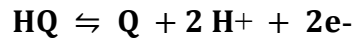


Figure 14 : Voltampérométrie cyclique de l'hydroquinone 1 mM dans du tampon citrate (NaCl 0,1 M) pH 5,5 sur électrode sérigraphiée en carbone (Dropsens) (0 → 800 → -200 → 0 mV)

L'hydroquinone (benzène-1,4-diol) comprend deux groupements hydroxyles liés à un noyau benzénique et est oxydée en perdant deux électrons et deux protons en une étape. Le dérivé oxydé de l'hydroquinone est la benzoquinone (cyclohexa-2,5-diène-1,4-dione). Cette réaction d'oxydation est lente, le transfert des électrons de l'hydroquinone à l'électrode de travail constitue l'étape limitante.

La Figure 14 représente la réponse en courant (voltampérogramme) obtenue lorsqu'une solution d'hydroquinone 1 mM (dans un tampon citrate contenant des chlorures 0,1 M) est soumise à un balayage de potentiel allant de 0 à 800 mV, ensuite de 800 à -200 mV et revenant enfin à 0 mV. Le dispositif à trois électrodes provient d'une tige de trois électrodes sérigraphiées comprenant les électrodes de travail et auxiliaire en carbone et l'électrode pseudoréférence en argent (cSPE). Du potentiel initial (0 mV) jusqu'à environ 300 mV (du point *a* au point *b*) le courant faradique est nul, aucun échange d'électrons n'a lieu, car dans ce domaine de potentiel, l'hydroquinone n'est ni oxydable ni réductible. Lorsque le potentiel dépasse 300 mV (point *b*), un courant faradique anodique dû à l'oxydation de l'hydroquinone en benzoquinone apparaît. En effet, l'électrode de travail, jouant le rôle de l'anode, va arracher deux électrons à l'hydroquinone, ce qui donne la benzoquinone avec libération de deux protons. Entre les points *b* et *c*, le courant augmente rapidement et est maximum au point *c*. Le potentiel correspondant au point *c* est le potentiel du pic anodique (E_{pa}), le courant est le courant de pic anodique (I_{pa}). Le courant au maximum est le résultat de deux contributions. L'une correspond au courant nécessaire à l'ajustement, au niveau de la surface de l'électrode de travail, de la concentration de l'hydroquinone à sa concentration d'équilibre imposée par la relation de Nernst, l'autre provient du courant contrôlé par la diffusion. Le premier courant diminue rapidement (points *c* à *d*) avec l'épuisement de l'hydroquinone à la surface de l'électrode de travail pour arriver à un plateau dit plateau de diffusion car uniquement régi par le courant de diffusion (points *d* à *e*). Au point *e*, le balayage de potentiel est inversé ; toutefois le courant reste anodique (point *f*) car le potentiel est suffisant pour oxyder l'hydroquinone. Dès qu'il n'est plus suffisant pour permettre cette oxydation, le courant devient nul (point *g*). Ensuite, le courant devient cathodique en raison de la réduction de la benzoquinone, accumulée au voisinage de la surface de l'électrode de travail, en hydroquinone (points *h* à *j*). La valeur absolue du courant cathodique passe par un maximum (point *i* correspondant au potentiel du pic cathodique (E_{pc}), le courant est le courant de pic cathodique (I_{pc}) avant de décroître en fonction de la consommation de la benzoquinone. Au point *j*, le balayage est à nouveau inversé pour revenir au potentiel initial⁴¹.

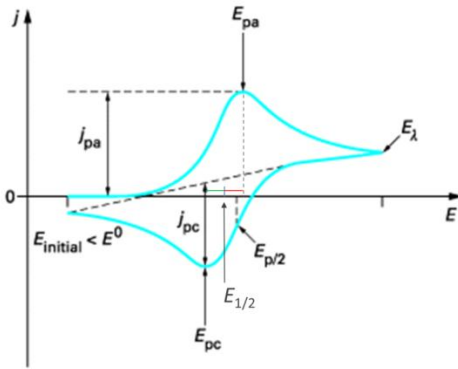


Figure 15 : Allure du voltampérogramme cyclique d'un système réversible avec les potentiels caractéristiques
(adapté de ³⁹)

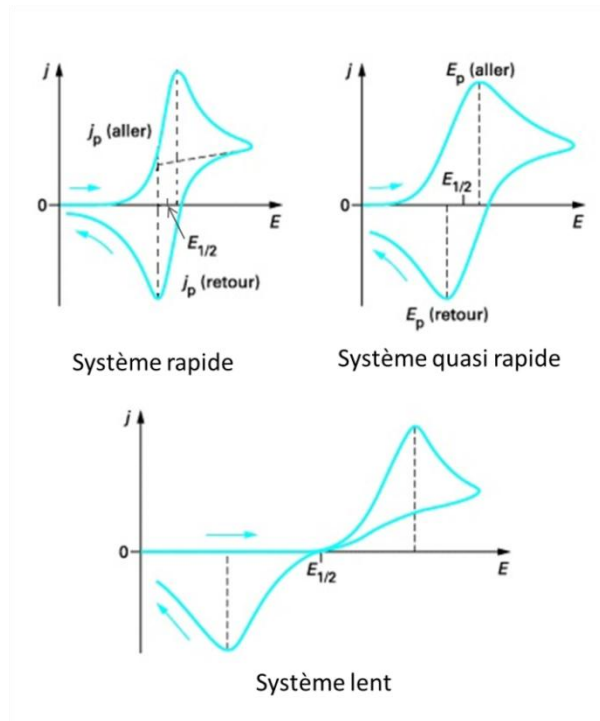


Figure 16 : Allure des voltampérogrammes cycliques rapide, quasi rapide et lent avec la valeur de $E_{1/2}$, (adapté de ³⁹)

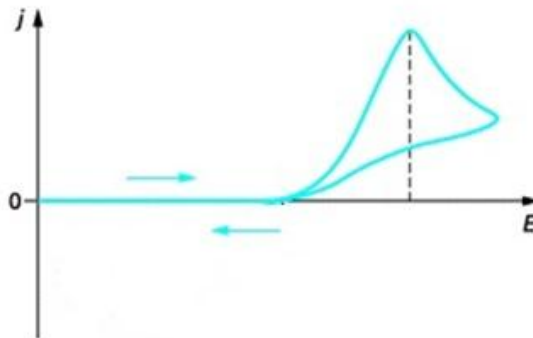


Figure 17 : Allure d'un voltampérogramme cyclique irréversible ³⁹

Les formes oxydée et réduite peuvent diffuser dans la solution, elles ne restent pas au niveau de la surface de l'électrode, ces diffusions dépendent du coefficient de diffusion D.

Le potentiel de demi-vague $E_{1/2}$ correspond à la demi-somme des pics anodique et cathodique tandis que le $E_{p/2}$ correspond au potentiel pour lequel l'intensité de courant vaut la moitié de I_{pa} , si l'on considère le pic d'oxydation ou la moitié de I_{pc} dans le cas du pic de réduction (Figure 15 et Figure 16). Il faut faire la distinction entre la valeur particulière $E_{1/2}$ en voltampérométrie cyclique et $E_{1/2}$ en polarographie. En effet, en polarographie, $E_{1/2}$ est défini comme étant la valeur de potentiel pour un courant correspondant à la moitié du courant limite ; le graphe de I en fonction de E est une vague se terminant par un plateau (courant limite) sans pic³⁹.

Dans le cas d'un système réversible (rapide), I_p peut être calculé en appliquant la relation de Randles-Sevcik. Cette équation montre que l'intensité du pic dépend non seulement de la concentration et des propriétés diffusionnelles de l'espèce électroactive, mais aussi de la vitesse de balayage^{42,43} :

$$I_p = 0,4463 \cdot \frac{\sqrt[3]{(nF)^2}}{\sqrt[2]{RT}} \cdot \sqrt[2]{D} \cdot \sqrt[2]{v} \cdot A \cdot C \quad (\text{Equation 8})$$

I_{pa} = intensité du pic en Ampère

n = nombre d'e- échangés

F = constante de Faraday en C/mol

R : constante des gaz parfaits (8,3144621 J/mol.K)

T : température en Kelvin (25°C soit 298,15 K)

A = surface de l'électrode en cm^2

C = concentration (en réducteur I_{pa}) en mol/cm^3

D = coefficient de diffusion (en réducteur I_{pa}) en cm^2/s

V = vitesse de balayage (V/s)

Soit à 25°C :

$$I_p = 2,69 \cdot 10^5 \cdot \sqrt[3]{n^2} \cdot \sqrt{D} \cdot \sqrt{v} \cdot A \cdot C \quad (\text{Équation 9})$$

Cette relation montre que pour une vitesse constante et en l'absence de phénomène d'adsorption, l'intensité de pic anodique est une fonction linéaire de la concentration et permet de quantifier l'analyte⁴³.

Dans les systèmes lents ou quasi rapides, l'écart entre les deux potentiels de pic est supérieur à 0,059/n V alors que dans un système réversible il est de 0,059/n V, avec n correspondant au nombre d'électrons échangés³⁹.

Lorsque l'espèce électroactive une fois oxydée ne peut plus être réduite par l'électrode de travail, le système est irréversible. Lorsque le balayage de potentiel est inversé, il n'y a pas de courant cathodique. Cette absence de retour à l'état initial de la molécule peut avoir plusieurs causes : (i) la molécule sous forme oxydée est stable, (ii) elle a quitté le champ réactionnel (complexation, dimérisation...), (iii) elle est détruite (hydrolyse), (iv) la gamme de potentiel explorée ne permet pas la réduction (Figure 17).

2.3 La voltampérométrie hydrodynamique

En voltampérométrie hydrodynamique, contrairement à la voltampérométrie cyclique, la solution est agitée durant tout le balayage de potentiel. Plusieurs variantes existent, soit la solution est agitée grâce à un agitateur magnétique, soit on fait tourner l'électrode de travail dans la solution à une vitesse rapide et constante, soit la mesure se fait à la sortie d'un tube dans lequel la solution s'écoule comme en analyse par injection dans un flux ou à la sortie d'une colonne de chromatographie liquide³⁷. Dans ce type d'analyse, le voltampérogramme est différent de celui obtenu en mode stationnaire. En effet, la solution étant agitée, aucun phénomène d'épuisement à la surface de l'électrode n'a lieu : il n'y a donc pas de pic mais bien un plateau. De plus, les molécules oxydées (ou réduites selon le cas) ne restent pas à la surface de l'électrode mais sont dispersées dans la solution et donc diluées ; aucun courant ne peut être détecté lors du balayage de potentiel retour.

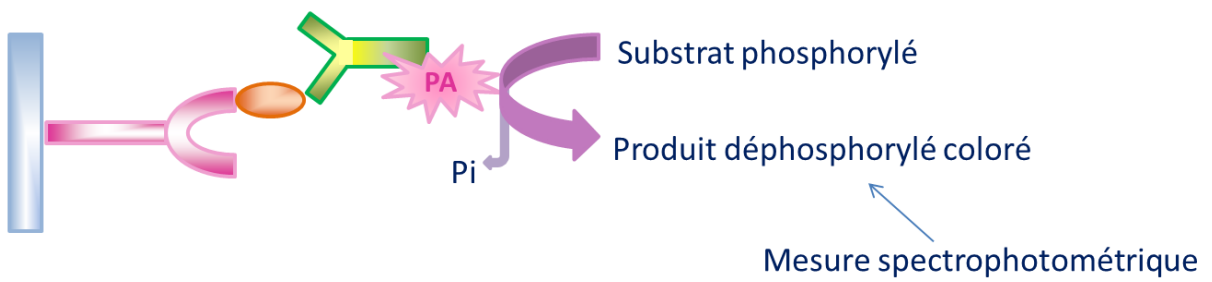


Figure 18 : Immunoessai de type sandwich dont le second anticorps est marqué par la phosphatase alcaline (PA), la détection du produit coloré est réalisée par spectrophotométrie

2.4 Ampérométrie

L'ampérométrie découle de la voltampérométrie mais ici, le potentiel est fixe. La mesure de l'intensité du courant est réalisée, en mode hydrodynamique, à un potentiel tel que l'espèce électrochimique est soit oxydée soit réduite. La concentration est proportionnelle à ce courant. Afin de déterminer le potentiel de mesure, un balayage voltampérométrique doit être préalablement réalisé. Le potentiel optimal est choisi au niveau courant limite de diffusion (dans le plateau) afin de minimiser les variations de courant en cas de légères modifications du potentiel^{37,38,41}.

2.5 Amplification enzymatique

Avant les années 1980, les immunoessais étaient déjà couramment utilisés pour la détermination d'une large gamme d'analytes. Ceux-ci étaient habituellement marqués par un radio-isotope, une substance fluorescente ou une enzyme. Cependant, ils étaient limités par la limite de détection de l'antigène ou l'anticorps marqués. Les dosages radio-immunologiques ont longtemps prédominé en raison de leur bonne sensibilité mais ils présentent de nombreux inconvénients tels que les dangers des rayonnements ionisants, la nécessité d'un équipement de mesure complexe, le temps d'analyse long ainsi que le coût. Leur limite réelle de sensibilité est due au degré d'incorporation des radio-isotopes aux antigènes ou aux anticorps et l'inévitable dégradation pendant le stockage⁴⁴. Les marqueurs fluorescents ont également des désavantages comme la nécessité d'utiliser un équipement coûteux pour leur détermination. De plus, ils sont particulièrement difficiles à standardiser. Afin de résoudre les problèmes rencontrés avec les marqueurs radio-isotopes et fluorescents, des enzymes sont maintenant utilisées. Les enzymes sont choisies pour leur capacité à catalyser des réactions avec un rendement élevé et faciles à mesurer. En général, le produit final généré est coloré et mesuré par spectrophotométrie (Figure 18)⁴⁵. Mais, il existe des désavantages à ce type de marquage : la liaison à l'enzyme peut entraîner une diminution de son activité et l'enzyme doit être présente en concentration suffisante pour être détectée. Pour remédier à ce problème, un marqueur enzymatique ainsi que son substrat peuvent être choisis de telle sorte que le produit de la réaction enzymatique ne soit pas directement détecté mais qu'il forme un activateur catalytique dont chaque molécule est capable de générer de nombreuses molécules détectables, ce qui provoque une amplification du signal mesuré.

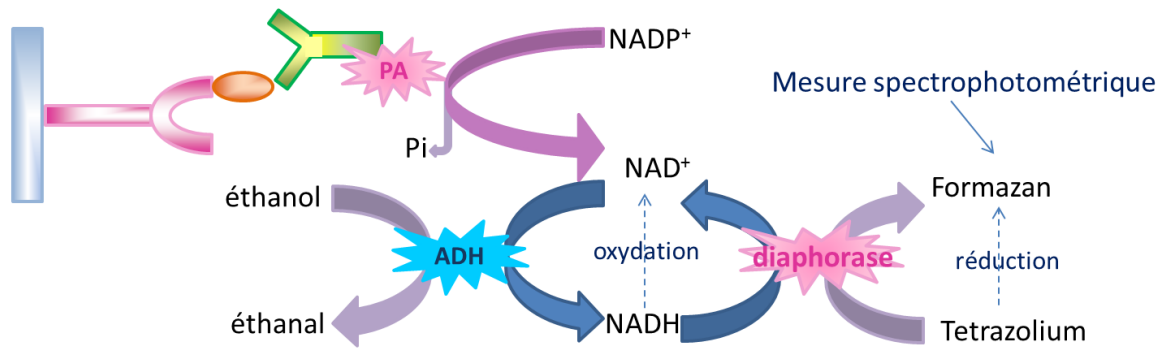


Figure 19 : Immunoessai de type sandwich dont le second anticorps est marqué par la phosphatase alcaline (PA) avec amplification enzymatique impliquant l'alcool déshydrogénase (ADH) et la diaphorase, la détection du produit coloré final est réalisée par spectrophotométrie

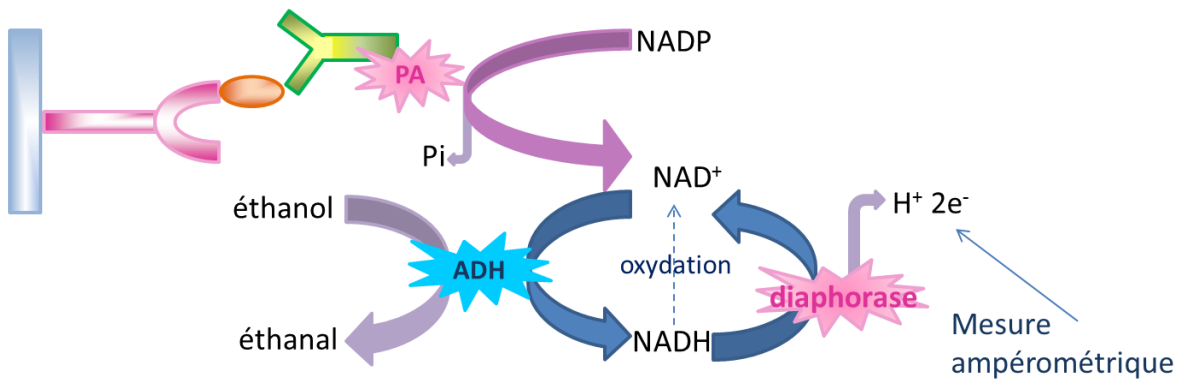


Figure 20 : Immunoessai de type sandwich dont le second anticorps est marqué par la phosphatase alcaline (PA) avec amplification enzymatique impliquant l'alcool déshydrogénase (ADH) et la diaphorase. L'oxydation du site actif de la diaphorase est réalisée par ampérométrie

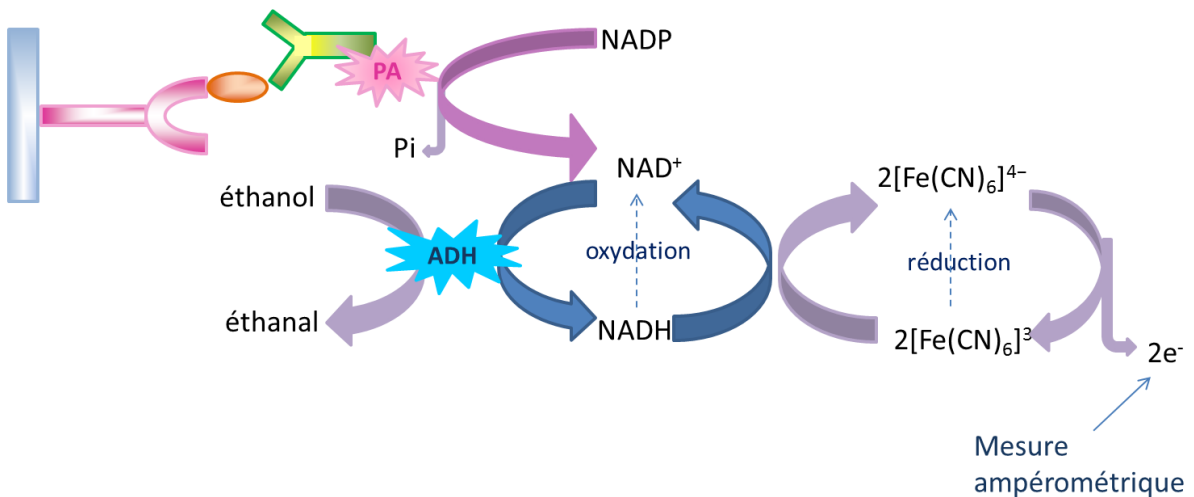


Figure 21 : Immunoessai de type sandwich dont le second anticorps est marqué par la phosphatase alcaline (PA) avec amplification enzymatique impliquant l'alcool déshydrogénase (ADH). Le ferricyanure sert de médiateur pour le transfert d'électron, permettant une mesure ampérométrique

Le principe de l'amplification enzymatique a été breveté par Colin Henry Self en 1988⁴⁶. Il est basé sur l'observation suivante : l'enzyme utilisée comme marqueur dans un dosage immunologique ou un dosage analogue peut être une enzyme qui produit, directement ou indirectement, une substance capable d'influencer un événement catalytique sans être elle-même consommée pendant l'évènement catalytique⁴⁶.

Self a démontré le principe de l'amplification enzymatique en capturant la phosphatase alcaline placentaire à partir d'une solution par un anticorps monoclonal lié à une phase solide⁴⁷. La quantité d'enzyme liée aux anticorps est évaluée de la façon suivante : (i) l'enzyme est exposée au nicotinamide adénine dinucleotide phosphate (NADP), qu'elle déphosphoryle en nicotinamide adénine dinucleotide (NAD), (ii) NAD^+ est l'activateur catalytique pour le système secondaire, qui fonctionne de façon cyclique par interconversion avec NADH. La réduction de NAD^+ est provoquée par l'alcool déshydrogénase et l'oxydation ultérieure de NADH par l'action de la diaphorase qui réduit simultanément un sel de tétrazolium, par exemple le p-iodonitrotétrazolium violet, en un produit coloré, le formazan, déterminé par spectrophotométrie (Figure 18). Dans ce système, le NAD^+ nécessaire à la seconde réaction et permettant la production du produit coloré n'est jamais épuisé puisque régénéré, ce qui permet l'amplification du signal^{44,48}.

Plusieurs articles ont été publiés, décrivant différents immunoessais, entre autres pour le dosage de la phosphatase alcaline dans le cancer des testicules, des Chlamydia trachomatis et de la TSH, utilisant le même principe d'amplification enzymatique, facilité par la commercialisation d'un kit d'amplification par IqBio Ltd (Cambridge, UK)⁴⁹⁻⁵¹.

Ce principe d'immunoessais à amplification enzymatique a été adapté aux mesures électrochimiques en 1988 par Stanley et ses collaborateurs. Plusieurs variantes avec le marquage par l'alcaline phosphatase et le NADP comme substrat sont possibles. Soit une électrode de travail est utilisée à la place du sel tétrazolium comme accepteur d'électrons pour oxyder directement le site actif de l'enzyme diaphorase (Figure 20), soit le sel de tétrazolium est remplacé par le transporteur d'électrons ferricyanure de potassium qui sert de médiateur pour le transfert d'électrons du cycle $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ à une électrode de platine (le ferricyanure est réduit en ferrocyanure et l'électrode oxyde le ferro en ferricyanure) (Figure 21)⁵². Auparavant, la phosphatase alcaline avait déjà été utilisée lors d'immunoessais ampérométrique. En utilisant le phénylphosphate comme substrat, du phénol est libéré et dosé ampérométriquement. Dans ce cas, le substrat de l'enzyme n'est pas régénéré, il n'y a

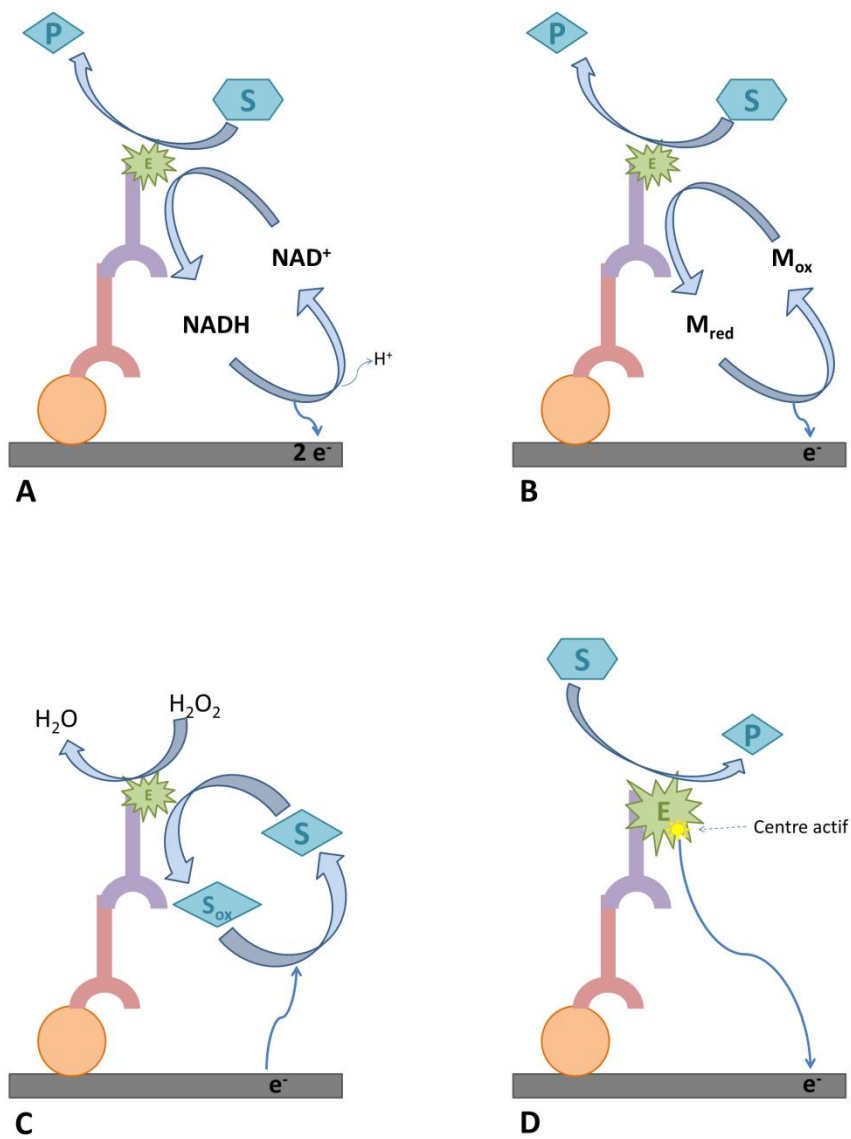


Figure 22 : Schémas des différentes stratégies de détection d'un marqueur enzymatique par ampérométrie adapté de⁴³

donc pas d'amplification enzymatique⁵³. A la même époque, la glucose oxydase a également été utilisée comme marqueur avec l'utilisation de ferrocène comme médiateur redox. Le médiateur va permettre de mesurer rapidement l'activité de l'enzyme sans nécessiter une étape d'incubation séparée⁵⁴.

2.5.1 Détection électrochimique de l'enzyme

Plusieurs stratégies peuvent être envisagées pour détecter un marqueur⁴³ :

- Détection de la consommation du cofacteur enzymatique, par exemple, en mesurant par oxydation le NADH produit à partir du NAD^+ lors d'un marquage avec une déshydrogénase (Figure 22A).
- Utilisation d'un médiateur redox, c'est-à-dire une petite molécule hautement réactive vis-à-vis de l'enzyme et facilement détectable électrochimiquement. L'activité de l'enzyme est amplifiée car elle ne dépend plus de son activation par son cofacteur, de plus l'état initial du médiateur est continuellement renouvelé lors de la réaction avec l'électrode (Figure 22B).
- Détection du produit de la réaction avec amplification enzymatique dans le cas où la détection électrochimique régénère le substrat comme dans le cas du système HQ/HRP avec détection de la quinone (Q) (Figure 22C).
- Détection par transfert direct d'électrons entre l'enzyme et l'électrode. L'enzyme est régénérée à l'électrode mais il n'y a pas réellement d'amplification enzymatique. Ce mode de détection n'est possible qu'avec des enzymes activées par changement d'état d'oxydation comme par exemple HRP (Figure 22D).



Figure 23 : Planche botanique de *Armoracia rusticana*⁵⁵

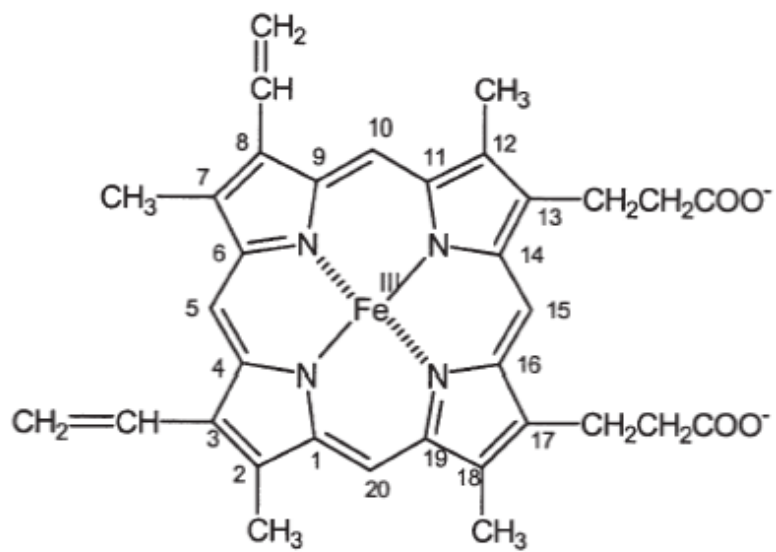
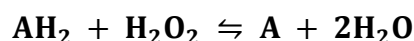


Figure 24 : Noyau hémique de l'isoenzyme C de la peroxydase de raifort⁴³

2.5.2 Cas particulier de la peroxydase de raifort

La peroxydase de raifort (HRP), comme son nom l'indique est issue du raifort (*Armoracia rusticana* P.Gaertn., B.Mey. & Scherb) et plus précisément de la racine. Le raifort est une plante vivace de la famille des *Brassicaceae*, sous-famille des *Brassicoideae*, aux longues racines charnues, feuilles rugueuses, panicules de fleurs blanches à quatre pétales (Figure 23). Le nom raifort provient du vieux français "raiz" (racine) et "fors" (âcre et piquant). En effet, la racine râpée, utilisée comme condiment, a un gout piquant proche de celui de la moutarde⁵⁶.

La peroxydase de raifort mise en évidence au 19^{ème} siècle est à l'heure actuelle l'une des enzymes la plus utilisée, en raison de son grand turn-over et de la facilité avec laquelle on la combine à des molécules porteuses et à la grande variété de ses substrats. Elle fait partie de la famille des peroxydases végétales et est une oxydoréductase (donneur d'hydrogène, peroxyde oxydoréductase, EC 1.11.1.7) qui catalyse l'oxydation d'une large variété de composés (AH₂) en présence de peroxyde d'hydrogène :



Comme toutes les peroxydases, l'HRP transfère de l'hydrogène d'un donneur d'hydrogène vers H₂O₂. Sa masse moléculaire relative est d'environ 44 kDa. Il existe une trentaine de formes différentes dont l'isoenzyme C de l'HRP qui est la plus abondante⁵⁷.

La structure covalente de l'enzyme native a été identifiée par Welinder en 1976⁵⁸. L'HRP est constituée d'un noyau hémique et d'une chaîne polypeptidique de 308 résidus d'acides aminés incluant quatre ponts disulfures entre les résidus de cystéine 11–91, 44–49, 97–301 et 177–209, deux ions Ca²⁺ et 8 chaînes latérales carbohydatées attachées au niveau des résidus d'asparagine 13, 57, 158, 186, 198, 214, 255 et 268. Les substrats aromatiques de l'enzyme se lient au niveau de la face exposée de l'hème entre les carbones 18 et 20 et non pas à l'atome de fer et y sont oxydés (Figure 24)⁵⁸.

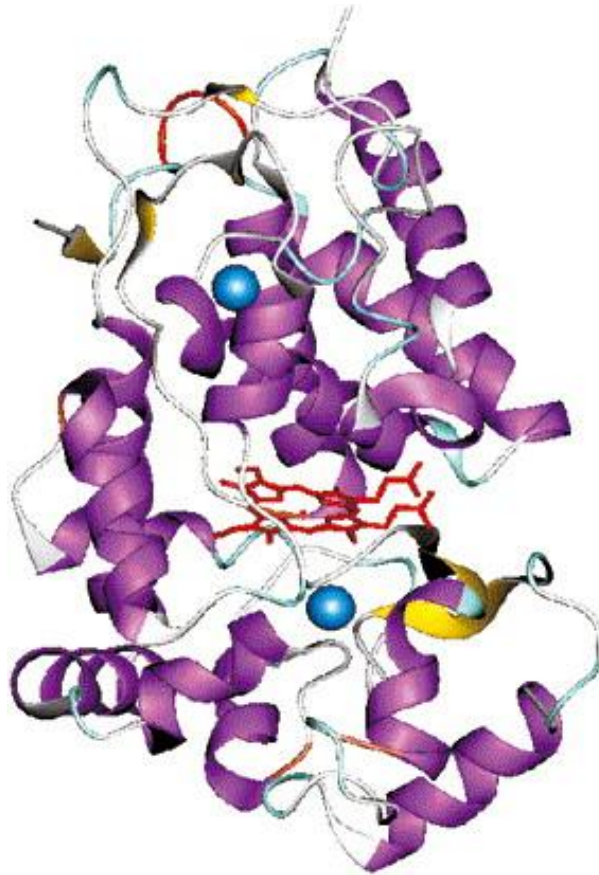


Figure 25 : Représentation en trois dimensions de la structure isoenzyme C de la peroxydase de raifort. Le groupe hème (rouge) est situé entre les domaines distaux et proximaux qui contiennent chacun un atome de calcium (sphères bleues). Les feuillets β et les hélices α sont respectivement indiqués en violet et jaune⁵⁹

Le Tableau 1 reprend le rôle de quelques acides aminés essentiels à l'activité de la peroxydase de raifort.

	Rôle
Arg 38	Joue un rôle essentiel dans la formation et la stabilisation du composé I et au niveau de la liaison et de la stabilisation des ligands et des substrats aromatiques
Phe 41	Empêche l'accès du substrat au groupe oxoferryl du composé I
His 42	Accepte les protons de H ₂ O ₂ et joue également un rôle au niveau de la liaison et de la stabilisation des ligands et des substrats aromatiques
Asn 70	Maintient la basicité de His 42 grâce à la formation d'un pont hydrogène entre l'oxygène de la fonction amide de l'asparagine (Asn 70) et l'azote de la fonction imidazole de l'histidine (His 42)
Pro 139-Ala 140-Pro 141	Motif présent dans toutes les peroxydases végétales
His 170	Liée de manière covalente à l'hème (lien de coordination avec l'atome de fer)

Tableau 1 : Rôle de quelques résidus acides aminés au niveau de l'HRP⁵⁹

Les ions calcium sont indispensables pour maintenir la structure tertiaire de l'enzyme, la perte d'un des deux ions entraîne une diminution de 40 % de l'activité enzymatique. Le calcium distal forme un lien hydrogène avec la Glu 64 qui est liée également par un pont hydrogène à Ans 70, ce qui le connecte à la poche hémique⁵⁹.

En 1990, Smith et ses collaborateurs, ont réussi à produire de l'HRP C non glycosylée recombinante. En effet, un gène synthétique codant pour HRP C a été exprimé dans *Escherichia coli*. Ils ont également démontré que la glycosylation n'est pas essentielle à l'activité de l'enzyme⁶⁰. Enfin, la structure tertiaire de HRP C a été résolue avec une précision de 2,15 Angstroms par cristallographie en 1997 par Gajhede et son équipe⁶¹.

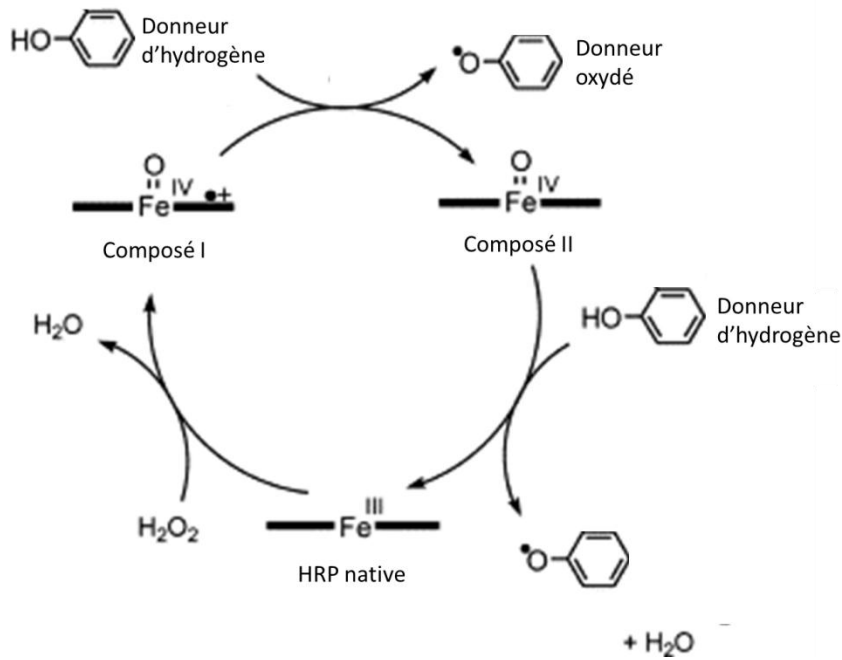


Figure 26 : Schéma du cycle catalytique de HRP : oxydation en une étape de HRP natif par H_2O_2 en composé I et réduction en deux phases du composé I en présence d'un donneur d'hydrogène (phénol) adapté de ^{43,59}

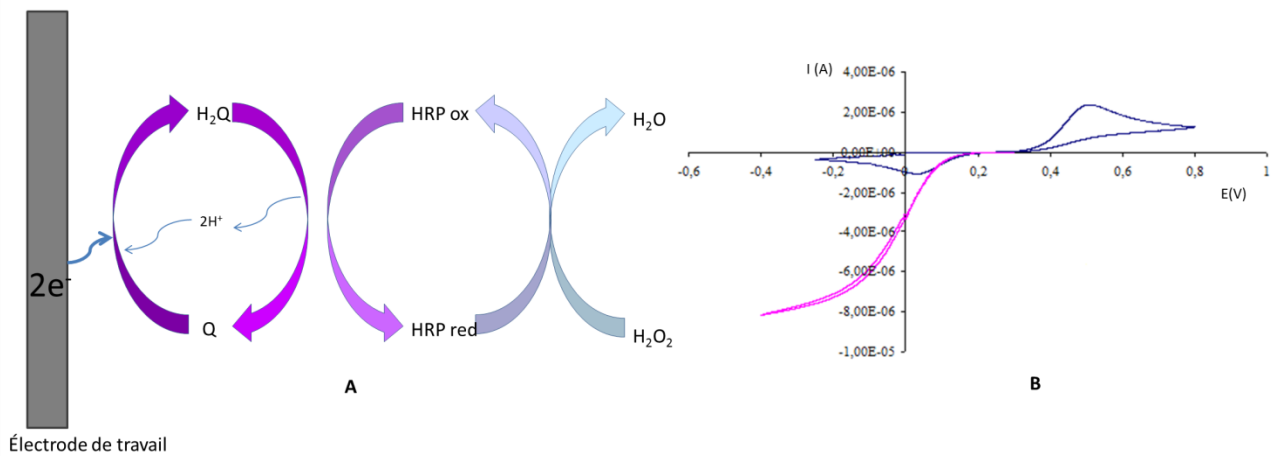


Figure 27 : A : Processus de l'amplification enzymatique impliquant l'hydroquinone (H_2Q), l'HRP et H_2O_2 . B : voltampérométrie cyclique de l'hydroquinone ($2 \times 10^{-4} M$) en bleu en l'absence de H_2O_2 et d'HRP : séquence de potentiel $0 \rightarrow 800 \rightarrow -200 \rightarrow 0 mV$. En rose : en présence de H_2O_2 ($20 mM$) et d'HRP ($5 \times 10^{-7} M$) : séquence de potentiel $0 \rightarrow 400 \rightarrow -400 \rightarrow 0 mV$. Vitesse de balayage : $10 mV/s$

2.5.2.1 *Electrocatalyse enzymatique*

La peroxydase (Fe III) se combine au peroxyde d'hydrogène qui oxyde le groupe hémique en composé I (Fe IV sous forme d'oxoferryl, radical cation porphyrrique $[\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]^+$). En l'absence de donneur d'électrons convenable ou en présence de trop faibles concentrations en peroxyde, le composé I se décompose lentement. En présence d'un donneur d'électrons, le composé I est réduit au stade initial par transfert de deux électrons en étapes successives: la première conduit au composé II (Fe IV sous forme d'oxoferryl ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$)) et le radical libre résultant de l'oxydation du donneur, la seconde régénère l'enzyme native (Fe^{III}) et à nouveau un radical libre. Donc, l'état original est restauré en deux étapes de réduction du composé I par un donneur d'hydrogène (Figure 26). Une couleur rouge ou verte (composés III et IV, respectivement) apparaît s'il y a un excès de substrat. Les composés III et IV sont des formes inactives. Un excès de peroxyde d'hydrogène inactive également l'enzyme. Il est donc important d'utiliser des concentrations optimales de substrat et de peroxyde d'hydrogène⁵⁷.

La stratégie de détection ampérométrique de HRP se base sur le fait que HRP va oxyder son substrat et que ce substrat oxydé peut être réduit par l'électrode de travail, reprendre sa forme initiale et à nouveau être oxydé par HRP et ainsi de suite. Ce mode de détection implique que le substrat n'est jamais épuisé et que la surface de l'électrode ne l'est jamais en produit oxydé.

Une voltampérométrie cyclique d'une solution d'hydroquinone (HQ) et d'HRP, à une faible vitesse de balayage (10 mV/s), pour laisser le temps à la réaction enzymatique de se faire, réalisée en présence et en absence de H_2O_2 , permet de visualiser cette amplification.

Le voltampérogramme cyclique de l'HQ seule possède une allure classique avec un pic d'oxydation suivi d'une diminution du courant due à l'épuisement de la surface de l'électrode en HQ suivi d'un pic de réduction des molécules oxydées se trouvant au voisinage de l'électrode de travail. Par contre l'allure du voltampérogramme de l'HQ en présence de HRP activée par son cofacteur est totalement différente. En effet, aucun courant d'oxydation n'est enregistré ce qui peut facilement s'expliquer par le fait que l'hydroquinone est oxydée par l'enzyme plutôt que par l'électrode. Le pic de réduction prend l'allure d'une vague caractéristique d'un processus catalytique c'est-à-dire un processus où la surface de l'électrode n'a pas l'occasion d'être épuisée en espèces quinones grâce à sa production continue par HRP⁶². Au fur et à mesure que l'hydroquinone est oxydée en quinone par HRP, la quinone est réduite en hydroquinone par l'électrode et peut de nouveau être oxydée par HRP et ainsi de suite (Figure 27).

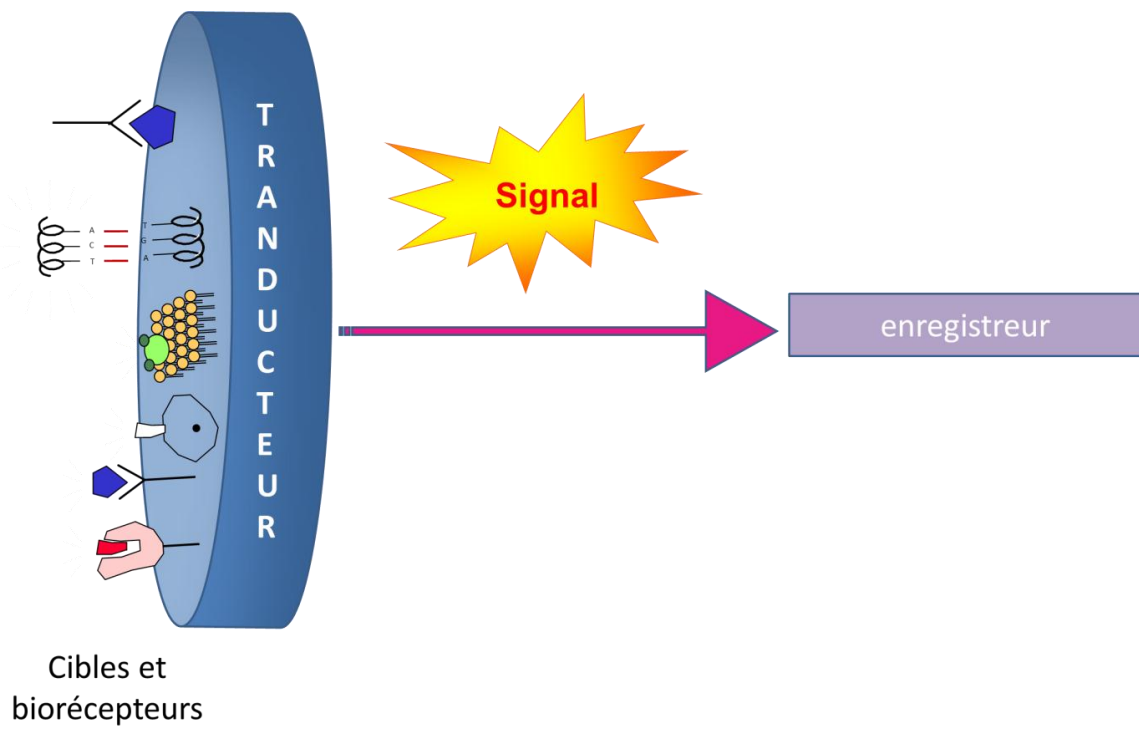


Figure 28 : Schéma d'un biocapteur

3. Les biocapteurs

Le terme biocapteur a longtemps été débattu. Initialement, le terme biocapteur a été utilisé pour décrire n'importe quel capteur utilisé conjointement à un système vivant. Mais cette définition ne donnait pas de limite, si bien que n'importe quelle technique utilisée pour sonder une plante, un animal ou un micro-organisme pouvait être qualifiée de biocapteur. Ensuite, une distinction a été faite entre (i) les techniques analytiques qui investissent des systèmes vivants comme étant une biosonde telle que peut l'être une sonde à pH ou une sonde de température et (ii) les techniques analytiques utilisant un élément biologique mais pas nécessairement dans un contexte biologique, par exemple une électrode à enzyme^{63,64}. En 1987, Anthony Turner définissait un biocapteur comme étant un dispositif d'analyse incorporant un élément de détection biologique ou d'origine biologique associé ou intégré à un transducteur physico-chimique. En 1992, l'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) établit une définition selon laquelle un biocapteur est un dispositif qui utilise des réactions biochimiques spécifiques induites par des enzymes isolées, des systèmes immunologiques, des tissus, des organites ou des cellules entières pour détecter des composés chimiques habituellement par des signaux électriques, thermiques ou optiques⁶⁵. Cette définition a été complétée en 1996 pour les biocapteurs électrochimiques et par extension pour les biocapteurs en général. Un biocapteur électrochimique est un dispositif autonome intégré, qui est capable de fournir une information analytique quantitative ou semi-quantitative spécifique à l'aide d'un élément de reconnaissance biologique (récepteur biochimique) qui est maintenu en contact direct avec un transducteur électrochimique. Théoriquement, contrairement aux dispositifs de bioanalyse, un biocapteur ne doit pas nécessiter des étapes de traitement supplémentaires telles que l'addition d'un réactif, le traitement d'un échantillon etc. Un dispositif à usage unique, et incapable de contrôler la concentration de l'analyte en continu ou après une régénération rapide et répétable, doit être désigné par le terme biocapteur à usage unique (Figure 28)¹.

Les définitions reprises ci-dessus, ne sont pas toujours respectées dans la mesure où, dans la littérature scientifique, le nom biocapteur est utilisé dès qu'un élément de reconnaissance biologique est associé à un transducteur, qu'il nécessite ou pas des étapes de traitement supplémentaires.

Le concept de biocapteur a été inventé par Leyland C. Clark en 1962 avec la mise au point de la première électrode à enzyme dédiée au dosage du glucose⁶⁶. En effet, Clark s'est basé sur des travaux antérieurs concernant un capteur à oxygène pour stipuler que la détection électrochimique de l'oxygène ou du peroxyde d'hydrogène pourrait être utilisée comme base pour un large éventail d'instruments bioanalytiques, par l'incorporation d'enzymes immobilisées appropriées⁶⁷. Le biocapteur à glucose, actuellement utilisé par de nombreux diabétiques pour contrôler leur glycémie à domicile, découle des travaux de Clark. En 1984, Anthony Cass, sous la direction d'Anthony Turner, publie un article dans *Analytical Chemistry*, intitulé « Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose »⁵⁴. Cet article est le premier d'une longue série décrivant une technique de dosage du glucose utilisant une électrode modifiée par la glucose oxydase en présence d'un médiateur rédox.

Les biocapteurs peuvent être classés de différentes manières, soit en fonction de l'élément de reconnaissance biologique, soit en fonction du transducteur. Une distinction peut également être faite entre les biocapteurs biocatalytiques (enzymes, cellules entières, organelles) pour lesquels la reconnaissance et la liaison de l'analyte sont suivies par un changement chimique et les biocapteurs d'affinité (anticorps, antigènes, ADN, aptamères, récepteurs membranaires) pour lesquels la liaison n'entraîne pas de réaction chimique.

3.1 Eléments de reconnaissance biologique

L'élément de reconnaissance biologique dépend du type de composant à analyser. Il sera

- une enzyme pour son substrat ou son inhibiteur
- un anticorps pour son antigène
- un antigène pour son anticorps
- un récepteur pour son ligand
- un brin d'ADN pour sa séquence complémentaire
- ...

Dans le cas de l'utilisation d'un anticorps pour doser un antigène et inversement, le biocapteur est appelé immunocapteur.

3.2 Transducteur

En fonction du transducteur utilisé le biocapteur sera :

- optique dans le cas de fibres optiques
- à résonance plasmonique de surface dans le cas d'une fine surface d'or associée à une mesure de l'angle de réfraction
- calorifique dans le cas de thermistance (basé sur la variation de la résistance électrique en fonction de la température)
- électrochimique dans le cas d'électrode ; le biocapteur électrochimique peut être ampérométrique, potentiométrique, à mesure d'impédance, électrochimiluminescence, ...
- conductimétrique dans le cas de microélectrodes interdigitées
- piézoélectrique dans le cas d'une microbalance à cristal de quartz

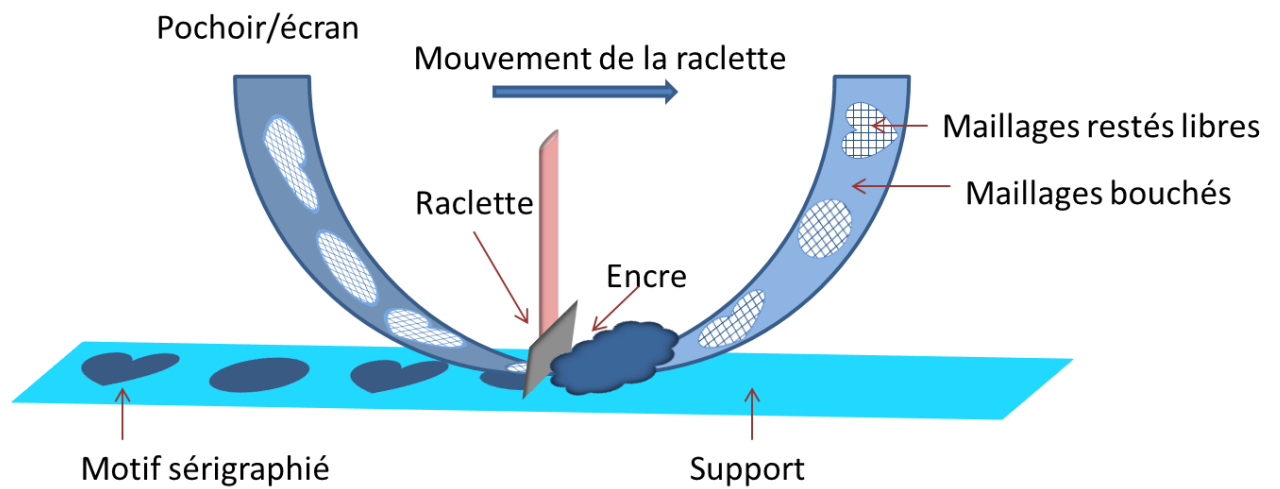


Figure 29 : Principe de la sérigraphie : Pochoir/écran : le tissu tendu dans un cadre est rendu imperméable à l'encre par l'action d'une émulsion photosensible (UV) durcissant (maillages bouchés), les parties du tissu non exposées aux UV restent perméables à l'encre (maillages restés libres). Raclette : pousse l'encre à travers le maillage non durci sur le support afin d'imprimer le motif

4. Les supports utilisés

4.1 Les électrodes sérigraphiées

4.1.1 La sérigraphie

La sérigraphie est une technique d'impression qui consiste à faire passer, à l'aide d'une raclette, une encre à travers un maillage très fin pour être déposée sur un support. Le maillage va jouer le rôle de pochoir dont le motif déposé aura la forme. Le nom sérigraphie vient du latin *sericum* la soie, en référence au pochoir en tissu de soie, et du grec *graphein* l'écriture (Figure 29)⁶⁸⁻⁷⁰.

Cette technique est utilisée pour de nombreuses applications comme l'impression de motifs sur du textile, d'affiches, de circuits électroniques ou d'électrodes.

La sérigraphie a largement été utilisée par les représentants du courant artistique Pop art à partir du milieu des années 1950. Ce mouvement consiste à utiliser des objets de la vie courante et à en faire une œuvre d'art afin de dénoncer la société de consommation. Ces artistes exploitent des produits utilisés dans le monde industriel comme la sérigraphie afin de reproduire à l'infini une image. L'artiste le plus connu issu de ce mouvement ayant utilisé la sérigraphie est Andy Warhol. Il a reproduit en série, entre autres des portraits de personnalités comme Marylin Monroe ou Mao, les transformant en produits de consommation⁷¹.

Début des années 1980, la firme Medisense a eu l'idée d'utiliser la sérigraphie pour produire des électrodes à enzyme⁷². L'utilisation de cette technique a été un élément décisif dans le succès des dispositifs électrochimiques médicaux pour doser le glucose à l'aide d'un appareil miniaturisé⁶⁴. A partir de là, la technologie de l'impression par sérigraphie a été transposée avec succès pour produire des électrodes dites sérigraphiées. C'est une cellule électrochimique complète qui est imprimée sur un support de 3 à 4 cm². Les électrodes sérigraphiées comprennent une électrode de référence, une électrode auxiliaire et une ou plusieurs électrodes de travail sur une même languette. Elles sont bon marché, facilement produites en série, portables, leur surface est modifiable et elles sont jetables (Figure 30).

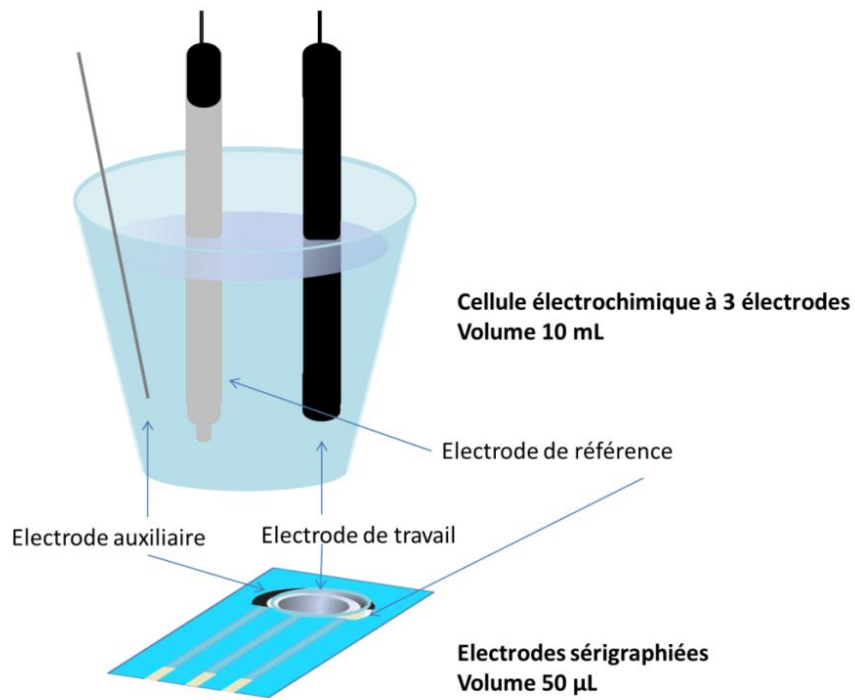


Figure 30 : Comparaison d'une cellule électrochimique classique avec une tigelette de SPE

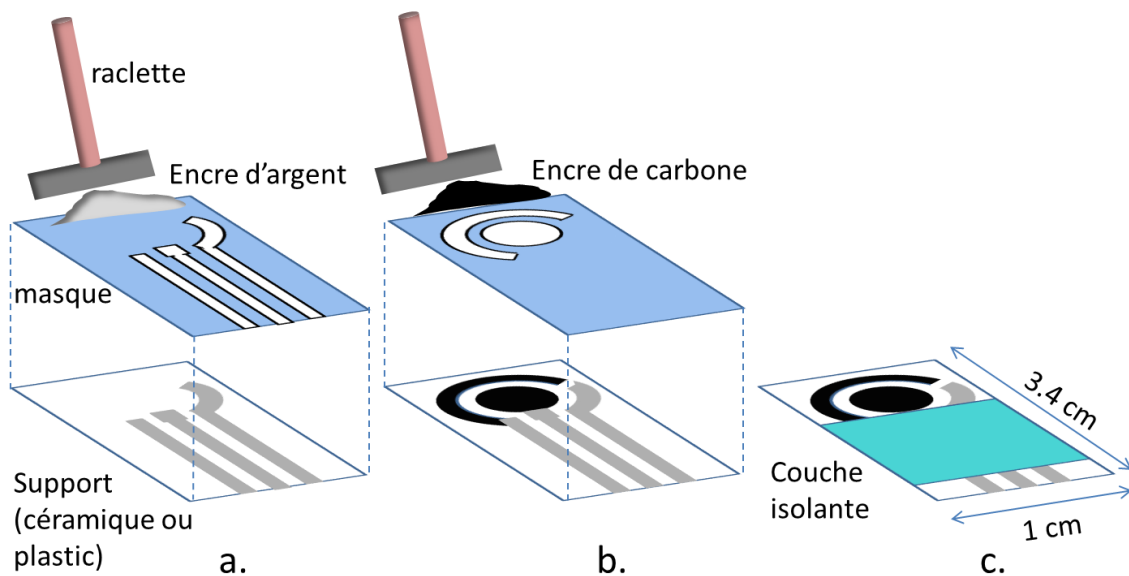


Figure 31 : Fabrication d'électrodes sérigraphiées (a) application de l'encre d'argent constituant les connexions et l'électrode de référence (b) application de l'encre de carbone constituant les électrodes de travail et auxiliaire (c) application d'une couche isolante

4.1.1.1 Fabrication des électrodes sérigraphiées

Une encre conductrice est appliquée sur des supports plats qui peuvent être la céramique ou le plastique. L'encre contient des particules de carbone ou de métaux comme l'or, l'argent ou le platine. Après avoir appliqué l'encre sur le support, celle-ci peut être chauffée pour permettre sa solidification. Tant les électrodes que les connexions électriques sont sérigraphiées. Généralement, les connexions sont réalisées avec une encre contenant de l'argent. Une couche isolante recouvre le support et quasiment la totalité des contacts en argent, tout en laissant les électrodes apparentes (Figure 31).

4.1.2 Les encres

L'encre est constituée d'un liant (mélange de polymères), d'un solvant et d'un matériau conducteur (particules de graphite, d'or, d'argent...). Les encres à base de carbone sont souvent utilisées, car le carbone est bon conducteur, relativement peu coûteux, facile à modifier et chimiquement inerte⁷³. La composition et le comportement des encres à base de carbone sont assez similaires à la pâte de carbone. Celle-ci a été développée au début des années 1960 par R. Adams⁷⁴. Elle est composée de particules de graphite et d'une huile minérale non miscible à l'eau et non conductrice comme par exemple la paraffine liquide. Les électrodes à pâte de carbone présentent un faible courant capacitif dans un large domaine de potentiel, leurs surfaces peuvent être facilement renouvelées, elles peuvent être modifiées par divers (bio)réactifs, l'analyte peut être préconcentré sur l'électrode etc. En dépit de leurs propriétés intéressantes, les électrodes à pâte de carbone n'ont pas suscité beaucoup d'intérêt dans l'industrie pharmaceutique et les laboratoires de contrôle des médicaments probablement en raison du renouvellement manuel de la surface et des exigences de lissage de la surface qui affectent la reproductibilité des résultats. Une alternative à la pâte de carbone consiste à mélanger le graphite avec de l'époxy ou de la silicone. Les électrodes qui en résultent s'appellent des électrodes en carbone composite⁷⁵. Ces électrodes sont plus rigides et plus stables sous conditions hydrodynamiques et dans les solvants organiques que les électrodes à pâte de carbone^{76,77}. Ces électrodes n'ont cependant pas encore obtenu de succès commercial. L'électrode de travail (en carbone) des électrodes sérigraphiées peut être considérée comme une version miniature et jetable des électrodes composites ou à pâte de carbone conçues dans une configuration à trois électrodes.

En plus du design des trois électrodes « tout en un », les avantages des SPE sont multiples :

- Configuration plane
- Volume de l'échantillon de l'ordre de 50 μL
- Facilité de production de masse
- Surface reproductible (RSD < 5 %)
- Surface facilement modifiable
- Dispositif à usage unique : pas d'effet mémoire
- Aucun traitement manuel de la surface n'est nécessaire
- Applicable à la fois aux composés inorganiques et organiques
- Adapté comme détecteur en microfluidique (LC, FIA)

Ces avantages devraient relancer l'intérêt de l'électroanalyse en général et plus particulièrement dans les secteurs médicaux, environnementaux et agroalimentaire.

Les électrodes sérigraphiées discutées dans ce travail ont une électrode de travail en carbone.

4.1.3 Modification de la surface de carbone des électrodes sérigraphiées

La surface de l'électrode de travail des électrodes sérigraphiées peut être modifiée dans le but d'augmenter sa sensibilité ou sa sélectivité.

4.1.3.1 Sensibilité

- Les allotropes du carbone (Figure 32)

Le carbone, à l'état solide, peut se trouver sous différentes formes cristallines : graphite, diamant, graphène, fullerène... La structure du graphite est constituée d'un empilement de plans, chacun étant constitué d'hexagones formant une structure en nid d'abeilles. Chaque atome est lié à trois atomes de carbone dans le même plan avec une distance de la liaison de 0,142 nm. Les liaisons reliant deux plans sont des liaisons faibles et font 0,34 nm. Ces plans peuvent facilement glisser les uns sur les autres. Par contre, les atomes de carbone du diamant sont reliés à quatre autres atomes constituant le réseau cristallin cubique. Toutes les liaisons

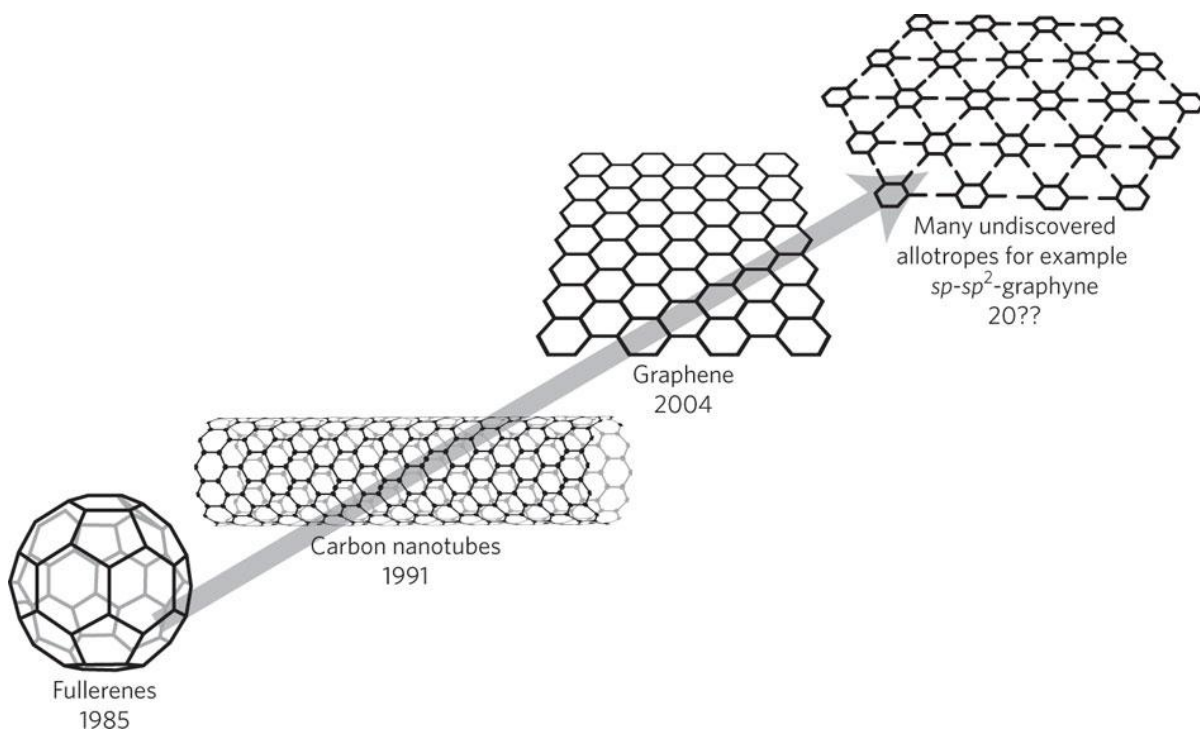


Figure 32 : Représentation schématique de différents allotropes du carbone avec leur année de découverte⁷⁸

sont fortes. La longueur de ces liaisons est de 0,136 nm. Les fullerènes sont constitués de minimum 60 atomes de carbone. L'assemblage des atomes de carbone peut prendre plusieurs formes. Le fullerène peut être sphérique (ballon de football ou buckyball) avec les atomes de carbone répartis sur des polyèdres, ce type de structure s'appelle Buckminsterfullerene⁷⁹. Il peut aussi être cylindrique avec les atomes de carbone formant un nid d'abeilles, on parle dans ce cas de nanotubes de carbone (CNT).

Il existe deux types de CNT : (i) à parois multiples (MWCNT) observé pour la première fois en 1991, par Sumio Iijima au microscope électronique⁸⁰ et (ii) à paroi unique (SWCNT), créé deux ans plus tard par Sumio Iijima et Donald Bethune⁸¹. Les CNT ont une structure cylindrique dont le diamètre interne est de l'ordre du nanomètre pour les SWCNT et plusieurs cylindres concentriques séparés de 0,34 nm pour les MWCNT ; les parois multiples peuvent aussi être le résultat d'un enroulement hélicoïdal. Leur longueur est proche du micromètre. Les CNT ont des propriétés électriques uniques, une grande surface spécifique et sont très résistants. Ils sont constitués d'une feuille de graphène (carbone formant des hexagones) enroulée sur un cylindre, les extrémités du cylindre peuvent être fermées chacune par 6 pentagones. Les liaisons des carbones de ces structures hexagonales sont des liaisons sp^2 plus résistantes que les liaisons sp^3 que l'on retrouve dans le diamant⁸². Les CNT sont cent fois plus résistants que l'acier et six fois plus légers. De plus, après pliage, les CNT ont la propriété de reprendre leur forme initiale. Les CNT ont également des propriétés électriques particulières, si le cylindre est placé perpendiculairement à une surface (comme par exemple la surface d'une électrode) et qu'un courant électrique est appliqué, les électrons vont se condenser à l'extrémité du cylindre et être émis à une grande vitesse. Comme l'extrémité du CNT est très fine, cette émission se fait déjà à de faibles potentiels⁸³. Le graphène est constitué d'un feuillet de graphite, c'est donc un réseau de carbone bidimensionnel en nid d'abeilles. Un feuillet de graphène enroulé en cylindre forme un CNT. Le graphène a une excellente conductivité électrique bidimensionnelle, un excellent taux de transfert électronique et une grande surface spécifique⁸⁴. Les électrons périphériques de chaque atome de carbone occupent l'orbitale planaire hybride sp^2 pour former trois liaisons σ dans le plan et une liaison π hors du plan. Bien que les liaisons σ rendent le graphène plus résistant que le diamant, les électrons σ délocalisés hors du plan le rendent plus électriquement et thermiquement conducteur. En raison de la courbure du feuillet de graphène qui constitue les CNT, la liaison sp^2 est légèrement hors du plan. Ce changement cause une ré-hybridation σ - π

dans laquelle les trois liaisons σ sont légèrement hors du plan et la liaison π est délocalisée hors du tube. Il en résulte une plus grande réactivité des CNT, particulièrement, ceux de petit diamètre, par rapport au graphène⁸⁵.

Les SWCNT, MWCNT ou le graphène peuvent contribuer à améliorer la conductivité de l'électrode ainsi qu'à augmenter sa surface spécifique. Le graphite peut facilement être remplacé pour des CNT ou du graphène dans la composition des encres, les allotropes du carbone peuvent aussi être déposés à la surface de l'électrode.

- Les argiles

Les argiles (il en existe de nombreuses variétés classifiées en fonction de leur structure et de leur composition) ont une structure lamellaire constituée par l'empilement de feuillets. Un feuillet est formé par l'association de couches tétraédriques et octaédriques. Ces feuillets sont neutres ou pas et contiennent des oxydes de silicium, d'aluminium, de fer, de magnésium, de lithium... De l'éthylène glycol ou du glycérol peuvent se retrouver dans l'espace interfoliaire⁸⁶. Certaines argiles ont la capacité de transporter des électrons à travers des canaux qui se forment au sein de leur structure. Ces argiles peuvent être déposées à la surface de travail des SPE et améliorer leur conductivité. Les constituants de l'argile peuvent aussi catalyser certaines réactions se déroulant à la surface de l'électrode⁸⁷.

- Les particules métalliques

Des microparticules de métaux tels que l'argent, l'or ou le platine peuvent être incorporées dans l'encre de l'électrode de travail et des nanoparticules peuvent être électrodéposées sur la surface de l'électrode de travail par application d'un potentiel donné à une solution contenant le cation métallique. Ce dépôt de nanoparticules va améliorer le transfert des électrons, augmenter la surface spécifique et permettre d'immobiliser différents composés sur l'électrode⁸⁸⁻⁹⁰.

4.1.3.2 Sélectivité

Différents éléments biologiques tels que des enzymes, de l'ADN, des anticorps voire des cellules complètes ou des agents piégeant comme des cyclodextrines ou des polymères à empreinte moléculaire peuvent facilement être immobilisés à la surface des électrodes sérigraphiées. Ils ont pour fonction de cibler l'analyte de manière à rendre l'électrode sélective⁹¹.

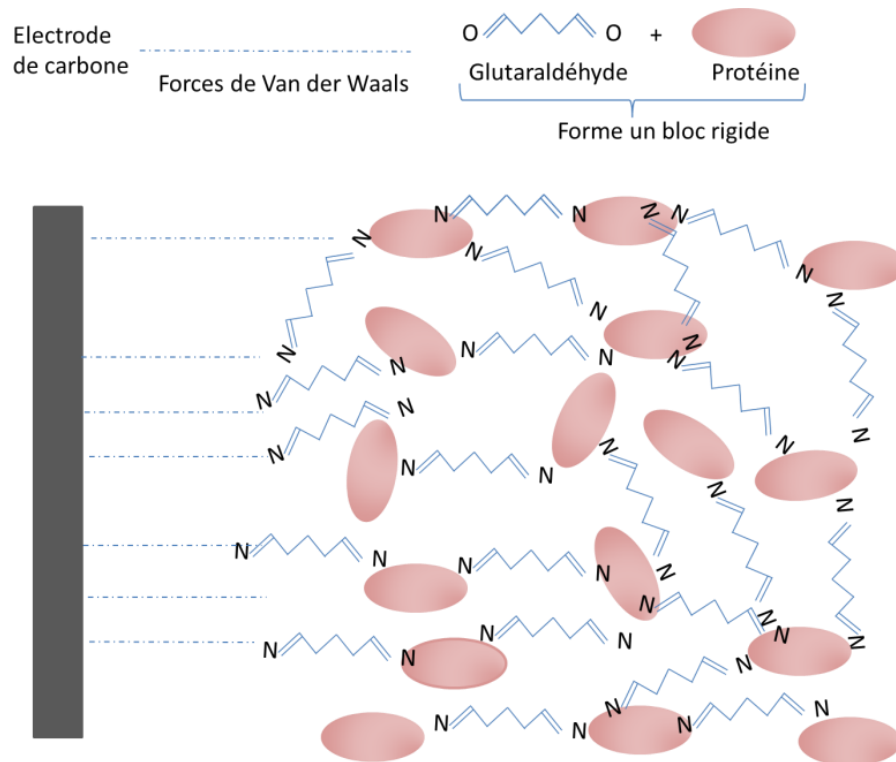


Figure 33 : Immobilisation physique par réticulation

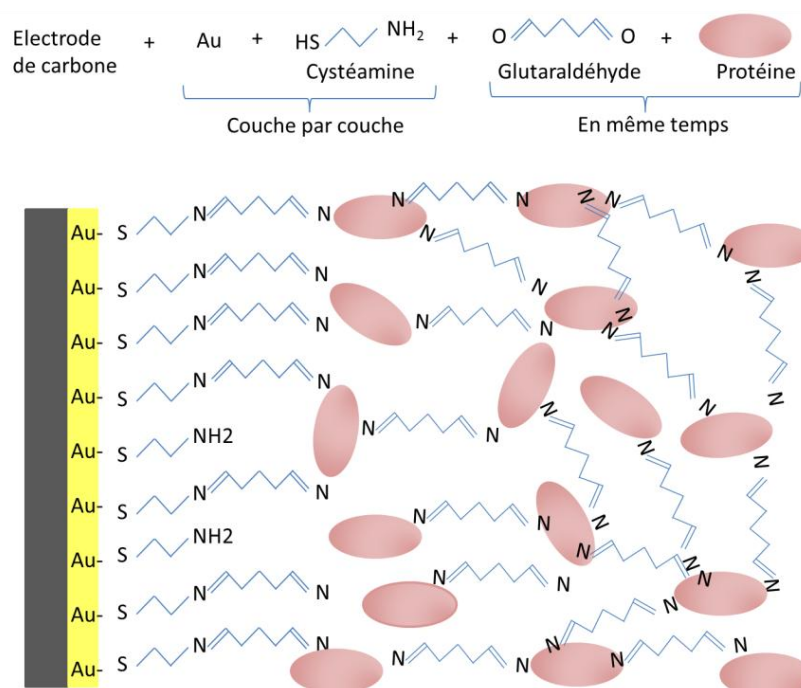


Figure 34 : Immobilisation par réticulation d'une protéine sur une électrode de carbone couverte d'une monocouche d'or

4.1.4 Méthodes d'immobilisation

4.1.4.1 Immobilisation mécanique

- Addition à l'encre

La substance modifiant l'électrode peut être mélangée à l'encre utilisée pour confectionner l'électrode à condition qu'elle résiste à la chaleur et que son orientation ne soit pas importante⁹².

- Immobilisation physique

La substance, par exemple une protéine, est mise en contact avec la surface de l'électrode pendant un temps donné. Dans le cas d'une SPE en carbone, sa surface peut être préalablement oxydée afin de générer des groupements carboxyliques. Les forces de Van der Waals, des interactions électrostatiques (dans le cas d'espèces chargées) et d'autres liaisons faibles apparaissent entre la surface de la SPE et le composant. Le composant non adsorbé est éliminé par lavage en douceur de la SPE avec une solution tampon⁹³.

- Réticulation (cross-linking)

L'immobilisation de protéines par réticulation en utilisant la glutaraldéhyde ou un autre agent bifonctionnel comme l'héxaméthylènediamine est une méthode efficace pour modifier des SPE. En effet, elle est facile à mettre en œuvre et les liaisons sont fortes. La protéine est réticulée avec elle-même ou avec une autre protéine inerte comme, par exemple, l'albumine de sérum bovin, donnant une co-réticulation. L'inconvénient majeur de la réticulation est le risque de la perte d'activité de la protéine en cas de modification chimique de son site actif ou de changement de conformation⁹⁴. Un mélange de glutaraldéhyde (solution diluée) avec la protéine à immobiliser et éventuellement la protéine de co-réticulation est déposé à la surface de l'électrode. La structure protéique ainsi rigidifiée est maintenue sur la surface de l'électrode par des forces de Van der Waals (Figure 33).

- Immobilisation par piégeage

Le composé à immobiliser peut aussi être piégé physiquement au sein d'un film mince déposé physiquement ou électrochimiquement à la surface d'une SPE. Le composé peut dès lors être

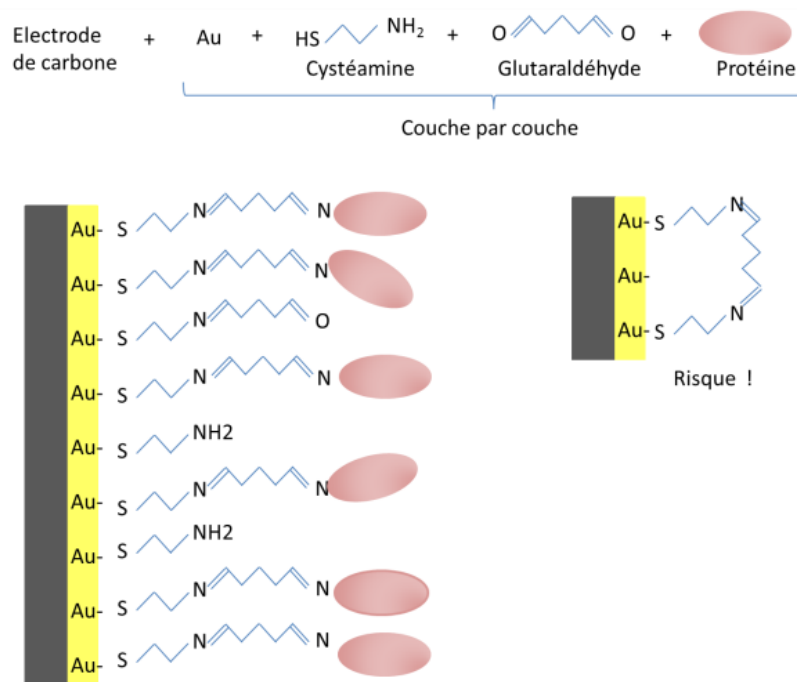


Figure 35 : Immobilisation par liaison imine d'une protéine sur une électrode de carbone couverte d'une monocouche d'or

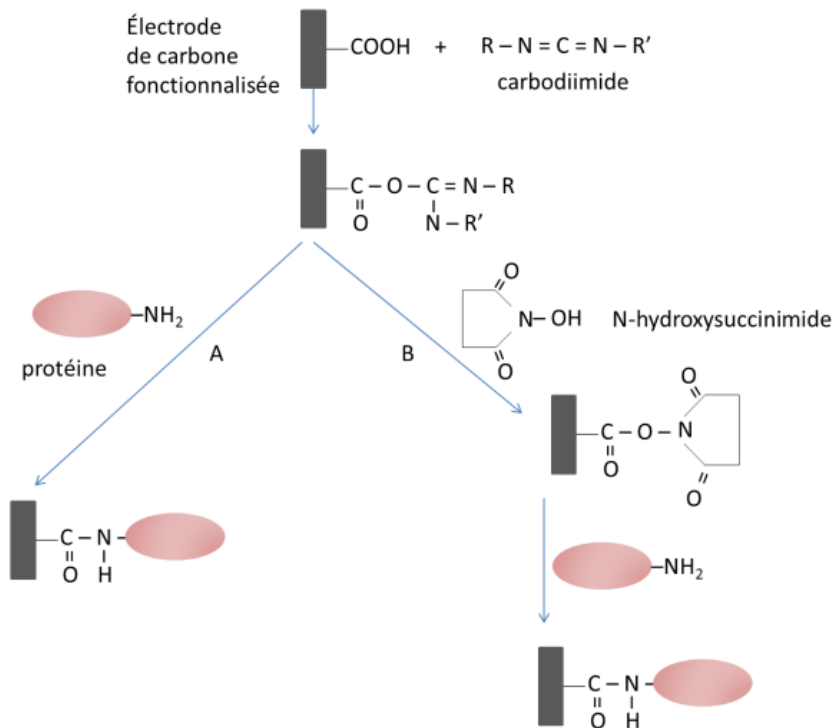


Figure 36 : Immobilisation d'une protéine sur une électrode de carbone fonctionnalisée par des groupes carboxyliques via un couplage avec un carbodiimide, sans (A) ou avec N-hydroxysuccinimide (B)

inclus dans une matrice à trois dimensions tel un polymère, ou de l'argile⁸⁷ ou dans une structure en brosse telle qu'observée avec des polymères conducteurs comme les polypyrroles⁹⁵.

4.1.4.2 Immobilisation chimique

- Liaison covalente
 - o Liaison imine

Il est possible de maintenir à la surface de l'électrode une protéine rigidifiée dans une structure réticulée impliquant la glutaraldéhyde en introduisant des groupements amines à la surface de l'électrode. Dans le cas d'une SPE d'or ou de carbone couverte de nanoparticules ou d'une monocouche d'or, la cystéamine est fréquemment utilisée. La cystéamine possède une fonction thiol qui peut réagir avec l'or pour former un lien Au-S fort et une fonction amine laissée libre qui va pouvoir réagir avec la glutaraldéhyde et former un lien imine (Figure 34)⁹¹.

La même réaction utilisant la glutaraldéhyde peut être utilisée pour immobiliser une protéine en monocouche (Figure 35). La glutaraldéhyde et la protéine sont alors déposées successivement sur l'électrode⁹¹. Cependant, il faut noter qu'il existe un risque que la glutaraldéhyde réagisse avec l'amine de deux cystéamines adjacentes.

- o Liaison amide

Les carbodiimides comme 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC), peuvent être utilisés pour lier une fonction amine présente sur la protéine à une fonction carboxylique présente sur le support⁹¹. Cette réaction va générer une liaison amide (liaison peptidique). La N-hydroxysuccinimide (NHS) peut être utilisée pour améliorer la réaction (Figure 36). Les groupements carboxyliques nécessaires à la liaison sont facilement générés à la surface d'une électrode de carbone par oxydation de cette dernière en appliquant un potentiel élevé en présence d'acide sulfurique. Il existe aussi des NTC fonctionnalisés avec de tels groupements qui peuvent être introduits dans l'encre ou déposés à la surface de l'électrode⁹⁴. Une SPE fonctionnalisée avec des groupements amines peut également lier une protéine par une fonction carboxylique via un lien amide.

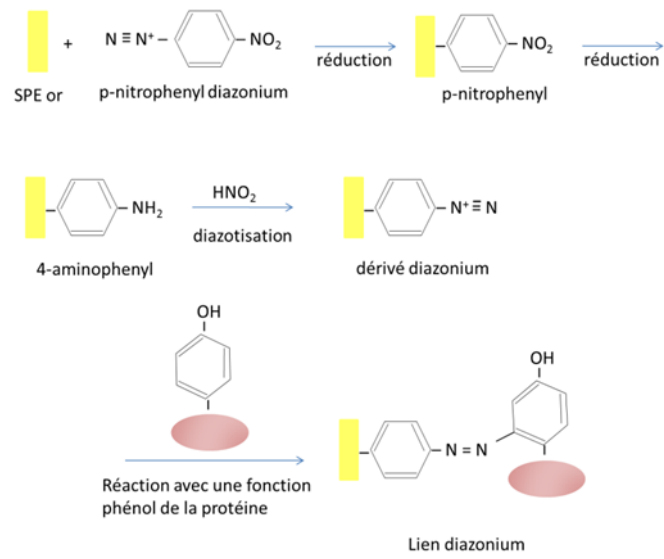


Figure 37 : Immobilisation d'une protéine sur une électrode d'or via un lien diazonium adapté de⁹⁶

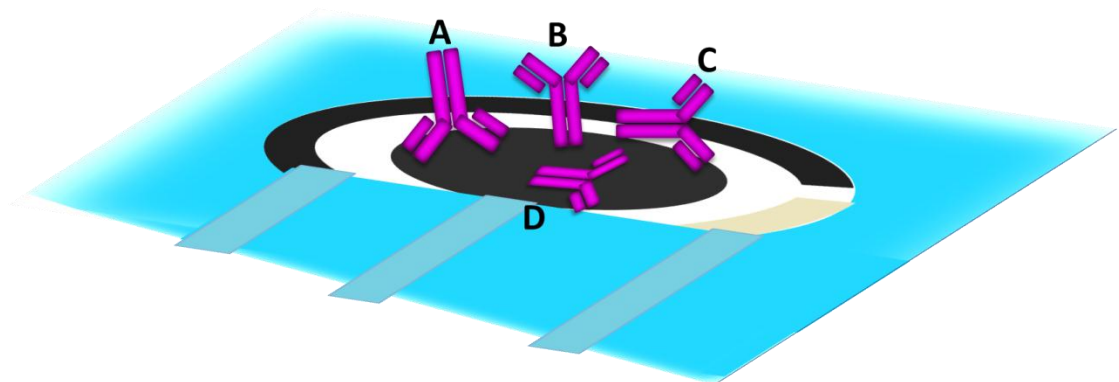


Figure 38 : Orientation différente des anticorps immobilisés au hasard : la tête en bas (A), à l'endroit (B), latéralement (C), à plat (D)

- Diazonium

Le groupement amine présent à la surface de l'électrode peut être transformé en diazonium avant le couplage avec la protéine à immobiliser. Le protocole décrit dans la littérature consiste à greffer électrochimiquement une monocouche de p-nitrophényle à la surface de la SPE, le groupement nitro est réduit en amine. Le groupement diazonium, permettant le couplage de la protéine, est généré par l'acide nitreux (Figure 37)⁹⁶.

4.1.4.3 Immobilisation par affinité

Les immobilisations par affinité ont l'avantage de permettre un contrôle de l'immobilisation. En effet, dans certains cas, une mauvaise orientation de la protéine entraîne une perte partielle ou totale de son activité. Le cas le plus évident, est l'immobilisation des anticorps. Si les bras de l'anticorps sont contre la surface de l'électrode, l'antigène ne pourra pas être lié (Figure 38 A). De même, si l'anticorps est couché à plat sur l'électrode, les domaines reconnaissant l'antigène ne sont pas accessibles (Figure 38 D). L'immobilisation idéale d'un anticorps doit se faire par la partie Fc, c'est-à-dire la partie constante et non pas par ses bras (Figure 38 B), les deux sites de liaison sont ainsi disponibles. Toutefois, si l'anticorps est immobilisé latéralement, une valence est disponible pour lier l'antigène (Figure 38 C)⁹⁷.

- Biotine/streptavidine

La streptavidine est une protéine tétramérique de 52,8 kDa, produite par la bactérie *Streptomyces avidinii*. Cette protéine a une très forte affinité pour la biotine (4 biotines par streptavidine) formant une des liaisons les plus fortes non covalentes existantes dans la nature ($K_d = 10^{-15}$ mol/L)^{98,99}. La streptavidine peut être immobilisée par physisorption à la surface d'une SPE. Des SPE streptavidinées sont également disponibles sur le marché. La molécule à immobiliser, souvent une protéine, doit être liée à un ester de biotine. Enfin, l'immobilisation se fait par simple mise en contact de la protéine biotinylée et d'une SPE modifiée par la streptavidine¹⁰⁰ (Figure 39A).

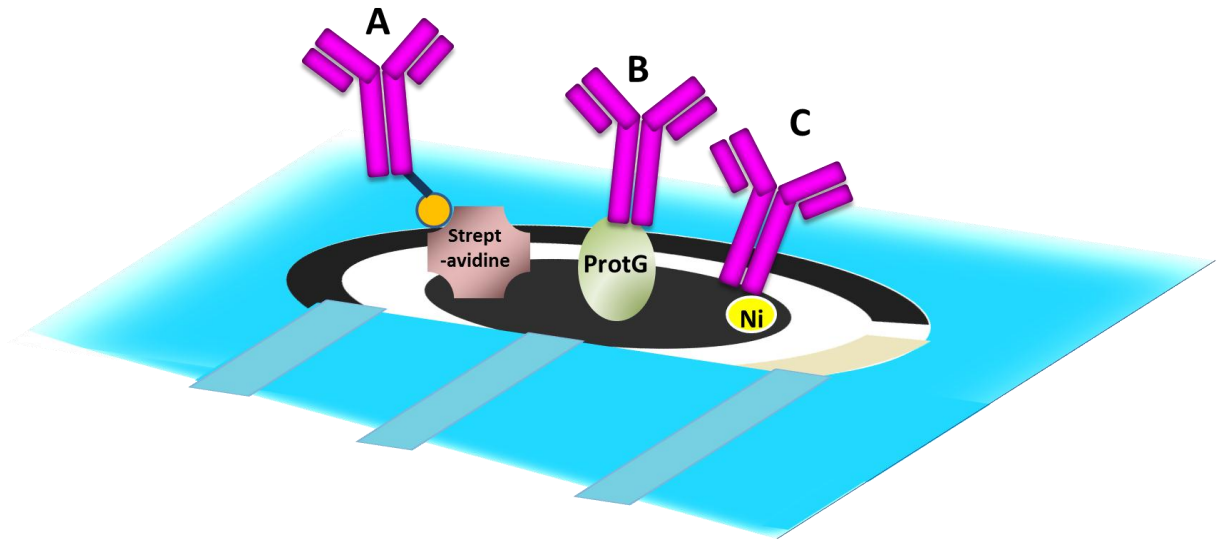


Figure 39 : Immobilisation d'anticorps au moyen de système d'affinité : streptavidine/biotine (A), protéine G (B), étiquette poly-histidine/nickel (C)

- Protéines G, A et L

Les protéines A, G et L, protéines issues de la paroi de différentes bactéries, ont la capacité de se lier avec une haute affinité à la partie Fc des immunoglobulines¹⁰¹. La fonction initiale de ces protéines est d'empêcher la phagocytose car l'anticorps se fixe à la bactérie dans le mauvais sens. Il est possible de fixer un anticorps en immobilisant au préalable ces protéines à la surface des SPE. Ce type d'immobilisation présente l'avantage d'orienter l'anticorps pour que les parties reconnaissant l'anticorps soient tournées vers l'extérieur¹⁰²⁻¹⁰⁴ (Figure 39B).

- Etiquette poly-histidine

La plupart des protéines recombinantes sont marquées par une étiquette poly-histidine aussi appelée His-tag®. Cette étiquette est constituée d'au moins six résidus histidine et est introduite à l'extrémité C ou N terminale de la protéine. Elle permet de purifier la protéine par chromatographie d'affinité métallique (IMAC) après sa production¹⁰⁵. L'IMAC est basée sur le fait que le motif poly-histidine se lie avec une grande affinité pour les cations bivalents comme le nickel et le cobalt. En effet la phase stationnaire de cette chromatographie est constituée d'agents chélateurs tels que l'acide nitrilotriacétique (NTA) ou l'acide iminodiacétique (IDA) complexant des ions bivalents (nickel le plus souvent, cobalt, cuivre ou zinc) qui vont former des liaisons de coordination avec l'étiquette poly-histidine de la protéine à purifier. Par contre les autres protéines ne seront pas retenues. Finalement pour éluer la protéine recombinante, la phase mobile est remplacée par une solution contenant de l'imidazole¹⁰⁶. Il est possible d'utiliser cette étiquette poly-histidine pour immobiliser des protéines recombinantes sur des cSPE modifiées avec du nickel ou une surface modifiée par le NTA^{107,108}. Cependant aucune trace d'EDTA ne peut être présente dans les échantillons à tester car l'EDTA décomplexe le nickel du NTA. Par contre, ce type d'immobilisation présente l'avantage de contrôler l'orientation de la protéine (Figure 39 C).

4.2 Les particules superparamagnétiques

Un des problèmes majeurs rencontrés dans le développement de techniques électrochimiques est dû à la propreté et à l'évolution non contrôlée de la surface de l'électrode de travail. Ce phénomène peut être évité par un renouvellement périodique de la surface de détection. La polarographie a été longtemps utilisée, entre autres, pour la facilité avec laquelle la surface est renouvelée, à l'identique, à chaque changement de goutte de mercure. Les électrodes de carbone sont très souvent utilisées car leur surface peut être nettoyée par polissage manuel, ce qui peut, cependant, engendrer des problèmes de répétabilité. Outre le problème de surface, les biocapteurs souffrent de l'inactivation ou de la perte de l'élément de reconnaissance biologique. De plus, la reconnaissance de la cible par le récepteur biologique peut se faire par une réaction irréversible, ce qui empêche toute utilisation ultérieure. L'exploitation de biocapteurs à usage unique permet d'éviter les inconvénients cités ci-avant. Une autre stratégie consiste à utiliser des particules superparamagnétiques et de les confiner à la surface de l'électrode de mesure. L'utilisation de ces particules comme support à l'immobilisation de l'élément de reconnaissance permet aisément son renouvellement. Il suffit d'enlever les particules en interrompant le champ magnétique et d'en retenir des neuves en appliquant le champ. De cette manière il n'y a pas de risque de contamination, de colmatage de la surface, de fuite ou de dénaturation de l'élément de reconnaissance biologique.

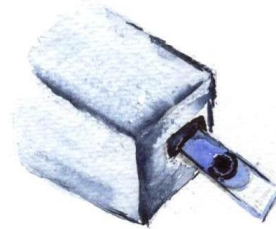
4.2.1 Magnétisme

L'utilisation de billes paramagnétiques offre la possibilité de séparation magnétique. Ces billes sont superparamagnétiques, ce qui signifie qu'elles n'ont pas de rémanence magnétique : elles répondent au champ magnétique mais perdent tout magnétisme dès que le champ est enlevé¹⁰⁹. Ainsi, les particules peuvent être séparées facilement de la phase solide avec un aimant et peuvent être redispersées immédiatement lorsque l'aimant est enlevé.

4.2.2 Matériel

Les microparticules superparamagnétiques (MPM) sont constituées d'un noyau d'oxyde de fer (maghémite (Fe_2O_3) et magnétite (Fe_3O_4)) entouré d'une coque protectrice uniforme en polymère permettant d'isoler les oxydes de fer qui peuvent interférer avec des réactions enzymatiques. Le polymère étant hydrophile, les interactions non spécifiques avec les protéines sont moins nombreuses. La surface des particules peut être couverte de différents groupements: acide carboxylique, amine, ou éléments biologiques: anticorps, streptavidine, protéine G...¹¹⁰.

But du travail



But du travail

Les immunocapteurs électrochimiques sont attractifs en raison de leurs avantages sur les autres systèmes de transduction, comme une grande sensibilité, une facilité d'utilisation, une automatisation possible et l'intégration dans des dispositifs analytiques compacts. De plus, ils sont bon marché et relativement simples de production à grande échelle et leur utilisation est aisée. Les immunocapteurs électrochimiques sont particulièrement intéressants pour développer des dispositifs permettant des mesures rapides décentralisées pour le diagnostic et la détection précoce de certaines maladies⁹⁷.

Ce travail s'inscrit dans le développement des immunocapteurs pour le diagnostic délocalisé proche du patient. Les dispositifs développés doivent à la fois être fiables pour éviter des erreurs de diagnostic mais ils doivent aussi être faciles d'utilisation. Ce type de dispositifs peut être complémentaire voire être préféré aux tests en laboratoires centraux quand le résultat doit être connu rapidement.

Les électrodes sérigraphiées sont particulièrement bien adaptées aux mesures décentralisées. L'utilisation d'un petit volume d'échantillon, le caractère jetable, le faible coût et la facilité avec laquelle elles sont modifiables en font un transducteur idéal. Nous avons voulu, dans ce travail, montrer la place importante que peuvent occuper les électrodes sérigraphiées dans la conception d'immunocapteurs.

Lors de ce travail, il nous est apparu important d'étudier différents supports pour l'immunoessai : les microparticules superparamagnétiques ainsi que l'électrode de travail en carbone des électrodes sérigraphiées.

De plus, nous avons voulu tester les nanobodies, anticorps à domaine unique, comme éléments de reconnaissance biologique innovants pour la conception d'immunocapteurs.

Deux cibles ont été choisies pour développer des immunocapteurs :

- Les anticorps sériques produits suite à la vaccination contre le tétanos

Afin d'éviter l'administration systématique du vaccin antitétanique lors d'accident potentiellement contaminant, un test simple, rapide, qualitatif et quantitatif pourrait être

effectué par le personnel des services d'urgence. Dans ce contexte, un des objectifs de ce travail est de développer un dispositif permettant de doser les anticorps anti-*tetani* sériques.

- Le biomarqueur de cancer du sein invasif, HER2

Afin de tester l'outil bioanalytique innovant que sont les nanobodies et en raison de la disponibilité de nanobodies anti-HER2, le deuxième objectif de ce travail est de développer un immunocapteur pour la détermination du taux de HER2. Cependant, cette partie du travail n'est pas applicable aux mesures décentralisées dans la mesure où le diagnostic rapide est moins important mais le concept peut être transposé à tout autre antigène à partir du moment où le nanobody est disponible.

Première partie : les anticorps anti- toxines tétaniques



Première partie : les anticorps anti-toxines tétaniques

1. Contexte et revue de la littérature

1.1 Le tétanos

1.1.1 La maladie

Le tétanos est une maladie fatale due à une bactérie universellement présente dans le sol : *Clostridium tetani*. C'est un bacille Gram positif sporulé, anaérobie strict. Cette bactérie produit une substance appelée toxine, qui se fixe sur les centres nerveux et provoque de violentes contractures musculaires pouvant entraîner la mort par blocage des muscles respiratoires¹¹¹. Cette infection a lieu lorsque des spores de la bactérie pénètrent dans la peau par une blessure. Ensuite, sous une pression d'oxygène réduite, ces spores vont libérer le bacille tétanique dans le tissu nécrosé¹¹². C'est lors de la croissance de la bactérie que des toxines sont produites. La toxine gagne le système nerveux central, son site d'action, grâce à un système de transport rétrograde (dans le sens contraire de celui de l'influx nerveux) le long des nerfs, alors que la bactérie reste au niveau du site d'entrée. C'est le tétanos ascendant. Ensuite, la toxine se fixe sur des récepteurs gangliosidiques des terminaisons nerveuses. N'étant plus affectée par les anticorps antitoxines, elle s'accumule dans le système nerveux et bloque la libération de neurotransmetteurs dans les synapses. Dans cette forme, la période d'incubation dépend de la distance séparant le site d'entrée du système nerveux central. Il existe une autre voie d'accès au système nerveux central, la voie hématogène, c'est le tétanos généralisé descendant¹¹³.

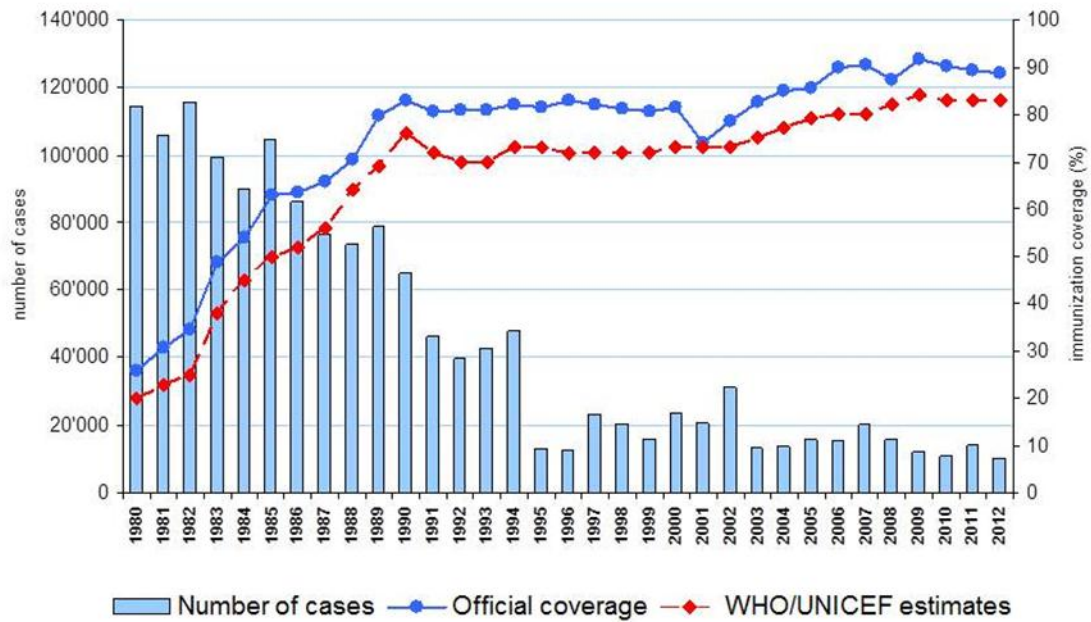
Le tétanos est une maladie plus particulièrement fréquente chez les nouveau-nés dans les pays en voie de développement. Le nouveau-né contracte la maladie lors de l'accouchement lorsqu'il n'est pas réalisé dans de bonnes conditions d'hygiène, en particulier si le cordon ombilical est coupé avec du matériel souillé^{112,114}.

1.1.2 La toxine tétanique

La toxine tétanique (TeTx), aussi appelée tétanospasme, est une protéine de 150 kDa. TeTx et les sept neurotoxines botuliques (BoNT A à G) constituent la famille des neurotoxines clostridiales métalloprotéases. Ces toxines, contenant environ 1300 acides aminés, sont clivées par une protéase en deux chaînes actives, une lourde (H, 100 kDa) et une légère (L, 50 kDa) reliées par un pont disulfure. La chaîne H est responsable de la liaison de la toxine à des récepteurs neuronaux (région carboxy terminale) et de l'entrée de la chaîne L dans le cytoplasme (région amino terminale). La chaîne L des neurotoxines clostridiales est une endopeptidase à zinc s'attaquant à des protéines spécifiques dont le clivage entraîne un blocage de l'exocytose de neurotransmetteurs dans la synapse. La chaîne L contient le motif de liaison du zinc caractéristique des endopeptidases à zinc : His-Glu-Xaa-Xaa-His. L'ion zinc est tétra-coordonné, ce qui est essentiel pour son activité catalytique. Il est coordonné par les deux résidus d'histidine du motif, par une molécule d'eau liée au glutamate et par un ou deux résidus supplémentaires. Les neurotoxines clostridiales contiennent un atome de zinc sauf la BoNT/C qui en contient deux^{115,116}.

La TeTx et quatre sérotypes de BoNT (B, D, F et G) ont pour cible la synaptobrevine ou VAMP (vesicle associated membrane protein). La VAMP est une protéine faisant partie de la famille des R-SNARE (SNAP Receptors) (ou v-SNARE car associée à la membrane vésiculaire contrairement aux t-SNARE ou Q-SNARE associées à la membrane cible (target)), elle se retrouve au niveau des synapses neuronales. Les R-SNARE possèdent une arginine tandis que les Q-SNARE possèdent une glutamine au centre de leur motif SNARE. La VAMP est impliquée dans la fusion des vésicules de sécrétion des neurotransmetteurs avec la membrane des neurones au niveau de la synapse¹¹⁷⁻¹²¹. Le clivage de cette protéine par les toxines clostridiales empêche la sécrétion des neurotransmetteurs inhibiteurs, l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) et la glycine, entraînant une contracture musculaire due à l'élévation de la libération d'acétylcholine, alors que les BoNT inhibent l'exocytose de l'acétylcholine provoquant une paralysie flasque. La durée de blocage dépend de la rémanence des neurotoxines dans les neurones, de la vitesse à laquelle les protéines clivées sont remplacées et de la mise en place temporaire de nouvelles terminaisons nerveuses¹²⁰.

Total tetanus global annual reported cases and DTP3 coverage, 1980-2012



Source: WHO/IVB database, 2013
194 WHO Member States.
Data as of July 2013

Date of slide: 12 July 2013



Figure 40 : Incidence annuelle du tétanos dans le monde comparée à la couverture vaccinale¹²²

1.1.3 La vaccination

La TeTx est considérée comme antigène par le système immunitaire et provoque la synthèse d'anticorps appelés antitoxines tétaniques (anti-*tetani*). La TeTx doit être transportée du site de synthèse jusqu'aux cellules cibles par le sang. Les antitoxines peuvent neutraliser la toxine tant qu'elle n'a pas rejoint sa cible. L'immunisation active par vaccination est donc tout à fait efficace^{112-114,123}. L'immunisation active contre le tétanos implique la stimulation du système immunitaire d'un individu par l'administration de l'anatoxine tétanique. Les anatoxines, obtenues par un procédé mis au point par Gaston Ramon, à l'Institut Pasteur en 1923, sont des protéines sécrétées par les bactéries, purifiées et traitées chimiquement pour leur faire perdre leur toxicité¹²⁴. L'anatoxine conserve certains épitopes de la toxine. Elle induit la production d'anticorps spécifiques de ces épitopes¹¹⁴. Le vaccin fournit une protection débutant relativement lentement et prenant deux à trois semaines pour s'installer.

La protection est durable, mais un rappel de vaccination est nécessaire pour éviter qu'elle ne s'atténue¹²⁵. La vaccination reste le meilleur moyen de prévenir la maladie (Figure 40). De plus, la vaccination de la mère permet de protéger son bébé lors de l'accouchement^{113,114,126}.

Pour produire le vaccin, des souches toxigènes de *Clostridium tetani* sont mises en croissance dans un milieu liquide favorisant la production de toxines. La toxine est récoltée par filtration et détoxifiée par le formaldéhyde pour donner l'anatoxine. Après plusieurs étapes de purification, elle est stérilisée. L'anatoxine est adsorbée sur des sels d'aluminium ou de calcium pour accroître son immunogénicité. Le vaccin est administré par injection intramusculaire. Après une seule injection, la protection est incomplète, l'immunité est atteinte chez la majorité des personnes après une deuxième injection, une troisième dose garantit une protection chez presque 100 % des vaccinés. Un intervalle de 4 semaines entre deux doses est indispensable¹²³.

L'administration du vaccin fait partie du schéma vaccinal recommandé par le Conseil Supérieur de la Santé et suivi par la Fédération Wallonie Bruxelles. Actuellement, une injection est réalisée à 2, 3 et 4 mois en cocktail avec la diphtérie, la coqueluche (DTPa), ensuite à 15 mois et à 6 ans. Puis tous les 10 ans un rappel doit être administré (tétanos et diphtérie associés)¹²⁵. Comme *Clostridium tetani* survit dans l'environnement indéfiniment sous forme de spores, il est impossible de l'éradiquer. La maladie sera toujours possible, un haut degré d'immunisation restera indispensable même si le nombre de cas de tétanos diminue jusqu'à tendre vers zéro.

Le taux d'anticorps assurant une immunité totale contre le tétanos n'est pas connu. Il n'existe pas un taux de protection absolue. Une protection est assurée quand la quantité d'anticorps est suffisante pour neutraliser la quantité de toxine produite par la bactérie¹¹⁴. Cependant, l'organisation mondiale de la santé (OMS) recommande un taux minimum de 0,01 UI/mL mesuré par neutralisation de toxine, méthode de référence. Mais ce taux d'anticorps considéré comme suffisant, est basé sur des études animales, les données expérimentales concernant les humains sont extrêmement limitées et insuffisantes. Quelques cas de tétanos avec un taux d'anticorps supérieur à 0,01 UI/mL ont été décrits dans la littérature¹¹⁴.

Dans les pays industrialisés, la quasi-totalité des nouveau-nés sont vaccinés contre le tétanos. Cependant, les rappels ne sont pas toujours effectués tous les dix ans. Cet oubli entraîne une diminution de l'immunisation et ce, d'autant plus chez les personnes âgées. Il existe peu de corrélation entre les dires du patient et le statut immunitaire, c'est-à-dire que certaines personnes pensent ne pas être en ordre de vaccin et ont un bon taux d'anticorps et d'autres prétendent être en ordre et ne sont pas protégées¹²⁷. Au vu de cette situation, les services d'urgences, ont pris l'habitude d'administrer un rappel de manière systématique aux victimes d'un accident potentiellement contaminant. Malheureusement, il a été constaté que cette pratique n'est pas sans risque quand le patient est déjà immunisé. En effet, des administrations répétées d'anatoxine tétanique entraîneraient une hyperimmunisation pouvant conduire à des réactions allergiques, principalement locales, entre autres de type Arthus dues aux dépôts de complexes anticorps/anatoxine donnant lieu à des réactions inflammatoires^{128,129}. Des complications neurologiques ont également été décrites comme des polyneuropathies¹³⁰⁻¹³². En raison de ces risques, le niveau sérique d'anticorps anti-*tetani* devrait être évalué avant toute injection d'anatoxine tétanique.

1.2 Dosage des anticorps anti-*tetani* et immunocapteurs SPE

Le mélange d'anticorps polyclonaux anti-*tetani* peut être dosé par essai d'immunoabsorption à enzyme conjuguée (ELISA, de type sandwich), par ToBI (toxin binding inhibition, de type compétitif indirect) ou par un test de neutralisation sur souris¹¹⁴. Les méthodes ELISA et ToBI sont performantes mais nécessitent du personnel qualifié et du matériel coûteux. De plus, elles sont relativement longues. Les tests de neutralisation sur souris nécessitent le sacrifice de nombreux animaux de laboratoire. Un test rapide est également disponible, il s'agit d'une immunochromatographie¹³³. Ce test est semi-quantitatif.

L'OMS recommande la méthode de neutralisation de toxines sur souris comme méthode de référence pour les études relatives à la protection contre le tétanos et recommande le titre de 0,01 UI/mL, tandis que la Pharmacopée Européenne renseigne les tests ELISA et ToBI. Lors de l'utilisation de tests ELISA, le taux considéré comme protecteur est de 0,06 UI/mL¹¹⁴.

Avant les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse, aucun immunocapteur n'avait été décrit pour le dosage des anticorps anti-*tetani*. De nombreux immunocapteurs utilisant des SPE ont été développés pour le dosage d'antigènes ; par contre, seuls quelques-uns sont dédiés aux dosages d'anticorps. Un des premiers immunocapteurs, pour le dosage d'anticorps, utilisant des SPE, fut dédié au dosage compétitif des IgG de lapin. L'équipe qui a fondé la spin-off Dropsens, dirigée par le Professeur Costa-Garcia, a démontré en 2005 qu'il est possible d'immobiliser un anticorps anti-IgG de lapin à la surface d'une SPE via un lien biotine-streptavidine. Les IgG à doser sont, dans un premier temps, mis en contact avec l'électrode modifiée ; ensuite, les IgG marqués par la phosphatase alcaline sont ajoutés et sont liés par les anti-IgG encore disponibles. Le substrat est le 3-indoxyl phosphate et le produit de la réaction enzymatique est détecté par voltampérométrie à ondes carrées et par VC¹⁰⁰. Par la suite, un immunocapteur SPE exploitant la détection par impédancemétrie fut mis au point par Balkenhohl et Lisdat pour le dosage d'anticorps anti-gliadine^{134,135}. La gliadine est la partie protéique des céréales formant le gluten avec la gluténine. Ces anticorps sont impliqués dans la maladie cœliaque. Pour réaliser cet immunocapteur, la surface d'une électrode de travail en or sérigraphiée est modifiée avec la gliadine¹³⁵. Une première incubation de l'électrode modifiée dans le sérum permet l'interaction entre les anticorps anti-gliadine et la gliadine ; une seconde incubation avec une solution contenant des anticorps anti-IgG marqués par la peroxydase permet la détection de l'immunocomplexe par mesure d'impédance (electrochemical impedance spectroscopy : EIS). Le substrat choisi pour être oxydé par la peroxydase est le 3-amino-9-éthylcarbazol. Le produit d'oxydation, le 3-azo-9-éthylcarbazole, précipite à la surface de l'électrode ce qui induit une modification des propriétés de surface de l'électrode de travail qui peut être évaluée par EIS. Un spectre d'impédance est enregistré en utilisant le couple redox Ferri/Ferrocyanure. Récemment, un immunocapteur pour le diagnostic de la maladie cœliaque basé sur la recherche d'anticorps anti-transglutaminases (IgA et IgG) a été décrit. Ces anticorps pourraient être responsables des lésions de l'intestin grêle lors d'un régime riche en gluten¹³⁶. Le principe de l'immunocapteur repose sur la modification d'une SPE (SWCNT) avec des particules d'or et la transglutaminase. La liaison

avec les auto-anticorps anti-transglutaminases est ensuite mise en évidence par un anti-IgG ou IgA humain marqué par la phosphatase alcaline. La détection se fait par voltampérométrie par redissolution anodique d'argent métallique généré à partir de l'ion argent, via la déphosphorylation du 3 inositol phosphate par l'enzyme.

Un immunocapteur destiné au dosage d'anticorps IgG anti *Helicobacter pylori* a été développé par l'équipe de Messina¹³⁷. Cette équipe a mis au point un immunoréacteur à électrodes sérigraphiées pour le dosage des anticorps anti-*Helicobacter pylori* dans le sérum humain. Des antigènes de *H. pylori* ont été immobilisés à la surface d'une électrode de platine sérigraphiée. Après liaison des anti-*H. pylori*, la détection est mise en évidence par un second antigène anti-IgG marqué par la phosphatase alcaline. Le substrat de l'enzyme est le p-aminophényl phosphate. Ce dernier est converti en p-aminophénol qui est lui-même mesuré par voltampérométrie à ondes carrées (SWV). Un système de flux conduisant à une chambre de détection contenant les électrodes a été mis au point. Le sérum dilué est introduit en premier et incubé, les anticorps marqués sont introduits ensuite. Pour finir, le substrat de l'enzyme est introduit dans le flux. Entre chaque injection, le flux est rincé avec le tampon.

Cette revue de la littérature des immunocapteurs électrochimiques n'est pas exhaustive et a été volontairement restreinte aux dispositifs dédiés aux dosages d'anticorps, nettement moins fréquemment décrits que ceux utilisés pour le dosage d'antigènes.

2. Travaux préliminaires

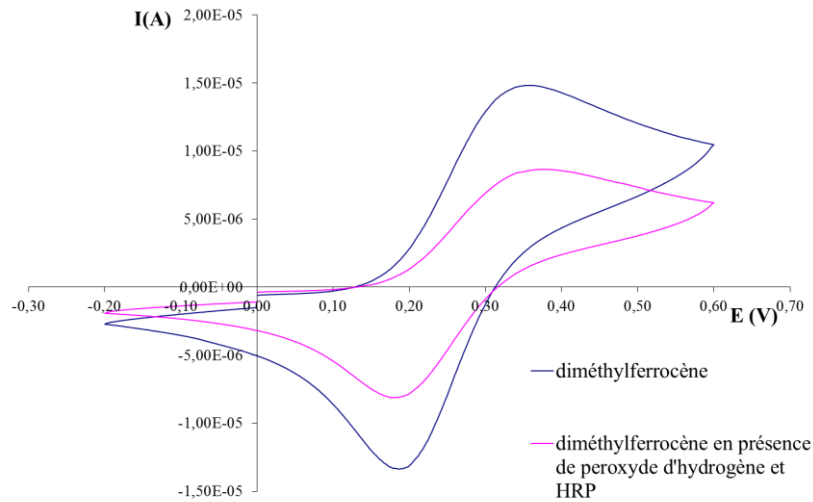
2.1 Choix du substrat de HRP

Une étude systématique de différents substrats de l'enzyme a été réalisée par voltampérométrie cyclique avec un dispositif à trois électrodes : une électrode de référence Ag/AgCl NaCl 3 M, une électrode auxiliaire de platine et une électrode de travail. Celle-ci était soit le carbone vitreux, soit la pâte de carbone liquide, soit la pâte de carbone solide. Les enregistrements en voltampérométrie cyclique ont été réalisés selon une séquence de potentiel : $0 \rightarrow 1000 \rightarrow -400 \rightarrow 0$ mV avec une vitesse de balayage de 50 mV/s. Les mesures ont été réalisées en solution acide citrique pH 4 pour une concentration du substrat de 0,25 mM. Le comportement rédox et l'amplitude du signal ont été évalués pour les candidats médiateurs suivants :

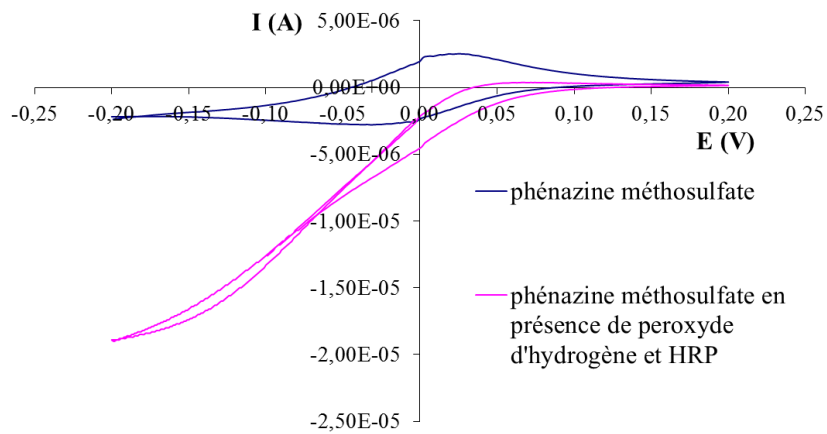
- le diméthylferrocène
- le ferrocyanure
- le 2,6-dichlorophénol indophénol (DCPI)
- la promazine
- le paracétamol
- la phénazine méthosulfate
- l'hydroquinone

2.1.1 Voltampérométrie cyclique

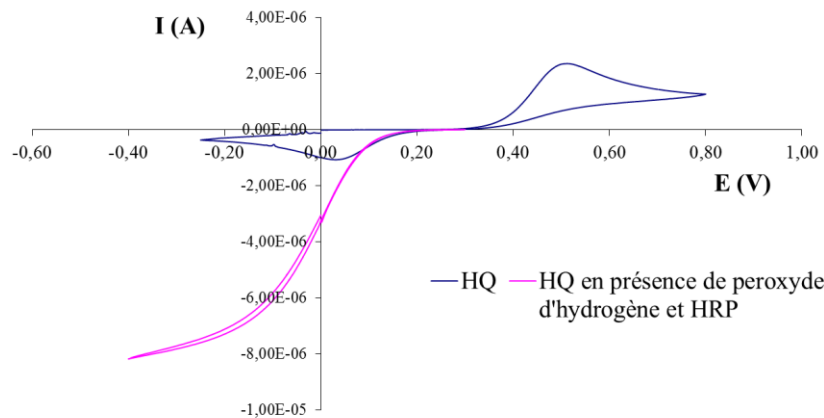
L'oxydation du paracétamol est irréversible dans les conditions expérimentales choisies ; aucun courant de réduction n'est enregistré durant le balayage retour. Le 2,6-dichlorophénol indophénol donne deux pics d'oxydation, le 2ème pic d'oxydation est irréversible. Si le potentiel maximum choisi pour la séquence de balayage est moins élevé (600 mV), l'oxydation du DCPI est alors tout à fait réversible avec un écart de l'ordre de 60 mV entre le pic d'oxydation et le pic de réduction. Le ferrocyanure présente un voltampérogramme réversible avec une amplitude de signal 10 fois inférieure aux autres



A



B



C

Figure 41 : Voltampérométrie cyclique, en bleu substrat (0,2 mM) seul, en rose, en présence de H_2O_2 (20 mM) et d'HRP (0,5 μM), en solution acide citrique pH 4, électrode de pâte de carbone liquide 10 mV/s ; (A) : diméthylferrocène 0 \rightarrow 600 \rightarrow -200 \rightarrow 0 mV ; (B) : phénazine méthosulfate, 0 \rightarrow 200 \rightarrow -200 \rightarrow 0 mV ; (C) : hydroquinone 0 \rightarrow 800 \rightarrow -200 \rightarrow 0 mV

médiateurs redox testés. La promazine donne un profil de voltampérogramme réversible. Toutefois, si l'oxydation est plus poussée, l'apparition d'un deuxième pic irréversible est constatée : cette oxydation n'est pas réversible. L'hydroquinone, le diméthylferrocène et la phénazine méthosulfate ont tous les trois un voltampérogramme présentant un pic d'oxydation et un pic de réduction (Figure 41).

2.1.2 Voltampérométrie cyclique en présence de HRP et H₂O₂

Le DCPI, la promazine, le diméthylferrocène, l'hydroquinone et la phénazine méthosulfate ont été testés en présence de peroxydase de raifort (0,5 µM) et de peroxyde d'hydrogène (20 mM) par voltampérométrie avec une vitesse de balayage de 10 mV/s. Le substrat est, dans ce cas, oxydé par la peroxydase en solution (dans un milieu acide citrique pH 4). La forme oxydée est ensuite réduite à l'électrode de travail. Au fur et à mesure que l'électrode réduit la forme oxydée en forme initiale, elle peut être réoxydée par la peroxydase. De cette façon, le courant de réduction est amplifié et correspond à une courbe électrocatalytique comme décrite précédemment. Le voltampérogramme de DCPI et de la promazine est plat, le pic d'oxydation a disparu parce que l'oxydation électrochimique a été remplacée par une oxydation enzymatique. L'amplification enzymatique du courant de réduction n'a cependant pas lieu car l'oxydation de ces deux molécules par la peroxydase est poussée jusqu'à l'oxydation irréversible des composés. Le diméthylferrocène ne donne pas d'amplification enzymatique dans les conditions expérimentales étudiées (Figure 41A). Par contre une amplification enzymatique du courant de réduction de la phénazine méthosulfate (Figure 41B) et de l'hydroquinone (Figure 41C) est observée. La phénazine méthosulfate a été utilisée sous forme oxydée, elle doit préalablement être réduite lors de la mise sous tension pour être ensuite oxydée par HRP. L'hydroquinone était par contre déjà sous forme réduite ; elle est oxydée en quinone (Q) en présence de HRP et H₂O₂, ce qui permet d'enregistrer un courant catalytique d'électro-réduction. HQ sera utilisé comme substrat de HRP tout au long de ce travail.

2.2 Détection ampérométrique

Les paramètres tels que le pH, la concentration en cofacteur (H₂O₂) et le potentiel de mesure ont été évalués par voltampérométrie cyclique afin de maximiser la réponse, avant la mise en œuvre de l'immunoessai. Un système classique à trois électrodes (pâte de carbone, Ag/AgCl NaCl 3 M et platine) a servi aux mesures électrochimiques. L'HRP normalement utilisée en tant que marqueur d'anticorps est au préalable étudiée en solution.

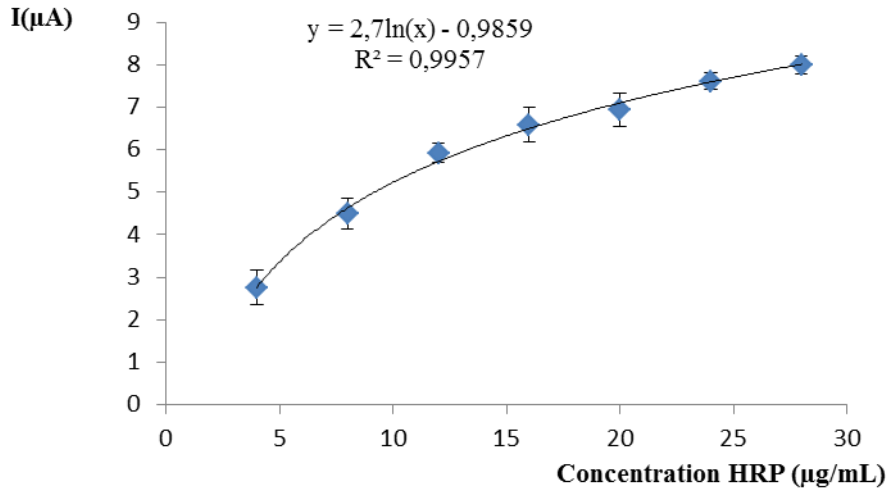


Figure 42 : Influence de la concentration en HRP sur la réponse ampérométrique. Solution acide citrique pH 4. HQ 0,2 mM, H₂O₂ 20 mM. Electrode de référence Ag/AgCl Electrode de travail pâte de carbone liquide. E_{app} = -250 mV (n = 3)

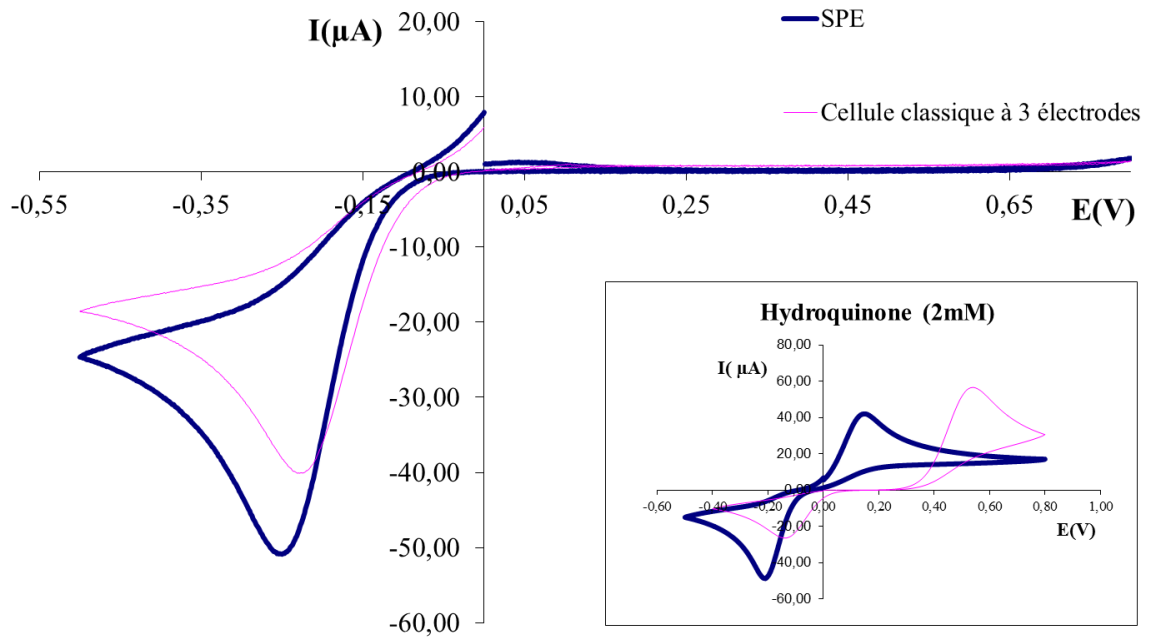


Figure 43 : Voltampérométrie cyclique de HQ (2 mM) (0 → 800 → -400 → 0 mV), vitesse de balayage 10 mV/s. En bleu SPE carbone, en rose pâte de carbone (travail), Ag/AgCl NaCl 3 M (référence), platine (auxiliaire). En présence et en absence (insert) de HRP (10 μM) / H₂O₂ (2 mM)

2.2.1 Choix du potentiel appliqué

La voltampérométrie cyclique (0 mV à 800 mV, 800 mV à -400 mV et retour à 0 mV) de l'HQ en présence d'HRP en solution et de peroxyde d'hydrogène a permis de visualiser l'amplification enzymatique du courant de réduction. En l'absence de HRP, un couple redox est obtenu, correspondant à l'oxydation de HQ et la réduction de Q. Après addition de HRP et de peroxyde d'hydrogène, l'oxydation de HQ à l'électrode n'a plus lieu alors que la réduction de la quinone est toujours visible. Le processus de bioélectrocatalyse correspond à l'électroréduction de Q en HQ, qui reforme biocatalytiquement la Q en présence de HRP et de peroxyde d'hydrogène. Un plateau apparaît à partir de -250 mV et cette valeur de potentiel est choisie pour les essais ampérométriques. Le courant cathodique à -250 mV augmente en fonction de la concentration en HRP (Figure 42).

Des voltampérométries cycliques ont également été réalisées sur cSPE. Un déplacement de potentiel est observé avec les cSPE par rapport à l'électrode à pâte de carbone. En l'absence de HRP, un décalage de 70 mV est observé pour la réduction de la quinone, par contre en présence de HRP, un décalage de moins de 30 mV est noté. Un potentiel de -280 mV est choisi pour les mesures ampérométriques réalisées avec cette électrode (Figure 43).

2.2.2 Influence du pH

Des cycles de voltampérométrie (0 mV à 800 mV, 800 mV à -400 mV et retour à 0 mV) ont été réalisés dans un tampon citrate à différentes valeurs de pH comprises entre 4,0 et 6,5 ; en présence de HRP et de peroxyde d'hydrogène. L'amplification enzymatique du courant de réduction augmente avec le pH pour être maximale à pH 5,5 et diminue ensuite. A partir de pH 5,5, le pic de réduction est décalé de -130 mV vers -230 mV (Figure 44).

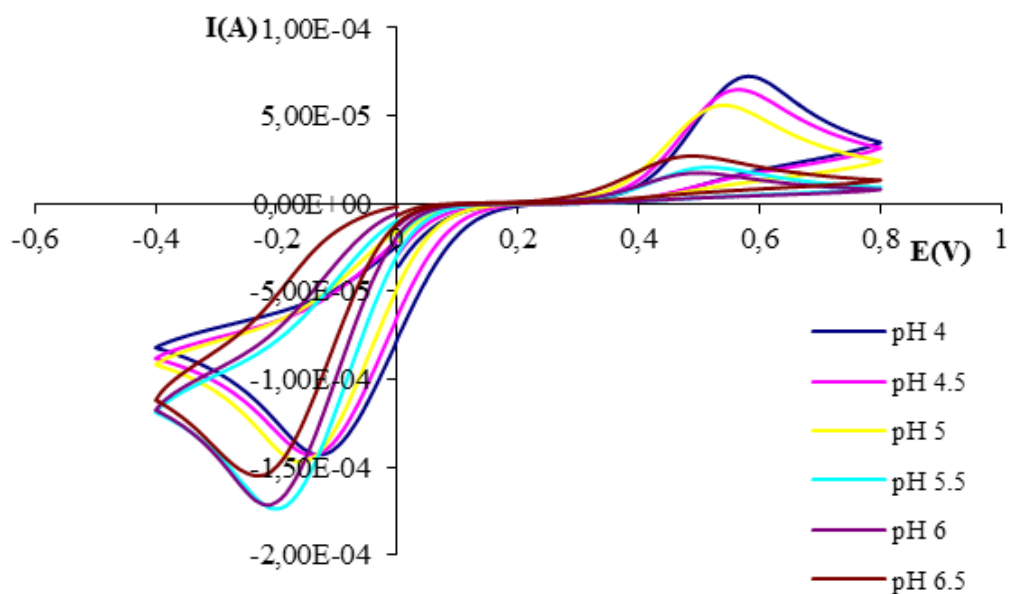


Figure 44 : Influence du pH sur l'amplification enzymatique. Voltampérométrie cyclique (électrode pâte de carbone liquide) de HQ (4 mM), H_2O_2 : 20 mM, HRP : 9×10^{-8} M ($0 \rightarrow 800 \rightarrow -400 \rightarrow 0$ mV) ; vitesse de balayage 10 mV/s

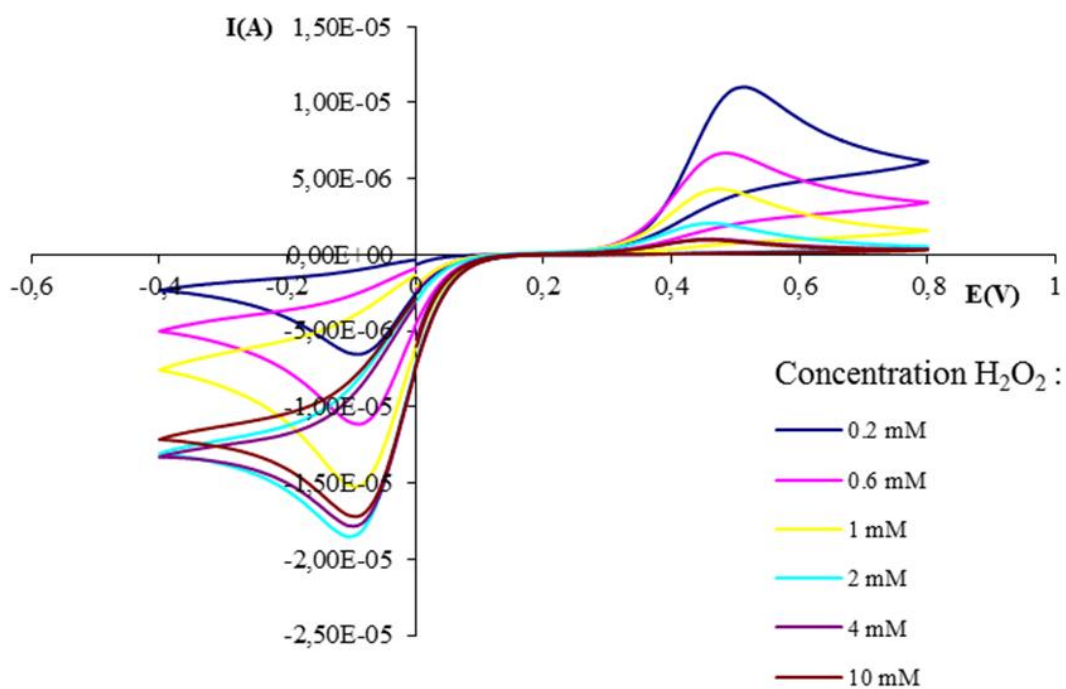


Figure 45 : Influence de la concentration de peroxyde d'hydrogène sur l'amplification enzymatique Voltampérométrie cyclique (électrode pâte de carbone liquide) de HQ (1 mM) HRP : 9×10^{-9} M ; ($0 \rightarrow 800 \rightarrow -400 \rightarrow 0$ mV) ; vitesse de balayage 10 mV/s ; pH : 5,5

2.2.3 Concentration de peroxyde d'hydrogène

La concentration optimale en peroxyde d'hydrogène a été évaluée par voltampérométrie cyclique de l'HQ en présence de HRP sur électrode de pâte de carbone. Différents cycles (0 mV à 800 mV, 800 mV à -400 mV et retour à 0 mV) ont été réalisés pour une concentration en eau oxygénée allant de 0,2 mM à 10 mM. Le courant de réduction est maximal pour une concentration de 2 mM (Figure 45).

Les conditions expérimentales finalement sélectionnées pour la détection ampérométrique sont les suivantes :

- tampon citrate pH 5,5
- peroxyde d'hydrogène 2 mM
- potentiel -250 mV lors de l'utilisation de l'électrode à pâte de carbone « magnétisée » et -280 mV lors de l'utilisation des électrodes sérigraphiées (cSPE).

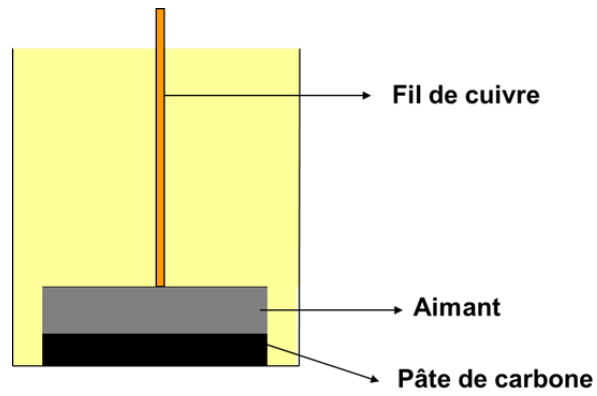


Figure 46 : Représentation schématique de l'électrode de travail « magnétisée »

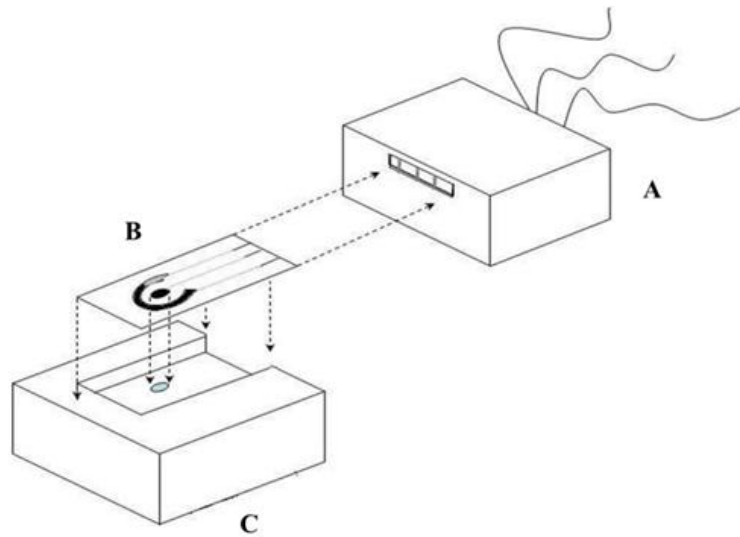


Figure 47 : Représentation schématique de SPE magnétique. Connecteur reliant la SPE au potentiostat (A) ; SPE (B) ; Bloc en plexiglas adapté aux SPE avec un aimant au centre se positionnant sous la surface de travail

3. Immunocapteur ampérométrique à billes superparamagnétiques*

Notre étude a pour but de montrer que le dosage des anticorps (IgG) anti-*tetani* (polyclonaux) est possible grâce à l'utilisation d'un immunocapteur ampérométrique.

La première stratégie envisagée est l'utilisation de microparticules superparamagnétiques (MPM) comme support pour l'immunoessai. Elles sont déposées sur une électrode de travail soumise à un champ magnétique constant pour la détection ampérométrique (Figure 46). Toute l'optimisation de l'immunoessai a été réalisée avec un système classique à 3 électrodes comprenant une électrode de travail à pâte de carbone « magnétisée ». Ensuite la technologie a été transférée aux électrodes sérigraphiées dans un souci de miniaturisation (Figure 47).

L'utilisation d'une électrode de travail « magnétisée » dans le but de retenir des immunoparticules à sa surface a été décrite en 1985 par Robinson *et al*¹³⁸. Avec l'apparition sur le marché de MPM de qualité vers 2000, plusieurs équipes, dont notre laboratoire, ont exploité le concept pour immobiliser des enzymes ainsi que des anticorps¹³⁹⁻¹⁴¹ à la surface d'électrodes^{142,143}. La rétention des MPM via un aimant à la surface d'une SPE a été décrite par Centi en 2005⁷ puis par notre laboratoire en 2010¹⁴⁴ et cette stratégie fait actuellement l'objet de nombreuses publications¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Cependant, mis à part notre travail, aucune de ces publications n'est consacrée aux dosages d'anticorps.

L'immunocapteur présenté dans ce travail et le protocole expérimental sont inspirés de la détermination du titre en anticorps dans du sérum de cobaye par le test ELISA de la Pharmacopée Européenne 5.1. Cette détermination est réalisée sur plaque ELISA. L'anatoxine tétanique est immobilisée à 37°C sur la paroi de la plaque durant une nuit. Ensuite, le sérum contenant les anticorps (IgG) à doser est ajouté. Après deux heures d'incubation à 37°C et lavage, les anticorps anti-IgG de cobaye conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) sont ajoutés dans les puits de la plaque ELISA (1h d'incubation à 37°C). Après lavage, le substrat de la peroxydase, le 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) de diammonium

* Traduction et adaptation de la publication: Patris, S. *et al.* Anti-Clostridium *tetani* Antibody Determination in Serum Samples by Amperometric Immunosensing. *Electroanalysis* **22**, 41-48 (2010).

(ABTS) est ajouté en présence d'une solution d'acide citrique pH 4 (l'acide citrique est un triacide organique dont les pKa respectifs sont de 3,10 ; 4,76 et 6,40) additionnée de peroxyde d'hydrogène. La réaction est suivie par mesure de l'ABTS oxydé par la peroxydase en un produit coloré ($\lambda_{\max} = 405 \text{ nm}$). La détermination du titre se fait grâce aux différentes dilutions des standards.

Dans l'immunocapteur électrochimique décrit ci-après, l'anatoxine tétanique est immobilisée sur MPM, ce qui permet d'avoir une plus grande surface de réaction, une cinétique réactionnelle élevée, une élimination du surnageant et une rétention sélective des MPM via l'emploi d'un aimant. De plus, les MPM sont séparées de la matrice biologique ce qui diminue le risque d'interférences. La détection spectrophotométrique est remplacée par une détection électrochimique et l'ABTS par l'HQ.

3.1 Réactifs et matériel

3.1.1 Réactifs

L'anatoxine tétanique (non adsorbée) et le sérum de cobaye anti-*tetani* (lyophilisé) ont été commandés auprès du National Institute for Biological Standards and Control (Hertfordshire, Grande-Bretagne). La N-hydroxysuccinimidobiotine, les anticorps anti-IgG de cobaye conjugués à la peroxydase de raifort en solution dans un tampon phosphate (0.01 M NaCl 0,9%, pH 7.4) contenant 1 % d'albumine sérique bovine et 0.01 % de thimerosal, le polysorbate 20 (tween 20) et l'hydroquinone ont été achetés chez Sigma (Bornem, Belgique). L'albumine sérique bovine (BSA) provient de Fluka (Neu-Ulm, Allemagne). Le lait écrémé provient de Bio-rad Laboratories (Nazareth-Eke, Belgique). Le peroxyde d'hydrogène (30 %) provient de VWR International Inc (Leuven, Belgique). L'acide citrique monohydraté et le carbonate de sodium anhydre sont de chez Janssen Chimica (Beerse, Belgique). L'hydrogencarbonate de sodium a été acheté chez Fisher Chemicals (Loughborough, Grande-Bretagne). Le chlorure de potassium et l'hydrogénophosphate disodique dihydraté proviennent de Merck (Darmstadt, Allemagne). Le dihydrogénophosphate de potassium dihydraté provient de chez Vel (Leuven, Belgique), le chlorure de sodium de chez Carlo Erba (Rodano, Italie). Les microparticules superparamagnétiques (MPM) couvertes de streptavidine (MasterBeads Streptavidin) ont été achetées chez Ademtech (Pessac, France).

Les tampons et les solutions utilisés sont décrits dans la monographie du vaccin tétanique de la Pharmacopée Européenne 5.1 et sont sauf mention contraire :

- Tampon carbonate (pH 9.6) contenant de l'hydrogénocarbonate de sodium à 0,035 M et du carbonate de sodium anhydre à 0,015 M pour la biotinylation de l'anatoxine tétanique.
- Tampon d'immobilisation permettant un couplage efficace des particules magnétiques avec la cible biotinylée. La composition n'a pas été divulguée par le fabricant (Ademtech, Pessac, France).
- Tampon phosphate salin (PBS) pH 7,4 contenant 8 g/L de chlorure de sodium, 0,2 g/L de chlorure de potassium, 8 mM de di-sodium hydrogénophosphate dihydraté et 1,5 mM de dihydrogénophosphate de potassium dihydraté pour les immunoréactions.
- Tampon de lavage : PBS contenant 0,5 g/L de polysorbate 20.
- Tampon citrate 0,05 M ajusté à pH 5,5 avec une solution d'hydroxyde de sodium pour les mesures électrochimiques (pH optimisé dans ce travail).

3.1.2 Instrumentation

Le pH des solutions et des tampons a été contrôlé par un pH-mètre Mettler delta 320 (Mettler Toledo). Le dispositif magnétique utilisé pour séparer les particules magnétiques provient de chez Ademtech (Pessac, France). L'agitation a été réalisée grâce à un mélangeur vortex Ika genius 3 (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Allemagne). La dialyse a été réalisée avec un boudin Spectra/Pro, Float-A-Lyser MWCO 25000 (Spectrumlabs, Breda, Pays-Bas). Les mesures électrochimiques ont été exécutées en utilisant un potentiostat LC Epsilon contrôlé par un ordinateur avec le programme Epsilon EC, une cellule électrochimique BASi C3 cell stand avec un barreau magnétique pour l'agitation (10 x 2 x 3 mm), une électrode de référence Ag/AgCl NaCl 3 M, une électrode auxiliaire de platine. Tout le matériel électrochimique provient de BASi (Kenilworth, Grande-Bretagne). L'électrode de travail (mCPE), construite au laboratoire, est composée d'un cylindre en plastique traversé d'un fil de cuivre pour assurer la conductivité. Un aimant permanent Neody Magnet (ND-Fe-B) (4 mm x 3 mm) provenant de As One, Ltd (Osaka, Japon) a été inséré dans une cavité se trouvant à la base du cylindre, de telle sorte qu'un renforcement d'approximativement 2 mm est laissé libre à la surface pour contenir la pâte de carbone. Cette dernière provient de Metrohm (Herisau, Switzerland).

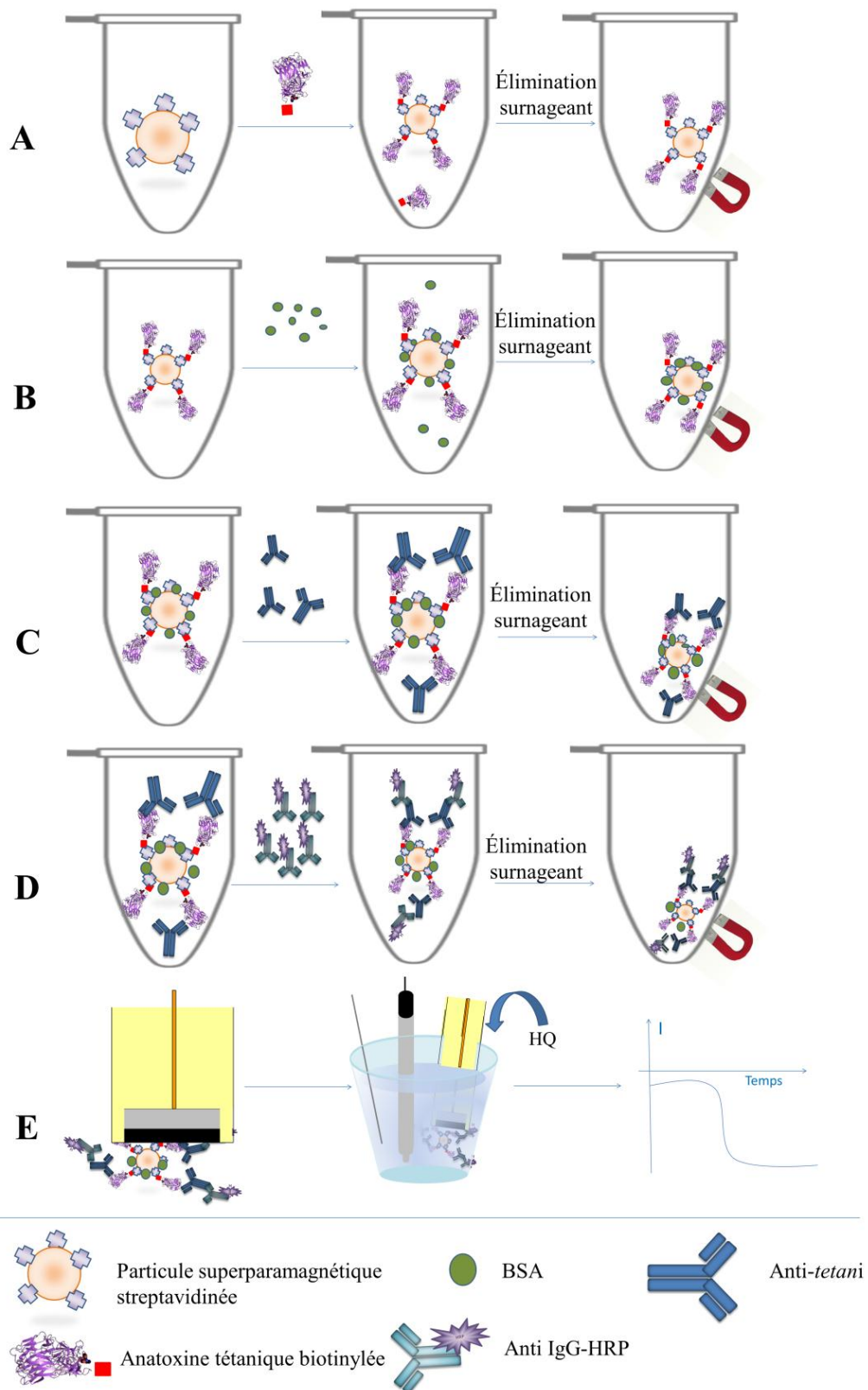


Figure 48 : Schéma du protocole expérimental (A → E) et représentation schématique de l'immunocapteur pour le dosage des anticorps anti-*tetani* (E). A : immobilisation de l'anatoxine biotinyllée sur les particules streptavidinées ; B : blocage de la surface des particules par la BSA ; C : incubation des anti-*tetani* ; D : incubation des anti-IgG marquées par HRP ; E : dépôt des particules sur l'électrode magnétique et détection ampérométrique

Les électrodes de carbone sérigraphiées (cSPE) et le connecteur adapté ont été achetés chez DropSens (Oviedo, Spain). Les cSPE ont les dimensions suivantes: 3,4 x 1,0 x 0,05 cm (longueur x largeur x épaisseur). L'électrode de travail (4 mm de diamètre) et la contre-électrode sont en carbone, tandis que l'électrode de référence et les contacts électriques sont en argent. Un support a été fabriqué au laboratoire pour contenir la tigette d'électrodes sérigraphiées. Il consiste en un bloc de Plexiglas avec une cavité ayant les dimensions exactes de la tigette de cSPE. Un aimant (Neody 4 mm de diamètre) a été placé dans le support juste en dessous de l'électrode de travail.

3.2 Méthode

3.2.1 Biotinylation de l'anatoxine tétanique

Chaque ampoule d'anatoxine tétanique contenait 900 unités Lf d'anatoxine (1 unité Lf est la quantité de toxine ou d'anatoxine tétanique nécessaire pour faire flocculer 1 unité internationale d'anti-*tetani*) et 50 mg de glycine (la masse moyenne contenue dans une ampoule est de 0,0631 g de substance desséchée \pm 0,38 %). Pour commencer 10 mg (environ 2 mg d'anatoxine) du contenu de l'ampoule ont été solubilisés dans 1 mL de tampon carbonate (pH 9,6) et ont été dialysés pour éliminer la glycine. La biotinylation de l'anatoxine se fait grâce à la réaction entre le groupement carboxylique de la biotine et les amines libres présentes au niveau du polypeptide pour former une liaison amide, il est donc nécessaire d'éliminer les amines comme la glycine.

Pour la biotinylation de l'anatoxine tétanique, 10 mg de N-hydroxysuccinimidobiotine ont été solubilisés dans 400 μ L de diméthylsulfoxyde (DMSO) lesquels ont ensuite été additionnés à la solution dialysée d'anatoxine (en solution tampon carbonate pH 9,6). Après 2 h d'incubation à température ambiante et sous légère agitation, la solution est dialysée contre 4 fois 1 L de PBS pour éliminer la biotine restée libre.

3.2.2 Immobilisation de l'anatoxine tétanique

Les MPM couvertes de streptavidine ont été utilisées pour immobiliser l'anatoxine tétanique biotinylée (Figure 48A). La procédure d'immobilisation suivie est fournie par le fabricant :

Procédure de lavage :

1. Remise en suspension des MPM streptavidinées, en évitant la formation de mousse, en pipetant ou en vortexant

2. Transvasement du volume désiré de MPM au moyen d'une pipette dans un tube Eppendorf
3. Placement du tube sur le dispositif magnétique pendant 1 min pour piéger les MPM
4. Elimination du surnageant en le prélevant soigneusement à la pipette et éliminé, les MPM sont laissées dans le tube
5. Remise en suspension des MPM dans le volume original avec le tampon d'immobilisation en retirant le tube du dispositif magnétique

Procédure d'immobilisation :

1. Lavage deux fois des MPM avec le tampon d'immobilisation et ensuite remises en suspension dans le tampon d'immobilisation dans le volume original donnant une concentration de 10 mg/mL.
2. Ajout de la molécule biotinylée et incubation à température ambiante pendant 30 min sous légère agitation.
3. Placement du tube sur le dispositif magnétique pendant 1 min.
4. Prélèvement à la pipette et élimination du surnageant, les MPM sont laissées dans le tube.

3.2.3 Procédure de blocage

Les particules couvertes par l'anatoxine ont été remises en suspension dans une solution de BSA (3 % m/v) et incubées 1 h à température ambiante sous une légère agitation. Le tube est ensuite placé sur le dispositif magnétique de telle sorte que les particules restent dans le tube et que le surnageant soit éliminé. Les MPM ont été rincées trois fois avec PBS et remises en suspension dans le volume original de PBS. La même procédure a été utilisée pour les autres solutions de blocage (Figure 48B).

3.2.4 Immunoessais

Toutes les réactions ont été réalisées dans un tube de type Eppendorf. Une procédure similaire à un essai immunologique de type sandwich a été adoptée pour la détermination du titre en anticorps anti-*tetani*. En effet, l'IgG anti-*tetani* est prise en sandwich entre l'antigène

immobilisé et le second anticorps. Ce dernier est un anticorps dirigé contre les IgG de cobaye et marqué par la peroxydase de raifort. Un volume de 10 μL de MPM a été ajouté à 100 μL de solution contenant le sérum anti-*tetani* de cobaye (sérum lyophilisé remis en solution dans du PBS). Après 15 min d'incubation à température ambiante, les MPM ont été séparées du surnageant grâce à un aimant et remises en suspension dans 100 μL de solution contenant l'anti-IgG de cobaye conjugué à la peroxydase de raifort (1/100). Après 45 min d'incubation, les particules ont été séparées par piégeage magnétique et le surnageant a été éliminé. Les MPM ont été lavées deux fois dans 0,5 mL de tampon de lavage. Finalement le tube a été placé sur le dispositif magnétique pour que les immunoparticules soient retenues et le surnageant éliminé. Les MPM ont été remises en suspension dans 10 μL ou 80 μL de tampon citrate pH 5,5 additionné de peroxyde d'hydrogène 2 mM pour la détection ampérométrique avec le système à trois électrodes classiques (10 μL) ou avec les SPE (80 μL). Les immunoparticules pour les essais à blanc ont été obtenues en réalisant les immunoréactions en l'absence d'antitoxine tétanique (Figure 48C et D).

3.2.5 Détection électrochimique

Deux systèmes de détection ont été étudiés : une cellule à trois électrodes classique et une tigelette d'électrodes sérigraphiées (cSPE). Le système classique était composé d'une électrode de référence Ag/AgCl NaCl 3 M, une électrode auxiliaire de platine et une électrode de travail magnétique à pâte de carbone (mCPE). Les électrodes ont été introduites dans 5 mL de tampon citrate en présence de peroxyde d'hydrogène 2 mM. Cet appareillage a été utilisé lors des étapes d'optimisation des paramètres tant immunologiques qu'ampérométriques. Un volume de 5 μL d'immunoparticules en suspension a été déposé à la surface de la mCPE. La mesure ampérométrique a été réalisée à potentiel constant (-250 mV). Dès que la ligne de base était stabilisée, l'hydroquinone a été introduite dans la cellule à une concentration finale de 2 mM. Le système utilisant une tigelette d'électrodes sérigraphiées a été utilisé pour les essais réalisés sur sérum de cobaye. Cette dernière a été placée dans un support contenant un aimant exactement localisé sous l'électrode de travail. Un volume de 40 μL d'immunoparticules en suspension a été déposé à la surface des électrodes sérigraphiées (la quantité d'immunoparticules contenue dans ces 40 μL est équivalente à la quantité de billes contenue dans les 5 μL déposés à la surface de la mCPE). Ensuite, 10 μL d'hydroquinone ont été ajoutés aux 40 μL (concentration finale de 2 mM) et le courant cathodique a été enregistré à -280 mV. La même tigelette a été utilisée pour tous les essais réalisés le même jour (Figure 48E).

3.2.6 Voltampérométrie cyclique en présence d'immunoparticules immobilisées sur SPE.

Ces essais ont été réalisés en présence de MPM retenues à la surface des cSPE. Les billes ont été préparées en réalisant les immunoessais sur des dilutions du sérum anti-*tetani* de référence (A: 0,350 IU/mL, B: 0,175 IU/mL, C: blanc). Les immunoessais ont été réalisés selon la méthode décrite précédemment. L'essai à blanc a été réalisé dans les mêmes conditions mais en l'absence de sérum antitoxine. Les immunoparticules ont été remises en suspension dans 80 μ L de tampon citrate et ensuite, un volume de 40 μ L a été déposé à la surface de la tige d'électrodes. La séquence de balayage en mode oxydation démarrait à 0 mV vers 800 mV et retour à 0. Le cycle de potentiel allait de 88 mV à -350 et revenait à 88 mV en mode réduction. La vitesse de balayage était de 10 mV/s. La même tige a été utilisée pour toute une série d'essais. Elle a été rincée à l'eau et séchée entre deux essais.

3.3 Résultats et discussions

3.3.1 Immobilisation de l'anatoxine tétanique

L'absorbance à 280 nm d'une solution contenant l'anatoxine dialysée et biotinylée enregistrée avant et après immobilisation sur les MPM permet de contrôler l'efficacité de l'immobilisation. A partir d'une pesée contenant 150 unités Lf d'anatoxine tétanique, suivie de l'étape de biotinylation, une diminution de l'absorbance de 20 % a été notée lors de l'immobilisation sur 100 μ L de MPM.

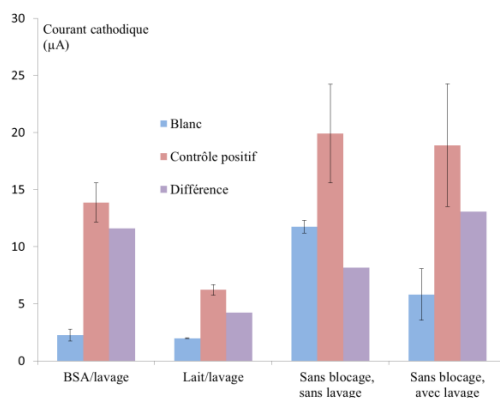


Figure 49 : Réponse ampérométrique de mCPE obtenus avec différentes méthodes de blocage de la surface des MPM. Anti-*tetani* : 0,02 UI/mL, volume d'incubation 100 µL, temps d'incubation 30 min ; anti-IgG marqué par HRP : 1/100, volume d'incubation : 100 µL, temps d'incubation : 45 min. Le lavage des MPM a été réalisé avec le tampon de lavage (PBS + tween 20). Les essais à blanc sont réalisés dans les mêmes conditions expérimentales sans anti-*tetani*. Eapp= -250 mV, HQ = 2 mM, H₂O₂ = 2 mM, volume de MPM déposé : 5 µL (n = 3, les barres d'erreur sont les écarts-types)

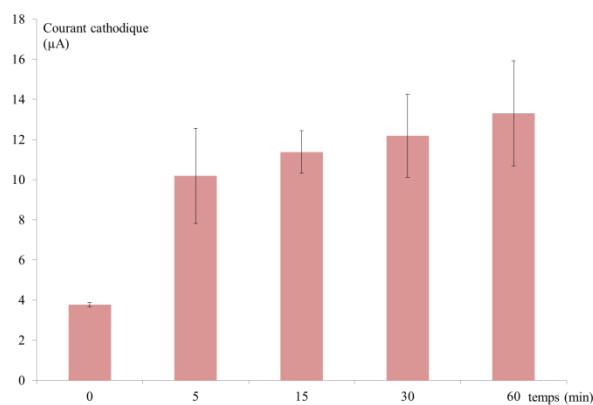


Figure 50 : Influence du temps d'incubation de l'anti-*tetani* sur la réponse ampérométrique de mCPE. Anti-*tetani* : 0,01 IU/mL, volume d'incubation : 100 µL, anti-IgG marqué par HRP 1/100, volume d'incubation : 100 µL, temps d'incubation : 45 min. Eapp = -250 mV, HQ 2 mM, H₂O₂ = 2 mM, volume MPM déposé : 10 µL ; (n = 3, les barres d'erreur sont les écarts-types)

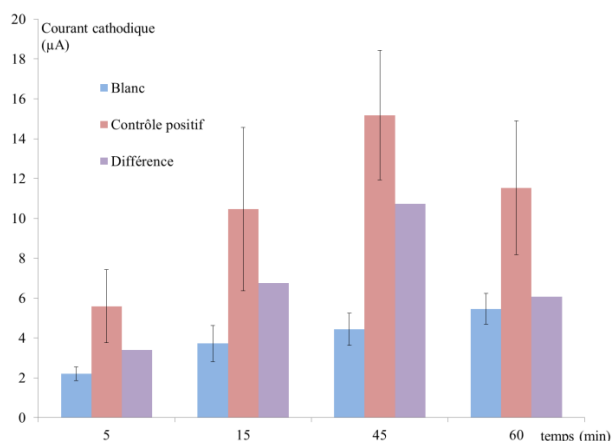


Figure 51 Influence du temps d'incubation de l'anti-IgG marqué par HRP sur la réponse ampérométrique de mCPE. Anti-*tetani* : 0.01 IU/mL, volume d'incubation : 100 µL, temps d'incubation : 15 min ; anti-IgG marqué par HRP 1/100, volume d'incubation : 100 µL. Eapp = -250 mV, HQ 2 mM, H₂O₂ = 2 mM, volume MPM déposé : 10 µL. Les réponses des blancs sont obtenues dans les mêmes conditions sans anti-*tetani* (n = 3, les barres d'erreur sont les écarts-types)

3.3.2 Comparaison entre les différentes phases de blocage et les étapes de lavage

Dans le but de minimiser l'adsorption non spécifique de l'anti-IgG marqué par HRP, des paramètres comme le blocage de la surface des MPM et l'étape de lavage ont été évalués. Une étape de blocage avec BSA 3 % et une autre avec le lait écrémé (2,5 %) ont été comparées. Pour chaque procédure expérimentale trois essais ont été réalisés avec 0,02 UI/mL de sérum anti-*tetani* et trois essais sans sérum anti-*tetani* (blanc). Pour la procédure de lavage, après l'étape d'incubation de l'anticorps marqué par HRP, les MPM ont été remises deux fois en suspension dans 0,5 mL de tampon de lavage. Les résultats démontrent la nécessité d'appliquer une phase de blocage et une étape de lavage pour diminuer l'adsorption non spécifique. Les résultats des mesures ampérométriques indiquent que les procédures avec un blocage de la surface donnent le plus petit signal correspondant au blanc. La procédure utilisant une étape de blocage avec le lait écrémé présente un signal pour le blanc plus faible que pour le blocage avec BSA. Le mode opératoire donnant la plus grande différence de signal entre le blanc et l'essai en présence d'immunosérum est celui utilisant un blocage avec BSA ainsi que celui n'incluant qu'une étape de lavage sans blocage. Cependant l'erreur (écart-type) est beaucoup plus importante dans la procédure n'incluant pas de blocage (Figure 49). C'est pourquoi, la procédure comprenant un blocage à l'albumine bovine sérique (BSA) associé à une étape de lavage a finalement été adoptée.

3.3.3 Influence du temps d'incubation

Le temps d'incubation du sérum anti-*tetani* avec les MPM a été testé entre 5 et 60 min (Figure 50). Les interactions entre l'anatoxine et les anticorps augmentent pendant les 10 premières min et se stabilisent ensuite. Un temps d'incubation de 15 min a été jugé un bon compromis entre un signal assez important et le respect de la rapidité du dosage.

Le temps d'incubation de l'anticorps marqué par la peroxydase a été augmenté de 5 min jusqu'à 60 (Figure 51). Les essais positifs ont été réalisés sur une solution contenant 0,01 UI/mL d'anti-*tetani*. En parallèle, des essais à blanc ont été menés, afin d'évaluer la variation avec le temps d'incubation des adsorptions non spécifiques. D'après les résultats obtenus (n = 3), une tendance à l'augmentation des liaisons non spécifiques avec le temps est constatée. Un temps d'incubation de 45 min a été sélectionné étant donné que la différence entre le blanc et l'essai positif y est plus importante.

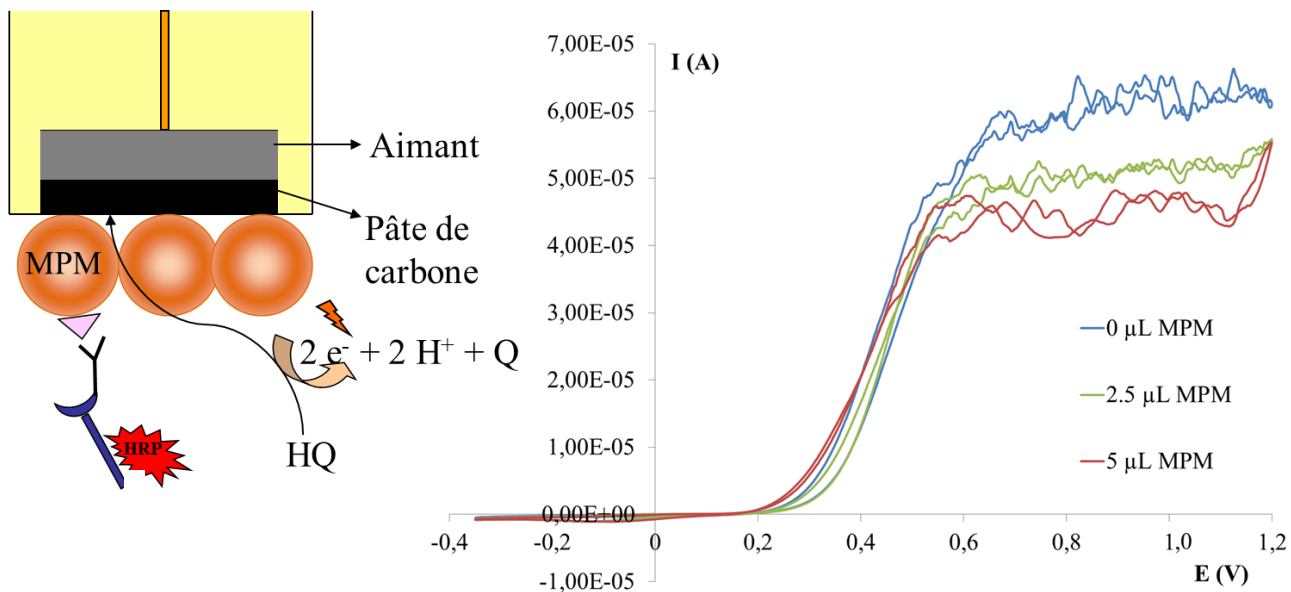


Figure 52 : Evaluation de l'encombrement par les MPM de la surface de l'électrode (mCPE) : voltampérométrie hydrodynamique de HQ (2 mM), tampon citrate pH 4, sans H₂O₂ réalisée en présence des MPM à la surface de l'électrode de travail. En vert, 2,5 μL de MPM ; en rouge 5 μL et en bleu 0 μL

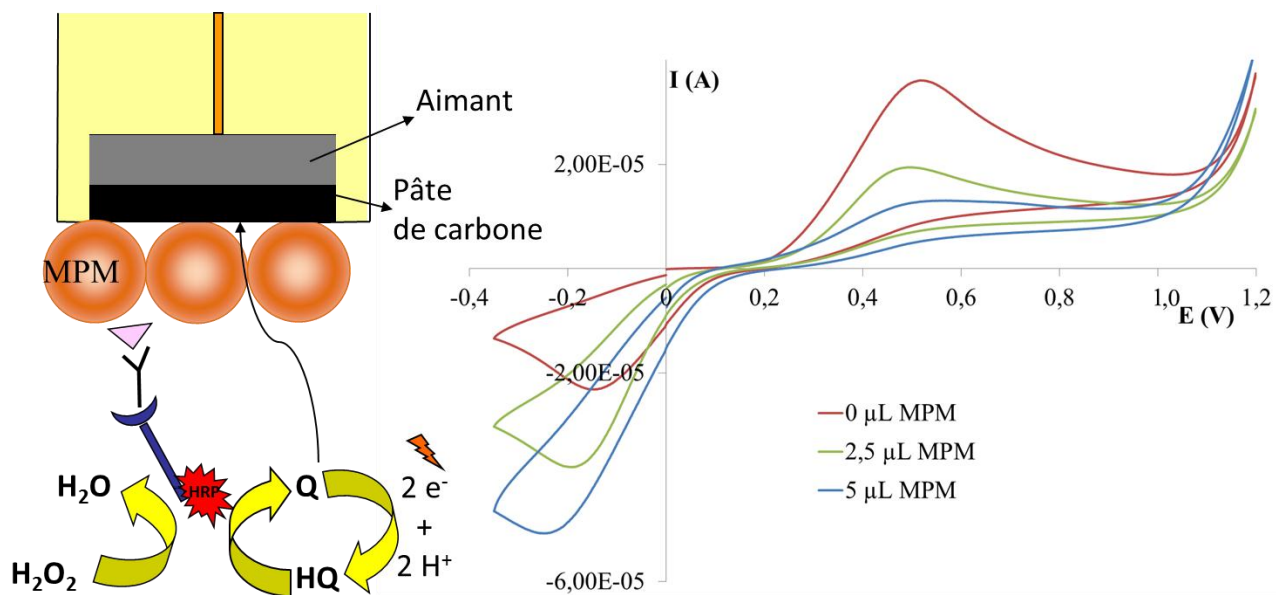


Figure 53 : Evaluation de l'effet de la quantité de MPM déposée sur l'électrode (mCPE) : voltampérométries cycliques de HQ (2 mM), tampon citrate pH 4, en présence de H₂O₂ (2 mM), vitesse de balayage = 10 mV/s

3.3.4 Quantité de microparticules magnétiques à déposer sur l'électrode

Afin de déterminer si la quantité de MPM retenue à la surface de l'électrode de travail ne perturbe pas la diffusion de l'analyte (HQ et Q) vers la surface, l'influence du volume du dépôt de MPM a été étudiée. Une voltampérométrie cyclique en conditions hydrodynamiques (agitation de la solution à l'aide d'un barreau magnétique) a été réalisée en présence d'une quantité croissante de MPM sur lesquelles est immobilisé l'immunocomplexe. Les mesures ont été effectuées en absence de H_2O_2 puisque ici les MPM ne doivent pas participer à la réaction. La réponse ampérométrique correspond à l'électro-oxydation de l'HQ ajoutée en solution. Les résultats indiquent une diminution du signal avec la quantité de MPM déposée à la surface de l'électrode (Figure 52). Plus aucun courant d'oxydation n'est détecté pour un dépôt de 15 μL . Ceci peut être mis en relation avec la diminution de l'accessibilité de HQ à la surface de l'électrode à cause de la barrière formée par les MPM. Ce phénomène avait déjà été mis en évidence au laboratoire par D. Yu et coll¹⁴². L'accessibilité de la surface de l'électrode est d'autant plus réduite que l'encombrement stérique est important ; non seulement les MPM mais également l'immunocomplexe immobilisé à leur surface contribuent au phénomène d'obstruction.

Aux faibles quantités de MPM déposées (entre 2,5 et 5 μL), l'amplification enzymatique du courant de réduction augmente avec la quantité d'immunoparticules déposée à la surface de l'électrode, car davantage d'enzymes sont retenus lorsque la quantité de MPM déposée est plus importante (Figure 53). Un dépôt de 5 μL a été jugé un bon compromis.

3.3.5 Electrodes sérigraphiées

Les mesures suivantes ont été réalisées à l'aide des cSPE. En effet, elles sont plus adaptées pour des analyses décentralisées : quelques microlitres d'échantillon suffisent pour les mesures et l'appareillage est portable. Une voltampérométrie cyclique de l'HQ a été réalisée sur 50 μL de solution en présence des immunoparticules préparées à différentes concentrations d'anticorps. La solution analysée contient de l'hydroquinone (2 mM) et du peroxyde d'hydrogène (2 mM), dans un tampon citrate à pH 5,5. Les immunoparticules ont été éliminées entre chaque voltampérogramme par rinçage modéré de la SPE avec de l'eau MilliQ. En balayant le potentiel entre 0 et 800 mV, l'oxydation de HQ a été observée avec un potentiel de pic à 200 mV (Figure 54 A). Une diminution du signal est observée en présence

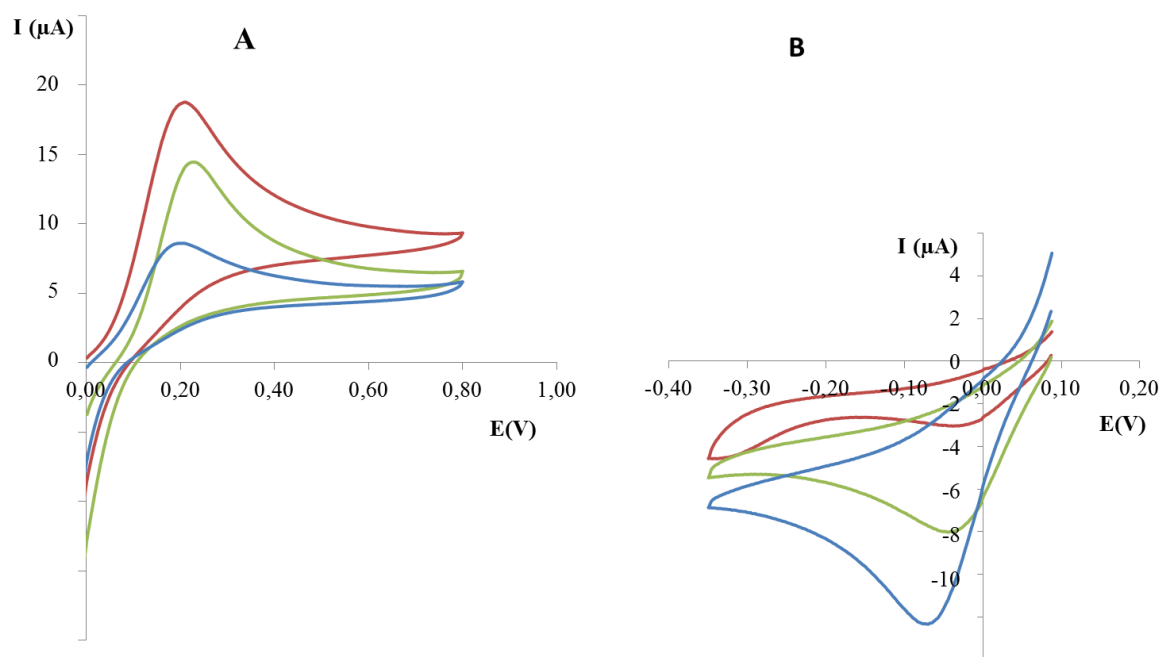


Figure 54 : Voltampérométrie cyclique sur SPE magnétique dans tampon citrate pH 5,5 avec les immunoparticules immobilisées préparées avec le sérum de référence dilué dans du PBS contenant les anti-*tetani* (bleu: 0,350 UI/mL, vert: 0,175 UI/mL, rouge: blanc), HQ 2 mM, H₂O₂ 2 mM, vitesse de balayage 10 mV/s. Séquence de balayage : A : 0 → 800 → 0 mV. B: 88 → -350 → 8 mV, (autres conditions voir méthode)

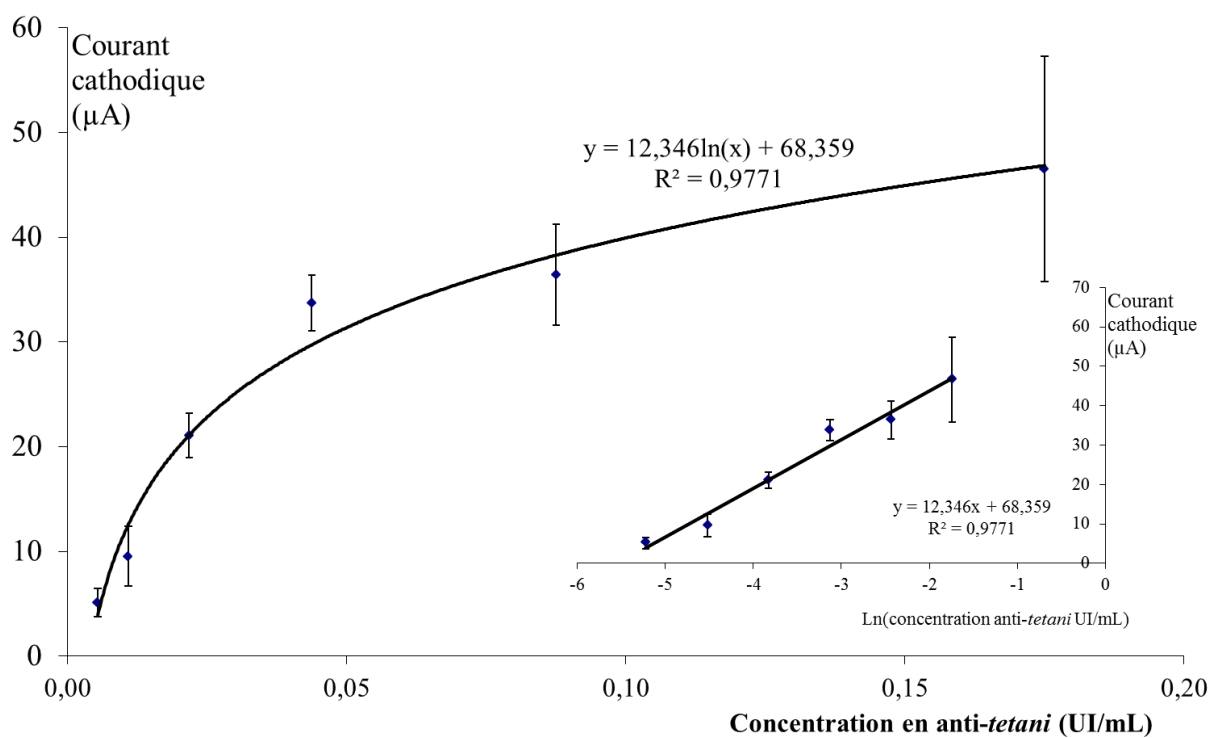


Figure 55 : Courbe de calibration réalisée aux conditions optimisées (n = 3)

des immunoparticules utilisées dans les essais avec l'anticorps anti-*tetani* à 0,350 UI/mL et 0,175 UI/mL (Figure 54, courbes bleue et verte) par rapport à celles ayant servi à l'essai à blanc, c'est à dire MPM sans anticorps anti-*tetani* (Figure 54 A courbe rouge). Des diminutions du courant d'oxydation respectivement de 54 % et 24 % sont observées. Cette tendance a confirmé la présence de l'enzyme HRP sur les billes conduisant à une diminution substantielle de la concentration de HQ en raison de la consommation enzymatique. Une voltampérométrie cyclique a été également réalisée en mode réduction en partant de 88 mV vers -350 et retour à 88 mV (Figure 54 B). Le courant de réduction augmente avec la quantité de HRP immobilisée (Figure 54B) qui est proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-*tetani* piégée sur les MPM. Il faut noter qu'un petit courant de réduction est obtenu avec les billes de l'essai à blanc en raison d'une adsorption non spécifique de l'anticorps marqué par HRP sur celles-ci (Figure 54 B courbe rouge). En mesurant le courant à -0,280 mV, la réponse ampérométrique augmente proportionnellement à la concentration en anticorps anti-*tetani* dans le sérum.

Des courbes d'étalonnage ont été réalisées avec la cSPE en appliquant la séquence :

1. Blocage par de la BSA de 10 μ L de MPM modifiées avec l'anatoxine pendant 1 h
2. Incubation pendant 15 min avec le sérum antitétanique
3. Incubation pendant 45 min, avec anti-IgG marqué par HRP (1/100)
4. Lavage des MPM avec 2 fois 100 μ L de tampon de lavage, puis avec 100 μ L de tampon citrate
5. Détection électrochimique ($E_{app} = -280$ mV, HQ 2 mM, H_2O_2 2 mM)

Chaque incubation a été effectuée dans un volume d'échantillon de 100 μ L.

Le signal est directement proportionnel au logarithme de la concentration en anticorps entre 0,0046 UI/mL et 0,175 UI/mL, avec une limite de détection (LOD) de 0,0046 UI/mL et une limite de quantification (LOQ) de 0,0057 UI/mL (dans PBS). Ces valeurs sont bien inférieures à la limite considérée comme protectrice de 0,06 UI/mL établie par test ELISA¹¹⁴. La gamme de concentration en anticorps mesurable est relativement restreinte car une saturation des sites empêche la détection de concentrations plus élevées et le signal du blanc empêche d'améliorer la limite de détection. La LOD et la LOQ ont été calculées à partir du signal donné par le blanc. Ce dernier est le signal obtenu sans anticorps anti-*tetani*.

Les moyennes et l'écart-type ont été calculés à partir de 4 essais. Les équations appliquées pour déterminer la LOD et la LOQ sont les suivantes :

$$\text{LOD} \rightarrow m_{bl} + 3 \text{SD}_{bl}$$

$$\text{LOQ} \rightarrow m_{bl} + 10 \text{SD}_{bl}$$

m_{bl} = moyenne de 4 blancs

SD_{bl} = écart-type de 4 blancs

Ce mode de calcul a été appliqué pour l'ensemble des résultats quantitatifs d'évaluation des limites.

L'étape de détection, répétée trois fois en utilisant la même SPE et avec les immunoparticules venant du même immunoessai, a donné une valeur de coefficient de variation inférieure à 3 %.

Il a été jugé nécessaire de réaliser une courbe de calibration chaque jour, un exemple de courbe de calibration est reporté à la Figure 55. La barre d'erreur est l'écart-type, cette erreur est plus importante pour les hautes concentrations que pour les faibles mais le coefficient de variation est du même ordre de grandeur pour toutes les concentrations.

3.3.6 Applications aux échantillons de sérum

L'effet de la matrice a été étudié en comparant le signal obtenu avec une solution de PBS et avec un échantillon de sérum, tous les deux dopés avec l'anticorps anti-tétani de référence à une concentration finale de 0,35 UI/mL. Le signal obtenu pour l'échantillon de sérum est plus de trois fois plus faible que celui obtenu avec la solution de PBS. En fait, le signal n'est pas plus élevé que le signal obtenu avec le blanc. En diluant le sérum 400 fois avec du PBS, le même signal que celui pour la solution PBS est obtenu. Dans des expériences ultérieures, les échantillons de sérum ont été dilués 400 fois en vue de minimiser l'effet de l'inhibition de la matrice et afin d'avoir une concentration en anticorps comprise dans le domaine de linéarité étudié. Les valeurs de LOD et LOQ dans le sérum, dans ces conditions, sont respectivement égales à 1,8 UI/mL et 2,3 UI/mL.

Quatre échantillons de sérum de cobayes immunisés contre le tétanos ont été analysés. Les cobayes ont reçu une injection intramusculaire d'anatoxine tétanique. Après un mois d'incubation, du sérum leur a été prélevé. La concentration en anticorps a été déterminée à la

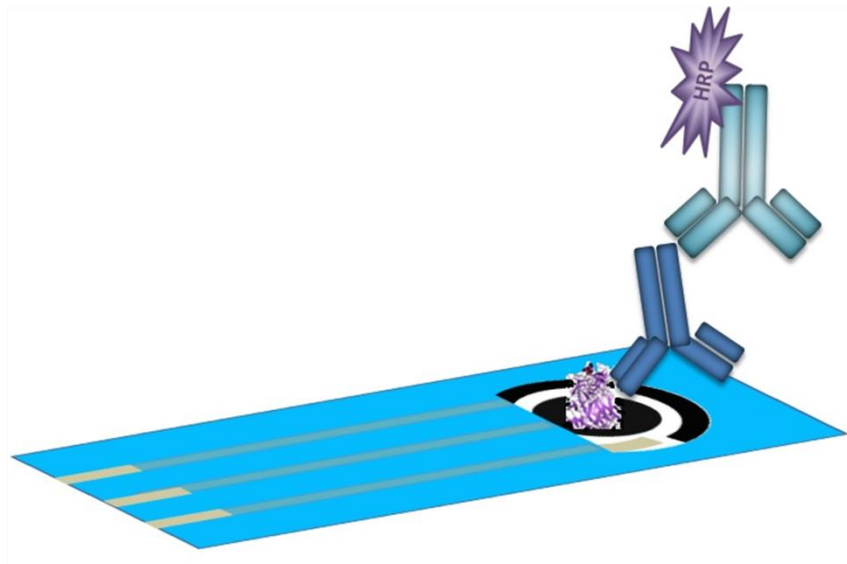
	ELISA	Immunoessai ampérométrique			
	(UI/mL)	Essai 1 (UI/mL)	Essai 2 (UI/mL)	Essai 3 (UI/mL)	Moyenne (UI/mL)
S1	5,3 ± 0,3	14,13	15,69	19,60	16 ± 3
S2	6,6 ± 0,3	8,60	9,88	11,24	10 ± 1
S3	13,7 ± 0,7	13,49	9,87	9,04	11 ± 2
S4	6,0 ± 0,3	13,68	12,18		13

Tableau 2 : Comparaison des résultats obtenus par ELISA et par immunoessai ampérométrique avec microparticules magnétiques

fois par la méthode ELISA de la Pharmacopée Européenne 5 (immunisation et essais réalisés par le laboratoire d'immunologie de l'association pharmaceutique belge (APB)) et par l'immunoessai ampérométrique sur SPE. La méthode des additions standards a été préférée à celle se référant à une courbe de calibration préétablie. Cela a permis de diminuer le temps d'analyse et de réduire les erreurs de l'effet de la matrice. Comme indiqué dans le Tableau 2, pour quatre échantillons de sérum analysés, les résultats sont du même ordre de grandeur, mais il semble que la répétabilité de l'essai immunologique ampérométrique soit moins bonne que celle de l'ELISA. Cela n'a pas été attribué à la détection électrochimique, mais peut-être à l'étape de biotinylation de l'anatoxine. Cette dernière a probablement modifié la structure de l'antigène de manière aléatoire, ce qui pourrait être à l'origine de la relativement grande variabilité du dosage immunologique.

3.4 Conclusion

Cette première partie du travail montre qu'il est possible d'utiliser l'immobilisation de l'anatoxine tétanique sur des MPM pour le dosage par immunoessai avec détection ampérométrique des anticorps anti-*tetani* dans le sérum. Ce test est nettement plus rapide qu'un test ELISA, pour une sensibilité équivalente (0,0040 UI/mL pour le test ELISA Genway¹⁴⁸ vs 0,0057 UI/mL) et ne nécessite pas le sacrifice d'animaux de laboratoire contrairement au test de neutralisation de toxine. De plus, la méthode présentée pourrait permettre des mesures délocalisées grâce à l'utilisation de SPE. Cette approche originale devrait convenir pour un pré-examen rapide afin de déterminer le taux d'anticorps dans des échantillons complexes.



Anatoxine tétanique



Anticorps anti-*tetani*



Anti-IgG marqué par HRP

Figure 56 : Représentation schématique de l'immunocapteur SPE avec l'anatoxine tétanique directement immobilisée sur la surface de l'électrode de travail

4. Immunocapteur ampérométrique SPE

L'utilisation des MPM présente l'avantage de pouvoir réaliser les étapes de réaction immunologique dans le milieu réactionnel sous agitation puis d'éliminer ce milieu et terminer par un rinçage aisé. Cela permet, d'une part, d'accélérer la cinétique de réaction et, d'autre part, la récupération de l'analyte pour ensuite déterminer sa concentration. Mais, la manipulation des MPM n'est pas aisée et peut entraîner des erreurs. En effet, le volume (quantité) de MPM prélevé est sujet aux erreurs liées à la micropipette : une partie des MPM reste dans l'embout de la micropipette. De plus, lors de l'élimination du surnageant, il arrive que des MPM soient entraînées. Une utilisation décentralisée hors laboratoire n'est pas envisageable à cause des nombreuses manipulations successives et des rinçages des MPM. C'est pourquoi, une autre stratégie se rapprochant plus du concept d'immunocapteur a été envisagée. Plutôt que d'immobiliser l'anatoxine sur des MPM, elle peut être fixée sur la surface de la SPE.

Toutes les étapes de l'immunoessai et de la détection se feront sur le même support. Lorsque la réaction a eu lieu, aucune perte n'est possible sauf éventuellement dans le cas de désorption de l'antigène. De plus, les manipulations sont plus aisées puisque l'utilisation d'aimant n'est plus nécessaire (Figure 56). Plusieurs modes d'immobilisation de l'anatoxine sont possibles.

La composition des tampons est identique à celle décrite au point 3.1.1

4.1 Immobilisations de l'anatoxine : essais- erreurs

Dans un premier temps, différentes méthodes d'immobilisation de l'anatoxine ont été investiguées. Une étude de la littérature a permis de sélectionner quelques méthodes facilement applicables à notre immunoessai.

4.1.1 Immobilisation d'affinité via la liaison streptavidine-biotine

4.1.1.1 Introduction

La liaison streptavidine-biotine est une liaison forte ($K_d = 10^{-15}$ mol/L) et très stable mais le désavantage de ce mode de liaison est que l'antigène doit être modifié par biotinylation. Celle-ci peut modifier la reconnaissance par l'anticorps si la biotine se fixe au niveau de l'épitope. La streptavidine doit également être immobilisée sur l'électrode de travail SPE. Une

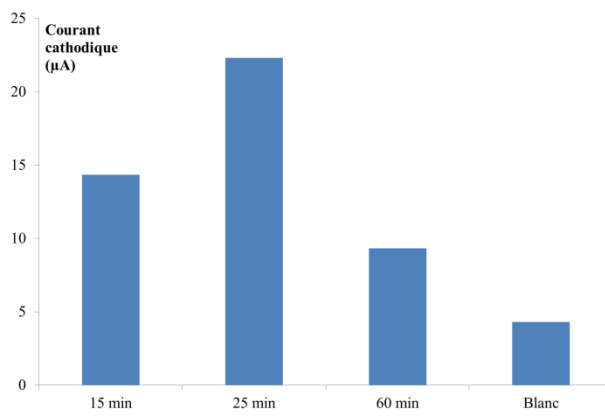
physisorption de la streptavidine sur l'électrode de travail et ensuite l'immobilisation de l'anatoxine biotinylée ont été réalisées dans le cadre de notre travail. L'intérêt d'utiliser la streptavidine est de pouvoir orienter ensuite la molécule à immobiliser en fonction de l'endroit où la biotine est fixée. De plus, la biotine (ester de biotine) possède un bras qui permet de diminuer l'encombrement stérique. Cependant, ici, l'orientation de l'antigène sur la surface de l'électrode n'a que peu d'intérêt vu qu'un mélange d'anticorps est dosé. Il ne sert à rien de privilégier un épitope plutôt qu'un autre, que du contraire. L'étape de biotinylation de l'antigène est longue en raison de la dialyse et, comme dit précédemment, elle pourrait modifier certains épitopes.

4.1.1.2 Méthode

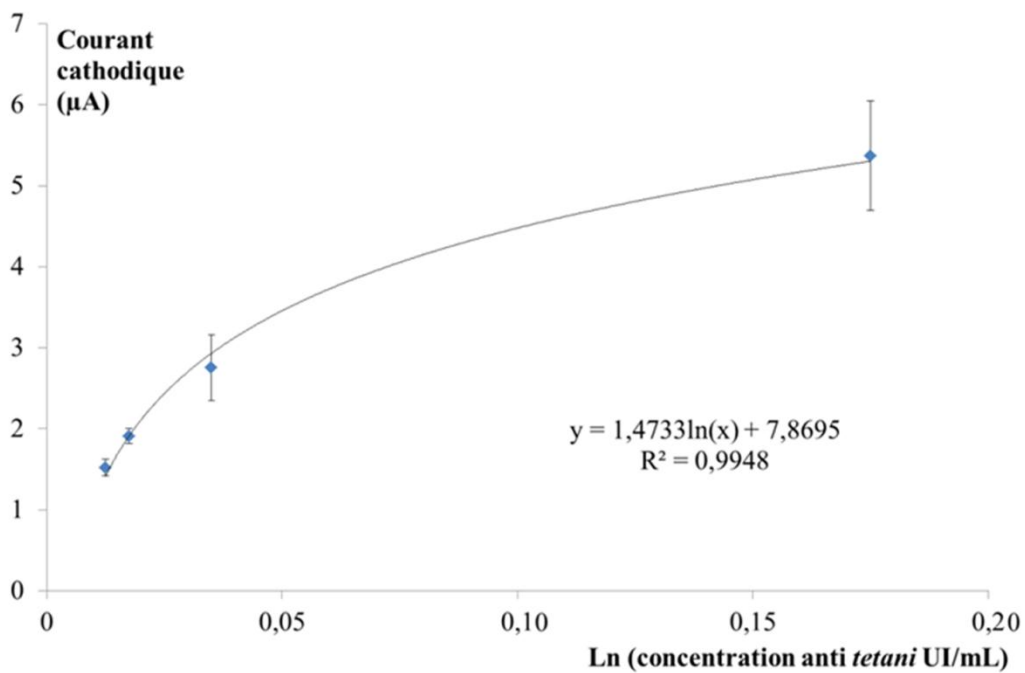
- Préparation des électrodes :

Le mode opératoire suivi pour l'immobilisation était le même que celui décrit par l'équipe de Diaz-Gonzalez publié dans Talanta en 2005¹⁰⁰.

- Modification des SPE (Dropsens DRP110, électrode de travail en carbone), selon la séquence suivante :
 1. Prétraitement de la SPE : dépôt de 50 μL de H_2SO_4 (0,1 M) à la surface de la SPE et application, pendant 2 min, d'un potentiel de 1,30 V
 2. Lavage avec le tampon PBS
 3. Adsorption de la streptavidine (1×10^{-5} M) sur l'électrode de travail : dépôt de 10 μL (en solution dans PBS) sur la surface de l'électrode de travail de la SPE, une nuit à 4°C
 4. Lavage avec le tampon PBS
 5. Blocage des sites libres : 10 μL d'une solution de BSA (2 %), pendant 15 min
 6. Immobilisation de l'anatoxine tétanique biotinylée (préparée comme expliqué au point 3.2.1) : dépôt de 40 μL durant 1h30
 7. Lavage avec le tampon PBS
 8. Blocage des sites libres : 10 μL d'une solution de BSA (2 %), pendant 15 min
 9. Lavage avec le tampon PBS



- Figure 57 : Influence du temps de réaction entre le sérum à doser et la SPE modifiée. Les conditions expérimentales sont décrites dans la méthode (n = 1).



- Figure 58 : Courbe de calibration réalisée aux conditions décrites dans la méthode

- Immunoessai sur la languette SPE :
 1. Incubation de l'anticorps antitétanique : 50 µL pendant 25 min
 2. Lavage avec le tampon PBS
 3. Incubation de l'anti-IgG marqué par HRP (1/100) 45 min
 4. Lavage avec le tampon de lavage

- Détection :
 1. Dépôt de 40 µL de tampon citrate contenant H₂O₂ (2,5 mM)
 2. Stabilisation du courant
 3. Ajout de 10 µL de HQ

4.1.1.3 Résultats

Le temps d'incubation de l'anticorps à doser offrant un signal maximal a été déterminé. Les résultats fournissent un graphique caractéristique en cloche avec un temps d'incubation optimal situé autour de 25 min (Figure 57). Un temps plus long entraîne certainement une compétition interne des anticorps pour l'antigène, provoquant une diminution de signal.

Le signal est proportionnel au logarithme de la concentration en anticorps anti-*tetani* (Figure 58).

La limite de détection (LOD) est égale à 0,008 UI/mL et la limite de quantification est de 0,013 UI/mL. La LOD et la LOQ ont été calculées à partir du signal donné par le blanc. Ce dernier est le signal obtenu sans anticorps anti-*tetani*. Les moyennes et l'écart-type ont été calculés à partir de 3 essais.

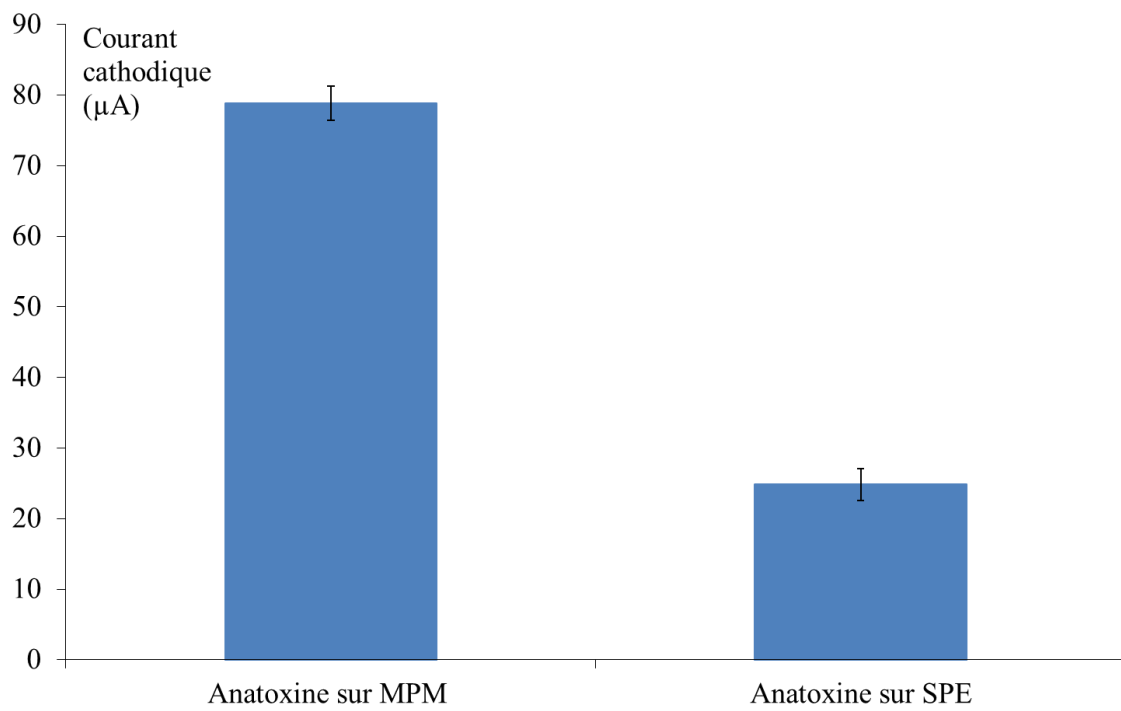


Figure 59 : Comparaison du signal obtenu avec la méthode utilisant les MPM et avec les SPE modifiées par la streptavidine. Les barres d'erreur sont les écarts-types (n = 3)

Tout comme avec les MPM, la LOQ est inférieure à la limite considérée comme protectrice de 0,06 UI/mL établie par test ELISA¹¹⁴. Cependant, la LOQ obtenue avec les MPM (0,0057 UI/mL) est deux fois plus basse. En effet, le signal obtenu (signal moins signal du blanc) est presque trois fois inférieur à celui obtenu avec les MPM (Figure 59). Le signal de base des SPE modifiées par la streptavidine, avant l'ajout d'HQ, est beaucoup plus élevé qu'avec les MPM sur SPE en raison d'un courant capacitif plus important.

4.1.2 Différentes stratégies d'immobilisation sans modification de l'anatoxine

4.1.2.1 Immobilisation physique sur la surface de carbone d'une SPE

- Introduction :

L'électrode de travail en carbone a été au préalable activée afin de générer des groupements fonctionnels (R-COOH, R-OH). L'anatoxine est ensuite adsorbée à la surface de la SPE. L'avantage de cette procédure est la facilité de mise en œuvre. De plus, l'antigène n'est pas modifié. Cependant, la liaison avec le transducteur n'est pas forte.

- Méthode :

La méthode d'immobilisation retenue est la suivante :

1. Prétraitement des SPE : dépôt de 50 μL de H_2SO_4 (0,1 M) à la surface de la SPE et application, pendant 2 min, d'un potentiel de 1,30 V
2. Lavage avec le tampon PBS
3. Adsorption de l'anatoxine (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) : 10 μL pendant 2h soit à 4°C soit à température ambiante dans une petite boîte hermétique puis la solution est laissée à évaporer.
4. Blocage des sites libres : BSA (2 %), 10 μL pendant 30 min
5. Lavage avec le tampon PBS

L'immunoessai et la détection sont réalisés de la même façon que précédemment (paragraphe 4.1.1.2).

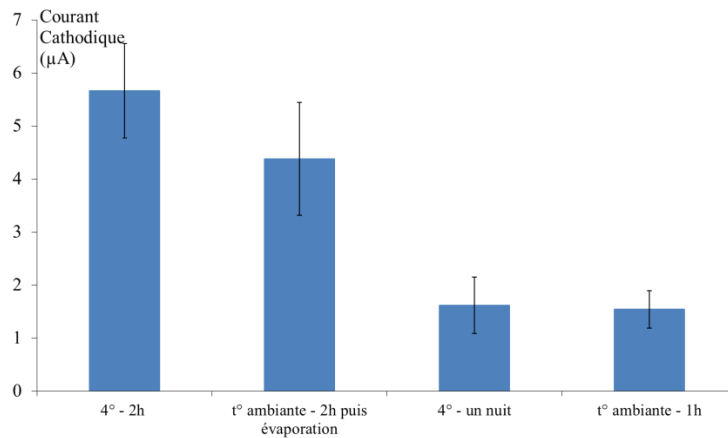


Figure 60 : Différentes immobilisations physiques de l'anatoxine tétanique : 150 µg/mL, 10 µL sur SPE oxydée à 1,30 V pendant 3 min (H₂SO₄ 0,1 M). Essai sur anti-*tetani* 0,035 UI/mL. Les barres d'erreur sont les écarts-types (n = 3)

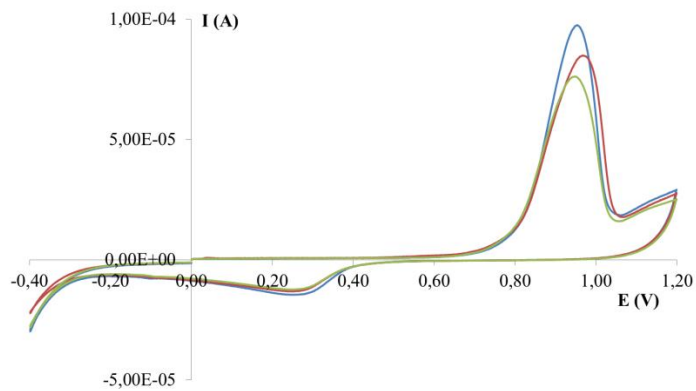


Figure 61 : Electrodeposition d'une couche d'or visualisée par VC d'une solution de PBS (0 → 1200 → -400 → 0 mV), vitesse de balayage 100 mV/s (n = 3)

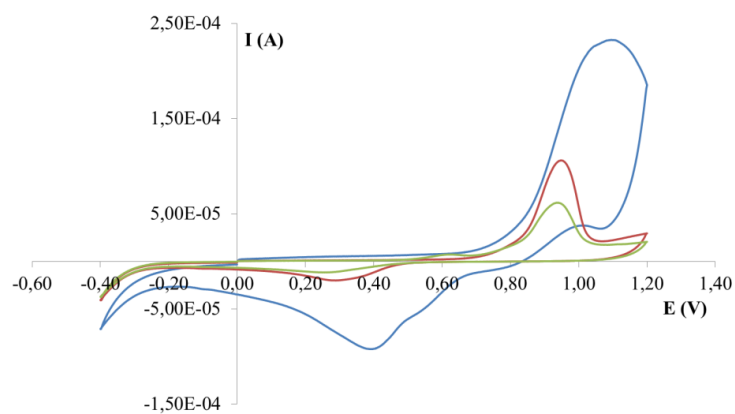


Figure 62 : Physisorption d'une couche d'or visualisée par VC d'une solution de PBS (0 → 1200 → -400 → 0 mV), vitesse de balayage 100 mV/s (n = 3)

- Résultats :

Différentes stratégies d'immobilisation physique ont été testées. Des paramètres tels que la température et le temps d'immobilisation ont été évalués. Une immobilisation à 4°C pendant un temps relativement court semble plus efficace qu'à température ambiante et pendant une nuit complète (Figure 60).

4.1.2.2 Immobilisation physique sur une couche d'or déposée à la surface de carbone d'une SPE

- Introduction :

Une électrodéposition ou un dépôt d'or par physisorption peuvent être facilement mis en œuvre. Cette couche supplémentaire aura pour rôle d'augmenter les transferts électroniques. L'anatoxine est ensuite physisorbée à sa surface.

- Méthode :

La couche d'or peut être formée par électrodéposition d'une solution d' $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,1 M dans H_2SO_4 0,5 M) en appliquant un potentiel de -400 mV pendant 180 s. Le dépôt d'or peut également se faire en laissant évaporer 10 μL d'une solution d'or colloïdal (105 mg/L) à la surface de l'électrode. Ensuite, l'anatoxine est physisorbée sur cette couche d'or.

- Résultats :

Le dépôt d'or a pu être visualisé par voltampérométrie cyclique d'une solution de PBS. Différentes voltampérométries cycliques ont été réalisées avec les SPE modifiées par l'or. Un pic d'oxydation est présent à 900 mV et de réduction à 300 mV pour l'électrodéposition correspondant respectivement à l'oxydation de l'or et à la réduction des oxydes d'or formés (Figure 61). Pour les électrodes modifiées par l'or colloïdal, le pic anodique est aussi présent mais à un potentiel variant de 850 à 1100 mV et le pic de réduction est situé entre 300 et 400 mV (Figure 62). Notons la bonne répétabilité de la modification par électrodéposition (Figure 61) par rapport à la modification physique (Figure 62).

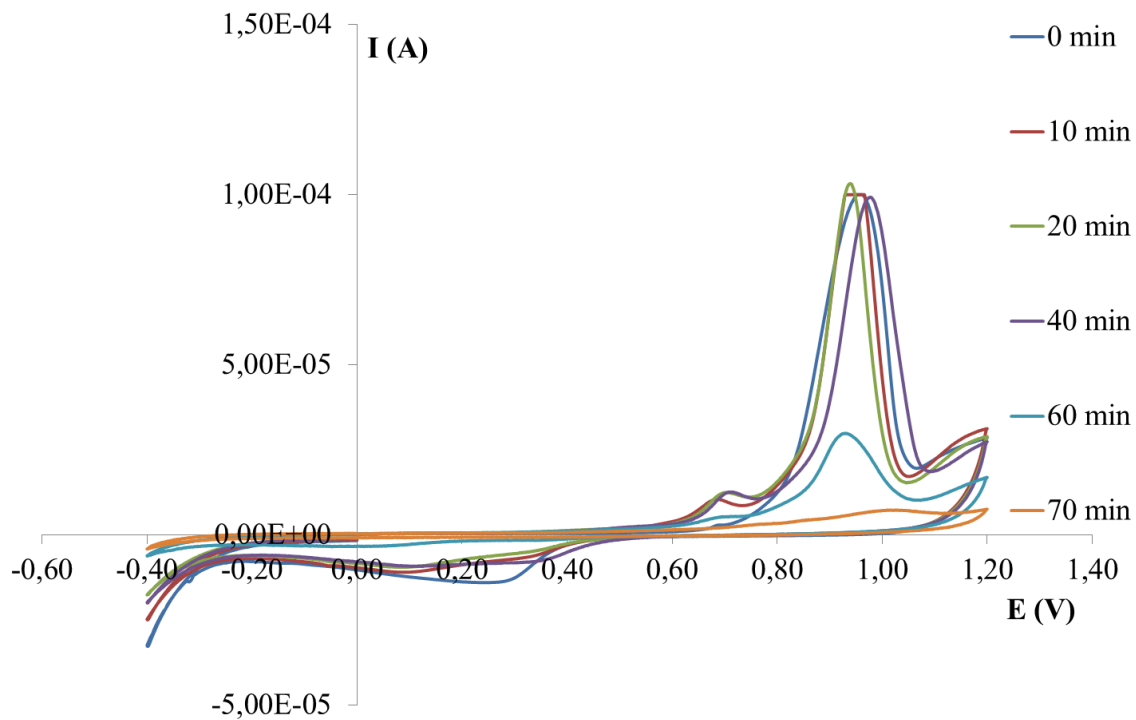


Figure 63 : Voltampérométrie cyclique d'une solution de PBS sur SPE modifiée par de l'or électrodéposé après différents temps de réaction avec l'AMP ($0 \rightarrow 1200 \rightarrow -400 \rightarrow 0$ mV), vitesse de balayage 100 mV/s, chaque voltampérométrie a été réalisée sur une nouvelle SPE

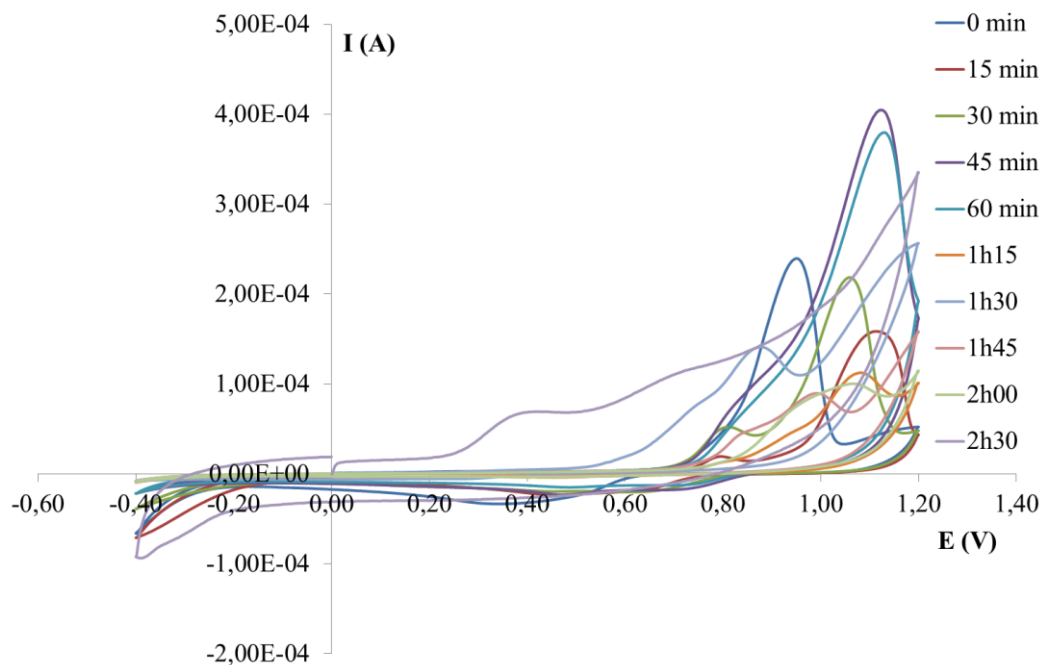


Figure 64 : Voltampérométrie cyclique d'une solution de PBS sur SPE modifiée par de l'or colloïdal après différents temps de réaction avec l'AMP ($0 \rightarrow 1200 \rightarrow -400 \rightarrow 0$ mV), vitesse de balayage 100 mV/s, chaque voltampérométrie a été réalisée sur une nouvelle SPE

4.1.2.3 Immobilisation chimique sur la couche d'or

- Introduction :

Afin d'introduire des fonctions carboxyliques à la surface de la couche d'or, de l'acide mercaptopropionique (AMP) est utilisé. En effet, la fonction thiol de cet acide va réagir avec l'or et former spontanément un lien chimique stable. Les fonctions carboxyliques libres vont ensuite être utilisées pour former un lien peptidique avec les fonctions amines de l'anatoxine par la méthode carbodiimide (EDC/NHS).

- Méthode :

Après le dépôt de la couche d'or par l'une ou l'autre méthode décrite au point précédent, la procédure suivante a été adoptée :

1. Dépôt de 10 μL d'AMP (40 mM) sur l'électrode de travail
2. Dépôt d'un mélange d'EDC et NHS sur l'électrode préalablement rincée et séchée par évaporation (1h à température ambiante)
3. Lavage avec le tampon PBS
4. Adsorption de l'anatoxine (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) : 10 μL pendant 1h à température ambiante
5. Désactivation des sites libres par ajout d'éthanolamine 1 M pendant 1h
6. Blocage des sites libres : 10 μL de solution de BSA (2 %) pendant 30 min
7. Lavage avec le tampon PBS

- Résultats

Afin de s'assurer que la totalité de la couche d'or a été fonctionnalisée par l'AMP, des voltampérométries cycliques ont été réalisées avec une solution PBS. Le pic d'oxydation de l'or diminue au fur et à mesure que l'or réagit avec l'AMP. Dès que le pic d'oxydation a disparu, quasi toute la surface d'or est fonctionnalisée par une monocouche de AMP. Lorsque la couche d'or est formée par électrodéposition, une diminution du courant est observée à partir de 40 min de réaction avec l'AMP et est totale dès 70 min (Figure 63). Tandis que dans le cas d'un dépôt d'or colloïdal, la disparition du pic d'oxydation a lieu après 2h30 (Figure 64). Cette différence de temps de réaction peut être due à la surface spécifique plus importante lors d'une électrodéposition.

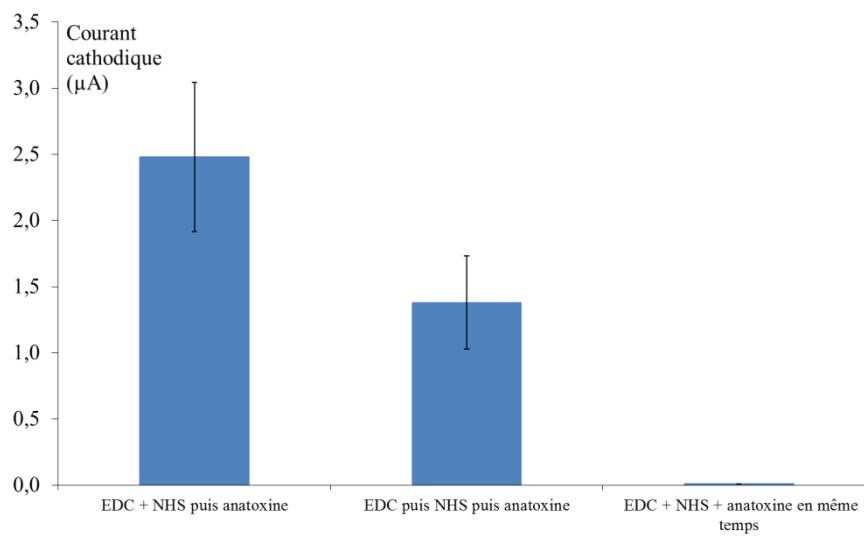


Figure 65 : Signal ampérométrique en fonction des étapes de modifications : EDC (0,1 M dans PBS), NHS (0,1 M dans PBS), anatoxine 25 µg/mL, anti-tetani 0,035 UI/mL

4.1.2.4 Immobilisation chimique sur la surface de carbone par la méthode carbodiimide

- Introduction :

Après génération par oxydation de groupements carboxyliques à la surface de l'électrode, une liaison peptidique est réalisée entre ces groupements et les fonctions amines de l'anatoxine.

- Méthode :

1. Prétraitement d'une SPE : dépôt de 50 μL de H_2SO_4 (0,1 M) à la surface de la SPE et application, pendant 2 min, d'un potentiel de 1,30 V
2. Lavage avec le tampon PBS
3. Dépôt d'un mélange d'EDC et NHS (0,1 M dans PBS) sur l'électrode de travail préalablement rincée et séchée par évaporation (1h à température ambiante)
4. Lavage avec le tampon PBS
5. Immobilisation de l'anatoxine (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) : 10 μL pendant 1h à température ambiante
6. Désactivation des sites libres par ajout d'éthanolamine 1 M pendant 1h
7. Blocage des sites libres : 10 μL d'une solution de BSA (2 %), pendant 30 min
8. Lavage avec le tampon PBS

- Résultats :

Plusieurs procédures ont été testées : l'ajout de EDC, NHS et de l'anatoxine a été effectué soit successivement, soit en même temps, soit un mélange de EDC et NHS puis l'anatoxine. Le meilleur signal a été obtenu lorsque les solutions d'EDC et NHS sont mises en contact avec la surface activée de l'électrode en même temps, suivi après 1h de réaction, du dépôt de l'anatoxine (Figure 65).

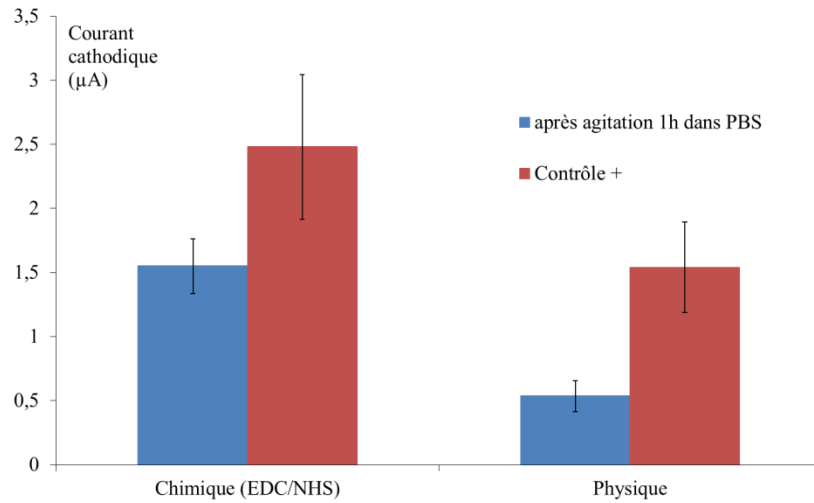


Figure 66 : Etude de la stabilité de l'immobilisation physique et chimique. Les SPE sont oxydées à 1,30 V pendant 3 min. 10 µL d'anatoxine tétanique à 25 µg/mL sont immobilisés soit physiquement soit chimiquement via EDC NHS 0,1 M pendant 2h (n = 3)

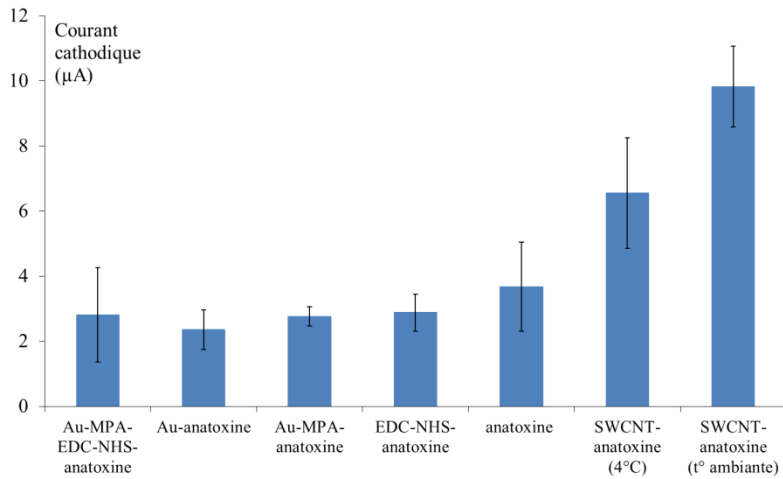


Figure 67 : Influence du mode de modifications. Anti-tetani 0,035 UI/mL (n = 3)

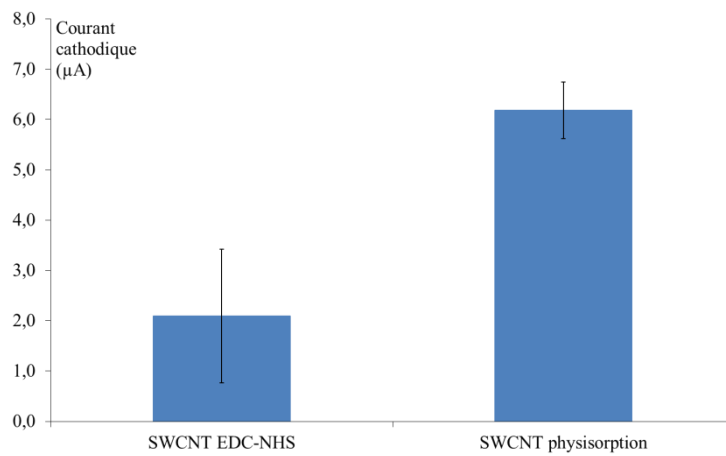


Figure 68 : Comparaison des immobilisations physique et chimique (via EDC et NHS). Anti-tetani 0,035 UI/mL (n = 3)

4.1.2.5 Immobilisation sur SPE modifiée par des nanotubes de carbone

Des SPE modifiées par des SWCNT (commercialisées par Dropsens) (SWCNT-SPE) ont également été investiguées. L'immobilisation de l'anatoxine a été effectuée par physisorption et via un lien carbodiimide (NHS/EDC) ; les modes opératoires sont identiques à ceux utilisés avec les cSPE.

4.1.2.6 Comparaison des différentes stratégies

Les cSPE modifiées ont été plongées dans une solution de PBS sous agitation (250 tours/min) pendant 1h afin d'évaluer la stabilité de l'immobilisation. Six SPE ont été modifiées chimiquement (EDC/NHS) et six physiquement. Trois électrodes de chaque ont servi à réaliser l'immunoessai directement. Les SPE modifiées restantes ont été utilisées pour l'immunoessai en ayant pris soin au préalable de bloquer les sites libres par la BSA

La liaison chimique sur cSPE résiste mieux que la physique. En effet, après le bain dans une solution de PBS, le signal est d'environ 34 % du signal de départ pour l'immobilisation physique contre 62 % pour la chimique (Figure 66).

Les SPE modifiées par SWCNT donnent un signal nettement plus important que les cSPE. Aucune modification ne se démarque significativement au niveau des cSPE (Figure 67). Les immobilisations par adsorption physique et par liaison chimique via EDC et NHS ont été comparées sur SPE SWCNT. Contrairement à ce qui serait attendu, l'adsorption chimique semble bien moins efficace que la physisorption. En effet, la réponse obtenue avec l'immobilisation chimique est environ trois fois inférieure à celle obtenue par immobilisation physique (à température ambiante) (Figure 68).

Le mode d'immobilisation de l'anatoxine sur les SPE le plus efficace semble donc être la physisorption sur SPE modifiée par des SWCNT. La température de l'immobilisation n'a pas une importance significative. Par facilité, l'immobilisation à température ambiante sera adoptée.

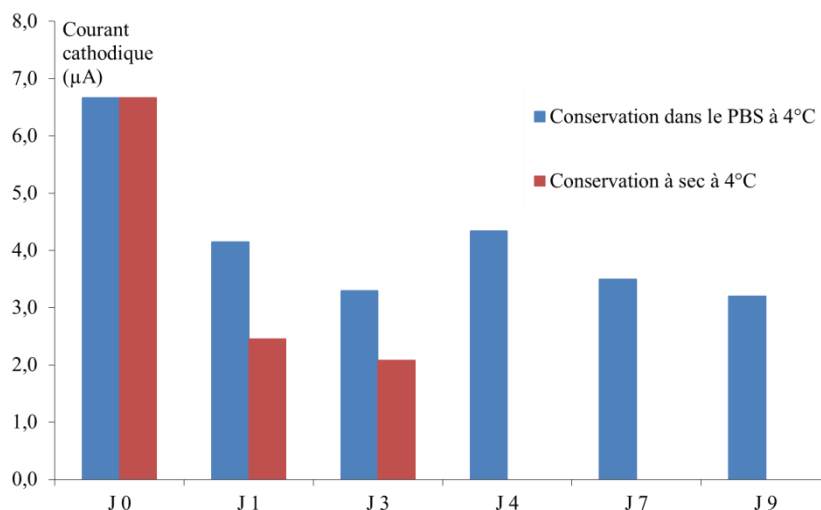


Figure 69 : Evaluation de la stabilité des SWCNT SPE modifiées par l'anatoxine tétanique physisorbée, conservées à sec ou dans du PBS à 4°C. L'essai est réalisé sur des échantillons contenant 0,035 UI/mL d'anti-tetani (n = 1)

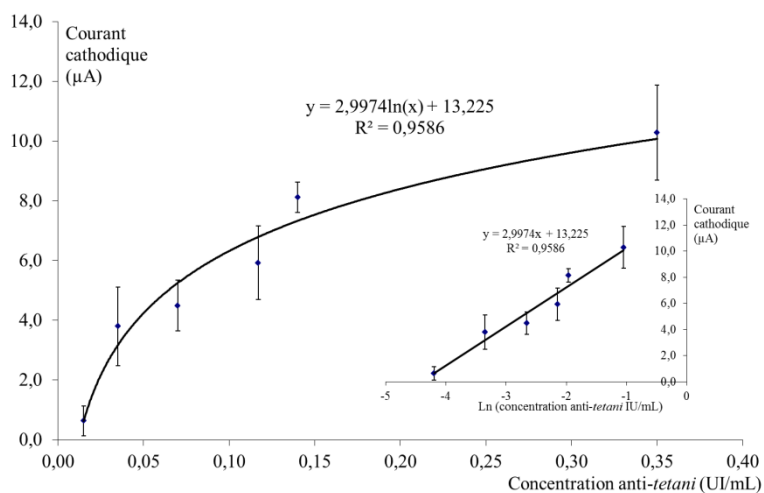


Figure 70 : Courbe de calibration réalisée avec des SWCNT SPE. Anatoxine physisorbée 25 µg/mL après oxydation des SPE. Le signal du blanc est déduit du signal (n = 3)

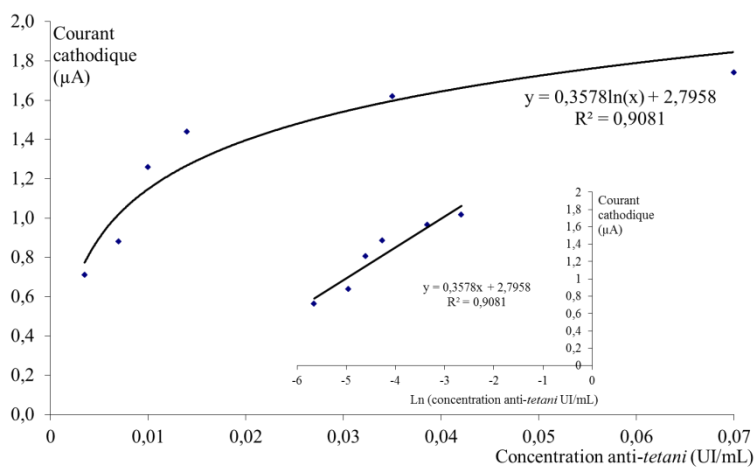


Figure 71 : Courbe de calibration réalisée avec des SPE SWCNT. Anatoxine physisorbée 25 µg/mL sans oxydation préalable des SPE. Le signal du blanc est déduit du signal (n = 1)

La stabilité des SWCNT-SPE modifiées a été évaluée. La conservation la plus efficace est à 4°C dans une solution de PBS. Après un jour de conservation dans une solution de PBS, le signal tombe à 62 % du signal initial et est stable durant neuf jours. Par contre, le lendemain de leur fabrication, les SPE conservées à sec ont un signal d'environ 30 % du signal initial et au bout de quatre jours, elles ne donnent plus de signal (Figure 69).

4.1.2.7 Courbes de calibration

Une courbe de calibration a été réalisée avec les SWCNT-SPE modifiées par physisorption de l'anatoxine tétanique (Figure 70). Le signal est directement proportionnel au logarithme de la concentration en anticorps entre 0,015 UI/mL et 0,35 UI/mL, avec une limite de détection (LOD) de 0,015 UI/mL et une limite de quantification (LOQ) de 0,018 UI/mL. Ces valeurs sont inférieures à la limite considérée comme protectrice de 0,06 UI/mL établie par un test ELISA¹¹⁴. La LOD et la LOQ ont été calculées à partir du signal donné par le blanc. Ce dernier est le signal obtenu sans anticorps anti-*tetani*. Les moyennes et l'écart-type ont été calculés à partir de 3 essais.

La LOQ est proche de celle obtenue avec les SPE modifiées par la streptavidine qui était de 0,013 UI/mL, mais plus fortement éloignée de celle obtenue avec les MPM (0,0046 IU/mL). La moyenne des coefficients de variation obtenus avec cette méthode est proche des 25 % alors qu'elle est de l'ordre des 13 % avec l'immobilisation par la streptavidine.

Une courbe de calibration a également été réalisée avec des SWCNT-SPE non prétraitées par oxydation (Figure 71). En effet, ces SPE ont directement été modifiées par physisorption. Le signal est bien proportionnel au logarithme de la concentration mais nettement plus faible qu'avec le prétraitement par oxydation des électrodes et le plateau du signal est atteint avec des concentrations plus faibles. Ceci peut s'expliquer par une moindre quantité d'anatoxines immobilisées.

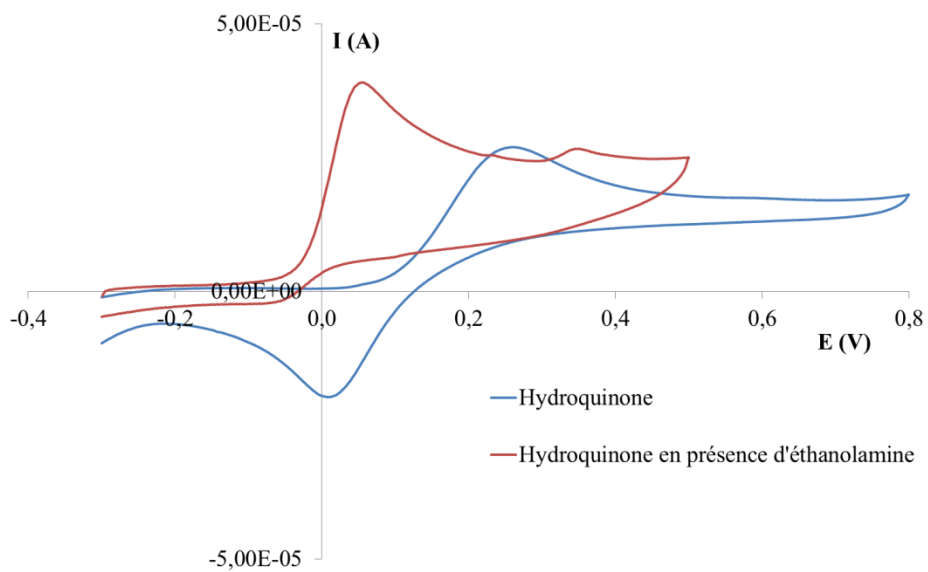


Figure 72 : Voltampérométrie cyclique sur cSPE de HQ (2 mM) (courbe bleue) et HQ (2 mM) en présence d'éthanolamine (200 mM) (ligne rouge) SPE, vitesse de balayage : 10 mV/s, tampon citrate pH 5,5 (-300 mV → +500 mV → -300 mV)

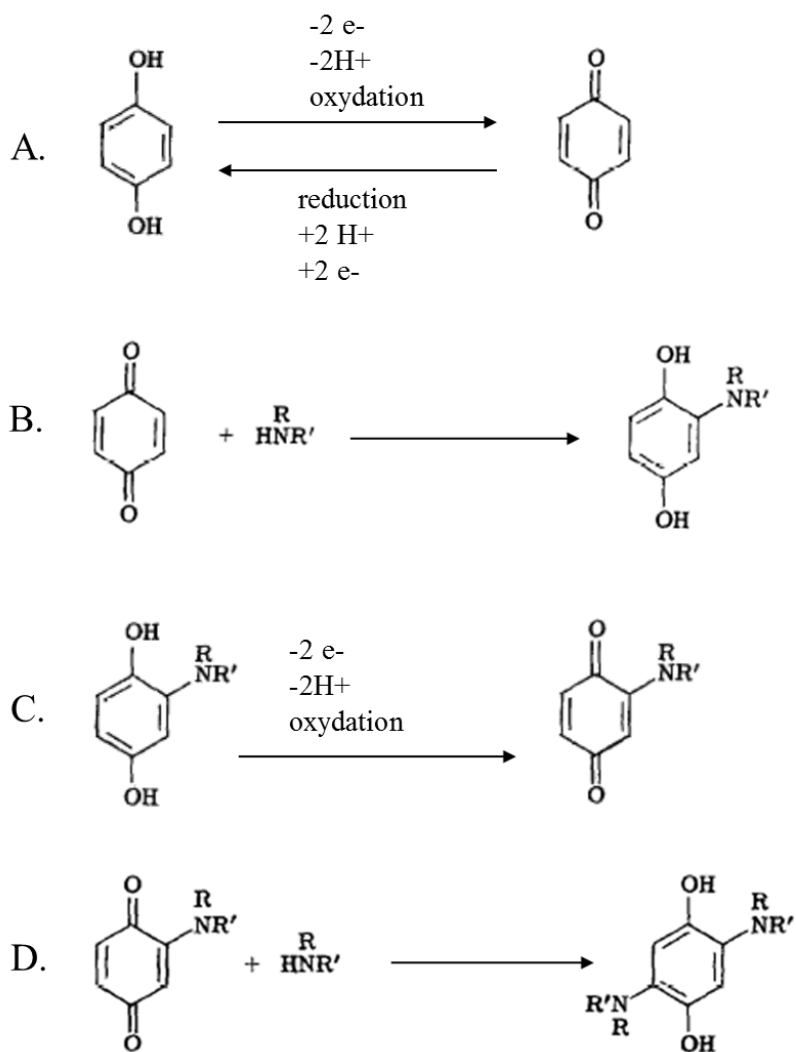


Figure 73 : Equations d'oxydation de HQ en présence d'éthanolamine, adapté de¹⁴⁹

4.2 Interférence de l'éthanolamine*

Il est surprenant que l'immobilisation chimique via EDC/NHS, particulièrement sur SWCNT-SPE, donne un signal si faible par rapport à l'immobilisation physique. Une explication est que de l'éthanolamine utilisée lors de la modification des SPE interfère dans la réaction de détection. En effet, au cours de l'étape de détection, l'hydroquinone est oxydée en benzoquinone par HRP. La benzoquinone est ensuite réduite électrochimiquement. Nous avons constaté que l'éthanolamine interfère dans ce processus en raison de sa réaction avec la benzoquinone. La réaction d'une quinone avec des amines a été décrite dans la littérature¹⁴⁹. Cette interaction a été vérifiée par voltampérométrie cyclique (VC) de HQ et de HQ en présence d'éthanolamine. Il se forme un composé d'addition qui ne peut être réduit au niveau d'une électrode.

La VC d'une solution 2 mM de HQ (Figure 72) montre un comportement quasi-réversible (bleu). En présence d'éthanolamine, l'électrooxydation de HQ donne lieu à un signal catalytique avec une augmentation du pic et un décalage important du potentiel vers des valeurs moins positives (rouge). Ceci peut s'expliquer par le fait que la forme oxydée réagit avec l'éthanolamine en donnant un dérivé d'addition stable. La réaction d'oxydation est donc facilitée, ce qui se traduit par un décalage du potentiel d'oxydation vers des valeurs inférieures et par une augmentation du signal. En présence d'éthanolamine, le pic de réduction disparaît car la réaction entre la benzoquinone et l'éthanolamine entraîne une consommation de la benzoquinone.

Sur le voltampérogramme de HQ en présence d'éthanolamine (rouge), deux pics d'oxydation sont observés. Le premier pic, situé à environ 50 mV, correspond à la formation de la benzoquinone (Figure 73 réaction A). Ce pic, en l'absence d'éthanolamine, se situe aux alentours de 250 mV. Le doublet non liant de l'azote de l'éthanolamine vient s'additionner sur un des carbones rendu disponible (δ^+) grâce à la présence de la fonction quinone (oxygène δ^-) de la benzoquinone. Cette addition entraîne une réduction interne pour former une hydroquinone substituée en ortho (Figure 73 réaction B). Le second pic d'oxydation, vers 350 mV, correspond probablement à l'oxydation de ce nouveau composé (Figure 73 réaction C). La benzoquinone substituée ainsi formée subit la même addition que lors de la réaction B mais sur le carbone symétrique en ortho de l'autre quinone (Figure 73 réaction D).

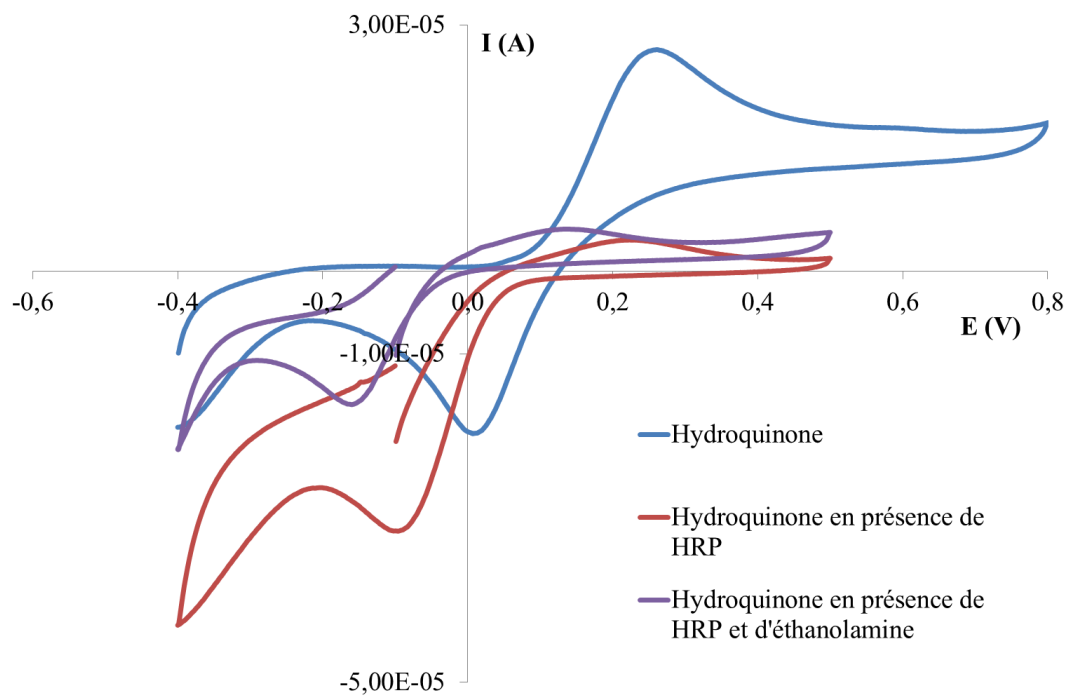
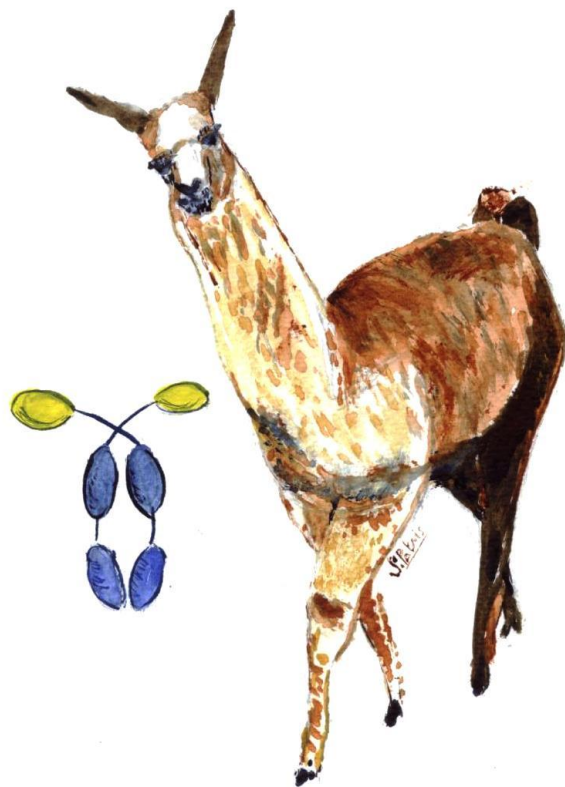


Figure 74 : Voltampérométrie cyclique de HQ (2 mM) (courbe bleue), HQ (2 mM) en présence d'HRP (0,4 mg/mL) (ligne rouge) et HQ (2 mM) en présence d'HRP et d'éthanolamine (200 mM) (ligne mauve). SPE, vitesse de balayage : 10 mV/s, tampon citrate pH 5,5 contenant H_2O_2 (2 mM) (-300 mV \rightarrow $+500$ mV \rightarrow -300 mV)

Les résultats de la VC nous indiquent donc que l'amplification enzymatique du courant de réduction de Q en présence de HRP est inhibée par l'éthanolamine (mauve). En effet, étant donné que la benzoquinone réagit avec l'éthanolamine pour donner une forme réduite, elle est moins disponible pour être réduite à l'électrode ce qui entraîne une diminution du courant de réduction (Figure 74).

Au vu de ces résultats, il a été jugé nécessaire de tester l'immobilisation par la méthode carbodiimide sans utiliser d'éthanolamine. L'éthanolamine a pour rôle de se lier avec les fonctions activées par EDC/NHS qui n'ont pas réagi avec la protéine à immobiliser. Un simple blocage avec la BSA peut s'avérer suffisant pour « éteindre » les dernières fonctions activées et éviter que d'autres protéines viennent se lier à la SPE.

Seconde partie : le biomarqueur HER2



Seconde partie : le biomarqueur HER2

1. Contexte et revue de la littérature

1.1 La protéine HER2

HER2 est une glycoprotéine faisant partie de la famille des récepteurs pour les facteurs de croissance épidermique humains, ErbB et de la sous-famille HER. HER2 a une masse de 185 kDa et est constituée de trois domaines : extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire. Le domaine extracellulaire comporte quatre sous-domaines. Dans cette sous-famille, il y a quatre récepteurs transmembranaires HER1, HER2, HER3 et HER4. Ces récepteurs sont impliqués dans la croissance et la différenciation des cellules. HER2 est le seul récepteur de cette famille n'ayant pas de ligand connu. La liaison d'un ligand spécifique à HER1, HER3 ou HER4 provoque une dimérisation du récepteur, de préférence avec HER2 comme partenaire, ce qui induit la signalisation cellulaire¹⁵⁸. Après dimérisation du récepteur, des résidus tyrosines au niveau du domaine intracellulaire sont phosphorylés à partir d'ATP, c'est l'autophosphorylation. Cette phosphorylation a pour but de libérer des sites de haute affinité pour des protéines de signalisation cellulaire. En effet, une kinase intracytoplasmique est ensuite activée, ce qui va provoquer une cascade de phosphorylations jusqu'au facteur transcriptionnel, situé dans le noyau, également activé par phosphorylation. Cette cascade de phosphorylations permet de transmettre le message depuis le récepteur membranaire jusqu'au noyau cellulaire entraînant la prolifération cellulaire¹¹⁷. Une croissance maligne se produit lorsque HER2 est surexprimé donnant naissance à de multiples hétérodimères HER2 et à une signalisation cellulaire plus forte, ce qui entraîne une réactivité accrue aux facteurs de croissance. La surexpression de HER2 est présente, entre autres, dans certains cas de cancer du sein, de l'ovaire, de l'estomac et de la prostate.

1.2 Les cancers du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez les femmes dans le monde. La maladie peut être subdivisée en quatre classes principales, à savoir:

- récepteurs hormonaux (œstrogène ou progestérone) positif
- HER2 positif
- récepteurs hormonaux et HER2 positifs
- récepteurs hormonaux et HER2 négatifs

Le cancer « récepteurs hormonaux positif » répond à l'hormonothérapie et le pronostic est généralement meilleur que pour les autres types de cancers du sein¹⁵⁹.

Les récepteurs HER2 sont surexprimés dans environ 20 à 30 % des cancers invasifs du sein et sont associés à un mauvais pronostic, ainsi qu'à une survie réduite¹⁶⁰. Le statut HER2 d'un cancer du sein est évalué avant d'instaurer le traitement parce que des composés thérapeutiques qui ciblent spécifiquement HER2 sont disponibles¹⁶¹.

1.3 Les traitements

Le trastuzumab (Herceptin[®], Roche) est un anticorps monoclonal recombinant humanisé dirigé contre le domaine extracellulaire de HER2. Il est actuellement utilisé dans certains carcinomes gastriques et mammaires avec surexpression de HER2^{125,162}. Vu le coût important de ce traitement (661€ pour une dose hebdomadaire de 150 mg) et sa toxicité cardiaque, le trastuzumab ne doit être utilisé que chez les patients atteints d'un cancer du sein ou gastrique précoce ou métastatique dont les tumeurs présentent soit une surexpression de HER2, soit une amplification du gène HER2 déterminée par une méthode précise et validée^{125,163}. Cet anticorps monoclonal se lie avec une grande affinité et spécificité au sous-domaine IV, une région juxtamembranaire du domaine extracellulaire de HER2. Cette liaison inhibe l'activation des voies de signalisation et empêche le clivage protéolytique de son domaine extracellulaire. Le trastuzumab a un effet sur le mécanisme d'activation de HER2 ce qui va empêcher la prolifération des cellules surexprimant HER2¹⁶³.

Le pertuzumab est un autre anticorps recombinant dirigé contre le domaine extracellulaire de HER2 (sous-domaine 2) qui n'est pas compétitif avec le trastuzumab. Il agit en inhibant la dimérisation de HER2 avec un autre récepteur HER et particulièrement avec HER3^{162,164}. Il a été approuvé en 2012 par l'US Food and Drug Administration (FDA), en combinaison avec le trastuzumab et le docetaxel pour le traitement du cancer du sein HER2 positif métastatique¹⁶⁴. Le pertuzumab est commercialisé en Belgique par la firme Roche sous le nom de Perjeta^{®125}.

Les gefitinib, erlotinib, neratinib et lapatinib sont des inhibiteurs de la tyrosine kinase qui se lient de manière compétitive au niveau du domaine intracellulaire de HER2 à un site de liaison de l'ATP^{162,165}. Le lapatinib est actuellement disponible sur le marché belge (Tyverb[®] GSK)¹²⁵.

Le trastuzumab-DM1 est une combinaison du trastuzumab et de la mertansine (DM1). La DM1 est un agent cytotoxique antimicrotubule utilisé pour permettre une action ciblée de la chimiothérapie. La DM1 peut aussi être liée à d'autres anticorps monoclonaux en fonction de la cible à atteindre¹⁶².

1.4 Méthodes de détection de HER2

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer le statut HER2 d'un cancer.

Les techniques validées sont :

- l'immunohistochimie (IHC) qui permet de détecter la surexpression HER2 sur des fragments tumoraux fixés
- la technique de « Fluorescence In Situ Hybridisation (FISH) » qui permet de mettre en évidence l'amplification du gène codant pour HER2 sur des fragments tumoraux fixés
- la technique de « Chromogenic In Situ Hybridisation (CISH) » qui permet également de mettre en évidence l'amplification du gène^{163,166}

En plus de ces techniques validées, plusieurs autres méthodes sont décrites. Généralement, elles sont dédiées à la détermination du domaine extracellulaire de HER2 présent dans le sérum après clivage. Cependant, le taux de HER2 circulant n'est pas toujours corrélé avec la surexpression de HER2. En effet, selon une étude de Roche, un taux de HER2 circulant a été

Test	Domaine de linéarité (ng/mL)	Limite de détection (ng/mL)	Réf
ELISA (Siemens) approuvé par la FDA		15	167
Immunocapteur piézoélectrique	0,05-2	$25,3 \times 10^{-3}$	168
Immunocapteur électrochimique à MPM (DPV)	6-30	6	169
Biocapteur optique en flux à résonateur en anneau	13-1000	13	170
Immunocapteur sans marquage avec particules d'oxyde de fer	0,01-10 10-100	$0,995 \times 10^{-3}$	171

Tableau 12 : Techniques de dosage de HER2 dans le sérum et leurs caractéristiques

déecté dans 64 % (286/447) des échantillons de sérum de patients classés HER2 positifs par une méthode validée ¹⁶³. La détermination sérique du domaine extracellulaire de HER2 n'est pas fiable pour évaluer le statut HER2 d'un patient¹⁷². Toutefois, la mesure du taux sérique de HER2 peut être utile pour suivre l'adéquation de la réponse au traitement. En effet les taux sériques élevés diminuent en cours de traitement.

Plusieurs techniques dédiées à la mesure sérique de HER2 sont reprises dans le Tableau 12.

Un immunocapteur électrochimique utilisant des électrodes modifiées par des nanodisques d'or sur lesquels le trastuzumab est immobilisé a été développé pour déterminer HER2 dans les lysats cellulaires et des lysats tumoraux. L'interaction entre HER2 et l'anticorps est détectée par des anticorps secondaires appropriés marqués avec HRP. Le bleu de méthylène est présent en tant que médiateur redox¹⁷³.

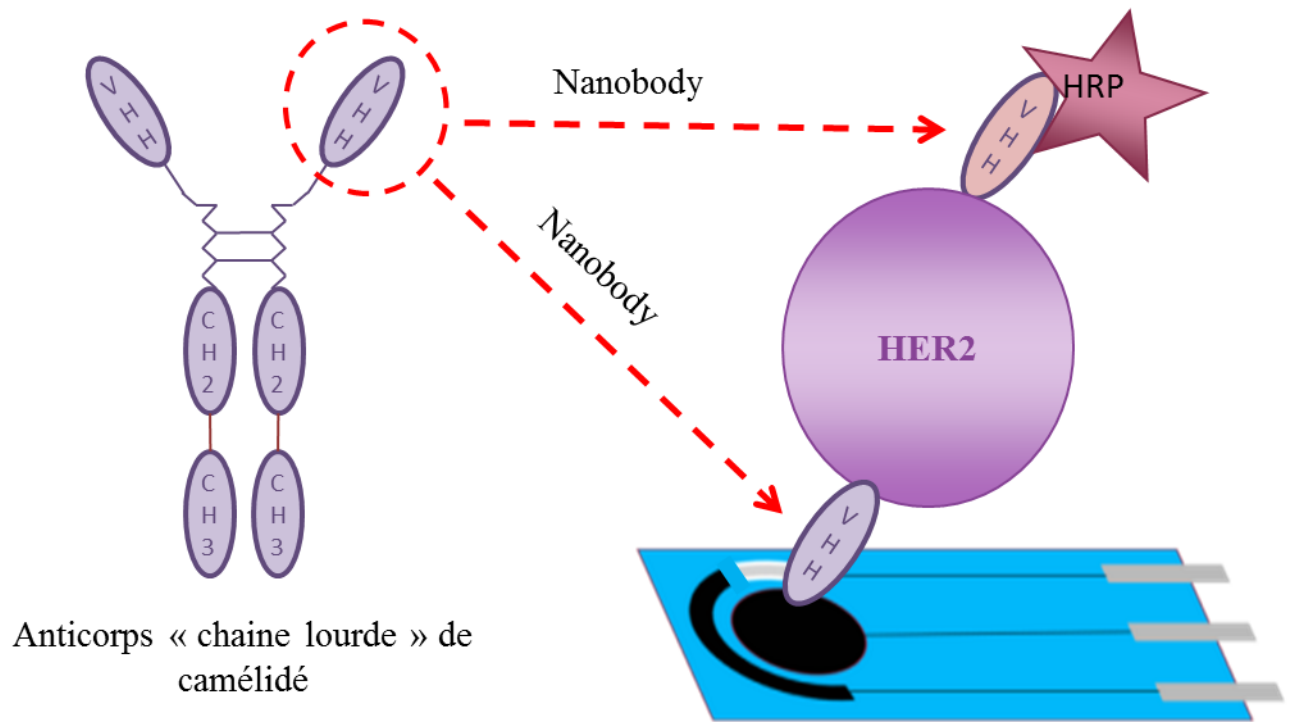


Figure 92 : Représentation schématique du nano-immunocapteur développé dans le cadre de ce travail

2. Les nanobodies en tant que outil bioanalytique

Dans le but de développer un immunoessai rapide pour le dosage de HER2, il est intéressant d'exploiter les avantages des nanobodies (NB). En effet, leur stabilité, leur taille (environ 15 kDa), leur affinité et leur spécificité pour l'antigène les rendent très attrayants pour le développement de nouveaux outils d'analyse. La mise en œuvre de NB en bioanalyse est encore relativement peu exploitée. Dans le domaine des biocapteurs, la première application publiée, en 2005, est une puce à base de NB pour l'analyse immunologique de l'antigène spécifique de la prostate en utilisant un dispositif de résonance de plasmon de surface (SPR)¹⁷⁴. Très récemment, en 2014, un immunocapteur électrochimiluminescent avec des NB immobilisés sur une électrode de carbone vitreux a été décrit pour le dosage très sensible de procalcitonine humaine dans des échantillons de sérum¹⁷⁵. Deux immunocapteurs ampérométriques utilisant des NB immobilisés sur des MPM pour la détection de fibrinogène dans le plasma ont également été décrits, cette même année³³. La petite taille des NB devrait contribuer à faciliter l'accès à leur cible et augmenter la sensibilité de la détection de signaux grâce à la proximité du transducteur. De plus la surface du transducteur devrait être moins obstruée que lors de l'utilisation d'anticorps classiques.

Dans ce travail nous rapportons la mise au point d'un dosage immunologique de type sandwich utilisant des NB et une SPE à base de carbone en tant que support solide pour la détermination du domaine extracellulaire de HER2 (Figure 92). L'antigène HER2 a été choisi comme modèle cible du biomarqueur en raison de sa disponibilité et d'une série de NB non-compétitifs contre HER2¹⁷⁶. Le taux de HER2 a été déterminé dans des cellules humaines enrichies avec HER2 mimant un lysat cancéreux.

3. Nanoimmunoessai sur SPE*

3.1 Réactifs et matériel

3.1.1 Réactifs

Voir 1^{ère} partie, paragraphe 3.1.1

N-(3-diméthylaminopropyl)-N-éthylcarbodiimide hydrochloride (EDC), N-Hydroxysuccinimide (NHS, Tris-Cl (Trizma[®] base) et Tergitol-type nonyl phenoxyethoxyethanol 40 (Nonidet P-40, NP40) ont été achetés chez Sigma (Bornem). Le kit EZ-link Plus Activated Peroxidase et le kit BCA protein assay proviennent de chez Pierce Biotechnology, Thermo scientific (Rockford, USA). Le Recombinant Human ErbB2/Fc Chimera (HER2) a été obtenu chez ImmunoSource (Schilde). Les tablettes de cocktail d'inhibiteurs de protéases viennent de chez Roche (Mannheim). L'acide 2-(4-morpholino) éthanesulfonique provient de chez Merck (Darmstadt, Germany).

En plus des tampons de lavage, PBS et citrate utilisés dans la 1^{ère} partie et repris à l'identique, les solutions suivantes ont été utilisées :

- Tampon MES contenant 10,6 g/L d'acide 2-(4-morpholino) éthanesulfonique ajusté à pH 5,5 pour la formation des liens peptidiques avec EDC et NHS.
- Tampon de lyse contenant 50 mM de Tris-HCl pH 8,0 ; 0,4 M de chlorure de sodium, 1 % (v/v) de NP40 et des inhibiteurs de protéases (1 tablette pour 10 mL) pour la lyse des échantillons cellulaires¹⁷³.

3.1.2 Instrumentation

Voir 1^{ère} partie, paragraphe 3.1.2

Les électrophorèses SDS-PAGE ont été réalisées sur des gels précoulés NuPAGE Novex 4-12 % Bis-tris avec du tampon de migration MES SDS dans une cuve X-cell SureLock Mini-cell de chez Invitrogen.

Les analyses LC-QTOF ont été réalisées avec un dispositif QTOF 6520 (Agilent technologies, Palo Alto, CA, USA).

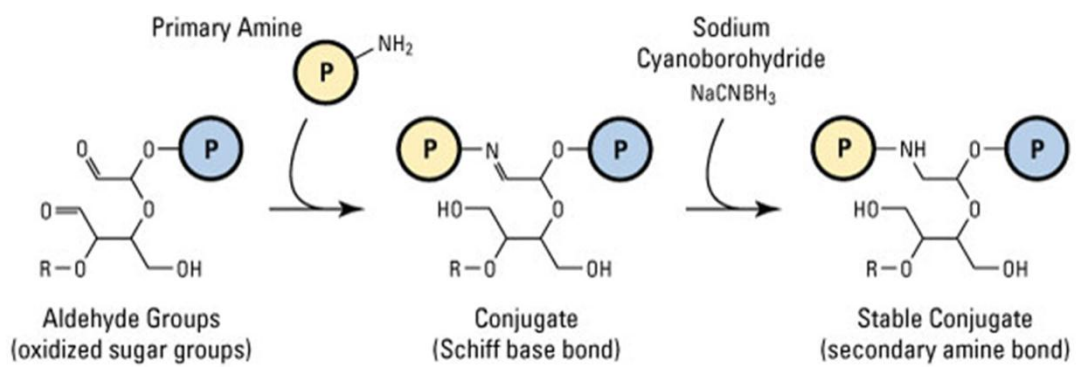


Figure 93 : Mécanisme du marquage par HRP¹⁷⁷

3.2 Méthode

3.2.1 Production et caractérisation des nanobodies

Les NB anti-HER2 2Rs15d, 1R143c et 1R59b ont été produits et purifiés par l'équipe du Laboratory of Cellular and Molecular Immunology Vrije Universiteit Brussel, Pleinlaan 2, 1050 Brussels, Belgium. La production de NB possédant une étiquette 6-His a été réalisée dans *E. coli* et la purification par chromatographie IMAC (metal affinity chromatography) grâce à l'affinité de l'étiquette poly-histidine pour le nickel. La procédure est décrite dans la littérature¹⁷⁶. L'affinité des NB et la non compétitivité entre eux ont été vérifiées par l'équipe de la VUB par résonance plasmonique de surface (Biacore). Trois NB non compétitifs nous ont été fournis.

3.2.2 Marquage des nanobodies par HRP

Le marquage des NB par HRP a été réalisé au moyen d'un kit EZ-LinkTM Plus activated peroxidase (Pierce). Les sucres de la HRP native ont été oxydés par le periodate pour générer des groupes aldéhydes (activated peroxydase). L'HRP oxydée est ensuite réticulée aux NB anti-HER2 en formant des bases de Schiff entre les aldéhydes de HRP et les amines primaires présentes sur le NB. Du cyanoborohydrure de sodium est ajouté pour réduire la liaison et former un conjugué HRP-NB stable¹⁷⁷ (Figure 93).

La procédure adoptée est différente de celle proposée par le fournisseur :

1. Ajout d'un volume de 100 μ L de HRP oxydée (1 mg/100 μ L) et 10 μ L de cyanoborohydrure de sodium (5,0 M) à 500 μ L de PBS contenant 0,3 mg de NB
2. Incubation de la solution une nuit à température ambiante sous agitation
3. Ajout d'un volume de 20 μ L de glycine 3 M et incubation 15 min à température ambiante pour stopper la réaction
4. Purification des NB marqués par HRP (NB-HRP) par chromatographie IMAC pour éliminer l'HRP libre et par chromatographie d'exclusion de taille pour éliminer le NB libre (VUB)

L'efficacité du marquage a été évaluée par électrophorèse SDS-PAGE. La migration s'est effectuée à 200 V, 50 mA à température constante de 25 ° C pendant 45 min. La solution de référence utilisée pour la comparaison des poids moléculaires des protéines était le Novex Sharp Protein standard d'Invitrogen composé d'un mélange de 12 standards pré-colorés (3,5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 30 ; 40 ; 50 ; 60 ; 80 ; 110 ; 160 et 260 kDa). La détection des protéines a été effectuée en utilisant la coloration au bleu de Coomassie (éthanol 40 % (v/v), de l'acide acétique à 10 % (v/v) et de Coomassie Brilliant R250 à 0,2 % (p/v)).

Afin de confirmer l'identité des bandes obtenues lors de l'électrophorèse, une identification par spectrométrie de masse (MS) a été réalisée. Une digestion préalable du gel est nécessaire. Le mode opératoire suivant a été suivi :

1. Découpage du gel en morceau d'environ 2 mm sur 2, au scalpel, au niveau des bandes à identifier, et placement dans des tubes Eppendorf.
2. Lavage des morceaux de gel avec 20-50 µL d'eau MilliQ et maintien sur un agitateur pendant 15 min.
3. Remplacement de l'eau par 20-50 µL d'acétonitrile (ACN) à 40 % et maintien des tubes sur un agitateur à 37°C pendant 15 min. Cette étape est renouvelée jusqu'à ce que la coloration bleue ait disparu. Il est important d'éliminer le bleu de Coomassie et le SDS car ils inhibent l'action de la trypsine.
4. Remplacement de la solution par 20-50 µL d'ACN à 100 % et agitation pendant 15 min ou jusqu'à ce que le gel se contracte.
5. Remplacement du solvant par 20-50 µL de dithiothréitol 10 mM dans 25 mM de NH_4HCO_3 (1,5 mg/mL). Incubation des tubes 45 min à 56°C puis refroidissement à température ambiante (cette étape réduit les ponts disulfures).
6. Elimination de la solution et remplacement par 20-50 µL d'iodoacétamide 55 mM dans 25 mM de NH_4HCO_3 (10,2 mg/mL). Incubation des tubes dans le noir, 30 min à température ambiante : l'iodoacétamide se lie de façon covalente avec le thiol de la cystéine ; l'incubation dans le noir permet de limiter le nombre d'adduits.
7. Remplacement de la solution par de l'ACN à 100 % (20-50 µL) afin de déshydrater le gel. Après 15 min d'incubation ou quand le gel a rétréci, élimination totale de l'ACN. Les tubes sont laissés ouverts pour que l'ACN restant s'évapore.

8. Réhydratation du gel avec 3 μL d'une solution préparée extemporanément de trypsine à 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dans 25 mM de NH_4HCO_3 (la trypsine permet de digérer les protéines)
9. Ajout d'un volume de 10-20 μL de NH_4HCO_3 (25 mM) et incubation durant une nuit (au moins 6h) à 37°C
10. Pour stopper la digestion, ajout d'1 μL d'acide trifluoroacétique (TFA)

Une extraction des peptides du gel n'est pas nécessaire car environ 80 % des peptides se retrouvent dans le surnageant par simple diffusion. De plus, une extraction risque de contaminer les échantillons par les polymères de polyacrylamide contenus dans le gel. Les échantillons peuvent être stockés à -20°C pour une utilisation ultérieure.

11. Avant l'analyse par LC-QTOF, dessalage des échantillons en utilisant des ZipTip C18 :

1. Activer le ZipTip avec du méthanol (aspirer/dispenser)
2. Equilibrer le ZipTip avec du TFA 0,1 % (aspirer/dispenser 5 cycles)
3. Aspirer/dispenser l'échantillon 7 à 10 cycles (les peptides sont retenus dans le ZipTip)
4. Dessaler en aspirant/dispensant du TFA 0,1 % 5 à 7 cycles
5. Eluer l'échantillon avec 10 μL d'ACN- acide formique 0,1 % (90/10)
6. Répéter les étapes 1 à 5 avec la totalité de l'échantillon en rassemblant les solutions de peptides
7. Evaporer l'ACN en utilisant un speedvacuum, ajouter 15 μL d'acide formique (0,1 %) pour obtenir un volume final entre 20 et 30 μL

12. L'analyse LC-QTOF a été réalisée par l'équipe de la plateforme analytique de la Faculté de Pharmacie de l'ULB.

Durant la séparation chromatographique, les échantillons ont été élués sur une colonne Poroshell 120 C18 (longueur : 100 mm, diamètre interne : 2,1 mm, taille des particules : 1,8 μm et taille des pores 300 Å) à 40 ° C en utilisant un gradient de deux phases mobiles A et B,

composées pour A d'acide formique 0,1 % dans l'eau et pour B d'un mélange de 90 % d'ACN et 10 % d'acide formique 0,1 % dans l'eau. Le gradient initial constitué de 99 % de phase mobile A a été maintenu à un débit de 0,2 mL/min pendant 2 min. Le pourcentage restant était constitué par la phase mobile B. Le débit a été augmenté linéairement à 0,3 mL/min et le solvant A diminué à 95 % en 8 min. La phase mobile A a été diminuée à 80 % en 10 min et le débit augmenté à 0,5 mL/min. Après la diminution du pourcentage de phase mobile A jusque 10 % en 10 min, cette composition a été gardée pendant 3 min. Enfin, les conditions initiales ont été récupérées en 2 min et maintenues pendant 5 min. Les données ont été acquises pendant un temps total de 40 min.

La détection MS/MS a été réalisée avec une ionisation par électronébuliseur (ESI) 6520 series et un quadrupole à temps de vol (Q-TOF) de chez Agilent Technologies. Les paramètres de l'ESI-Q-TOF auto-MS/MS sont :

- mode positif
- mode haute résolution d'acquisition (4 GHz)
- température du gaz : 300 ° C
- débit du gaz de séchage : 11 L/min
- pression de nébulisation : 50 psig
- tension du capillaire : 4500 V
- tension de l'écorceur (skimmer) : 175 V
- énergie de collision fixée pour chaque ion précurseur par l'équation $E = (\text{Pente} \times \text{masse de précurseur} / 100 \text{ (Da)}) + \text{ordonnée à l'origine}$; en utilisant une pente de 3,6 V et une ordonnée à l'origine de -4,8 V
- balayage MS : 100-1700
- vitesse de balayage MS : 3 spectres/s
- balayage MS/MS : 50-1700
- vitesse de balayage MS/MS : 3 spectres/s
- auto-MS/MS : 3 précurseurs, exclusion active sur deux répétitions et libéré après 0,1 min; état de charge préféré: 2, 3,> 3, inconnu.

Les données ont été acquises par le logiciel Mass Hunter Acquisition[®] (Agilent Technologies), analysées par le logiciel Spectrum Mill[®] (Agilent Technologies) et les résultats ont été affichés dans le “Protein - Sample Centric Rows” option du logiciel Spectrum Mill[®]. Une base de données comprenant la séquence du nanobody et de la peroxydase C1a (P00433) a été utilisée pour faire correspondre la bande de protéines identifiées.

3.2.3 Immobilisation des nanobodies de capture sur la SPE

La surface d'une SPE a été modifiée selon le mode opératoire suivant:

1. Activation de la SPE en présence de 50 μL de H_2SO_4 2 M à 1,60 V pendant 150 s, rinçage de la SPE à l'eau MilliQ et séchage délicat avec un papier absorbant (Figure 94.1a).
2. Dépôt d'un volume de 10 μL d'une solution contenant 40 mM d'EDC et 40 mM de NHS dans du tampon MES sur la surface de l'électrode de travail. Après 1h de réaction, rinçage de la SPE à l'eau MilliQ et séchage à l'air libre (Figure 94.1b).
3. Dépôt d'un volume de 10 μL d'une solution de NB anti-HER2 à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (6.6×10^{-7} M) sur la surface de l'électrode de travail et contact pendant 1h. Elimination avec de l'eau MilliQ et séchage à l'air libre (Figure 94.1c).
4. Blocage de la surface avec 10 μL d'une solution de BSA (1 %) pendant 30 min afin de diminuer les adsorptions non spécifiques (Figure 94.1d).

Toutes les incubations ont eu lieu à température ambiante et sous atmosphère humide de telle sorte que les solutions déposées sur la surface de l'électrode de travail ne s'évaporent pas.

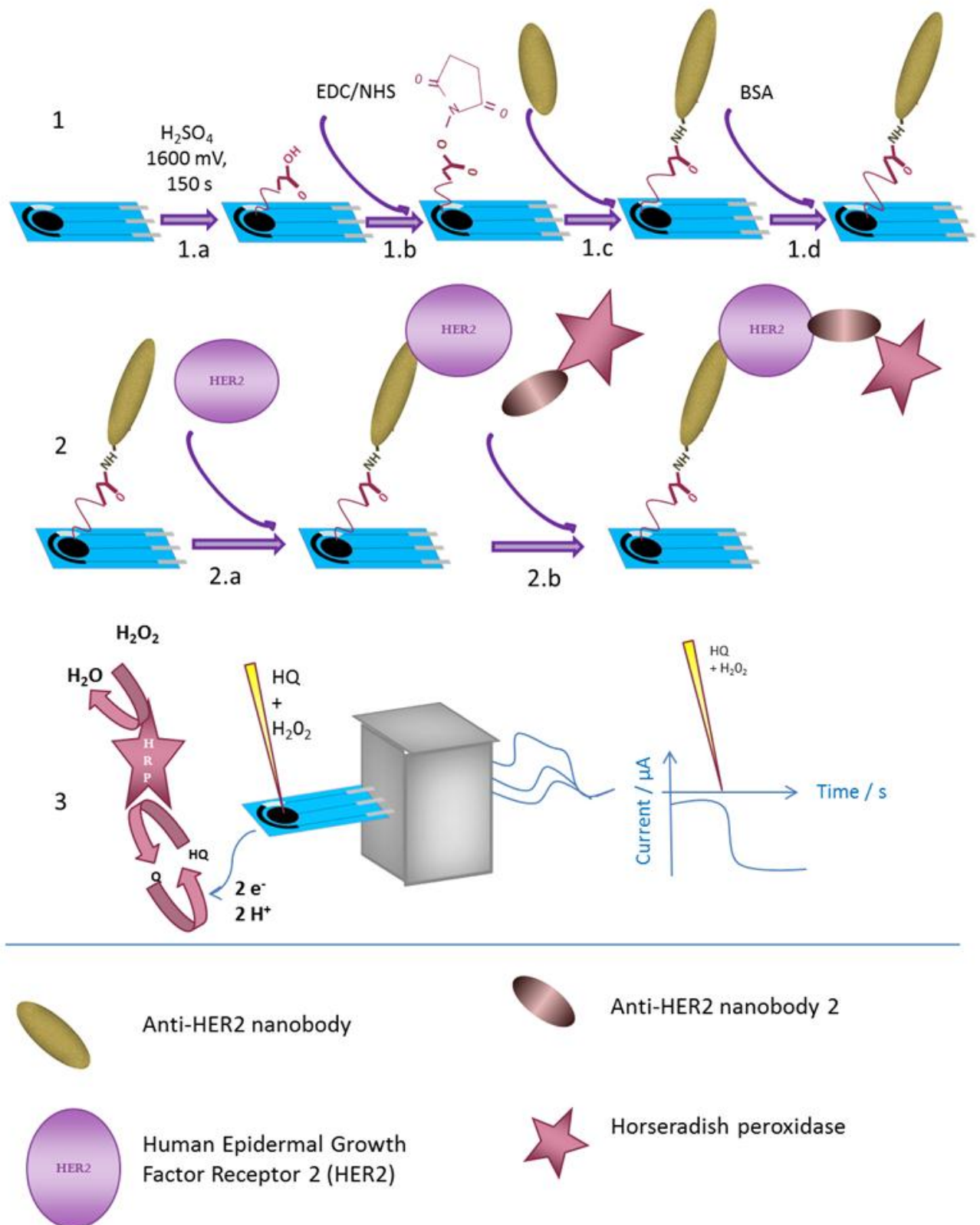


Figure 94 : 1. Modification de la SPE: oxydation à 1,60 V pour générer des groupes carboxyliques sur la surface de carbone (1a), activation des groupes carboxyliques avec une solution de EDC et de NHS (1b), immobilisation du NB anti-HER2 (1c), blocage des sites libres par la BSA (1d); 2. Sandwich nano-immunoessai : incubation de HER2 (2a), incubation de NB-HRP (2b); 3. Détection ampérométrique de la benzoquinone (Q) générée par HRP en présence d'HQ et H_2O_2

3.2.4 Nanoimmunoessai

Le nanoimmunoessai a été réalisé selon le mode opératoire suivant :

1. Dépôt de 10 μL de solution de HER2 dans du PBS sur la surface modifiée de la SPE. Après une période d'incubation, la SPE est rincée avec de l'eau MilliQ et séchée à l'air libre (Figure 94.2a).
2. Ajout de 10 μL NB-HRP et réaction pendant 20 min (Figure 94.2b).
3. Lavage de la SPE deux fois avec 1 mL de tampon de lavage puis rinçage à l'eau et séchage à l'air libre
4. Dépôt de 40 μL de tampon citrate contenant H_2O_2 (2,5 mM) sur les 3 électrodes de la tige SPE pour la détection ampérométrique. Application d'un potentiel de -280 mV.
5. Stabilisation du courant
6. Ajout de 10 μL HQ (0,1 M) dans les 40 μL de tampon déposés précédemment et mesure du courant de réduction (Figure 94.3).

3.2.5 Application aux échantillons de cellules cancéreuses

Les cellules (MCF7) HER2 négatives ont été cultivées dans une flasque T80 contenant 15 mL du milieu suivant : RPMI, 10 % de sérum de veau fœtal (FBS) inactivé par la chaleur, 2 % de Pen-strep (10.000 UI/mL), 2 % de L-glutamine (200 mM) et 0,2 % gentamicine (50 mg/mL). Les cellules ont été recueillies lorsque la confluence a atteint 85 à 90 %. Les lysats cellulaires ont été préparés en utilisant 500 μL de tampon de lyse. Après un temps d'incubation de 30 min à 4° C, les lysats ont été collectés, traités par sonication et centrifugés. Un volume de 70 μL de lysat a été dopé avec 30 μL de HER2 (concentrations adaptées) et 10 μL de cet échantillon ont servi pour le nanoimmunoessai ($n = 3$). La concentration totale en protéine a été estimée par un essai de Bradford avant l'ajout de HER2. Les concentrations HER2 dans les échantillons ont été déterminées en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée tous les jours dans le PBS.

Nanobody	SPR			MW	Lys #	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)
	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (nM)			
2Rs15d*	$2,14 \times 10^5$	$5,71 \times 10^{-4}$	2,70	13453	6	25690
1R59b*	$5,01 \times 10^5$	$2,43 \times 10^{-3}$	4,90	13361	3	11710
1R143c*	$6,27 \times 10^5$	$4,23 \times 10^{-3}$	6,80	14540	6	20650

* non-compétitivité entre ces NB ainsi qu'envers le Trastuzumab a été démontrée par SPR
 K_D (nM) Trastuzumab: 0,1

Tableau 13 : Propriétés des NB sélectionnés (Essais réalisés par Dr P. De Pauw)

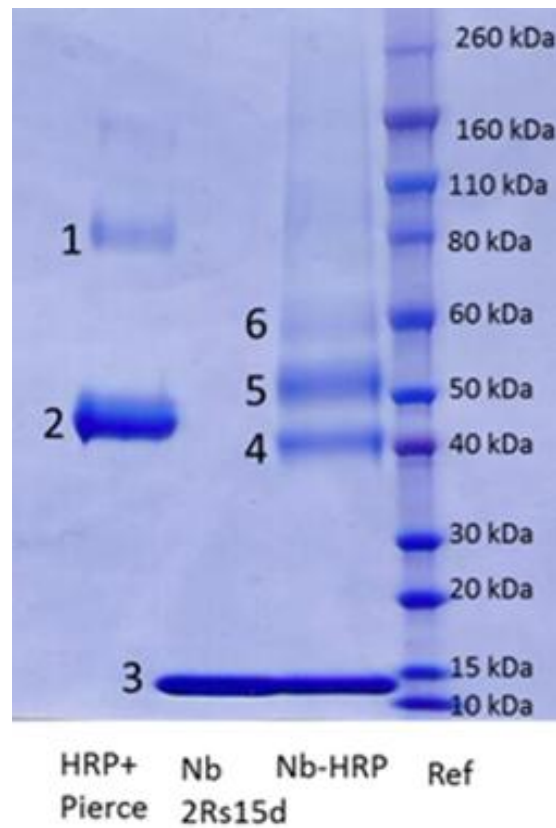


Figure 95 : Électrophorèse SDS-PAGE de HRP oxydé, NB et le mélange de HRP oxydé et NB. Les séquences peptidiques de la peroxydase C1A ont été identifiées par LC-QTOF dans les bandes 1, 2 et 4. Les bandes 2 et 4 correspondent à HRP et la bande 1 à un dimère d'HRP. Les séquences peptidiques de Nb 2Rs15d ont été identifiées dans la bande 3 et les séquences peptidiques de la peroxydase C1A et Nb 2Rs15d ont été identifiées dans les bandes 5 (NB-HRP) et la bande mineure 6 (NB₂-HRP)

3.3 Résultats et discussions

3.3.1 Sélection des nanobodies

NB 2Rs15d et 1R59b ont été testés comme NB de capture (immobilisés sur la SPE) et les NB 2Rs15d et Nb143c ont été marqués avec HRP. La paire 1R59b comme NB de capture et 2Rs15d-HRP a donné le signal ampérométrique le plus élevé au cours des nanoimmunoessais : elle a été sélectionnée pour les essais futurs. Les résultats obtenus par SPR (tableau 13) indiquent que le 2Rs15d devrait être le meilleur NB de capture en raison de son taux de dissociation faible, mais le marquage par HRP du NB 1R59b, contenant seulement trois lysines, a échoué. Le NB143c-HRP comme NB de détection a probablement souffert de ses propriétés de liaisons moins favorables.

3.3.2 Marquage des nanobodies par HRP

Les NB anti-HER2 2Rs15d et 1R143c ont été marqués par HRP activée. Les produits de réaction ont été suivis par SDS-PAGE. La Figure 95 montre les résultats pour le NB 2Rs15d. La bande de 40 kDa correspondant à HRP a été observée, ainsi que deux bandes supplémentaires (Figure 95 : Nb-HRP 5 et 6). Ces deux bandes correspondent à la masse de HRP, plus une (Figure 95 : Nb-HRP 5) ou deux (Figure 95 : Nb-HRP 6) fois la masse de Nb 2Rs15d. Les bandes ont été identifiées par LC-QTOF¹⁷⁸ par excision des morceaux de gel, ensuite ces morceaux ont été soumis à une digestion par la trypsine¹⁷⁹. Les résultats de LC-QTOF ont confirmé la présence de HRP et 2Rs15d dans les deux bandes supplémentaires. Le produit de réaction a été purifié en deux étapes pour isoler les conjugués de HRP-2Rs15d par IMAC et chromatographie d'exclusion de taille, où NB-HRP (considéré comme composant principal) et NB₂-HRP sont élués dans le même pic (Figure annexe 3 A et B). En outre, ce mélange a été utilisé pour le nanoimmunoessai.

3.3.3 Immobilisation des nanobodies de capture sur la SPE

La procédure d'immobilisation classique avec EDC et NHS a été utilisée pour relier, par l'intermédiaire d'une liaison peptidique, les groupes carboxyles générés à la surface de la SPE avec une fonction amine du NB. Cependant, les groupes activés n'ont pas été bloqués par l'éthanolamine, car il a été démontré que l'éthanolamine restante interagissait avec la benzoquinone générée par HRP dans le dosage ampérométrique.

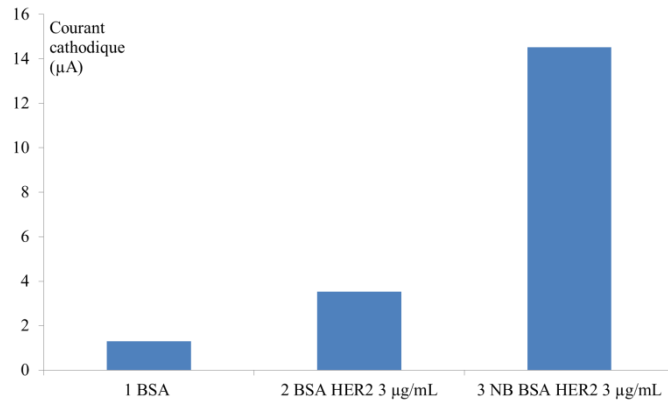


Figure 96 : Le temps d'incubation Nb-HRP est de 15 min pour les 3 essais. (1) SPE modifiée par EDC/NHS et BSA 3 %. (2) SPE modifiée par EDC/NHS et BSA 3 %, incubation de HER2 pendant 15 min. (3) SPE modifiée par EDC/NHS, NB anti-HER2 et la BSA 3 %, incubation de HER2 pendant 15 min (n = 1)

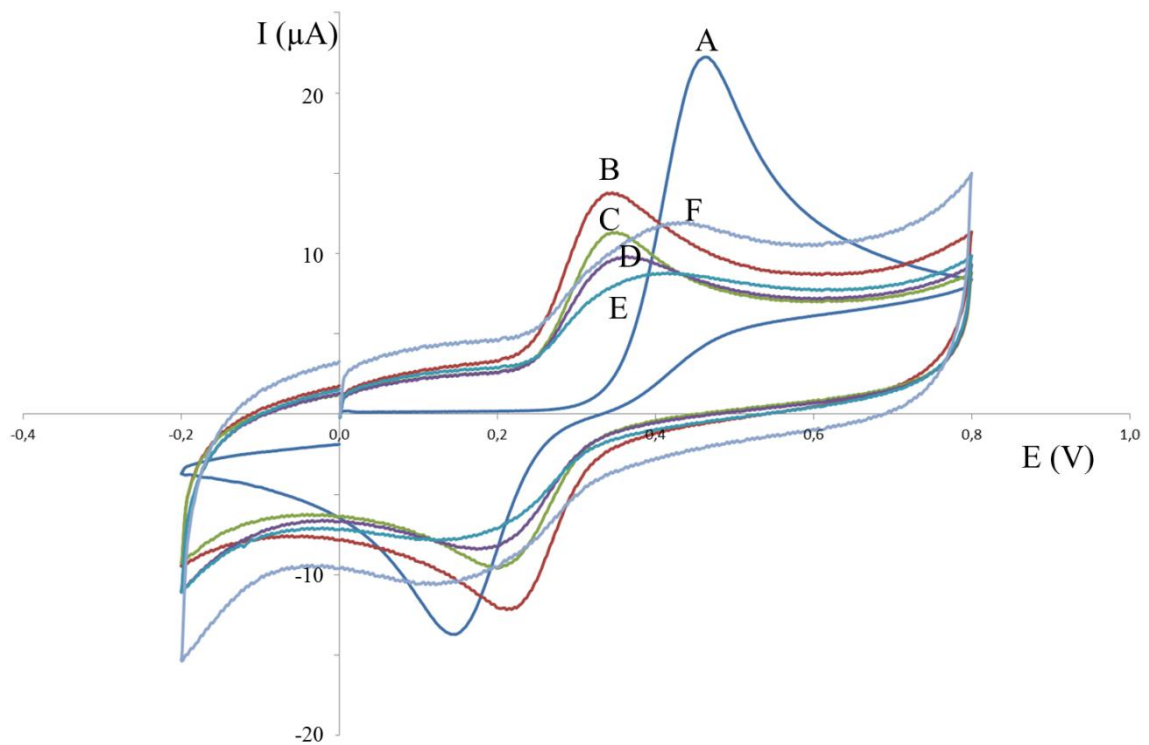


Figure 97 : Voltampérométrie cyclique de HQ (0,1 mM) dans le tampon citrate (0 → 800 → -200 → 0 mV), vitesse de balayage: 100 mV/s. SPE non modifiée (A), SPE oxydée (B), après l'étape EDC-NHS (C), après immobilisation du NB de capture (10 µg/mL) (D), après l'étape de blocage (BSA 1 %, 30 min) (E) et après incubation de HER2 et NB-HRP (F)

Pour contrôler l'efficacité de l'immobilisation du NB sur la SPE, la réponse de l'électrode modifiée a été comparée à la réponse obtenue avec une SPE modifiée seulement avec de la BSA. Le signal obtenu en présence de NB de capture est 4 fois plus élevé qu'en son absence (Figure 96).

Pour suivre les modifications de la surface de SPE et évaluer les restrictions de diffusion éventuelles, des voltampérométries cycliques de HQ (0,1 mM) ont été réalisées après chaque étape de modification. Comme le montre la Figure 97, après oxydation de la surface de l'électrode, le courant pseudo-capacitif augmente sensiblement et le voltampérogramme devient quasi-réversible ($\Delta E_p = 300$ mV est devenu $\Delta E_p = 100$ mV), mais le pic anodique et le pic cathodique diminuent (Figure 97 A puis B) Après chaque étape de modification, la hauteur des pics de courant diminue légèrement, tandis que l'addition de NB-HRP provoque un décalage de potentiel et une augmentation du courant capacitif (Figure 97F).

La même expérience a été réalisée avec le trastuzumab, un anticorps "classique" contre HER2, comme élément de capture. L'électrode a été modifiée avec la même quantité d'anticorps que pour les NB en termes d'équivalent de reconnaissance, c'est-à-dire deux sites de reconnaissance par anticorps et un site par NB. Après l'immobilisation du trastuzumab sur la SPE, une diminution de 27 % du pic d'oxydation de HQ a été observée en VC, tandis qu'elle est seulement de 15 % dans le cas de la modification par les nanobodies. Cela permet de déduire une restriction moins importante de l'accès de HQ à la surface de l'électrode lors de l'utilisation de NB comparée à l'anticorps "classique".

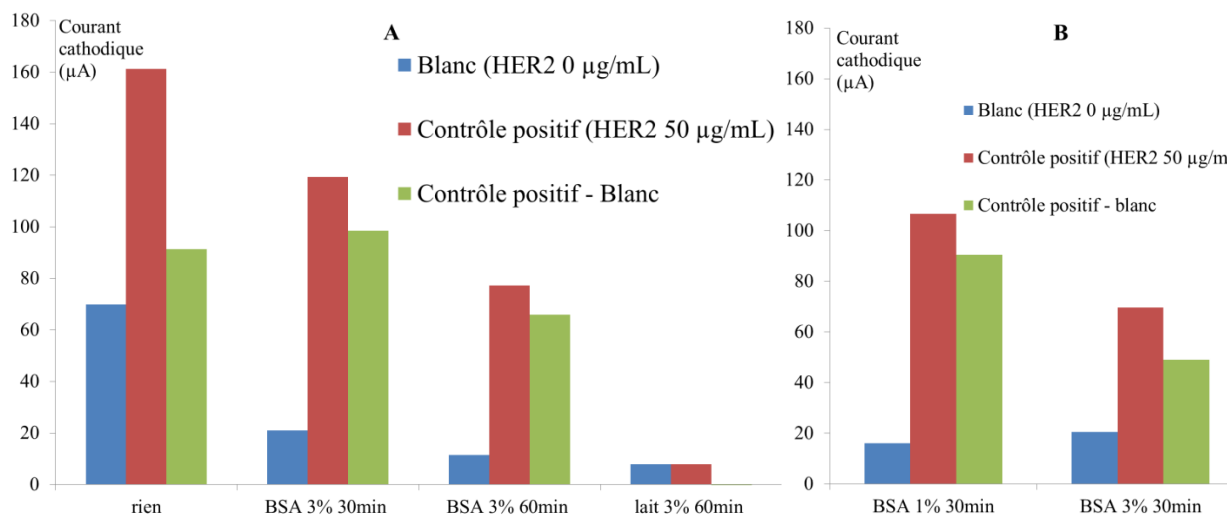


Figure 98 : Comparaison des différentes méthodes de blocage. Les deux temps d'incubation sont de 20 min, volume d'incubation : 10 µL ; concentration de HER2 : 50 µg/mL. Détection : $E_{app} = -280$ mV, HQ 20 mM, H_2O_2 25 mM

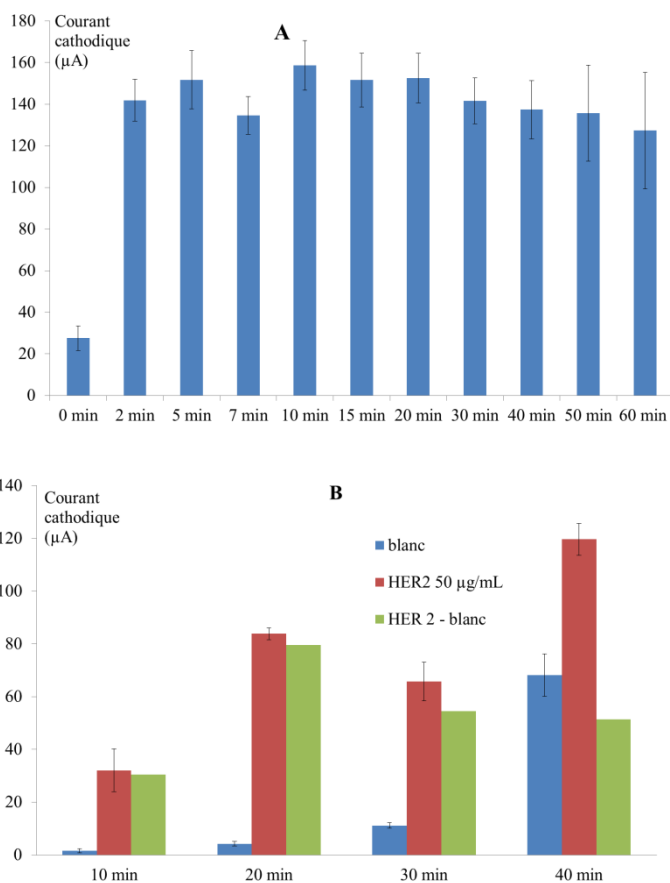


Figure 99 : Influence du temps d'incubation (dans du PBS) sur la réponse électrochimique. $E_{app} = -280$ mV, HQ 20 mM, H_2O_2 : 25 mM, volumes d'incubation : 10 µL, concentration de HER2 : 50 µg/mL. (A) Comparaison entre les différents temps d'incubation de HER2 : le premier temps d'incubation va de 0 à 60 min et le deuxième temps d'incubation est de 20 min. (B) Comparaison entre les différents temps d'incubation de NB-HRP : le premier temps d'incubation est de 20 min et le second temps d'incubation va de 20 à 40 min. Les mesures à blanc ont été réalisées en l'absence de HER2 (n = 3)

3.3.4 Phase de blocage

Afin de minimiser l'interaction non spécifique de NB-HRP, différents agents de blocage ont été considérés à savoir la BSA et la poudre de lait écrémé (Figure 98A). Un bon agent de blocage devrait limiter les liaisons non spécifiques, sans restreindre les liens spécifiques. La BSA, avec un temps d'incubation de 30 min, a été sélectionnée et deux concentrations (1 et 3 % m/v) ont été testées (Figure 98B). La BSA 1 % (m/v) a donné des réponses non spécifiques minimales et spécifiques maximales et a donc été utilisée dans les essais ultérieurs.

3.3.5 Temps d'incubation

Le temps d'incubation entre l'antigène et la SPE modifiée a été investigué entre 0 et 60 min (Figure 99A). L'amplitude du signal résulte de l'interaction entre HER2 et le NB anti-HER2 immobilisé sur la SPE. La réaction atteint très rapidement son maximum : un temps d'incubation de 2 min a été choisi.

Le temps d'incubation du second NB (NB-HRP) a été testé entre 10 et 40 min (Figure 99B). L'interaction non spécifique augmente avec le temps, alors que l'interaction spécifique avec HER2 augmente puis diminue. Un temps d'incubation de 20 min a été choisi car il constitue un bon compromis pour un signal de grande amplitude lié à l'interaction antigène-NB et un faible signal du blanc.

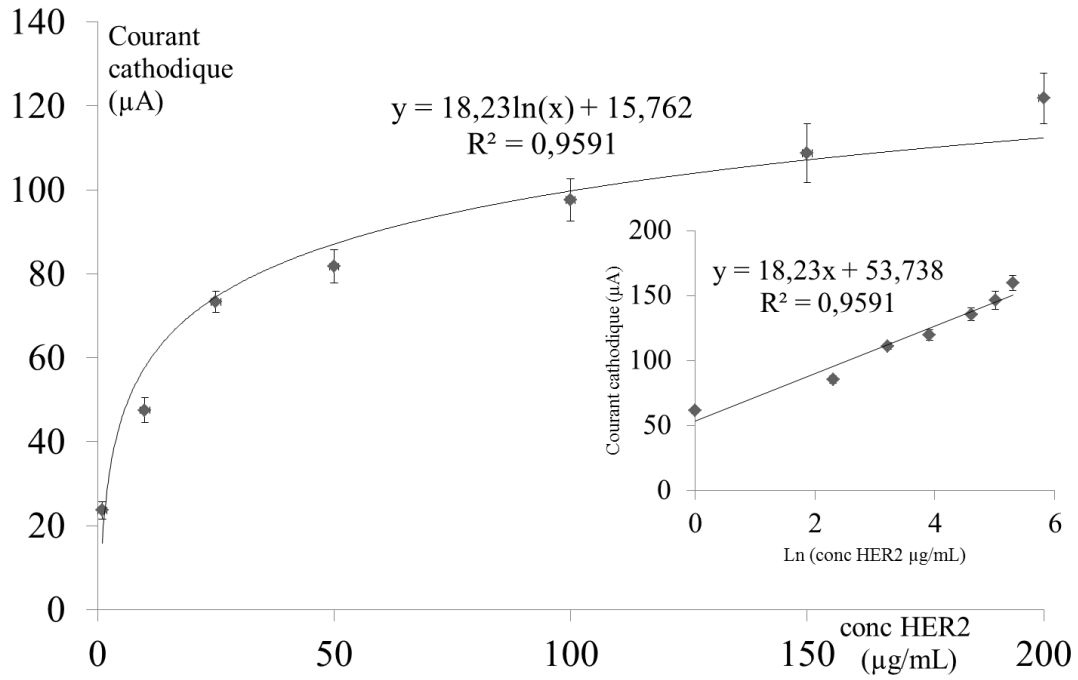


Figure 100 : Résultats représentatifs obtenus avec SPE modifiées par EDC/NHS, anti-HER2 NB (1R59b) et BSA 1 %, incubation HER2 2 min; incubation NB-HRP (2Rs15d) 20 min. Signal du blanc soustrait (n = 3)

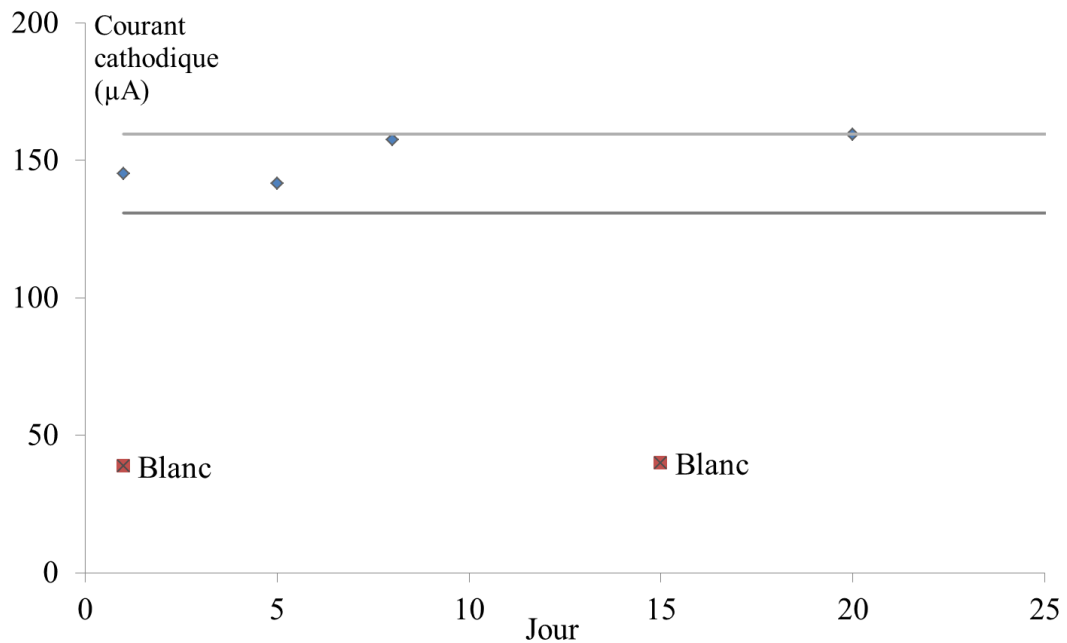


Figure 101 : Stabilité de la SPE modifiée évaluée pendant 21 jours. Réalisation du nano-immunoessai avec HER2 50 µg/mL. Les limites supérieure et l'inférieure ont été calculées comme égales à trois fois l'écart-type des mesures (n = 3) réalisées le premier jour

3.3.6 Performances du nanoimmunoessai

Des courbes d'étalonnage ont été réalisées avec les SPE modifiées, la durée d'incubation était de 2 min pour la première et 20 min pour la seconde. Le NB-HRP a été utilisé à 30 µg/mL. Le signal est proportionnel au logarithme de la concentration de HER2 entre 1 et 200 µg/mL, avec une limite de détection (LOD) de 1 µg/mL et une limite de quantification (LOQ) de 4,4 µg/mL (Figure 100). La LOD et la LOQ ont été calculées à partir du signal donné par le blanc (n = 3). Ce dernier est le signal obtenu sans HER2. Les moyennes et l'écart-type ont été calculés à partir de trois essais.

La valeur limite de détection a été adaptée à la courbe d'étalonnage étudiée.

A des concentrations plus élevées, une saturation des sites de liaison du NB est supposée puisque le signal n'augmente plus. A faible concentration, aucun signal n'a été mesuré.

3.3.7 Stabilité des SPE modifiées

La stabilité du stockage à sec et à 4° C des SPE modifiées a été évaluée sur une période de 3 semaines. Diverses SPE préparées le même jour comme indiqué dans la section expérimentale ont été stockées et utilisées des jours différents. La réponse du nanoimmunoessai reste dans les limites fixées (trois fois l'écart-type des mesures (n = 3) réalisées le premier jour) pendant au moins 3 semaines. La réponse non spécifique de l'NB-HRP, évaluée par le blanc est également restée identique pendant cette période (Figure 101).

3.3.8 Application aux échantillons de cellules dopées en HER2

La concentration totale des protéines dans les échantillons étudiés, mesurée par la technique de Bradford, est égale à 3 mg/mL. Trois échantillons de cellules dopées avec HER2 ont été analysés avec le nanoimmunoessai (n = 3 pour chaque échantillon). Un échantillon témoin ne contenant pas de HER2 a également été testé. Le signal obtenu avec cet échantillon est similaire au signal obtenu avec le tampon PBS. Cela indique une absence d'interférence de notre nanoimmunoessai et reflète la spécificité du test. Les résultats obtenus avec les échantillons enrichis sont présentés dans le Tableau 14. Un biais négatif acceptable a été trouvé pour tous les échantillons, probablement en raison de la forte concentration de protéines dans les lysats cellulaires testés.

HER2 ajouté ($\mu\text{g/mL}$)	HER2 trouvé ($\mu\text{g/mL}$)	Recouvrement (%)	Biais (%)	CV (%) (répétabilité)
25	22	88	-12	8
50	41	82	-18	6
75	66	88	-12	14

Tableau 14 : Recouvrements, biais, CV pour la détermination de HER2 dans les lysats cellulaires en utilisant le nano-immunoessai HER2 développé

3.4 Conclusion

Ce travail a montré qu'il est possible de modifier des SPE avec des NB. Il a permis un nouveau type de dosage immunologique que nous avons appelé nanoimmunoessai sur SPE. Une stabilité élevée de NB immobilisés a permis une stabilité au stockage des SPE modifiées supérieure à 3 semaines. De très courtes durées d'incubation étaient suffisantes pour obtenir une réponse satisfaisante. Le nanoimmunoessai a permis de déterminer le taux d'HER2 dopé dans des lysats cellulaires. Des travaux futurs, cependant, sont nécessaires afin d'augmenter la sensibilité du nanoimmunoessai pour permettre, par exemple, l'application aux sérums à des valeurs physiologiques pertinentes et aux lysats cellulaires après dilution éventuelle.

Conclusion générale



Conclusion générale

Dans le cadre de ce travail, nous avons étudié deux supports pour réaliser des immunoessais au moyen d'électrodes sérigraphiées (SPE) à savoir les microparticules superparamagnétiques (MPM) et l'électrode de travail en carbone d'une SPE. Nos travaux, débutés en 2007, concernant l'approche utilisant les MPM immobilisées par un aimant à la surface d'une SPE font partie des pionniers en la matière. Ces deux supports ont permis de développer des immunocapteurs performants pour le dosage des anticorps anti-*tetani* ainsi qu'un immunocapteur prometteur pour la détermination de la protéine HER2. Différents modes d'immobilisations ont pu être développés avec succès et comparés.

De plus, nous avons montré que les nanobodies (NB) peuvent être utilisés comme éléments de reconnaissance biologique pour la conception d'immunocapteurs. Les NB ne sont, sans aucun doute, qu'au début de leur utilisation en tant que outil bioanalytique, cette thèse ouvre la voie à d'autres applications.

Ce travail a permis de mettre en évidence que l'utilisation des plans d'expérience, pour l'optimisation des immunoessais sur SPE apporte un réel plus. En 7 jours, quatre paramètres peuvent être optimisés en utilisant 36 SPE. Les conditions optimales trouvées sont plus justes que lors d'une optimisation univariée.

Les stratégies analytiques développées utilisant une immobilisation aussi bien sur les SPE que sur les particules superparamagnétiques nécessitent plusieurs étapes. En effet, l'échantillon à analyser ne permet pas un signal directement mesurable au contact du dispositif. Diverses manipulations sont nécessaires d'autant plus que le mode sandwich a été adopté afin d'assurer une plus grande sélectivité. De plus, plusieurs temps d'incubation, certes plus courts que pour un test ELISA, sont nécessaires. Ces deux aspects limitent l'utilisation de ce type d'essai aux laboratoires. Il est peu vraisemblable qu'ils soient mis en œuvre dans un cabinet médical et totalement inimaginable à domicile.

Les stratégies envisagées ne permettent pas une utilisation décentralisée « sur le terrain » si ce n'est en développant un système d'automatisation. En effet, un dispositif avec différents réservoirs libérant, après un temps d'incubation, l'échantillon, le tampon de rinçage ou l'anticorps marqué et le substrat pourrait être développé.

Cependant, pour les essais demandant une réponse positive ou négative, l'immunochromatographie semble plus simple à mettre en œuvre. L'utilisation de nanobodies apporterait sans doute un plus à cette technique en termes de stabilité du dispositif et de facilité de production.

Il est certain que les immunoessais sur SPE comme supports solides sont plus simples d'utilisation que la méthode exploitant les MPM mais il est préférable de les dédier aux dosages d'analytes relativement concentrés. Dans le cadre de ce travail, nous avons observé une limite de détection moins basse que lors de l'utilisation des MPM.

Perspectives



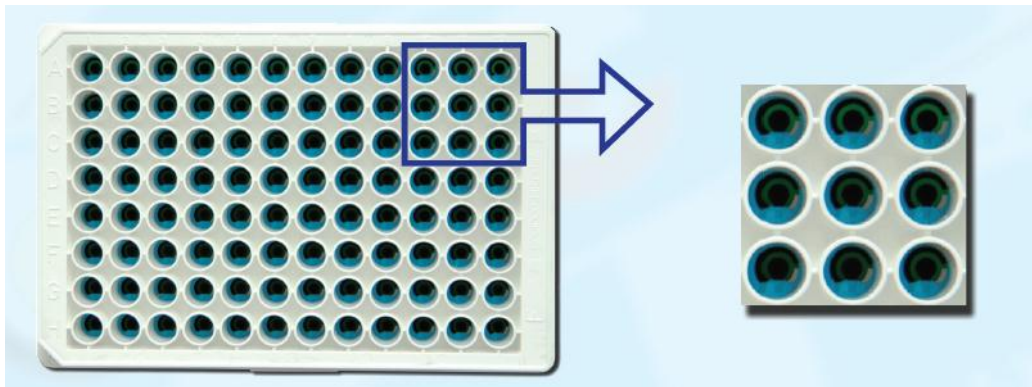


Figure 102 : Plaque ELISA électrochimique (96 cellules) commercialisée par Dropsens (Oviedo, Espagne)

Perspectives

Au terme de ce travail de thèse et fort de quelques résultats prometteurs engrangés, nous avons le sentiment de ne pas être arrivés au bout du chemin. De nombreuses pistes peuvent encore être explorées.

Afin de faciliter la réalisation des courbes de calibration et la mesure de plusieurs échantillons simultanément en plusieurs duplications, il serait intéressant de réaliser les essais sur des plaques de 96 électrodes sérigraphiées. En effet, il existe depuis peu dans le commerce des plaques électrochimiques constituées de 96 cellules électrochimiques à 3 électrodes sérigraphiées (SPE) placées dans des puits de plaque ELISA (Figure 102). Ces SPE pourraient être modifiées de la même façon que décrit dans ce travail pour réaliser en une fois 96 immunoessais. Evidemment, dans le cas de l'utilisation de microparticules magnétiques (MPM), un support avec 96 petits aimants adaptés à la plaque devra être mis au point. A la place d'effectuer les immunoessais dans des tubes et de transférer ensuite les MPM sur une SPE magnétique, l'entièreté des essais pourrait se faire dans les puits de la plaque ELISA. Dans ce cas, au moment de la mesure électrochimique, le support magnétique serait placé sous la plaque pour retenir les MPM à la surface des électrodes de travail. Ce système semble beaucoup plus adapté aux mesures réelles car il nécessite beaucoup moins de manipulations et un grand nombre d'essais seraient réalisables en même temps.

Pour des dosages de routine en laboratoire, une analyse par injection séquentielle dans un flux (SIA) avec une détection électrochimique pourrait être développée. Des MPM couvertes de streptavidine ou fonctionnalisées par des groupements carboxyliques seraient utilisées comme phase mobile solide. Dans le cas du dosage des anticorps anti-*tetani*, l'immunoessai sandwich serait réalisé en immobilisant l'anatoxine tétanique sur les MPM qui seraient introduites dans le flux et retenues juste avant le détecteur par des aimants placés autour du tuyau. Ensuite, l'échantillon et l'anti-IgG marqué par HRP seraient injectés successivement dans le flux. Celui-ci pourrait être stoppé pour permettre l'incubation et les MPM pourraient être piégées et agitées en utilisant un système de deux électroaimants qui seraient activés et désactivés en quinconce. En fin d'incubation, les MPM seraient lâchées jusqu'au détecteur en désactivant les aimants. L'HQ et H₂O₂ seraient introduits dans le flux pour permettre la détection ampérométrique. Le même protocole pourrait être adapté au dosage de HER2 en immobilisant le NB anti-HER2 sur les MPM.



Figure 103 : Cellule électrochimique avec électrodes lithographiées adaptée aux systèmes microfluidiques commercialisé par Micrux (Oviedo, Espagne)

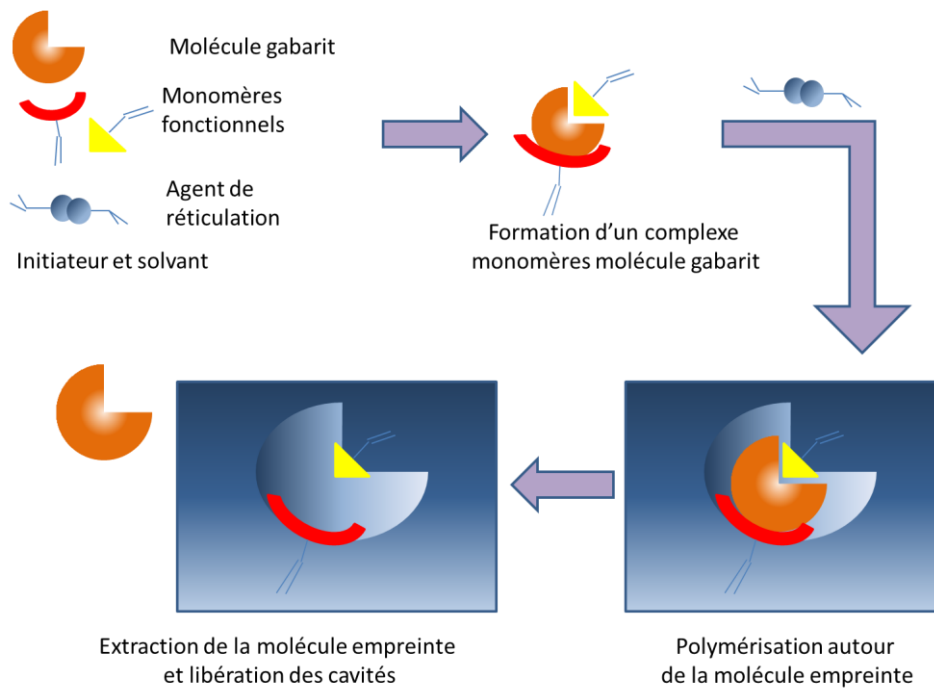


Figure 104 : Schéma de la formation d'un polymère à empreintes moléculaires

Actuellement, des puces microfluidiques (Figure 103) avec électrodes intégrées sont commercialisées et pourraient être utilisées pour permettre une automatisation des immunoessais développés dans ce travail. Une puce microfluidique permet d'instaurer un flux dans un canal de quelques dizaines de micromètres. A la sortie de ce canal, se trouve une cellule électrochimique sérigraphiée ou parfois lithographiée. L'électrode de travail devrait être modifiée par l'anatoxine tétanique ou les nanobodies anti-HER2 en fonction de l'échantillon à analyser. Cependant, l'électrode devrait être remodifiée pour chaque mesure. Pour éviter ce problème, l'utilisation de MPM au sein même du microflux pourrait être envisagée. Ceci serait la version miniaturisée du SIA décrit ci-dessus. Un véritable « Lab-on-chip », comprenant toutes les étapes de l'immunoessai, serait ainsi développé.

Le mode de marquage des nanobodies (NB) nous semble être une des étapes limitante du travail. En effet, de grandes pertes sont supposées lors de la purification du NB marqué. La production de NB biotinylés recombinant a été mise au point par l'équipe de la VUB lors de notre collaboration. Malheureusement, en raison d'une faible qualité de l'HRP streptavidinée utilisée, ces NB biotinylés n'ont pas pu être utilisés. Il serait intéressant d'exploiter ces NB biotinylés pour tenter de diminuer la limite de détection de notre nanoimmunoessai. L'utilisation de MPM serait également une piste à exploiter.

En s'éloignant un peu des immunoessais, d'autres éléments de reconnaissance pourraient être utilisés tels que les polymères à empreintes moléculaires ou « molecularly imprinted polymer » (MIP) ou les aptamères.

Les MIP sont en quelque sorte des anticorps artificiels. En effet, la molécule cible sert de gabarit autour duquel le polymère est synthétisé. Ensuite la molécule gabarit est éliminée (Figure 104). Une fois le MIP immobilisé à la surface de la SPE, il va être capable de piéger sélectivement la molécule cible qui entrera parfaitement dans les empreintes laissées dans le polymère. Les MIP ne peuvent pas être utilisés pour le dosage de protéines. En effet, l'empreinte laissée par la protéine dans le polymère est beaucoup trop grande et d'autres petites molécules pourraient y entrer facilement. Plusieurs détections électrochimiques sont possibles si la molécule cible est électroactive. Dans le cas contraire, une détection par spectroscopie d'impédance peut être envisagée.

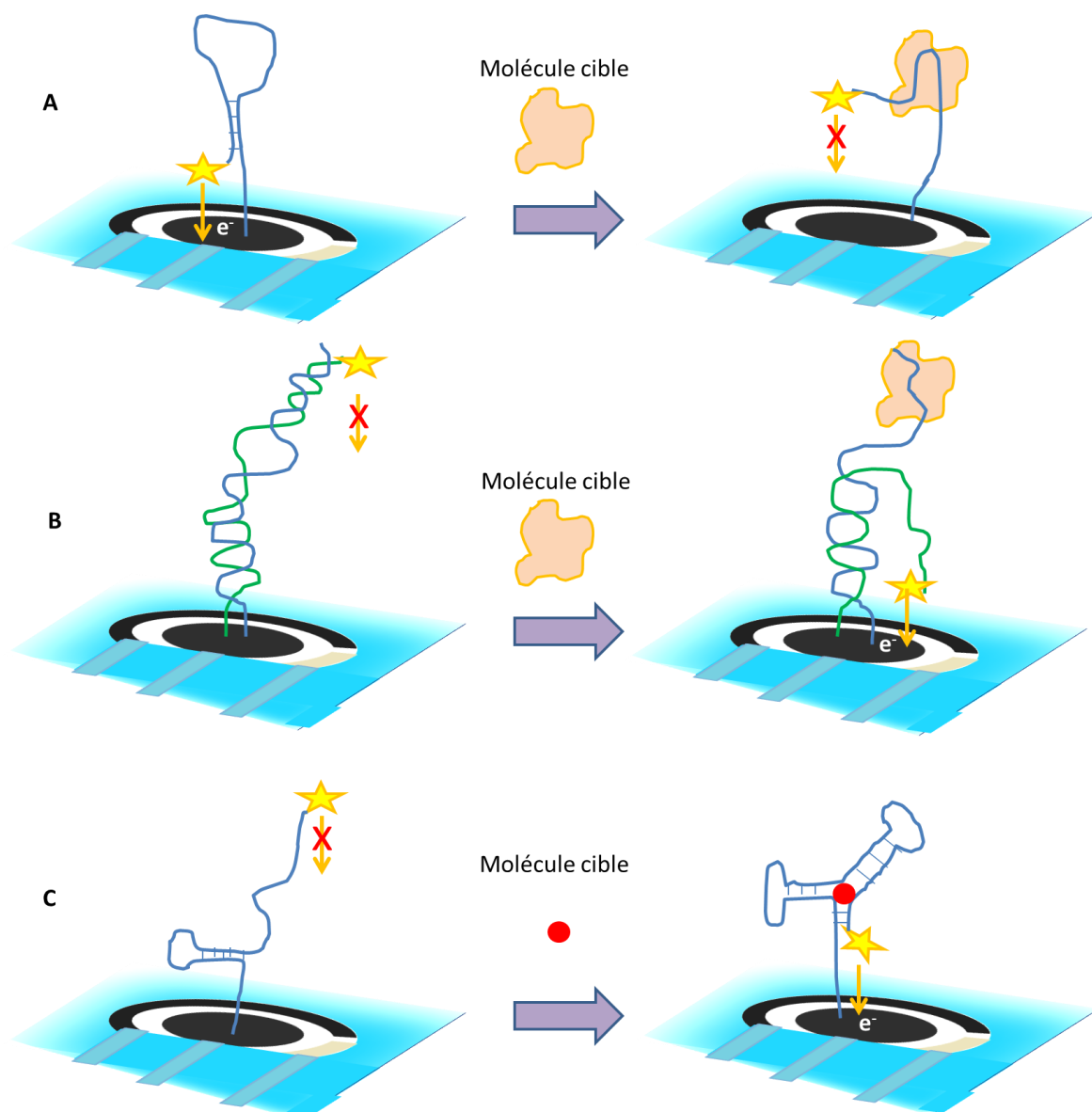


Figure 105 : Aptamère immobilisé à la surface d'un SPE. (A) un brin, la liaison de la cible donne un signal négatif. (B) deux brins, la liaison de la cible donne un signal positif. (C) Un brin, la liaison de la cible donne un signal positif

Un aptamère est un oligonucléotide synthétique capable de fixer un ligand spécifique. L'aptamère peut être fixé à une SPE et être marqué par une sonde électroactive. L'aptamère immobilisé va se replier sur lui-même en épingle à cheveux. Si l'aptamère rencontre sa cible, molécule qui offre un plus grand nombre d'interactions, l'oligonucléotide s'étend et se lie à celle-ci¹⁸⁰. La sonde électroactive qui marque l'aptamère va s'éloigner de la surface de la SPE. Ce type de capteur donne un signal négatif. Cette méthode a été mise au point dans les années 1990 par Kevin W. Plaxco. A l'origine, la cible était un brin complémentaire d'ADN mais, la méthode a aussi été adaptée à des protéines (Figure 105 A)¹⁸¹. Idéalement un biocapteur donne un signal positif lorsque la cible est détectée. Ciara O'Sullivan a eu l'idée d'introduire un 2^{ème} brin d'ADN partiellement complémentaire au brin immobilisé¹⁸². La sonde électroactive est fixée au 2^{ème} brin. Dans un premier temps, les deux brins sont étendus, la sonde est donc éloignée de la surface de l'électrode. Ensuite, lorsque la cible est mise en contact avec le capteur, le 1^{er} brin se lie préférentiellement avec elle, libérant ainsi le 2^{ème} brin. Celui-ci se replie sur lui-même, ce qui a pour conséquence de rapprocher la sonde de la surface de la SPE. Un signal électrochimique est alors enregistré (Figure 105 B). Au même moment, Plaxco et son équipe ont développé un aptocapteur pour le dosage de la cocaïne utilisant un aptamère possédant 3 parties à double brin. En l'absence de la cible, l'aptamère est partiellement déplié avec seulement une des trois parties à double brin présente. Comme l'aptamère est déplié, la sonde fixée à son extrémité est éloignée de l'électrode. Quand la cible est présente, l'aptamère se replie en trois tiges de brins complémentaires, rapprochant la sonde de l'électrode, ce qui augmente le transfert d'électrons. Cette approche permet un signal positif en présence de la cible (Figure 105 C)¹⁸³.

Enfin, d'une manière plus générale, d'autres immunoessais associés aux électrodes pourraient être développés. Dans le cas où de petites molécules seraient choisies comme cible, des immunoessais compétitifs pourraient être développés.

Références

Références

1. Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A. & Wilson, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* **16**, 121–131 (2001).
2. Cass, A. E. G., Davis, G., Francis, G. D. & Hill, H. A. Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal. Biochem.* **56**, 667–671 (1984).
3. Teixeira, S., Conlan, R. S., Guy, O. J. & Sales, M. G. F. Novel single-wall carbon nanotube screen-printed electrode as an immunosensor for human chorionic gonadotropin. *Electrochim. Acta* **136**, 323–329 (2014).
4. Taguchi, M., Ptitsyn, A., McLamore, E. S. & Claussen, J. C. Nanomaterial-mediated biosensors for monitoring glucose. *J. Diabetes Sci. Technol.* **8**, 403–411 (2014).
5. Zhu, D., Liu, J., Tang, Y. & Xing, D. A reusable DNA biosensor for the detection of genetically modified organism using magnetic bead-based electrochemiluminescence. *Sensors Actuators B Chem.* **149**, 221–225 (2010).
6. Nunes, G. S. *et al.* Design of a macroalgae amperometric biosensor; application to the rapid monitoring of organophosphate insecticides in an agroecosystem. *Chemosphere* **111**, 623–630 (2014).
7. Centi, S., Laschi, S., Fránek, M. & Mascini, M. A disposable immunomagnetic electrochemical sensor based on functionalised magnetic beads and carbon-based screen-printed electrodes (SPCEs) for the detection of polychlorinated biphenyls (PCBs). *Anal. Chim. Acta* **538**, 205–212 (2005).
8. Yáñez-Sedeño, P., Agüí, L., Villalonga, R. & Pingarrón, J. M. Biosensors in forensic analysis. A review. *Anal. Chim. Acta* **823**, 1–19 (2014).
9. Yean, C. Y. *et al.* Enzyme-linked amperometric electrochemical genosensor assay for the detection of PCR amplicons on a streptavidin-treated screen-printed carbon electrode. *Anal. Chem.* **80**, 2774–2779 (2008).
10. Díaz-González, M., de la Escosura-Muñiz, A., González-García, M. B. & Costa-García, A. DNA hybridization biosensors using polylysine modified SPCEs. *Biosens. Bioelectron.* **23**, 1340–1346 (2008).
11. Butler, D., Pravda, M. & Guilbault, G. G. Development of a disposable amperometric immunosensor for the detection of ecstasy and its analogues using screen-printed electrodes. **556**, 333–339 (2006).
12. Asturias-Arribas, L., Asunción Alonso-Lomillo, M., Domínguez-Renedo, O. & Julia Arcos-Martínez, M. Cytochrome P450 2D6 based electrochemical sensor for the determination of codeine. *Talanta* **129**, 315–319 (2014).

13. Dylan P. Webster *et al.* An arsenic-specific biosensor with genetically engineered *Shewanella oneidensis* in a bioelectrochemical system. *Biosens. Bioelectron.* **62**, 320–324 (2014).
14. Ricci, F., Adornetto, G. & Palleschi, G. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. *Electrochim. Acta* **84**, 74–83 (2012).
15. Garrett, R. H. & Grisham, C. M. *Biochimie.* (De Boeck Supérieur, 2000).
16. Gosling, J. P. *Immunoassays: A Practical Approach. Clin. Chem.* **47**, (Oxford University, 2001).
17. Abbas, A. K. & Lichtman, A. H. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique.* (Elsevier Inc., 2005).
18. Mayer, G. & Hudrisier, D. *Immunoglobulines - structure et fonction.* (University of South Carolina/Université de Toulouse, 2012).
19. Revillard, J.-P. *Immunologie. 4ème édition.* (De Boeck Supérieur, 2001).
20. Hamers-Casterman, C. *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**, 446–448 (1993).
21. Conrath, K. E., Wernery, U., Muyldermans, S. & Nguyen, V. K. Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Dev. Comp. Immunol.* **27**, 87–103 (2003).
22. Nguyen, V. K., Desmyter, A. & Muyldermans, S. Functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Adv. Immunol.* **79**, 261–296 (2001).
23. Greenberg, A. S. *et al.* A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature* **374**, 168–173 (1995).
24. Muyldermans, S. Single domain camel antibodies: current status. *J. Biotechnol.* **74**, 277–302 (2001).
25. Flajnik, M. F., Deschacht, N. & Muyldermans, S. A case of convergence: why did a simple alternative to canonical antibodies arise in sharks and camels? *PLoS Biol.* **9**, e1001120 (2011).
26. Muyldermans, S. *et al.* Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **128**, 178–183 (2009).
27. Site Web Institut Pasteur - Technologies (25/07/14).
<<https://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/recherche/plates-formes-technologiques/proteopole/modules/ingenierie-des-anticorps/technologies>>

28. Fu, X. *et al.* Design and selection of a camelid single-chain antibody yeast two-hybrid library produced de novo for the cap protein of porcine circovirus type 2 (PCV2). *PLoS One* **8**, e56222 (2013).
29. Janeway, C. A. & Travers, P. *Immunobiologie*. (De Boeck, 2003).
30. Li, X.-M., Yang, X.-Y. & Zhang, S.-S. Electrochemical enzyme immunoassay using model labels. *TrAC Trends Anal. Chem.* **27**, 543–553 (2008).
31. Wisdom, G. B. Enzyme-immunoassay. *Clin. Chem.* **22**, 1243–1255 (1976).
32. Garcinuño, B. *et al.* Amperometric immunosensor for the determination of ceruloplasmin in human serum and urine based on covalent binding to carbon nanotubes-modified screen-printed electrodes. *Talanta* **118**, 61–67 (2014).
33. Campuzano, S. *et al.* Disposable amperometric magnetoimmunosensors using nanobodies as biorecognition element. Determination of fibrinogen in plasma. *Biosens. Bioelectron.* **52**, 255–260 (2014).
34. Barek, J. & Zima, J. Eighty Years of Polarography - History and Future. *Electroanalysis* **15**, 467–472 (2003).
35. Jaroslav Heyrovsky - Biographical (07/05/14).
<http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1959/heyrovsky-bio.html>
36. Hickling, A. Studies in electrode polarisation. Part IV.-The automatic control of the potential of a working electrode. *Trans. Faraday Soc.* **38**, 27–33 (1942).
37. Skoog, D. A., West, D. M. & Holler, F. J. *Chimie analytique*. 996 (De Boeck Supérieur, 1997).
38. Kissinger, P. & Heineman, W. *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*. (Elsevier Inc., 1996).
39. Bedioui, F. Voltampérométrie. Théorie et mise en œuvre expérimentale. *Tech. l'ingénieur. Anal. caractérisation* **3**, P2126–1
40. Krulic, D. *Techniques électroanalytiques à potentiel imposé*. (notes de cours (Université Pierre et Marie Curie, Paris, France), 2005).
41. Skoog, D. A., Holler, F. J. & Nieman, T. A. *Principes d'analyse instrumentale*. 956 (De Boeck Supérieur, 2003).
42. Christophe, C. *Intégration de microcapteurs électrochimiques en technologies "Silicium et Polymères" pour l'étude du stress oxydant. Application à la biochimie cutanée*. Thèse. (Université de Toulouse, 2010).

43. Blankert, B. *Développement de méthodes électroanalytiques hybrides pour l'étude de la biotransformation des médicaments. Thèse.* (Université Libre de Bruxelles, 2006).
44. Johannsson, A., Stanley, C. J. & Self, C. H. A fast highly sensitive colorimetric enzyme immunoassay system demonstrating benefits of enzyme amplification in clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta.* **148**, 119–124 (1985).
45. Engvall, E. & Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.* **109**, 129–135 (1972).
46. Self, C. H. *Assay method using enzymes as labeling substances.* (Patent - EP0027036 B1, 1988).
47. Self, C. H. Enzyme amplification—a general method applied to provide an immunoassisted assay for placental alkaline phosphatase. *J. Immunol. Methods* **76**, 389–393 (1985).
48. Stanley, C. J., Johannsson, A. & Self, C. H. Enzyme amplification can enhance both the speed and the sensitivity of immunoassays. *J. Immunol. Methods* **83**, 89–95 (1985).
49. Moss, D. W. *et al.* An enzyme-amplified monoclonal immunoenzymometric assay for prostatic acid phosphatase. *Clin. Chim. Acta.* **152**, 85–94 (1985).
50. Pugh, S. F. *et al.* Enzyme amplified immunoassay: a novel technique applied to direct detection of *Chlamydia trachomatis* in clinical specimens. *J. Clin. Pathol.* **38**, 1139–1141 (1985).
51. Clark, P. M. & Price, C. P. Enzyme-amplified immunoassays: a new ultrasensitive assay of thyrotropin evaluated. *Clin. Chem.* **32**, 88–92 (1986).
52. Stanley, C. J., Generics, S. & Road, K. Amperometric enzyme-amplified immunoassays. **112**, 153–161 (1988).
53. Wehmeyer, K. R., Halsall, H. B. & Heineman, W. R. Heterogeneous enzyme immunoassay with electrochemical detection: competitive and “sandwich”-type immunoassays. *Clin. Chem.* **31**, 1546–1549 (1985).
54. Cass, A. E. G. *et al.* Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal. Chem.* **56**, 667–671 (1984).
55. Coupin, H. *Les plantes qui nourrissent.* (Médiathèque André Malraux de Lisieux, 2012).
56. Bremness, L. *Herbs.* (Eyewitness Handbooks, 1994).
57. Ryan, O., Smyth, M. R. & Fágáin, C. O. Horseradish peroxidase: the analyst's friend. *Essays Biochem.* **28**, 129–146 (1994).

58. Welinder, K. G. Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7). *FEBS Lett.* **72**, 19–23 (1976).
59. Veitch, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* **65**, 249–259 (2004).
60. Smith, A. T. *et al.* Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca²⁺ and Heme. *J. Biol. Chem.* **265**, 13335–13343 (1990).
61. Gajhede, M., Schuller, D. J., Henriksen, A., Smith, A. T. & Poulos, T. L. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 1032–1038 (1997).
62. Delvaux, M., Walcarius, A. & Demoustier-Champagne, S. Electrocatalytic H₂O₂ amperometric detection using gold nanotube electrode ensembles. *Anal. Chim. Acta* **525**, 221–230 (2004).
63. Turner, A. P. F. Current trends in biosensor research and development. *Sensors and Actuators* **17**, 433–450 (1989).
64. Turner, A. P. F. Biosensors: sense and sensibility. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 3184–3196 (2013).
65. Nagel, B., Dellweg, H. & Gierasch, L. M. Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992). *Pure Appl. Chem.* **64**, 143–168 (1992).
66. Clark, L. C. & Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **102**, 29–45 (1962).
67. Newman, J. D. & Setford, S. J. Enzymatic biosensors. *Mol. Biotechnol.* **32**, 249–268 (2006).
68. La sérigraphie (07/05/14). <<http://www.thieme.eu/fr/la-serigraphie>>
69. Rivière, B. *Optimisation du procédé de sérigraphie pour la réalisation de capteurs de gaz en couche épaisse Etude de la compatibilité avec la technologie microélectronique. Thèse.* (Ecole Supérieure Nationale des Mines, Saint-Etienne, 2004).
70. Sukkivan, C. *History of screen printing.* (Curator Janet Turner Print Museum, 2011).
71. Andy Warhol et le Pop art (07/05/14). <<http://www.le-pop-art.com/andy-warhol-pop-art.html>>
72. Hill, H. A. O., Higgins, I. J., McCann, J. M. & Davis, G. *Strip electrode with screen printing.* (Patent - US 5727548 A, 1998).

73. Morrin, A., Killard, A. J. & Smyth, M. R. Electrochemical characterization of commercial and home-made Screen-Printed Carbon electrodes. *Anal. Lett.* **36**, 2021–2039 (2003).
74. Adams, R. N. Carbon paste electrodes. *Anal. Chem.* **30**, 1576–1576 (1958).
75. Ioana Corb, Florica Manea, Ciprian Radovan, Aniela Pop, Georgeta Burtica, Plamen Malchev, Stephen Picken, J. S. Carbon-based composite electrodes: preparation, characterization and application in Electroanalysis. *Sensors (Basel)*. **7**, 2626 (2007).
76. Maleki, N., Safavi, A. & Tajabadi, F. High-performance carbon composite electrode based on an ionic liquid as a binder. *Anal. Chem.* **78**, 3820–3826 (2006).
77. Ramírez-García, S., Alegret, S., Céspedes, F. & Forster, R. J. Carbon composite electrodes: surface and electrochemical properties. *Analyst* **127**, 1512–1519 (2002).
78. Hirsch, A. The era of carbon allotropes. *Nat. Mater.* **9**, 868–871 (2010).
79. Kroto, H. W., Heath, J. R., O'Brien, S. C., Curl, R. F. & Smalley, R. E. C60: Buckminsterfullerene. *Nature* **318**, 162–163 (1985).
80. Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **354**, 56–58 (1991).
81. Bethune, D. S. *et al.* Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls. *Nature* **363**, 605–607 (1993).
82. Hiura, H., Ebbesen, T. W., Fujita, J., Tanigaki, K. & Takada, T. Role of sp³ defect structures in graphite and carbon nanotubes. *Nature* **367**, 148–151 (1994).
83. Fransen, M. ., van Rooy, T. . & Kruit, P. Field emission energy distributions from individual multiwalled carbon nanotubes. *Appl. Surf. Sci.* **146**, 312–327 (1999).
84. Alwarappan, S., Erdem, A., Liu, C. & Li, C.-Z. Probing the Electrochemical Properties of Graphene Nanosheets for Biosensing Applications. *J. Phys. Chem. C* **113**, 8853–8857 (2009).
85. Rouxinol, F. P., Gelamo, R. V & Moshkalev, S. A. Gas sensors based on decorated carbon nanotubes. 357–375 (1991).
86. Charradi, K. *et al.* *Contribution des argiles ferrifères à l'élaboration de biocapteurs ampérométriques : Etude de l'interaction de l'Hémoglobine avec des Argiles et des Hydroxydes Doubles Lamellaires. Thèse.* (Université de Grenoble, 2010).
87. Mousty, C. Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes - new trends. *Appl. Clay Sci.* **27**, 159–177 (2004).
88. Burgoa Calvo, M. E., Domínguez Renedo, O. & Arcos Martínez, M. J. Determination of lamotrigine by adsorptive stripping voltammetry using silver nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes. *Talanta* **74**, 59–64 (2007).

89. Oliveira, P. R. De, Oliveira, M. M., Zarbin, A. J. G., Marcolino-Junior, L. H. & Bergamini, M. F. Flow injection amperometric determination of isoniazid using a screen-printed carbon electrode modified with silver hexacyanoferrates nanoparticles. *Sensors Actuators B Chem.* **171-172**, 795–802 (2012).
90. Caetano, F. R. *et al.* Electroanalytical application of a screen-printed electrode modified by dodecanethiol-stabilized platinum nanoparticles for dapsone determination. *Electrochim. Acta* **66**, 265–270 (2012).
91. Sassolas, A., Blum, L. J. & Leca-Bouvier, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.* **30**, 489–511 (2012).
92. Ricci, F. *et al.* Prussian blue and enzyme bulk-modified screen-printed electrodes for hydrogen peroxide and glucose determination with improved storage and operational stability. *Anal. Chim. Acta* **485**, 111–120 (2003).
93. Rico, M. A. G., Olivares-Marín, M. & Gil, E. P. Modification of carbon screen-printed electrodes by adsorption of chemically synthesized Bi nanoparticles for the voltammetric stripping detection of Zn(II), Cd(II) and Pb(II). *Talanta* **80**, 631–635 (2009).
94. Guibault, G. G., Kauffmann, J.-M. & Patriarche, J. *Protein Immobilization. Immobilized enzyme electrodes as biosensors* (Taylor & Francis, 1991).
95. Xu, H., Li, G., Wu, J., Wang, Y. & Liu, J. A glucose oxidase sensor based on screen-printed carbon electrodes modified by polypyrrole. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* **2**, 1917–20 (2005).
96. Radi, A.-E., Muñoz-Berbel, X., Cortina-Puig, M. & Marty, J.-L. Novel protocol for covalent immobilization of horseradish peroxidase on gold electrode surface. *Electroanalysis* **21**, 696–700 (2009).
97. Wan, Y., Su, Y., Zhu, X., Liu, G. & Fan, C. Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. *Biosens. Bioelectron.* **47**, 1–11 (2013).
98. Michael Green, N. *Avidin-Biotin Technology. Methods Enzymol.* **184**, 51–67 (Elsevier, 1990).
99. Ben-Hur, H. *Avidin-Biotin Technology. Methods Enzymol.* **184**, 80–89 (Elsevier, 1990).
100. Díaz-González, M., Hernández-Santos, D., González-García, M. B. & Costa-García, A. Development of an immunosensor for the determination of rabbit IgG using streptavidin modified screen-printed carbon electrodes. *Talanta* **65**, 565–573 (2005).
101. Björck, L. & Kronvall, G. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J. Immunol.* **133**, 969–74 (1984).

102. Fernández Romero, J. M., Stiene, M., Kast, R., Luque de Castro, M. D. & Bilitewski, U. Application of screen-printed electrodes as transducers in affinity flow-through sensor systems. *Biosens. Bioelectron.* **13**, 1107–1115 (1998).
103. Fowler, J. M., Stuart, M. C. & Wong, D. K. Y. An amperometric immunosensor with a thiolated Protein G scaffold. *Electrochem. commun.* **10**, 1020–1023 (2008).
104. Wan, Y., Su, Y., Zhu, X., Liu, G. & Fan, C. Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. *Biosens. Bioelectron.* **47**, 1–11 (2013).
105. Mooney, J. T. *et al.* Purification of a recombinant human growth hormone by an integrated IMAC procedure. *Protein Expr. Purif.* **94**, 85–94 (2014).
106. His-tagged Proteins (16/07/14). <<http://www.piercenet.com/method/his-tagged-proteins>>
107. Bhalla, V. & Zazubovich, V. Self-assembly and sensor response of photosynthetic reaction centers on screen-printed electrodes. *Anal. Chim. Acta* **707**, 184–90 (2011).
108. Maly, J. *et al.* Reversible immobilization of engineered molecules by Ni-NTA chelators. *Bioelectrochemistry* **63**, 271–5 (2004).
109. Prévot, M. & Dunlop, D. Louis Néel: 40 years of magnetism. *Phys. Earth Planet. Inter.* **126**, 3–6 (2001).
110. magnetic separation technology by Ademtech (10/05/14). <<http://www.ademtech.com/company.aspx#technology>>
111. Brostoff, J., Scadding, G. K., Male, M. & Roitt, I. M. *Immunologie Clinique*. (De Boeck Université, 1993).
112. Million, A. Diagnosis, treatment, and prevention of tetanus. *Prim. Care Update Ob. Gyns.* **4**, 75–79 (1997).
113. Popoff, M. R. & Poulain, B. Tétanos : physiopathologie, épidémiologie, formes cliniques, traitements et vaccination. *Antibiotiques* **7**, 23–41 (2005).
114. Galazka, A. M. *Immunological basis for immunization module 3: Tetanus (WHO/EPI/GEN/93.4)*. (1993).
115. Linial, M., Grasso, A. & Lazarovici, P. *Secretory Systems and Toxins*. 475 (Taylor & Francis, 2003).
116. Binz, T., Sikorra, S. & Mahrhold, S. Clostridial neurotoxins: mechanism of SNARE cleavage and outlook on potential substrate specificity reengineering. *Toxins (Basel)*. **2**, 665–682 (2010).
117. Voet, D. & Voet, J. G. *Biochimie*. (De Boeck Supérieur, 2005).

118. Shiff, G. *Characterization of the snare complex in torpedo electroneuron : syntaxin 1, snap 25, and vamp form a stable complex during rapid anterograde axonal transport.* Thèse. (Université de Paris 6, 1997).
119. Galli, T., Martinez-Arca, S. & Paumet, F. Mécanisme de la fusion membranaire. *médecine/sciences* **18**, 1113–1119 (2002).
120. Poulain, B. & Humeau, Y. Le mode d'action des neurotoxines botuliques : aspects pathologiques, cellulaires et moléculaires. *Ann. réadaptation médecine Phys.* **46**, 265–275 (2003).
121. Rossetto, O. *et al.* The metallo-proteinase activity of tetanus and botulism neurotoxins. *J. Physiol. Paris* **89**, 43–50 (1995).
122. *Tetanus: Immunization, Vaccines and Biologicals.* (World Health Organization, 2013). <http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/tetanus/en/>
123. WHO. Tetanus vaccine. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **20**, 198–208 (2006).
124. Roitt, I. M., Brostoff, J. & Male, D. *Immunologie. 3ème édition.* **4**, 496 (De Boeck Supérieur, 2002).
125. Centre belge d'information pharmacothérapeutique (CBIP). *Répertoire Commenté des Médicaments.* (2014).
126. Maral, I. *et al.* Tetanus immunization in pregnant women. Serum levels of antitetanus antibodies at time of delivery. *Eur. J. Epidemiol.* **17**, 661–665 (2001).
127. Tardy, H. *Situation vaccinale antitétanique et statut immunitaire des patients consultant au service d'accueil des urgences du CH d'Annecy.* Thèse. (Joseph Fourier, Grenoble, 1995).
128. Facktor, M. A., Bernstein, R. A. & Fireman, P. Hypersensitivity to tetanus toxoid. *J. Allergy Clin. Immunol.* **52**, 1–12 (1973).
129. Olander, R.-M., Auranen, K., Härkänen, T. & Leino, T. High tetanus and diphtheria antitoxin concentrations in Finnish adults--time for new booster recommendations -. *Vaccine* **27**, 5295–5298 (2009).
130. Centre belge d'information pharmacothérapeutique (CBIP). Neuropathies périphériques d'origine médicamenteuse. *Folia Pharm.* **1**, (2002).
131. Reinstein, L., Pargament, J. M. & Goodman, J. S. Peripheral neuropathy after multiple tetanus toxoid injections. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* **63**, 332–334 (1982).
132. Pollard, J. D. & Selby, G. Relapsing neuropathy due to tetanus toxoid. *J. Neurol. Sci.* **37**, 113–125 (1978).

133. Ardelean-Jaby, D. *et al.* Évaluation du test sanguin « Tetanos Quick Stick » (TQS) en situation d'urgence. *Immuno-analyse Biol. Spécialisée* **17**, 330–335 (2002).
134. Balkenhohl, T. & Lisdat, F. An impedimetric immunosensor for the detection of autoantibodies directed against gliadins. *Analyst* **132**, 314–322 (2007).
135. Balkenhohl, T. & Lisdat, F. Screen-printed electrodes as impedimetric immunosensors for the detection of anti-transglutaminase antibodies in human sera. *Anal. Chim. Acta* **597**, 50–57 (2007).
136. Neves, M. M. P. S., González-García, M. B., Nouws, H. P. A. & Costa-García, A. Celiac disease detection using a transglutaminase electrochemical immunosensor fabricated on nanohybrid screen-printed carbon electrodes. *Biosens. Bioelectron.* **31**, 95–100 (2012).
137. Messina, G. A., De Vito, I. E. & Raba, J. Screen-printed immunosensor for quantification of human serum IgG antibodies to *Helicobacter pylori*. *Sensors Actuators B Chem.* **128**, 23–30 (2007).
138. Robinson, G. A. *et al.* Bioelectrochemical enzyme immunoassay of human choriogonadotropin with magnetic electrodes. *Clin. Chem.* **31**, 1449–1452 (1985).
139. Zacco, E. *et al.* Electrochemical magneto immunosensing of antibiotic residues in milk. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 2184–2191 (2007).
140. Liébana, S. *et al.* Rapid detection of *Salmonella* in milk by electrochemical magneto-immunosensing. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 510–513 (2009).
141. Zhang, J.-G., Kang, T.-F., Xue, R. & Sun, X. An Immunosensor for Microcystins Based on Fe₃O₄ @Au Magnetic Nanoparticle Modified Screen-Printed Electrode. *Chinese J. Anal. Chem.* **41**, 1353–1358 (2013).
142. Yu, D. *et al.* Amperometric biosensor based on horseradish peroxidase-immobilised magnetic microparticles. *Sensors Actuators B Chem.* **113**, 749–754 (2006).
143. Liu, M., Xiang, J., Zhou, J. & Ding, H. A disposable amperometric sensor for rapid detection of serotonin in the blood and brain of the depressed mice based on Nafion membrane-coated colloidal gold screen-printed electrode. *J. Electroanal. Chem.* **640**, 1–7 (2010).
144. Patris, S. *et al.* Anti-*Clostridium tetani* Antibody Determination in Serum Samples by Amperometric Immunosensing. *Electroanalysis* **22**, 41–48 (2010).
145. Xin, Y. *et al.* A novel H₂O₂ biosensor based on Fe₃O₄-Au magnetic nanoparticles coated horseradish peroxidase and graphene sheets-Nafion film modified screen-printed carbon electrode. *Electrochim. Acta* **109**, 750–755 (2013).
146. Yang, X., Wu, F., Chen, D.-Z. & Lin, H.-W. An electrochemical immunosensor for rapid determination of clenbuterol by using magnetic nanocomposites to modify screen

- printed carbon electrode based on competitive immunoassay mode. *Sensors Actuators B Chem.* **192**, 529–535 (2014).
147. Eguílaz, M. *et al.* An electrochemical immunosensor for testosterone using functionalized magnetic beads and screen-printed carbon electrodes. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 517–522 (2010).
 148. Genway. *Tetanus Toxoid IgG ELISA Instruction Manual*. <<http://www.genwaybio.com/media/custom/upload/File-1382037430.pdf>>
 149. Morrison, M., Steele, W. & Danner, D. J. The reaction of benzoquinone with amines and proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **134**, 515–523 (1969).
 150. Fisher, R. A. *Statistical Methods for Research Workers*. (Boyd and Oliver, 1925).
 151. Driesbeke, J.-J., Saporta, G. & Fine, J. *Plans d'expériences: applications à l'entreprise*. (Technip, 1997).
 152. Rabier, F. *Modélisation par la méthode des plans d'expériences du comportement dynamique d'un module IGBT utilisé en traction ferroviaire. Thèse*. (Institut National Polytechnique de Toulouse, 2007).
 153. Dejaegher, B. & Vander Heyden, Y. The use of experimental design in separation science. *Acta Chromatogr.* **21**, 161–201 (2009).
 154. Goupy, J. Tutoriel: les plans d'expériences. *Rev. Modul.* **34**, 74–116 (2006).
 155. Del Torno-de Román, L. *et al.* Fabrication and characterization of disposable sensors and biosensors for detection of formaldehyde. *Talanta* **86**, 324–328 (2011).
 156. Teste, B. *et al.* A chemometric approach for optimizing protein covalent immobilization on magnetic core-shell nanoparticles in view of an alternative immunoassay. *Talanta* **81**, 1703–1710 (2010).
 157. Ferreira, S. L. C. *et al.* Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *J. Chromatogr. A* **1158**, 2–14 (2007).
 158. George, R. A. & Heringa, J. An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding. *Protein Eng. Des. Sel.* **15**, 871–879 (2002).
 159. Kim, M.-J. *et al.* Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. *Hum. Pathol.* **37**, 1217–1226 (2006).
 160. Révillion, F., Bonnetterre, J. & Peyrat, J. ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur. J. Cancer* **34**, 791–808 (1998).
 161. Pathmanathan, N. *et al.* Characteristics of HER2-positive breast cancer diagnosed following the introduction of universal HER2 testing. *Breast* **21**, 724–729 (2012).

162. Saini, K. S. *et al.* Beyond trastuzumab: new treatment options for HER2-positive breast cancer. *Breast* **20 Suppl 3**, S20–S27 (2011).
163. Roche. *Résumé des caractéristiques du produit: Trastuzumab*. (2010).
164. Zagouri, F. *et al.* Pertuzumab in breast cancer: a systematic review. *Clin. Breast Cancer* **13**, 315–324 (2013).
165. Arteaga, C. ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Exp. Cell Res.* **284**, 122–130 (2003).
166. Di Palma, S. *et al.* Chromogenic in situ hybridisation (CISH) should be an accepted method in the routine diagnostic evaluation of HER2 status in breast cancer. *J. Clin. Pathol.* **60**, 1067–1068 (2007).
167. Siemens. Breast cancer the serum HER-2/neu test and metastatic breast cancer (26/05/14). <<http://www.healthcare.siemens.com/clinical-specialities/oncology/laboratory-diagnostics-in-oncology/breast-cancer>>
168. Loo, L. *et al.* Highly sensitive detection of HER2 extracellular domain in the serum of breast cancer patients by piezoelectric microcantilevers. *Anal. Chem.* **83**, 3392–3397 (2011).
169. Al-Khafaji, Q. A. M. *et al.* An electrochemical immunoassay for HER2 detection. *Electroanalysis* **24**, 735–742 (2012).
170. Gohring, J. T., Dale, P. S. & Fan, X. Detection of HER2 breast cancer biomarker using the opto-fluidic ring resonator biosensor. *Sensors Actuators B Chem.* **146**, 226–230 (2010).
171. Emami, M., Shamsipur, M., Saber, R. & Irajirad, R. An electrochemical immunosensor for detection of a breast cancer biomarker based on antiHER2-iron oxide nanoparticle bioconjugates. *Analyst* **139**, 2858–66 (2014).
172. Lennon, S. *et al.* Utility of serum HER2 extracellular domain assessment in clinical decision making: pooled analysis of four trials of trastuzumab in metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1685–93 (2009).
173. Mucelli, S. P., Zamuner, M., Tormen, M., Stanta, G. & Ugo, P. Nanoelectrode ensembles as recognition platform for electrochemical immunosensors. *Biosens. Bioelectron.* **23**, 1900–1903 (2008).
174. Huang, L. *et al.* Prostate-specific antigen immunosensing based on mixed self-assembled monolayers, camel antibodies and colloidal gold enhanced sandwich assays. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 483–490 (2005).
175. Li, H. *et al.* Nanobody-based Electrochemiluminescent Immunosensor for Sensitive Detection of Human Procalcitonin. *Analyst* **139**, 3718–3721 (2014).

176. Vaneycken, I. *et al.* Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. *FASEB J.* **25**, 2433–2446 (2011).
177. Pierce. HRP Plus Activated Conjugation Kit (27/05/14).
<<http://www.piercenet.com/product/hrp-plus-activated-conjugation-kit>>
178. Delporte, C. *et al.* Optimization of apolipoprotein-B-100 sequence coverage by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the future study of its posttranslational modifications. *Anal. Biochem.* **411**, 129–38 (2011).
179. Slomianny, M.-C. *et al.* Profiling of membrane proteins from human macrophages: comparison of two approaches. *Proteomics* **6**, 2365–2375 (2006).
180. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818–822 (1990).
181. Xiao, Y., Lubin, A. A., Heeger, A. J. & Plaxco, K. W. Label-Free Electronic Detection of Thrombin in Blood Serum by Using an Aptamer-Based Sensor. *Angew. Chemie* **117**, 5592–5595 (2005).
182. Radi, A.-E., Acero Sánchez, J. L., Baldrich, E. & O’Sullivan, C. K. Reagentless, reusable, ultrasensitive electrochemical molecular beacon aptasensor. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 117–124 (2006).
183. Baker, B. R. *et al.* An electronic, aptamer-based small-molecule sensor for the rapid, label-free detection of cocaine in adulterated samples and biological fluids. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 3138–9 (2006).

Annexes

Annexes

1. Productions des nanobodies à la VUB

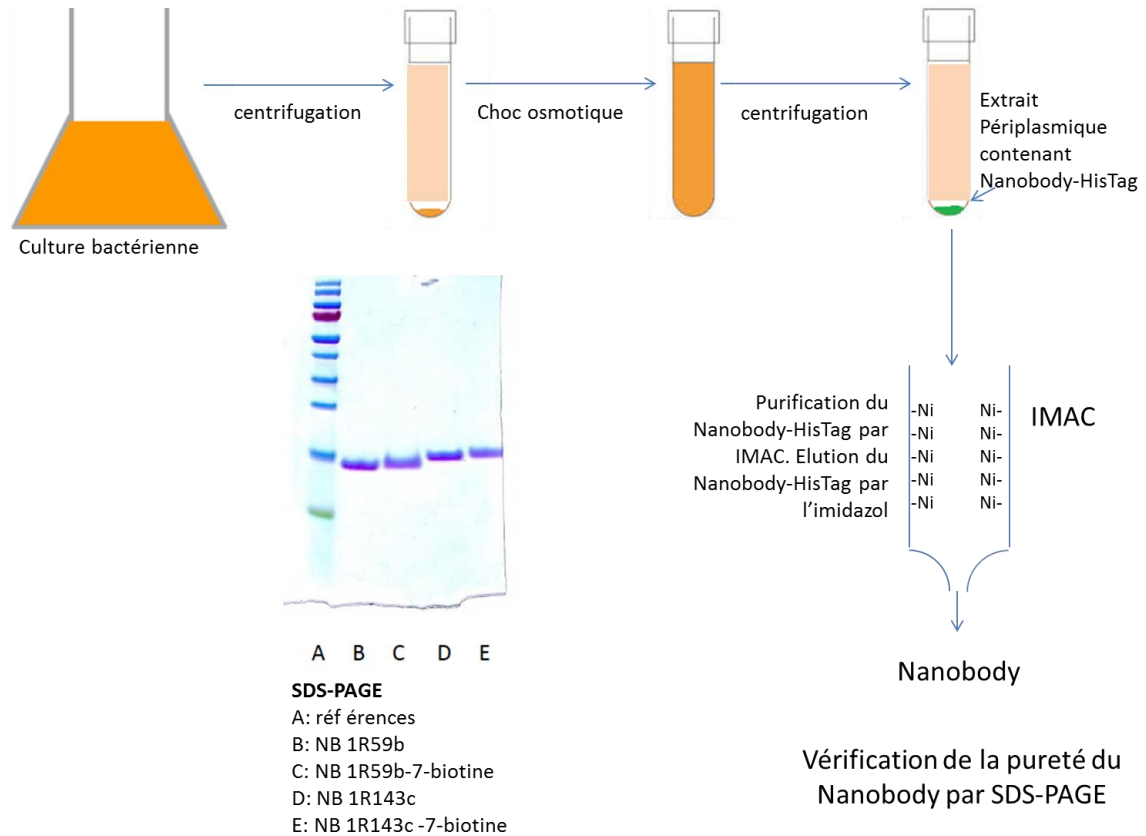


Figure annexe 1 : schéma de production et purification des nanobodies

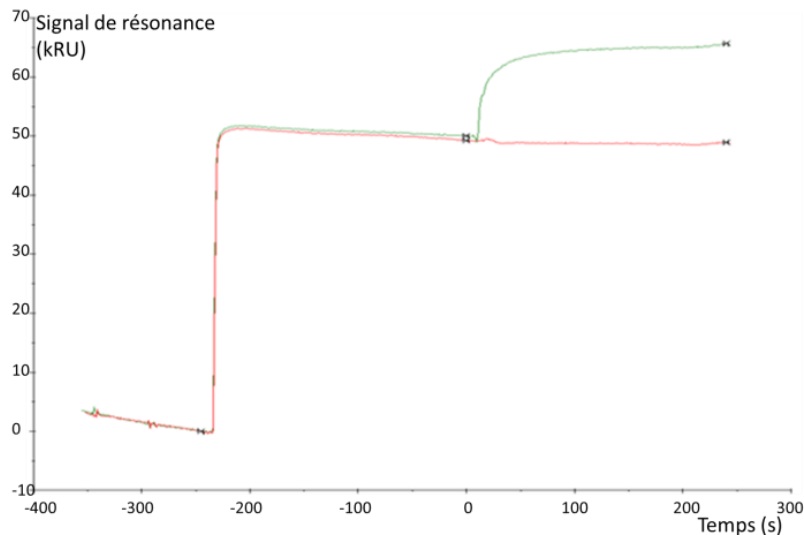


Figure annexe 2 : Non compétitivité entre NB 2Rs15d et 1R59b démontrée par SPR (Biacore®). Ligne rouge : injection du NB 1R59b au temps -350 s et au temps 0 s. Ligne verte : injection du NB 1R59b au temps -350 s et injection du NB 2Rs15d au temps 0 s (Essais réalisés par Dr P. De Pauw)

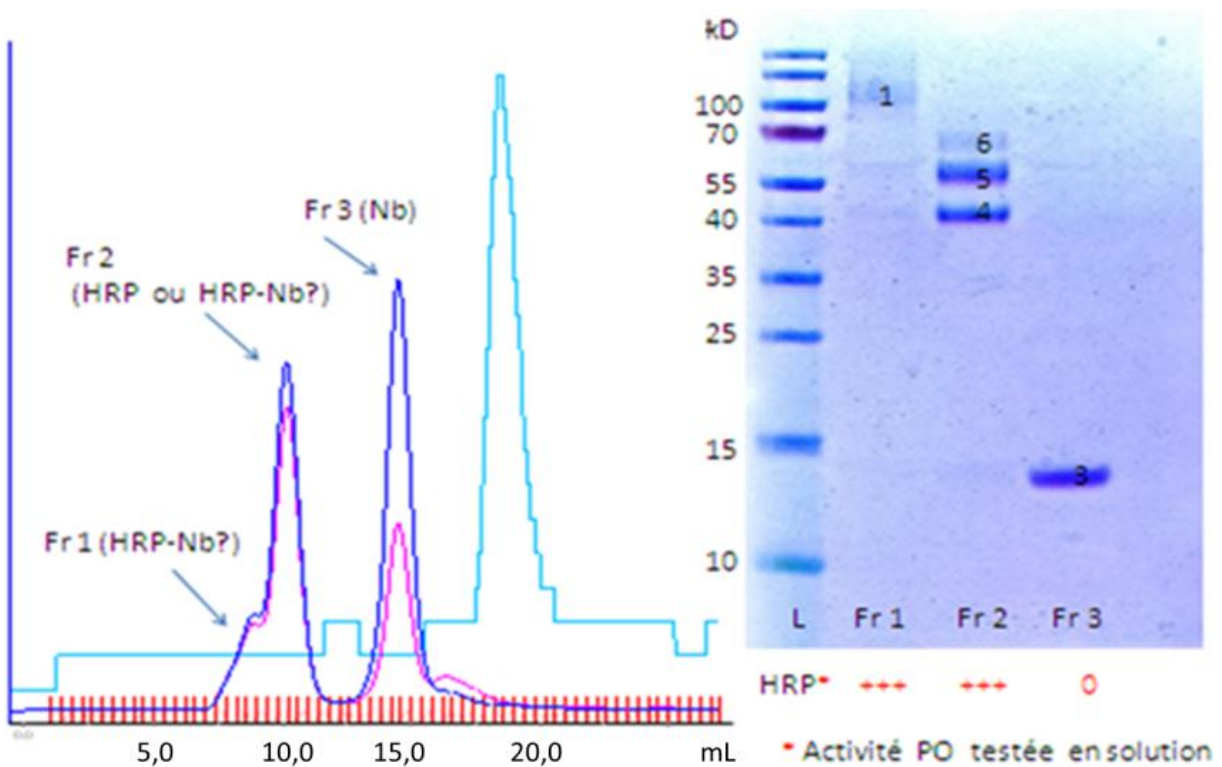


Figure annexe 3 : A. Tamisage moléculaire sur colonne Superdex®, effectué sur Akta Explorer®. Absorbance à 280 nm (bleu foncé), conductivité (bleu clair) et absorbance à 254 nm (rose). Les traits rouges sur l'axe des X représentent les fractions. B. Électrophorèse SDS-PAGE des fractions de tamisages moléculaire 1, 2 et 3. Les poids moléculaires correspondent à un dimère de HRP (bande 1), au Nb 2Rs15d (2), à HRP (4), à NB-HRP (5) et NB₂-HRP (6) (B et C réalisés par Dr P. De Pauw)

2. Articles

Anti-*Clostridium tetani* Antibody Determination in Serum Samples by Amperometric Immunosensing

S. Patris,^{a*} C. De Vriese,^a F. Prohoroff,^b E. Burgoa Calvo,^c J. Arcos Martínez,^c J.-M. Kauffmann^{a*}

^a Université libre de Bruxelles, Pharmaceutical Institute, Campus Plaine CP 205/6, 1050 Brussels, Belgium.

^b Association Pharmaceutique Belge, 11 rue Archimède, 1000 Brussels, Belgium

^c University of Burgos, Chemistry Department, 09001 Burgos, Spain

*e-mail: spatris@ulb.ac.be; jmkauf@ulb.ac.be

Received: August 7, 2009

Accepted: November 10, 2009

Abstract

An electrochemical (EC) immunosensing assay for anti-*Clostridium tetani* antibody determination in serum has been developed. The antigen tetanus toxoid was immobilized on superparamagnetic nanobeads. The immunoreaction occurred in Eppendorf minitubes. The anti-*tetani* antibody was incubated in the presence of the toxoid functionalized nanobeads, then reacted with horseradish peroxidase-labeled anti-IgG. The resulting immunobeads were retained onto the carbon paste working electrode with a magnet. Hydroquinone served as redox label. The level of anti-*Clostridium tetani* antibody in guinea pig serum samples was determined by amperometry using a carbon based screen-printed electrode (cSPE) housed onto a magnetic support. The EC response was proportional to the logarithm of the antibody concentration comprised between 0.0046 IU/mL and 0.175 IU/mL with a limit of detection of 0.0046 IU/mL. In order to minimize the matrix effect, the standard addition method was applied. The assay was validated by comparing the EC immunosensing data with those obtained by applying the ELISA method described in the European Pharmacopoeia.

Keywords: Immunosensing, Tetani antibody, Screen printed electrode, Antibodies, Immunoassays

DOI: 10.1002/elan.200900396

1. Introduction

Tetanus is a fatal disease caused by the toxins of bacterium *Clostridium tetani* which are universally present in soil. The infection occurs when the bacteria penetrates in the skin by a wound. The neurotoxin is produced by the bacteria during its growth in dead tissues. The toxin affects neurons and causes spasms of voluntary muscles. The initial symptom is cramping and twitching of muscles around a wound. Portion of the body can become extremely rigid with abnormal posturing [1, 2]. Tetanus is particularly common and serious for newborn babies [3]. Neonatal tetanus is really frequent if the deliveries are at home without precaution of hygiene. In 2000, WHO estimates that neonatal tetanus killed about 200 000 babies. The tetanus toxin is an antigen that elicits specific antibodies called antitoxin. The antitoxin can react with the toxin and neutralize it. For being deleterious, the toxin must be distributed by the blood from the site of synthesis to the target cell. Hopefully, the antitoxin can neutralize it before it binds to target cell membranes, and therefore humoral antitoxic immunity is relatively effective. The best way to prevent tetanus is to immunize with tetanus toxoid. During childbirth, the newborn is protected by mother's antibodies if she has been vaccinated. The treatment of tetanus infection consists of using a serum with anti-tetanus immunoglobulin from human plasma by passive transfer of tetanus antibodies. In industrial countries,

the vaccination against tetanus is generalized [2] and is achieved by injection of a sterile suspension of alum-precipitated tetanus toxoid. However, a booster vaccine every ten years is essential to maintain an optimal immunization [2]. The rate of tetanus booster vaccination is low. Emergency services have as a practice to administer a booster vaccine to the victims. Allergic symptoms, however, e.g. Arthus hypersensitivity reaction due to preformed antibody complexes with deposited toxoid giving rise to an inflammatory response, can appear in the event of administration of the vaccine to a hyperimmunized subject [2, 4–6]. The literature also points out a more important risk to develop neurological reactions in the event of multiple injections of tetanus toxoid [2, 7]. Because of these risks, antitoxin levels should be known before determining the need for a subsequent booster [5]. Taking these data into account, it was found of interest to develop a quick hand held test to determine the patients' immunization state.

The level of antibody can be determined by means of a toxin-neutralizing assay in mice (TNA) or by an in vitro test such as an enzyme-linked immunoassay (ELISA) or a toxoid inhibition assay (ToBI) [8]. The amount of tetanus antitoxin necessary for a total immunity towards tetanus is, however, not known. There is no absolute protective level of antibody, a protection is assured when there is sufficient tetanus antitoxin compared to the quantity of toxin. The

WHO accepts only the TNA as reference method for the studies on protection against tetanus and recommends the titre of 0.01 IU/mL as protective minimum. A limit of 0.06 IU/mL was proposed when using an ELISA test to determine the antibody [9]. But these antibody levels, considered as protective, are based on animal studies and experimental data on humans are extremely limited. Some tetanus cases with an antibody level higher than 0.01 IU/mL of serum were reported in the literature [9–11]. The TNA measured the tetanus antitoxin level by demonstrating the toxin-neutralizing property of the serum on laboratory animals (generally mice). This test is expensive, time consuming and requires a large number of animals [8].

Immunoassays based on the specific antigen–antibody recognition are applied in many fields (clinical, food and environmental analysis...). The conventional immunoassay methods include radioimmunoassay, enzyme-linked immunoassay, surface plasmon resonance... These methods are successful, use no laboratory animals, but sophisticated instruments and long reaction times are generally necessary [12, 13]. Electrochemical (EC) immunosensors are integrated devices that combine the high sensitivity of an electrochemical transducer with the high selectivity of an immunochemical reaction [12].

Various types of EC immunosensings were described in the literature. Most often the assay consisted of the antigen determination with the antibody immobilized onto superparamagnetic beads or directly onto a screen printed electrode (SPE). The immunoreaction can take place in a tube filled with a suspension of magnetic beads, [13–16] in a microreactor [17, 18] or directly onto the electrode surface [19, 20]. The majority of the EC immunosensing systems described in the literature were dedicated to antigen determination [14–16, 21, 22] and only a few were devoted to antibody assay. Recently, an immunosensor for the determination of an autoantibody (antigliadin) was developed with the antigen immobilized onto the electrode surface [19]. An immunoreactor for the quantification of human IgG antibodies to *Helicobacter Pylori* was developed. H. Pylori antigen was immobilized onto a platinum SPE and the electrochemical detection took place in a flow injection system [20]. In the present work, the antigen (attenuated) was linked to magnetic beads which, after an indirect antibody capture assay, were spiked onto a magnetized electrode for the amperometric detection of the immunocomplex. The use of magnetic nanobeads in immunoassays is particularly interesting since it allows high reaction kinetics in a small volume with consequently a substantial shortening of the incubation time. The beads can be magnetically separated from the reaction medium in order to minimize the matrix effect in the detection step [12, 13]. The results showed that the quantification of the antibody level against the tetanus toxin in serum could be performed within 1.5 h at room temperature with a miniaturized EC device. The ELISA test, however, required an incubator at 37 °C and took 4.5 h for the assay [8]. The optimization of the immunoassay parameters was performed by using a ‘magnetized’ carbon paste electrode

(mCPE) and the assay of guinea pig serum sample was performed using a cSPE.

2. Experimental

2.1. Reagents and Materials

The tetanus toxoid (not adsorbed, 02/232) and tetanus antitoxin guinea pig serum (98/572) were obtained from National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, Hertfordshire, United Kingdom). *N*-hydroxysuccinimidobiotin, the peroxidase labeled goat antiguinea pig IgG (solution in 0.01 M phosphate buffered saline, pH 7.4, containing 1% bovine serum albumin and 0.01% thimerosal), sera from guinea pig, polysorbate 20 (tween 20), and hydroquinone were purchased from Sigma (Bornem, Belgium). Albumin from bovine serum (BSA) was from Fluka (Neu-Ulm, Germany). Nonfat dry milk was from Bio-rad Laboratories (Nazareth-Eke, Belgium). Hydrogen peroxide (30%), citric acid monohydrate, sodium carbonate anhydrous, sodium hydrogen carbonate, potassium chloride, di-sodium hydrogen phosphate dihydrate, potassium dihydrogen phosphate and sodium chloride were of analytical grade. Superparamagnetic beads (10 mg/mL) coated with streptavidin (diameter of 510 ± 20 nm, MasterBeads Streptavidin), were purchased from Ademtech (Pessac, France). The buffers and the solutions used were those described for the ELISA assay in the European Pharmacopoeia [8] unless otherwise specified:

- Carbonate buffer (pH 9.6) containing 0.035 M sodium hydrogen carbonate and 0.015 M anhydrous sodium carbonate for the tetanus toxoid biotinylation. Immobilization buffer for coating the beads as advised by the manufacturer (Ademtech) to allow an efficient coupling with the biotinylated target.
- Phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS) containing 8 g/L of sodium chloride, 0.2 g/L of potassium chloride, 8 mM di-sodium hydrogen phosphate dihydrate and 1.5 mM potassium dihydrogen phosphate for immunochemical reactions.
- PBS containing 0.5 g/L of polysorbate 20 as washing buffer.
- A 0.05 M citric acid solution adjusted to pH 5.5 with a solution of sodium hydroxide for the electrochemical measurements.

2.2. Instrumentation

The magnetic device used to trap the superparamagnetic beads was purchased from Ademtech (Pessac, France). The stirring was realized with a vortex shaker Ika genius 3 (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany). The dialysis was realized with Spectra/Pro, Float-A-Lyser MWCO 25000 (Spectrumlabs, Breda, The Netherlands). The electrochemical measurements were performed using a LC Epsilon computer-controlled potentiostat with Epsilon EC soft-

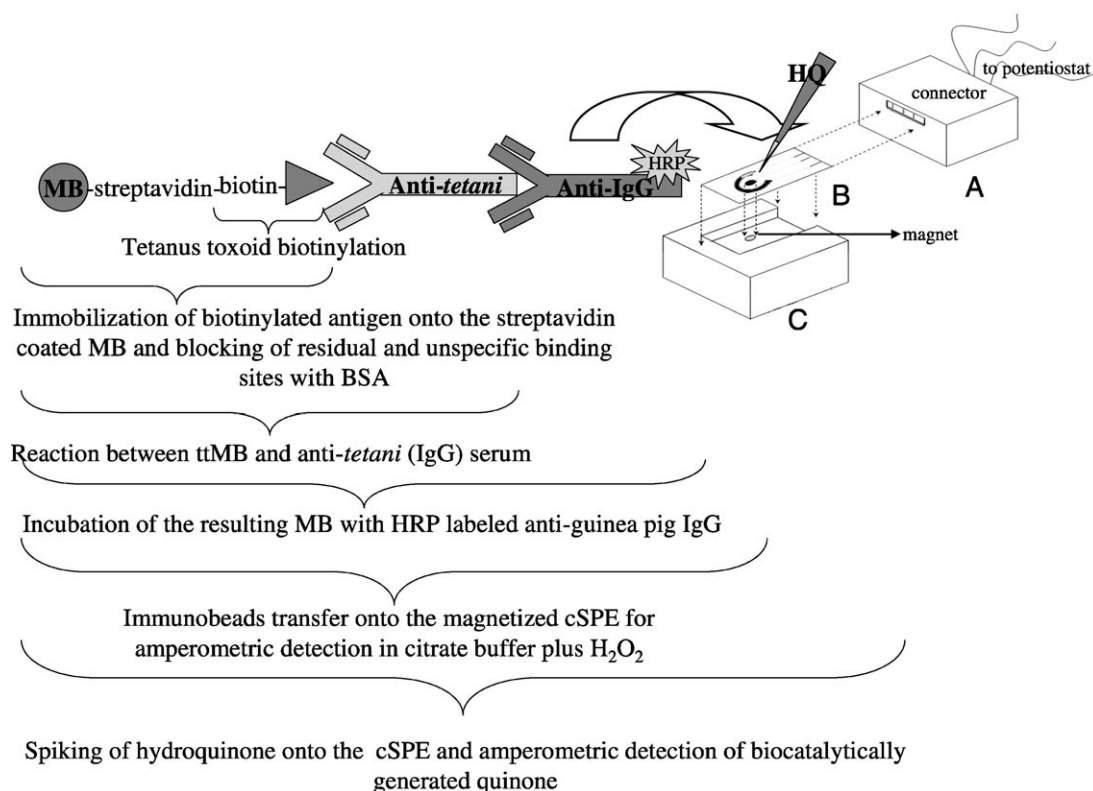


Fig. 1. Schematic illustration of the EC-immunosensing procedure and cartoon of the EC detection module: SPE connector (A), cSPE (B) home made block with magnet (C).

ware, a BASi C3 cell stand electrochemical cell with a stirring magnet for mixers ($10 \times 2 \times 3$ mm), a Ag/AgCl 3 M NaCl reference electrode, a platinum auxiliary electrode BASi (Kenilworth, United Kingdom). The carbon paste working electrode (CPE) was made up of a plastic cylinder crossed by a copper wire to ensure conductivity; a Neody (Nd-Fe-B) permanent magnet (i.d. 4 mm \times 3 mm) purchased from As One, Ltd (Osaka, Japan) was inserted into the base of the cylinder, leaving a depression at the surface of approximately 2 mm to accommodate the carbon paste. The latter was from Metrohm (Herisau, Switzerland). The carbon screen printed electrodes (cSPE) and the adapted connector (Fig. 1 part A) were purchased from DropSens (Oviedo, Spain). The cSPE had the following dimensions: 3.4 \times 1.0 \times 0.05 cm (length \times width \times height). Working (4 mm diameter) and counter electrodes were made of carbon, whereas reference electrode and electric contacts were made of silver (Fig. 1 part B). A support was fabricated to house the electrode strip. It consisted of a Plexiglas block with a cavity having exactly the dimensions of the cSPE strip. A strong magnet (Neody 4 mm diameter) was placed in the support just below the working electrode (Fig. 1 part C).

2.3. Biotinylation of Tetanus Toxoid

Each ampoule of tetanus toxoid contained 900 Limit flocculation units (Lf) of tetanus toxoid (1 mg corresponds

approximately to 70 Lf) and 50 mg of glycine (the average dry weight of the ampoule content was determined as $0.0631 \text{ g} \pm 0.4\%$). First, 10 mg of the content of the vial (i.e. approx. 2 mg of toxoid) was solubilized in 1 mL of carbonate buffer and dialyzed against carbonate buffer (pH 9.6) to eliminate the glycine. The tetanus toxoid is a polypeptide of 150 kDa [23] allowing the linking of biotin groups thanks to the free amine groups of the polypeptide. The process consisted of mixing 10 mg of *N*-hydroxysuccinimidobiotin, dissolved in 400 μ L of DMSO, with 2 mL dialyzed tetanus toxoid solution. After 2 h incubation at room temperature and gentle stirring, the solution was dialyzed against PBS pH 7.4.

2.4. Tetanus Toxoid Immobilization on the MB (ttMB)

The superparamagnetic beads coated with streptavidin (MB) allowed the strong binding of the biotinylated toxoid. The washing procedure suggested by the manufacturer was applied as follows: (1) the MB were resuspended by pipetting and vortexing avoiding foaming, (2) the volume to be used was pipetted into the desired test tube, (3) the tube was placed close to the magnet (Ademtech) for 1 min to trap the MB, (4) the supernatant was carefully pipetted off from the beads, (5) the test tube was removed from the magnet and the beads were gently resuspended in 10 mL of the immobilization buffer. A volume of biotinylated toxoid

(2 mg/2 mL) was mixed with an equal volume of the beads suspension, and incubated at room temperature for 30 min under gentle rotation in the Eppendorf tube. The latter was placed close to a magnet for 1–2 min and the supernatant carefully pipetted off, leaving the beads undisturbed.

2.5. Blocking Procedure

The tetanus toxoid coated MB (ttMB) were resuspended in a BSA solution in PBS (3% m/v) and incubated for 1 h. The test tube was placed on the magnetic device and the supernatant was pipetted off carefully, leaving beads undisturbed. The latter were washed 3 times with PBS and resuspended in the original sample volume with PBS.

2.6. Immunoassay Parameters Optimization

All the reactions were performed in a 2 mL Eppendorf test tube. A procedure similar to a sandwich type enzyme-linked immunoassay was adopted for the determination of the tetanus antitoxin i.e. the antibody anti-*tetani* was taken in sandwich between the immobilized antigen and a second antibody. The latter was an antibody against IgG and labeled with HRP [24]. A volume of 10 μL of ttMB was mixed with 100 μL of tetanus antitoxin guinea pig serum diluted in PBS. After 15 min incubation at room temperature the beads were separated from the supernatant with the magnetic device and resuspended in 100 μL of peroxidase labeled anti-guinea pig IgG diluted to 1/100. After a 45 min incubation time for the immunosandwich formation on the beads to occur, the latter were magnetically separated and the supernatant was eliminated. The beads were washed twice with 0.5 mL of washing buffer. The test tube was placed on the magnetic device, the supernatant removed and the beads remained in the test tube. The immunobeads were resuspended in 10 μL citrate buffer or 80 μL of citrate buffer plus 2 mM H_2O_2 at pH 5.5 for EC detection at the mCPE and at the cSPE, respectively. Immunobeads for the blank assay were obtained by performing the immunoreactions but without the presence of the antibody anti-*tetani*.

2.7. Electrochemical Measurement

Two working electrodes were studied: the mCPE for optimization of the immunoreaction parameters and a cSPE was subsequently used for the guinea pig serum sample assays. A volume of 5 μL of immunobeads suspension was spiked onto the top of the mCPE. Amperometric measurements were performed at a constant applied potential (–250 mV) with the mCPE dipped in 5 mL of citrate buffer in the presence of 2 mM H_2O_2 . Once stabilization of the baseline was achieved (i.e. a few seconds) hydroquinone was spiked into the solution to a final concentration of 2 mM. Amperometric experiments with

the cSPE were performed by housing the electrode strip in a holder containing a strong magnet precisely located under the working electrode (Fig. 1). A volume of 40 μL of the immunobeads suspension was spiked onto the screen-printed strip (the amount of immunobeads contained in these 40 μL was equivalent to the beads amount contained in the 5 μL deposited onto the mCPE working electrode). Then, 10 μL of HQ was spiked into the 40 μL drop to a final concentration of 2 mM and the cathodic current was recorded at –280 mV. A schematic drawing and a summary of the different immunoreactions and EC detection are provided in Figure 1. Unless otherwise stated, one cSPE served for all the experiments performed the same day.

2.8. Cyclic Voltammetry at the Immunobeads Immobilized cSPE

The experiments were realized at the cSPE with trapped immunobeads. The latter were prepared by performing the immunoassay on diluted reference serum containing the anti-*tetani* antibody (a: 0.350 IU/mL, b: 0.175 IU/mL, c: blank). The immunoassay was realized as described above. Blank assays were performed under the same experimental conditions but without the presence of the tetanus antitoxin serum. The immunobeads were resuspended in 80 μL of citrate buffer and subsequently a volume of 40 μL was spiked onto the cSPE surface. The scanning sequence was in the oxidative mode from 0 mV to 800 mV and back to 0 mV, and in the reductive mode from 88 mV to –350 mV and back to 88 mV with a scan rate of 10 mV/s.

2.9. Serum Sample Assays

Serum samples from immunized guinea pigs were diluted 400 times with PBS before being analyzed following the immunoassay procedure described above and amperometric detection at the cSPE. Calibration curves were realized with diluted reference serum containing the anti-*tetani* antibody. Blank assays were performed under the same experiment conditions but without tetanus antitoxin serum. The method of standard addition consisted in analyzing the serum sample (100 μL) and 3 serum samples (100 μL each) spiked with 10, 20 and 30 μL of a standard solution. The latter consisted of the reference serum diluted with PBS to an antibody concentration of 0.35 IU/mL. Each serum sample assay was repeated 3 times.

3. Results and Discussion

3.1. Tetanus Toxoid Immobilization

The tetanus toxoid (150 Lf), biotinylated and dialyzed, was immobilized onto the MB (100 μL). To check for the immobilization efficiency, the absorbance at 280 nm of the tetanus toxoid solution was performed before and after

reaction. An absorbance decrease of 20% was noted suggesting that the antigen was effectively linked to the beads.

3.2. Electrochemical Detection at the mCPE

Cyclic voltammetry (CV) experiments have permitted to point out that a potential of -250 mV was suitable for the amperometric detection of the generated quinone (Q) by the HRP/H₂O₂ system in the presence of HQ in citrate buffer with a maximum sensitivity at pH 5.5 (data not shown). CV of HQ at the mCPE covered with HRP immobilized immunobeads permitted also to point out that the signal increased as a function of the amount of immunobeads. The response decreased, however, for a too high quantity of beads. No response was observed for a deposit of 15 μ L (i.e. 150 μ g of original beads) and above. This was likely due to a diffusion limitation of both HQ and Q towards the electrode surface due to the barrier formed by the immunobeads layer a phenomenon already pointed out in the literature [25]. A spiking of 5 μ L of immunobeads was a good compromise and was selected in further experiments. A stable base line was achieved in amperometry within a few seconds and the HQ signal was stable for periods as long as 30 min.

3.3. Comparison Between Different Blocking Phases and Washing Steps

In order to minimize nonspecific adsorption, parameters such as blocking phase and washing steps were evaluated. A blocking phase with BSA 3% (m/v) and another one with nonfat dry milk 2.5% (m/v) were compared. For each procedure, 3 assays were realized with 0.02 IU/mL tetanus antitoxin serum and 3 assays without tetanus antitoxin serum (blank). For the washing procedure, after the anti-IgG enzyme conjugate incubation step, the MB were resuspended twice in 0.5 mL of washing buffer. Results demonstrated the absolute need to apply a blocking phase and a washing step to minimize nonspecific adsorption of peroxidase conjugate anti-guinea pig IgG. The blocking with milk gave the smallest blank signal, but the response with antibodies was the smallest too (Fig. 2). The procedure with albumin blocking followed by a washing step gave the highest current variation between tetanus antitoxin serum (0.02 IU/mL) and the corresponding blank. Therefore, this procedure was adopted to maximize the sensitivity of the test.

3.4. Incubation Time

The incubation time between the tetanus antitoxin serum and the ttMB was varied between 5 and 60 min (Fig. 3A). The magnitude of the signal resulted from the extent of interaction between tetanus antitoxin and the toxoid

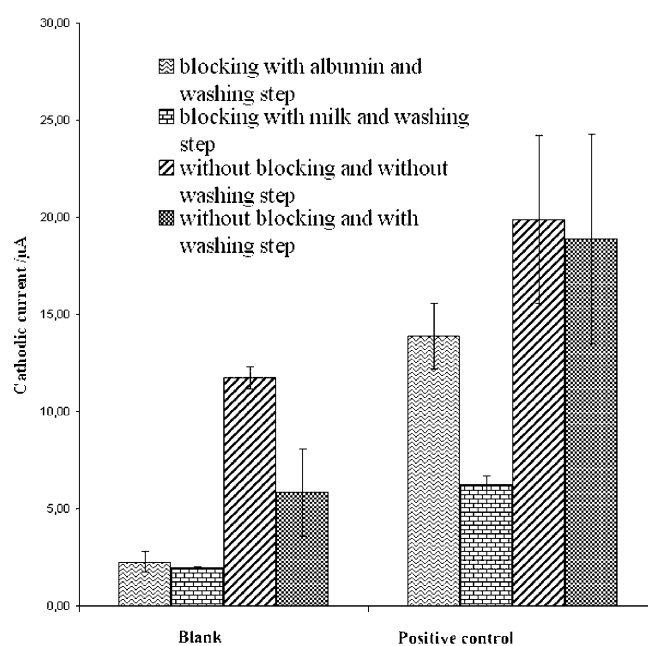


Fig. 2. Amperometric response at the mCPE. Comparison between different blocking agents. ttMB (10 μ L), tetanus antitoxin 0.02 IU/mL, incubation volume 100 μ L, peroxidase labeled anti-guinea pig IgG antibody 1/100, incubation volume 100 μ L. The first incubation time was 30 min and the second incubation time 45 min. Blank assays performed under the same experimental conditions but without tetanus antitoxin serum. $E_{app} = -250$ mV, HQ 2 mM, H₂O₂ = 2 mM. Error bars are standard deviations ($N = 3$).

immobilized on the beads, it increased during the first ten minutes and then it stabilized. An incubation time of 15 min was found to be a good compromise for a high signal with respect to the analysis time period. The incubation time of the peroxidase labeled anti-IgG was varied between 5 and 60 min (Fig. 3B). An incubation time of 45 min was selected.

3.5. Screen-printed Electrode (cSPE)

The cSPE was subsequently used as sensing probe as it is better suited for decentralized assays: it allowed assays on few microliters of sample with good repeatability between different electrodes (RSD below 4%, $n = 5$). CV of HQ was realized in 50 μ L droplets onto the cSPE in the presence of the immunobeads prepared at various concentrations of antibody. The analyzed solution contained hydroquinone (2 mM) and hydrogen peroxide (2 mM), in citric acid buffer at pH 5.5. The immunobeads were renewed between each voltammogram by gentle rinsing the cSPE with water. By scanning the potential between 0 and 800 mV, the oxidation of hydroquinone was observed with a peak potential at 200 mV (Fig. 4A). A signal decrease was observed in the presence of the immunobeads having been used for the assays with the anti-*tetani* antibody at 0.350 IU/mL and 0.175 IU/mL (Fig. 4A curves a and b) compared to those having been used for the blank assay, i.e. beads without anti-

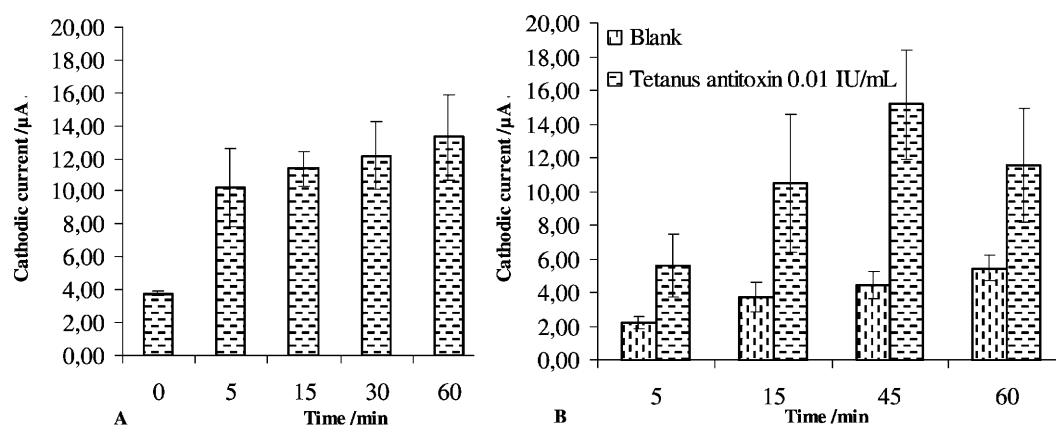


Fig. 3. Influence of incubation time on the EC response. $E_{\text{app}} = -250$ mV, HQ 2 mM, $\text{H}_2\text{O}_2 = 2$ mM, tetanus antitoxin 0.01 IU/mL, incubation volume 100 μL , peroxidase conjugate anti-guinea pig IgG 1/100, incubation volume 100 μL . (A) Comparison between different tetanus antitoxin incubation times. ttMB (10 μL); the first incubation time was varied and the second incubation time was 45 min. (B) Comparison between different labeled antibody incubation times. ttMB (5 μL); the first incubation time was 15 min and the second incubation time was varied. Error bars are standard deviations ($N=3$).

tetani antibody (Fig. 4A curve c). A decrease of the oxidation current of 54% and 24% was observed, respectively. This trend confirmed the presence of the HRP enzyme onto the beads leading to a substantial decrease of HQ concentration in the droplet due to enzymatic consumption. CV was also realized in the reductive mode by starting from 88 mV to -350 and back to 88 mV (Fig. 4B). The reduction current increased with the amount of immobilized HRP (Fig. 4B curves c to a) and was proportional to the amount of anti-*tetani* antibody trapped onto the bead. It should be noted, however, that a small reduction current was obtained with the blank beads due to some non-specific adsorption of HRP labeled antibody onto the beads (Fig. 4B curve c). By poisoning the cSPE at -0.280 mV, the amperometric response increased proportionally to the anti-*tetani* antibody concentration in serum.

Calibration curves were realized with the cSPE by applying the following analysis sequence: 10 μL ttMB blocking by BSA (1 h), incubation (15 min) with tetanus antitoxin serum, incubation (45 min) with HRP labeled anti-guinea pig IgG (1/100), EC reading ($E_{\text{app}} = -280$ mV, HQ 2 mM, H_2O_2 2 mM). Each incubation was performed in a 100 μL sample volume and the HRP labeled anti-IgG incubation was followed by a washing procedure. The signal was directly proportional to the logarithm of the antibody concentration between 0.0046 IU/mL and 0.175 IU/mL with a limit of detection (LOD) of 0.0046 IU/mL and a limit of quantification (LOQ) of 0.0057 IU/mL. These values were well under the protective human antibody limit of 0.06 IU/mL established by an ELISA test [9]. At higher concentrations, a saturation of the antibody link sites was inferred. At lower concentration, the signal of the blank limited the

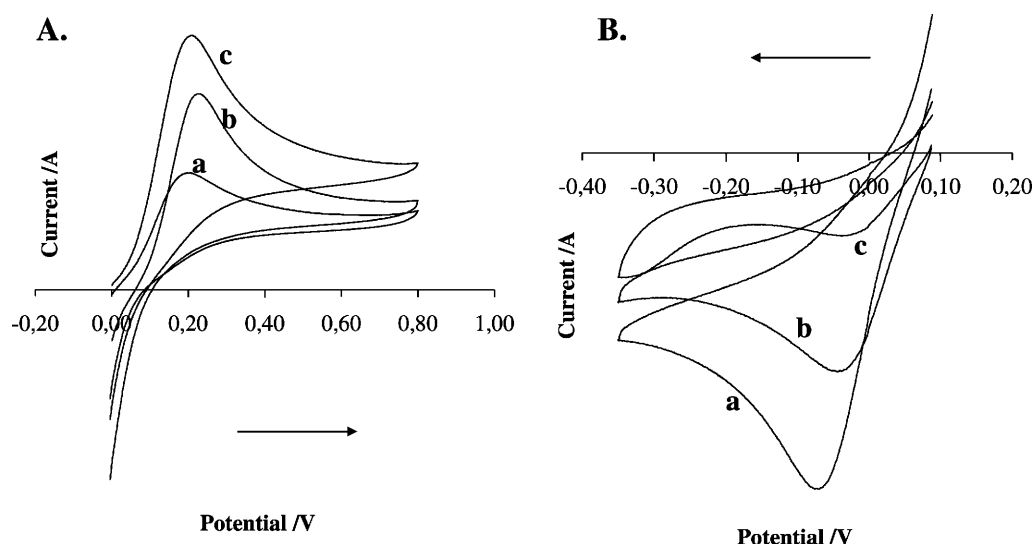


Fig. 4. Cyclic voltammetry at the cSPE in citrate buffer with immobilized immunobeads prepared in diluted reference serum containing anti-*tetani* antibodies (a: 0.350 IU/mL, b: 0.175 IU/mL, c: blank), HQ 2 mM, H_2O_2 2 mM, scan rate 10 mV/s. A) scanning from 0 to 800 mV reverse from 800 to 0 mV. B) scanning from 88 to -350 mV reverse from -350 to 88 mV. Other conditions as in Sec. 2.

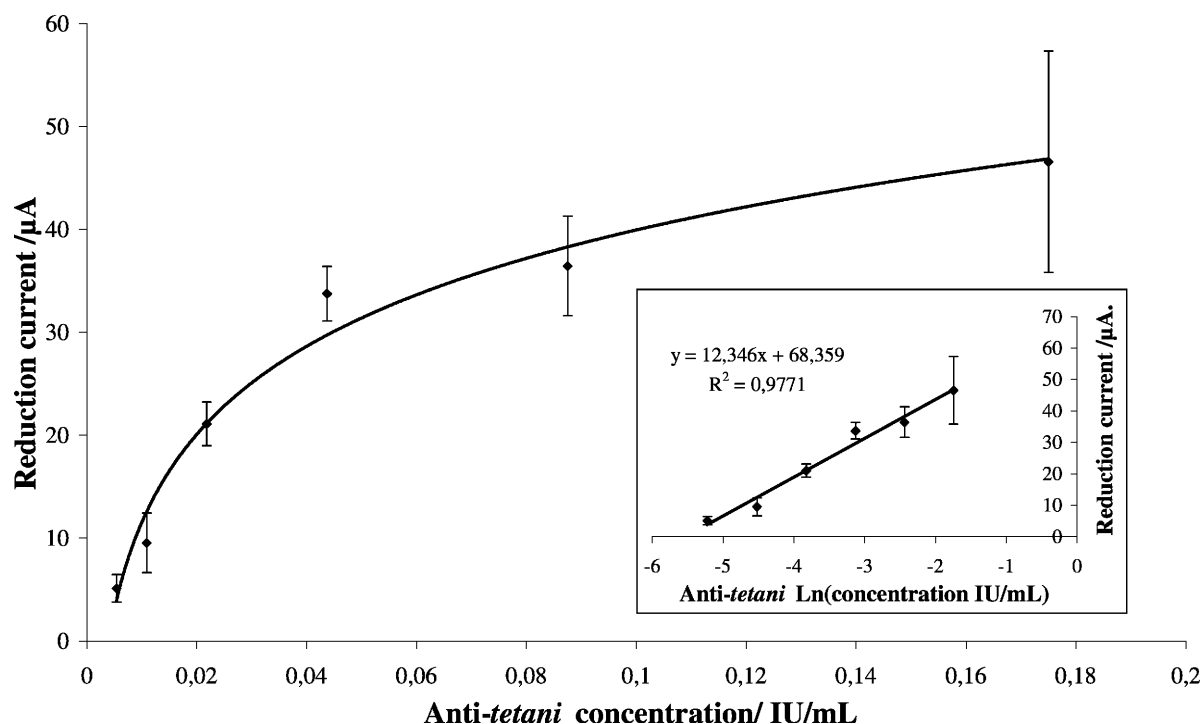


Fig. 5. Calibration curve realized with diluted reference serum containing anti-*tetani* antibodies. cSPE, $E_{app} = -280$ mV vs. silver pseudoreference, HQ 2 mM, H_2O_2 mM. Error bars are standard deviations ($N = 4$).

sensitivity. The LOD and the LOQ were calculated from the signal given by the blank. The latter was the signal obtained without tetanus antibodies. The means and the standard deviation were calculated from 4 assays. The equations applied to determine the LOD and the LOQ were the following:

$$LOD = m_{bl} + 3 SD_{bl}$$

$$LOQ = m_{bl} + 10 SD_{bl}$$

With m_{bl} : mean of 4 blank assays and SD_{bl} : standard deviation of 4 blank assays.

The detection step, repeated three times using the same cSPE and with the immunobeads coming from the same immunoassay gave a RSD value lower than 3%. It was found necessary to realize a new calibration curve every day. An example of calibration curve is shown in Figure 5. The standard deviations (SD) on the high values were more important than those on the low values but the RSD was in the same order of magnitude for each concentration.

3.6. Application to Serum Samples

The effect of the matrix was studied by comparing the signal obtained in a PBS and in a serum sample, from non immunized guinea pig, both spiked with the reference antibody (to a final concentration of 0.35 IU/mL). The signal was more than 3 times lower for the assay with the serum sample comparing to the PBS solution. Actually the signal was not higher than the signal obtained with the blank. Yet, by diluting the serum 400 times with PBS the same signal as with the PBS solution was obtained. In subsequent experiments, the serum samples were diluted 400 times in order to minimize the inhibition effect of the matrix and to have an antibody concentration comprised in the studied linearity domain.

Samples of guinea pig serum immunized against tetanus were analyzed. The guinea pigs had received a tetanus toxoid by intramuscular injection and their serum was taken one month after the administration. The antibody concentration was determined both by the ELISA method of the European Pharmacopoeia and by the amperometric immu-

Table 1. Antibody assay in guinea pig serum samples: comparison between ELISA and amperometric immunosensing results.

	ELISA (IU/mL)	Amperometric immunosensing (AI) (IU/mL)			
		Assay 1	Assay 2	Assay 3	Mean
S1	5.3 ± 0.3	14.13	15.69	19.60	16 ± 3
S2	6.6 ± 0.3	8.60	9.88	11.24	10 ± 1
S3	13.7 ± 0.7	13.49	9.87	9.04	11 ± 2
S4	6.0 ± 9.3	13.68	12.18	–	13

nosensing at the cSPE. The standard addition method was preferred instead of referring to a preestablished calibration curve. This allowed to decrease the analysis time and it reduced matrix effect errors. As reported in Table 1, for 4 serum samples analyzed, results are the same order of magnitude but it appears that the repeatability of the amperometric immunoassay was less good than that of the ELISA. This was not attributed to the EC step but might be attributed to the toxoid biotinylation step. The latter likely affected the antigen structure in a random manner and this might be the origin of the relatively large immunoassay variability.

4. Conclusions

The present work aimed at pointing out the possible use of antigen immobilized magnetic beads for the amperometric quantification of the antibody level against tetanus toxoid in serum. The assay was less time consuming than the European Pharmacopoeia ELISA method and can readily be implemented using a portable electrochemical set up. This original approach can be extended to on site applications dealing with the screening of antibody level in complex samples.

5. References

- [1] J. W. Peterson, in *Medical Microbiology*, 3rd ed. (Ed: S. Baron MD) Churchill Livingstone, London **1991**, ch. 7.
- [2] A. Million, *Prim. Care Update Ob/Gyns*. **1997**, 4, 75.
- [3] World Health Organization. <http://www.who.int> accessed July **2007**.
- [4] M. A. Facktor, R. A. Bernstein, P. Fireman, *J. Allergy Clin. Immunol.* **1973**, 52, 1.
- [5] E. H. Moylett, I. C. Hanson, *J. Allergy Clin. Immunol.* **2004**, 114, 1010.
- [6] C. Ponvert, P. Scheinmann, *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.* **2004**, 44, 461.
- [7] L. Reinstein, J. M. Pargament, J. S. Goodman, *Arch. Phys. Med. Rehab.* **1982**, 63, 332.
- [8] S. Gross, P. Volkers, M. Eckert-Ziem, S. Kuschel, G. Schäffner, *Pharmeuropa Bio.* **2006**, 1, 1.
- [9] A. M. Galazka, *Immunological Basis for Immunization Module 3: Tetanus*, WHO/EPI/GEN/93.4, Genève **1993**.
- [10] E. L. Passen, B. R. Andersen, *J. Am. Med.* **1988**, 255, 1171.
- [11] J. Bourleaud, M. Huet, *Méd. Mal. Infect.* **1985**, 15, 7.
- [12] Y.-M. Zhou, S.-Q. Hu, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, *Biosens. Bioelectron.* **2003**, 18, 473.
- [13] E. Zacco, M. I. Pividori, S. Alegret, R. Galve, M.-P. Marco, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 1780.
- [14] S. Centi, S. Laschi, M. Franek, M. Mascini, *Anal. Chim. Acta* **2005**, 538, 205.
- [15] G. Volpe, N. H. Ammid, D. Moscone, L. Occhigrossi, G. Palleschi, *Anal. Lett.* **2006**, 39, 1599.
- [16] P. Sarkar, D. Ghosh, D. Bhattacharyay, S. J. Setford, A. P. F. Turner, *Electroanalysis* **2008**, 20, 1414.
- [17] A. Bange, H. B. Halsall, W. R. Heineman, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, 20, 2488.
- [18] R. Zhang, K. Hirakawa, D. Seto, N. Soh, K. Nakano, T. Masadome, K. Nagata, K. Sakamoto, T. Imato, *Talanta* **2005**, 68, 231.
- [19] T. Balkenhohl, F. Lisdat, *Analyst* **2007**, 132, 314.
- [20] G. A. Messina, I. E. De Vito, J. Raba, *Sens. Actuators B.* **2007**, 128, 23.
- [21] N. Soh, H. Nishiyama, Y. Asano, T. Imato, T. Masadome, Y. Kurokawa, *Talanta* **2004**, 64, 1160.
- [22] H. Kuramitz, M. Dziewatkoski, B. Barnett, H. B. Halsall, W. R. Heineman, *Anal. Chim. Acta* **2006**, 561, 69.
- [23] T. B. Helting, O. J. Zwisler, *Biol. Chem.* **1977**, 252, 187.
- [24] M. Wilson, P. Nakane, in *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*, Elsevier Biomed Press, Amsterdam **1978**, p. 215
- [25] D. Yu, B. Blankert, E. Bodoki, S. Bollo, J.-C. Viré, R. Sandulescu, A. Nomura, J.-M. Kauffmann, *Sens. Actuators B.* **2006**, 113, 749.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Nanoimmunoassay onto a screen printed electrode for HER2 breast cancer biomarker determination



Stéphanie Patris^a, Pieter De Pauw^{b,e}, Marie Vandeput^a, Joëlle Huet^c, Pierre Van Antwerpen^d, Serge Muyldermans^{b,e}, Jean-Michel Kauffmann^{a,*}

^a Laboratory of Instrumental Analysis and Bioelectrochemistry, Faculty of Pharmacy, Université Libre de Bruxelles, Boulevard du Triomphe, Campus Plaine, CP 205/06, 1050 Brussels, Belgium

^b Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Vrije Universiteit Brussel, Pleinlaan 2, 1050 Brussels, Belgium

^c Laboratory of Biopolymers and Supramolecular Nanomaterials, Faculty of Pharmacy, Université Libre de Bruxelles, Boulevard du Triomphe, Campus Plaine, CP 206/04, 1050 Brussels, Belgium

^d Analytical Platform, Faculty of Pharmacy, Université Libre de Bruxelles, Boulevard du Triomphe, Campus Plaine, CP 205/05, 1050 Brussels, Belgium

^e Structural Biology Research Center, VIB, Vrije Universiteit Brussel, 1050 Brussels, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2014

Received in revised form

27 June 2014

Accepted 28 June 2014

Available online 7 July 2014

Keywords:

Screen printed electrode

Nanobody

HER2

Immunoassay

Amperometric immunosensor

ABSTRACT

A chip format sandwich-type immunoassay based on Nanobodies[®] (Nbs) with the Human Epidermal Growth Factor Receptor (HER2) extracellular domain as antigen model has been developed. The HER2 is considered as an important biomarker because its overexpression causes an aggressive type of breast cancer. Nbs are single domain antigen-binding fragments derived from camelid heavy-chain antibodies. The strategy of the presently developed sandwich immunoassay takes advantage of the small size of Nbs for the detection of the electroactive redox tracer onto the screen printed electrode (SPE). A capture anti HER2 Nb was covalently immobilized onto the SPE, and the detection Nb, raised against another epitope of HER2, was labeled with horseradish peroxidase (HRP). The biosensor signal corresponded to the electroreduction of para-quinone generated at the SPE by the HRP in the presence of hydroquinone and hydrogen peroxide. The best performing and optimized immunoassay conditions consisted of 2 and 20 min for the first and the second incubation times, respectively. The amperometric signal obtained was proportional to the logarithm of HER2 concentration between 1 and 200 µg/mL and the modified SPE storage stability lasted for at least three weeks. Determination of HER2 in human cells has been realized.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide. The disease can be subdivided in four main classes, i.e. (i) hormone (estrogen or progesterone) receptor positive, (ii) HER2 positive, (iii) hormone receptor and HER2 positive and (iv) hormone receptor and HER2 negative breast cancers. The hormone receptor positive cancer responds to endocrine therapy and the prognosis is generally better than the other type of breast cancers [1]. Human epidermal growth factor receptors (HER/erbB) are involved in the normal growth and differentiation of cells. HER2 is the only receptor of this family which has no known ligand. The association of a specific ligand to HER1, HER3 or HER4 provokes a receptor dimerization, preferentially with HER2 as partner and induces cell signaling. A malignant growth occurs when HER2 is overexpressed giving rise to

multiple HER2 heterodimers and to a stronger cell signaling, resulting in enhanced responsiveness to growth factors [2]. The HER2 overexpression is present in some cases of breast, ovarian, gastric, prostate and other cancers [3]. HER2 is a trans-membrane glycoprotein of 185 kDa with tyrosine kinase activity, encoded by a gene located on the long arm of chromosome 17 [4]. The amplification of this chromosome region leads to over-expression of the HER2 [5]. The HER2 is over-expressed in around 20–25% of invasive breast cancers and is associated with poor-prognosis as well as reduced survival [4]. The HER2 status of a breast cancer should be evaluated because therapeutic compounds that specifically target HER2 are available [5]. Trastuzumab (Herceptin[®], Roche), a humanized monoclonal antibody against HER2 extracellular domain, is currently used but a significant proportion of patients with HER2 positive breast cancer display either primary or secondary resistance [6]. Trastuzumab combined with paclitaxel after a treatment with doxorubicin and cyclophosphamide reduce the rate of recurrence by half among women with operable HER2 positive breast cancer and the mortality was reduced by one third. The therapeutic results were similar for women with hormone-receptor-negative

* Corresponding author.

E-mail addresses: spatris@ulb.ac.be (S. Patris), jmkauf@ulb.ac.be (J.-M. Kauffmann).

tumors and women with hormone-receptor-positive tumors [7]. Only patients with HER2 overexpression receive the anti-HER2 treatment because of the therapeutic cost and the side-effects. It is important to avoid false negatives so that only HER2 positive patients receive a treatment [8]. Immunohistochemistry is the primary technique applied to determine the HER2-status. The extracellular domain of HER2 (110 kDa) is released into the systemic circulation after HER2 cleavage by matrix metalloproteinase. Subsequently it can be determined in serum of patients. An enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) has been commercialized by Siemens, which has been approved by the FDA in 2000 [8]. The serum extracellular HER2 normal level limit is 15 ng/mL and it is a good indicator of the antitumor treatment efficiency. The extracellular domain level of HER2, however, is not always in correlation with the tumor response [9]. A high serum level of extracellular domain of HER2 could indicate resistance against trastuzumab [10].

Another HER2 immunoassay has been developed using two monoclonal antibodies directed against independent but adjacent target epitopes on the HER2 receptor [11]. One antibody is labeled with a fluorescent VeraTag™ and the other with a photosensitive molecule that releases free oxygen radicals upon photoactivation. The free oxygen radicals cleave the nearby VeraTag™ reporter which is subsequently collected and quantified using capillary electrophoresis [11]. Techniques such as real time PCR and microarray based sensors have been described to quantify the RNA level coding for HER2. Two techniques to measure DNA are approved by the FDA: a fluorescence in situ hybridization test and a chromogenic hybridization test [12].

An electrochemical immunosensor has been developed by immobilizing trastuzumab on gold nanodisk electrodes. The interaction between HER2 and antibody is detected by suitable secondary antibodies labeled with HRP and methylene blue as the redox mediator. This immunosensor is used to determine HER2 in cell lysates and tumor lysates [13]. Another electrochemical immunoassay for HER2 detection is based on a sandwich format in which a primary monoclonal anti-HER2 antibody is coupled to protein A modified magnetic beads and the secondary antibody is labeled with biotin. After the two immunoreactions, alkaline phosphatase conjugated with streptavidin and 1-naphtyl-phosphate are used for the differential pulse voltammetry detection at screen printed electrodes [14]. An opto-fluidic ring resonator biosensor has also been developed to determine the HER2 extracellular domain in spiked serum [15]. A label free electrochemical immunosensor for HER2 based on antiHER2-iron oxide nanoparticle bioconjugates has recently been published. After the immunoreaction the nanoparticles are laid over the gold electrode surface for differential pulse voltammetry detection [16].

With respect to the development of a rapid immunoassay for HER 2 determination, it was of interest to exploit the advantages provided by Nanobodies® (Nbs). Also referred to as “VHH” because they consist of the variable part of heavy chain-only antibodies, they are the smallest known single entity with full antigen binding properties that are derived from functional antibodies [17]. Heavy chain-only antibodies were first discovered in serum of camel, but all species of the *Camelidae* contain these unique IgGs' in their serum [18]. Nbs have similar antigen binding properties compared to whole antibodies, but they offer multiple advantages over other antibody fragments e.g. they are readily produced by *E. coli* and are resistant to heat and reducing agents and are highly water soluble [17]. Their stability, size (ca 15 kDa) and antigen affinity and specificity make them highly attractive for developing novel analytical tools. In the biosensor field, the first reported application is a Nb-based chip for prostate-specific antigen immunoassay using a commercially available surface plasmon resonance (SPR) device [19]. An electrochemiluminescent immunosensor with Nbs immobilized onto a glassy carbon electrode was described for the

highly sensitive assay of human procalcitonin in serum samples [20]. Subsequently we reported an amperometric immunoassay with nanobodies immobilized onto SPE for HER2 detection [21]. Two amperometric magnetoimmunosensors using nanobodies for fibrinogen detection in plasma [22] have also been described. The small size of the Nbs was instrumental for easy access to their target and for signal detection in close proximity of the transducer.

Here, we report for the first time the development of a sandwich type immunoassay (nanoimmunoassay) using Nbs linked to a carbon based screen printed electrode (SPE) for the HER2 extracellular domain determination. HER2 antigen was selected as a biomarker target model because of its availability together with a series of non-competitive anti HER2 Nbs [23]. The HER2 level was determined in human cells spiked with HER2 to mimic a cancerous lysate.

2. Material and methods

2.1. Reagents

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), N-Hydroxysuccinimide (NHS), polysorbate 20 (tween 20), hydroquinone, Tris-Cl (Trizma® base) and Tergitol-type nonyl phenoxy polyethoxy ethanol 40 (Nonidet P-40, NP40) were purchased from Sigma (Bornem, Belgium). EZ-link Plus Activated Peroxidase kit and BCA protein assay kit were from Pierce Biotechnology /Thermo scientific (Rockford, USA). Albumin from bovine serum (fraction V) (BSA) was from Fluka (Neu-Ulm, Germany). Recombinant Human ErbB2/Fc Chimera (HER2) was obtained from ImmunoSource (Schilde, Belgium). Hydrogen peroxide (30%) was from VWR International Inc (Leuven, Belgium). Citric acid monohydrate and sodium carbonate anhydrous were from Janssen Chimica (Beerse, Belgium). Sodium hydrogen carbonate was from Fisher Chemicals (Loughborough, United Kingdom). Potassium chloride and di-sodium hydrogen phosphate dihydrate were from Merck (Darmstadt, Germany). Potassium dihydrogen phosphate dihydrate was from Vel (Leuven, Belgium). Sodium chloride was from Carlo Erba (Rodano, Italy). The protease inhibitor cocktail tablets were from Roche (Mannheim).

Following buffers and solutions were prepared:

- Phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS) containing 8 g/L of sodium chloride, 0.2 g/L of potassium chloride, 8 mM di-sodium hydrogen phosphate and 1.5 mM potassium dihydrogen phosphate for immunochemical reactions.
- MES buffer containing 10.6 g/L 2-(4-morpholino) ethanesulphonic acid adjusted to pH 5.5 for the formation of the peptide bond with EDC and NHS.
- PBS containing 0.5 g/L of polysorbate 20 as washing buffer.
- A 0.05 M citric acid solution was adjusted to pH 5.5 with a solution of sodium hydroxide for the electrochemical measurements.
- Lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.4 M sodium chloride, 1% (v/v) NP40 and protease inhibitor cocktail (1 tablet for 10 mL) was used to lyse sample cells [13].

2.2. Instrumentation

The electrochemical measurements were performed using an LC Epsilon computer-controlled potentiostat with Epsilon EC software. The screen printed electrodes (SPE) and the adapted connector were purchased from DropSens (Oviedo, Spain). SPE had the following dimensions: $3.4 \times 1.0 \times 0.05 \text{ cm}^3$ (length \times width \times height). Working (4 mm diameter) and counter electrodes were made of carbon, pseudoreference electrode and electric contacts were made of silver.

The LC-QTOF analyzes were performed with a QTOF 6520 (Agilent technologies, Palo Alto, CA, USA).

2.3. Anti-HER2 Nb production

The anti-HER2 Nbs 2Rs15d, 1R143c and 1R59b were produced and purified as described previously [23]. In short, their DNA fragments were re-cloned in vector pHEN6 and expressed in *E. coli* WK6 after isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) induction to obtain His₆-tagged Nbs in the periplasm. The Nbs were extracted from the periplasm by osmotic shock and purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) on Ni-NTA resin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), eluting with 0.5 M imidazole in PBS pH 7.5 and containing 80 g/L NaCl, and further purified by molecular sieving on Superdex 75 h 16/60 (Pharmacia, Gaithersburg, USA) in PBS. Molecular weights, the number of lysines and the extinction coefficients at 280 nm were calculated from their amino acid sequence analysis, and binding properties were determined by SPR (Table 1).

2.4. Surface plasmon resonance (SPR)

To confirm the mutual non-competitiveness of the utilized anti-HER2 Nbs, single solutions and paired mixtures were subjected to SPR performed on a Biacore T100 instrument (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), with the recombinant human ErbB2/Fc fusion protein immobilized on a CM-5 gold layer chip. In practice, the first 600 s binding phase occurred with a single Nb, and was followed by a second 600 s binding phase with a mixture of the Nb and one other HER2 Nb. Control curves were measured with the single Nb in both phases and analyzed using Biacore's evaluation software (not shown).

2.5. Peroxidase labeled anti-HER2 Nbs

The procedure recommended by the kit supplier was followed except that glycine was used instead of ethanolamine (see reason below) to neutralize the excess of EZ-Link™ Plus activated peroxidase, and was optimized in terms of pH and incubation time. The sugars of native HRP were oxidized by periodate to generate aldehyde groups, and the oxidized HRP was then crosslinked to the anti-HER2 Nbs by forming Schiff-bases between the aldehydes on HRP and the primary amines present on the Nb. Sodium cyanoborohydride was added to reduce the link and form a stable HRP-Nb conjugate. (i) A volume of 100 μ l of oxidized HRP (1 mg/100 μ l) and 10 μ l of sodium cyanoborohydride (5.0 M) were added to 500 μ l PBS containing 0.3 mg of Nb; (ii) this solution was incubated overnight under stirring at room temperature; (iii) a 20 μ l volume of glycine 3 M was added and reacted during 15 min at room temperature. At the end, the HRP labeled Nb (Nb-HRP) was purified as described above for free Nbs by IMAC (to remove free HRP) and size exclusion chromatography (to remove free Nb). The efficiency of the labeling was tested by SDS-PAGE. The SDS-PAGE experiments were carried out on precast gels (NuPAGE Novex 4–12% Bis–tris with MES SDS running buffer) using the X-cell SureLock Mini-cell from Invitrogen. The running conditions

were 200 V, 50 mA at constant temperature 25 °C during 45 min. The Novex Sharp Protein standard from Invitrogen consisted of a mixture of 12 pre-stained standards (3.5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 110, 160, 260 kDa) for protein molecular weight comparison. Protein detection was performed using Coomassie Blue staining (ethanol 40% (v/v), acetic acid 10% (v/v) and Coomassie Brilliant R250 0.2% (w/v)).

2.6. Immobilizing capture anti-HER2 on the SPE (Fig. 1.1)

The SPE surface was modified according to the following procedure: (i) the SPE was activated in the presence of 50 μ l of 2 M H₂SO₄ dropped onto the SPE and by applying a voltage of +1.60 V for 150 s, then the SPE was washed with distilled water, (ii) 10 μ l of 40 mM EDC and 40 mM NHS solution in MES buffer was spiked onto the pretreated SPE surface during 1 h, (iii) the SPE was again thoroughly washed with distilled water and dried to remove excess reagent and 10 μ l of 10 μ g/mL (6.6×10^{-7} M) anti-HER2 Nb were spiked onto the electrode surface, (iv) after 1 h the non-linked Nbs were eliminated by gently washing the SPE with distilled water. Any remaining surface free sites were blocked by 10 μ l of BSA solution in PBS (1% m/v) for 30 min. Finally the SPE was washed with water. All the incubations and reactions occurred at room temperature and in a humid atmosphere.

2.7. Nanoimmunoassay (Fig. 1.2 and 1.3)

The SPE surface modified with anti-HER2 Nb was spiked with 10 μ l of HER2 solution in PBS for 2 min at room temperature (Fig. 1.2a). After this incubation period, the SPE was rinsed with water and 10 μ l Nb-HRP solution was added and left reacting for 20 min (Fig. 1.2b). The SPE was washed twice with 1 mL of washing buffer then, 40 μ l of citrate buffer containing 2.5 mM H₂O₂ was added onto the SPE for the amperometric detection. A potential of –280 mV was applied and 10 μ l HQ (0.1 M) was spiked onto the electrode and the reduction current was monitored (Fig. 1.3). All the electrochemical parameters were optimized in a previous study [24].

2.8. Sample assays

HER2 negative (MCF7) cells were cultured in a T80 flask in 15 mL of the following medium: RPMi, 10% FBS heat inactivated, 2% Pen-strep (10,000 U/ml), 2% L-glutamine (200 mM) and 0.2% Gentamicine (50 mg/mL). The cells were collected when the confluence reached 85–90%. The cell lysates were prepared using 500 μ l of lysis buffer. After an incubation time of 30 min at 4 °C, the lysates were collected, sonicated, and centrifuged. A volume of 70 μ l of lysate was spiked with 30 μ l HER2 and 10 μ l of this sample served for the HER2 nanoimmunoassay ($n=3$). The total protein concentration was estimated by a Bradford assay before adding HER2. The HER2 concentration in the samples was determined by referring to a calibration curve realized daily in PBS.

3. Results and discussion

3.1. Anti-HER2 Nb selection

Three different Her2-specific Nbs were selected based on their known binding rate constants and mutual non-competitiveness (Table 1). For stability reasons, the Nb 2Rs15d having the lowest k_d , would be the first choice as capture Nb (immobilized onto the SPE), to be combined with Nb 1R59b having the second best k_d and K_D as detecting Nb (HRP conjugated) in a HER2 nanoimmunoassay. The 1R59b Nb however contains only three lysines

Table 1
Properties of selected Nbs.

Nanobody	SPR			MW	Lys #	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)
	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)			
2Rs15d ^a	2.14×10^5	5.71×10^{-4}	2.70	13453	6	25690
1R59b ^a	5.01×10^5	2.43×10^{-3}	4.90	13361	3	11710
1R143c ^a	6.27×10^5	4.23×10^{-3}	6.80	14540	6	20650

^a Non-competitiveness between these Nbs was demonstrated with SPR.

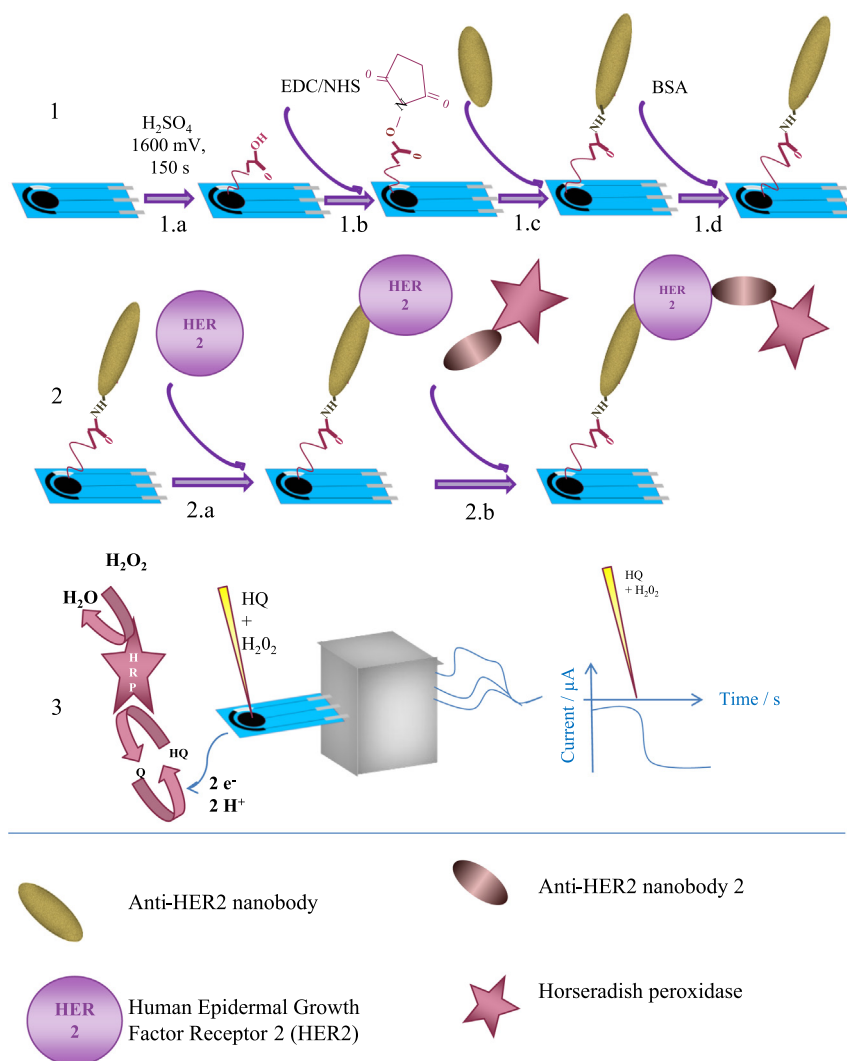


Fig. 1. Schematic drawing of SPE modification (1) and nanoimmunoassay (2 and 3). 1. SPE oxidation to generate carboxylic groups (1a), activation of the carboxylic groups with EDC and NHS (1b), immobilization of the anti-HER2 Nb (1c), blocking of the free sites by BSA (1d); 2. Sandwich nanoimmunoassay: HER2 sample incubation (2a), Nb-HRP incubation (2b); 3. Amperometric detection of p-quinone (Q) generated by HRP in the presence of HQ and H_2O_2 .

compared to 6 for the other two Nbs, and thus has less free amine groups available for conjugation with HRP.

Nbs 2Rs15d and 1R59b were tested as capturing Nb (immobilized onto the SPE) and Nb 2Rs15d and Nb143c were labeled with HRP. The pair 1R59b as capturing Nb and 2Rs15d-HRP gave the highest amperometric signal during the nanoimmunoassay, and was selected for further application of nanoimmunoassay. The SPR results (Table 1) suggest that 2Rs15d is the best capturing Nb because of its low dissociation rate, but the HRP labeling of 1R59b, containing only three lysines, was unsuccessful. Nb143c-HRP as detecting Nb probably suffered from its less favorable binding properties.

3.2. Peroxidase labeled anti-HER2 Nb

Anti-HER2 Nb 2Rs15d and Nb 1R143c were crosslinked with activated HRP. The reaction products were followed by SDS-PAGE. Fig. 2 shows the results for Nb 2Rs15d. The 40 kDa band of HRP was observed as well as two additional bands (Fig. 2: Nb-HRP 5 and 6). These two bands corresponded to the mass of HRP plus one (Fig. 2: Nb-HRP 5) or two (Fig. 2: Nb-HRP 6) times the mass of Nb 2Rs15d. The bands were identified by LC-QTOF [25] by excising gel pieces subsequently submitted to in gel trypsin digestion [26]. The LC-QTOF results confirmed the presence of HRP and 2Rs15d in

the two additional bands. The reaction product was further purified in two steps to isolate the HRP-2Rs15d conjugates by IMAC and size exclusion chromatography, where both HRP-Nb (considered as major component) and HRP-Nb₂ eluted in the same peak. This mixture was further used for nanoimmunoassay.

3.3. Anti-HER2 Nb immobilization

The optimal oxidation conditions for surface activation were evaluated by voltammetry. A progressive increase in the pseudocapacitive current (i.e. higher amount of charged functionalities) occurred till 150 s and then stabilized (figure not shown), and the SPE surface was therefore oxidized at 1.6 V during 150 s in 2 M H_2SO_4 . The classical immobilization procedure with EDC and NHS was used to link, via a peptide bond, the carboxyl groups generated at the SPE surface with an amine function of the nanobody. The activated groups, however, were not blocked by ethanolamine since some remaining ethanolamine was found to react with the HRP generated quinone in the amperometric assay. During the detection step, hydroquinone was oxidized to p-quinone by HRP and the p-quinone was electrochemically reduced. Ethanolamine interfered in this process due to its reaction with p-quinone. The reaction of a quinone with amines was described in the literature [27]. This interaction was verified by cyclic voltammetry (CV) of HQ and of

HQ in the presence of ethanolamine; it involves the formation of a compound which cannot be reduced at the electrode. The CV of HQ showed a quasi-reversible behavior (Fig. 3 curve A). The addition of ethanolamine regenerated a HQ form giving rise to a catalytic signal with peak increase and shift in potential (Fig. 3 curve B) while the Q reduction peak had disappeared. Because of its interference, the use of ethanolamine was avoided in the immunosensor preparation. No such interference was observed with BSA or glycine. The quenching solution containing ethanolamine provided with EZ-link Plus Activated Peroxidase kit was replaced by a solution of glycine or BSA.

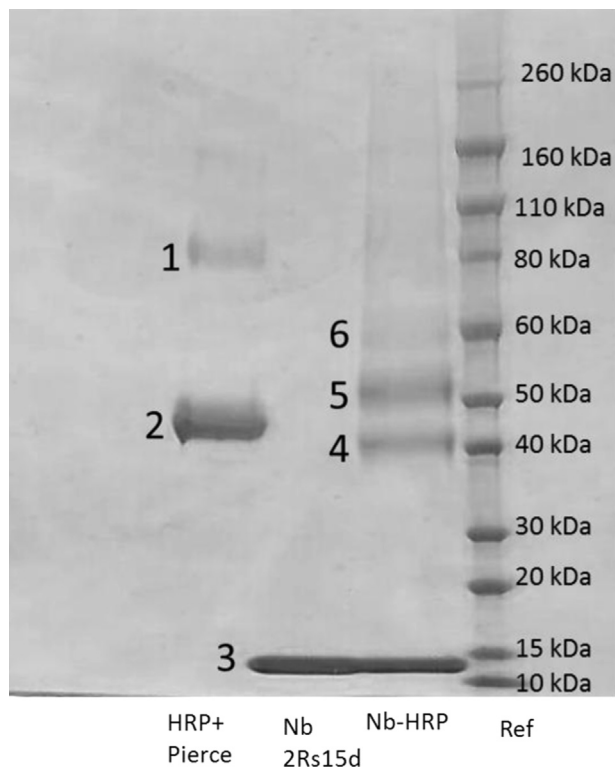


Fig. 2. SDS-page electrophoresis of oxidized HRP, Nb and the mix of oxidized HRP and Nb. Peptide sequences of peroxidase C1A were identified in bands 1, 2 and 4. Band 2 and 4 corresponded to HRP and band 1 corresponded to HRP-dimer. Peptide sequences of Nb 2Rs15d were identified in band 3 and peptide sequences of peroxidase C1A and Nb 2Rs15d were identified in bands 5 (HRP-Nb) and minor band 6 (HRP-Nb₂).

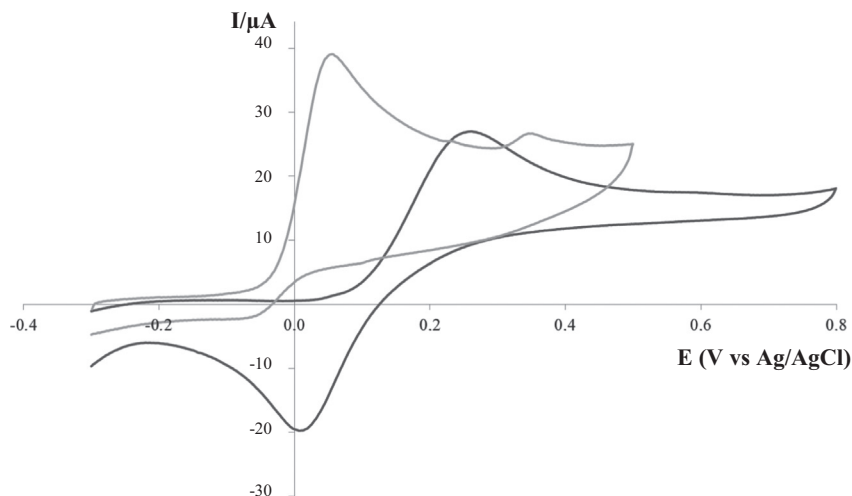


Fig. 3. Cyclic voltammetry of hydroquinone (2 mM) (dark gray, curve A) and hydroquinone (2 mM) with ethanolamine (200 mM) (light gray, curve B) carbon SPE, scan rate: 10 mV/s, citrate buffer pH 5.5 (−300 mV → +500 mV → −300 mV).

To control the efficiency of Nb immobilization onto the SPE, the response of the modified electrode was compared to the response obtained with a SPE modified only with BSA. The signal obtained in presence of capturing Nb was 4 times higher than in its absence.

To follow the SPE surface modifications and to evaluate any diffusional restriction, cyclic voltammetric experiments of HQ (0.1 mM) were realized after each modification step. As shown in Fig. 4, after the surface of the electrode has been oxidized, the pseudocapacitive current increased substantially and the voltamperogram became quasi-reversible but the anodic peak current and the cathodic peak current decreased (Fig. 4B) ($\Delta E_p = 300$ mV became $\Delta E_p = 100$ mV). After each modification step a slight signal decrease was observed, while the addition of Nb-HRP caused a potential shift and an increase of the capacity current.

The same experiment was carried out with trastuzumab, a “classical” antibody against HER2, as capturing element. The electrode was modified with the same amount of antibody as for the nanobody in terms of recognition element i.e. two recognition sites by antibody and one by nanobody. After the immobilization of trastuzumab onto the SPE, a 27% decrease of the anodic peak was observed while it was only 15% in the case of the modification by the nanobodies. This permitted to infer a less important surface access restriction of the HQ mediator when using Nbs comparing to the “classical” antibody.

3.4. Blocking step

To minimize unspecific interaction (interaction of Nb-HRP without HER2 link) i.e. different blocking agents were considered such as BSA and no-fat milk. BSA with an incubation time of 30 min was selected and two concentrations (1 and 3% m/v) were tested. BSA 1% (m/v) gave lowest unspecific and highest specific responses and was therefore employed in further experiments.

3.5. Nanoimmunoassay incubation time

The incubation time between the antigen and the modified SPE was varied between 0 and 60 min (Fig. 5A). The magnitude of the signal resulted from the extent of interaction between HER2 and anti-HER2 Nb immobilized on the SPE. The response was very quickly at its maximum. An incubation time of 2 min was selected. The incubation time of the Nb-HRP was varied between 10 and 40 min (Fig. 5B). The non-specific interaction between the HRP conjugate and the SPE increased with time (blank) while the

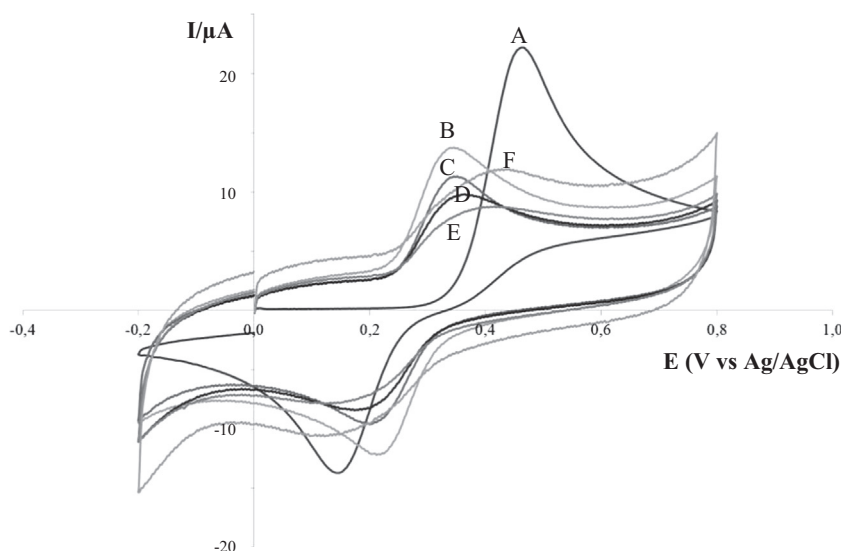


Fig. 4. Evaluation of SPE surface diffusional restriction. Cyclic voltammetry of HQ (0.1 mM) in citrate buffer (0.00 to 0.80, 0.80 to -0.20 and -0.20 to 0.00 V, scan rate: 100 mV/s). Unmodified SPE (A), oxidized SPE (B), after EDC-NHS step (C), after capturing Nb (10 $\mu\text{g/mL}$) immobilization (D), after blocking step (BSA 1%, 30 min) (E) and after HER2 and Nb-HRP incubation (F).

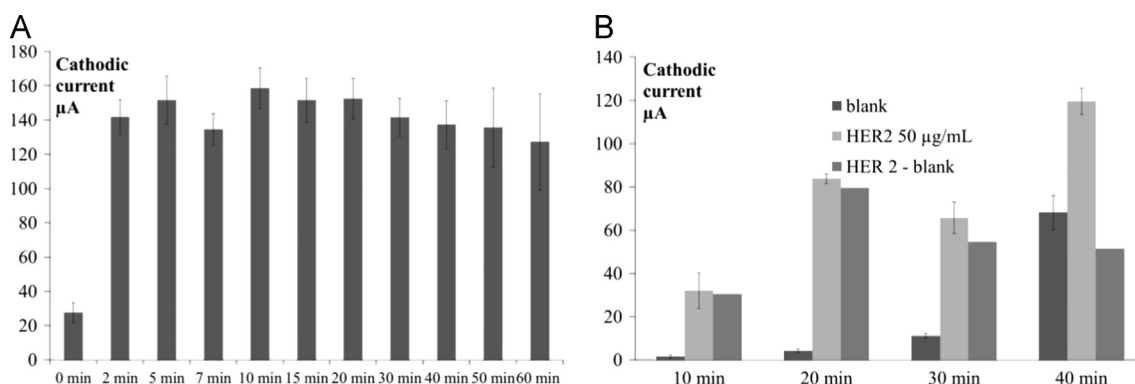


Fig. 5. Influence of incubation time (in PBS) on the EC response. $E_{\text{app}} = -280$ mV, HQ 20 mM, H2O2 25 mM. (A) Comparison between different HER2 incubation times. HER2 50 $\mu\text{g/mL}$, incubation volume 10 μL , HRP labeled anti-HER2 Nb incubation volume 10 μL ; the first incubation time was varied between 0 and 60 min and the second incubation time was 20 min. (B) Comparison between different HRP labeled Nb incubation times. HER2 50 $\mu\text{g/mL}$, incubation volume 10 μL , HRP labeled anti HER2 Nb incubation volume 10 μL ; the first incubation time was 20 min and the second incubation time was varied. The assay blank was realized in the absence of HER2 ($n=3$).

HER2–anti HER2 interaction tended to decrease (HER2-blank). An incubation time of 20 min was selected. This time was a good compromise for a high signal related with the antigen-Nb interaction and a small blank signal.

3.6. Nanoimmunoassay performances

Calibration curves were realized with the modified SPE, the first incubation time being 2 min and the second 20 min. The Nb-HRP was used at 30 $\mu\text{g/mL}$. The signal was proportional to the logarithm of HER2 concentration between 1 and 200 $\mu\text{g/mL}$ with a limit of detection (LOD) of 1 $\mu\text{g/mL}$ and a limit of quantification (LOQ) of 4.4 $\mu\text{g/mL}$. The LOD and the LOQ were calculated from the signal given by the blank. The latter was the signal obtained without HER2. The means and the standard deviation were calculated from 3 assays. The equations applied to determine the LOD and the LOQ were the following:

$$\text{LOD} = m_{\text{bl}} + 3\text{SD}_{\text{bl}}$$

$$\text{LOQ} = m_{\text{bl}} + 10\text{SD}_{\text{bl}}$$

with m_{bl} : mean of 3 blank assays and SD_{bl} : standard deviation of

3 blank assays. The LOD value was adapted to the studied calibration curve.

At higher concentrations, a saturation of the antibody link sites was inferred since the signal no longer increased. At lower concentration, no signal was measured (Fig. 6).

3.7. Stability

The storage stability of the modified SPE under dry conditions at 4 $^{\circ}\text{C}$ was evaluated for a period of 3 weeks. Various SPEs were prepared on the same day as reported in the experimental section, stored and used in different days. The nanoimmunoassay response remained within the limits (set at 3 times the standard deviation of the measurements ($n=3$) realized the first day) during 3 weeks and more. The non-specific response of the Nb-HRP, evaluated by the blank, also remained constant during this period.

3.8. Application to HER2 spiked cells

The total protein concentration in the studied samples was measured by Bradford technique at 3 mg/mL. Three cell samples spiked with increasing amounts of HER2 were analyzed with the nanoimmunoassay ($n=3$ for each sample). A blank sample

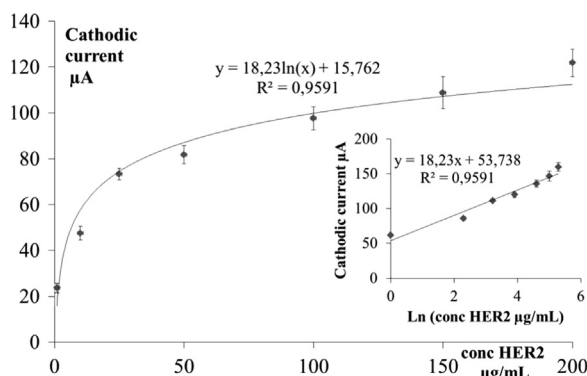


Fig. 6. Calibration curve. Representative results obtained with SPE modified by EDC/NHS, anti-HER2 (1R59b) Nb and BSA 1%, incubation HER2 2 min; Nb-HRP (2R515d) incubation 20 min. Blank signal was subtracted.

Table 2

Recoveries, biases, RSDs for HER2 determination in cell lysates using the developed HER2 nanoimmunosensor.

HER2 spiked ($\mu\text{g/mL}$)	HER2 found ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)	Bias (%)	RSD (%)
25	22	88	−12	8
50	41	82	−18	6
75	66	88	−12	14

containing no HER2 was also tested. The signal obtained with this sample was similar to the signal obtained with the PBS buffer. This indicated an absence of interference in our nanoimmunoassay and reflects the specificity of the test. The results obtained with the spiked samples are shown in Table 2. An acceptable negative bias was found for all samples, possibly due to the high protein concentration in tested cell lysates.

4. Conclusion

This work reported the successful SPE modification by Nb. It permitted a new type of immunoassay called nanoimmunoassay onto the SPE. A high stability of Nb was inferred since the storage stability of the SPE was higher than 3 weeks. Very short incubation times were sufficient to obtain a satisfactory response. The nanoimmunoassay allowed determining HER2 spiked in cell lysates. Future work, however, is needed in order to increase the sensitivity of the nanoimmunoassay for serum sample applications at physiological relevant values and for cell lysates assays after eventual dilution.

Acknowledgments

Thanks are expressed to Institut Jules Bordet, Université Libre de Bruxelles (ULB) and especially to Ms. Zéna Wimana for trastuzumab supply, Ms. Aude Ingels from the Cancerology and Experimental Toxicology Laboratory, Faculty of Pharmacy of ULB for cell samples handling and Mr. Damien Dufour from Analytical Platform, Faculty of Pharmacy of ULB for the LC-QTOF analysis.

References

- [1] M.-J. Kim, J.Y. Ro, S.-H. Ahn, H.H. Kim, S.-B. Kim, G. Gong, *Hum. Pathol.* 37 (2006) 1217–1226.
- [2] R.A. George, J. Heringa, *Protein Eng. Des. Sel.* 15 (2002) 871–879.
- [3] W. Tai, R. Mahato, K. Cheng, *J. Control. Release* 146 (2010) 264–275.
- [4] F. Révillion, J. Bonnetterre, J. Peyrat, *Eur. J. Cancer* 34 (1998) 791–808.
- [5] N. Pathmanathan, P.J. Provan, H. Mahajan, G. Hall, K. Byth, A.M. Bilous, et al., *Breast* 21 (2012) 724–729.
- [6] K.S. Saini, H.A. Azim, O. Metzger-Filho, S. Loi, C. Sotiriou, E. de Azambuja, *Breast* 20 (3) (2011) S20–S27.
- [7] E.H. Romond, E.A. Perez, J. Bryant, V.J. Suman, C.E. Geyer, N.E. Davidson, et al., *N. Engl. J. Med.* 353 (2005) 1673–1684.
- [8] C.B. Moelans, R.A. de Weger, E. Van der Wall, P.J. van Diest, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 80 (2011) 380–392.
- [9] S. Lennon, C. Barton, L. Banken, L. Gianni, M. Marty, J. Baselga, et al., *J. Clin. Oncol.* 27 (2009) 1685–1693.
- [10] M. Scaltriti, F. Rojo, A. Ocaña, J. Anido, M. Guzman, J. Cortes, et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 99 (2007) 628–638.
- [11] Y. Shi, W. Huang, Y. Tan, X. Jin, R. Dua, E. Penuel, et al., *Diagn. Mol. Pathol.* 18 (2009) 11–21.
- [12] S. Di Palma, N. Collins, C. Faulkes, B. Ping, G. Ferns, B. Haagsma, et al., *J. Clin. Pathol.* 60 (2007) 1067–1068.
- [13] S.P. Mucelli, M. Zamuner, M. Tormen, G. Stanta, P. Ugo, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 1900–1903.
- [14] Q.A.M. Al-Khafaji, M. Harris, S. Tombelli, S. Laschi, A.P.F. Turner, M. Mascini, et al., *Electroanalysis* 24 (2012) 735–742.
- [15] J.T. Gohring, P.S. Dale, X. Fan, *Sens. Actuators B Chem.* 146 (2010) 226–230.
- [16] M. Emami, M. Shamsipur, R. Saber, R. Irajirad, *Analyst* 139 (2014) 2858–2866.
- [17] S. Muyldermans, *Annu. Rev. Biochem.* 82 (2013) 775–797.
- [18] C. Hamers-Casterman, T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E.B. Songa, et al., *Nature* 363 (1993) 446–448.
- [19] L. Huang, G. Reekmans, D. Saerens, J.-M. Friedt, F. Frederix, L. Francis, et al., *Biosens. Bioelectron.* 21 (2005) 483–490.
- [20] H. Li, Y. Sun, J. Elseviers, S. Muyldermans, S. Liu, Y. Wan, *Analyst* (2014).
- [21] S. Patris, P. De Pauw, S. Muyldermans, J.-M. Kauffmann, Nano-immunoassays for the determination of HER2, a breast cancer marker, using a screen printed electrode. 2012. Abstracts book (<https://www.ulb.ac.be/facs/pharma/docs/abstract.pdf>).
- [22] S. Campuzano, V. Salema, M. Moreno-Guzmán, M. Gamella, P. Yáñez-Sedeño, L.A. Fernández, et al., *Biosens. Bioelectron.* 52 (2014) 255–260.
- [23] I. Vaneycken, N. Devoogdt, N. Van Gassen, C. Vincke, C. Xavier, U. Wernery, et al., *Fad. Am. Soc. Exp. Biol. J.* 25 (2011) 2433–2446.
- [24] S. Patris, C. De Vriese, F. Prohoroff, E.B. Calvo, J.A. Martínez, J.-M. Kauffmann, *Electroanalysis* 22 (2010) 41–48.
- [25] C. Delporte, P. Van Antwerpen, K. Zouaoui Boudjeltia, C. Noyon, F. Abts, F. Métral, et al., *Anal. Biochem.* 411 (2011) 129–138.
- [26] M.-C. Slomianny, A. Dupont, F. Bouanou, O. Beseme, A.-L. Guihot, P. Amouyel, et al., *Proteomics* 6 (2006) 2365–2375.
- [27] M. Morrison, W. Steele, D.J. Danner, *Arch. Biochem. Biophys.* 134 (1969) 515–523.